

ETUDE SUR LA FERMENTATION DIASTASIQUE DES PRODUITS VEGETAUX⁽¹⁾

PREMIERE PARTIE

LE DECLENCHEMENT PROVOQUE DES PHENOMENES ENZYMATIQUES ET L'ACCELERATION ARTIFICIELLE DES PROCESSUS DE LA VIE RESIDUELLE

Leur importance dans les industries agricoles

par M. A. BOBIER, Pharmacien Colonel, Chimiste-Conseil

PREAMBULE

Il a été souvent observé que beaucoup de produits chimiques ont sur les végétaux une action, jusqu'ici mal connue, dont les effets sont quelquefois fâcheux, en particulier lors de la fumigation des végétaux vivants ou parties de ces végétaux à l'état de vie ralentie, ces actions ayant une répercussion sur la conservation, la maturation, la germination, ainsi que sur les qualités organoleptiques.

Ces observations, principalement celles que l'on peut faire au laboratoire lorsque l'on utilise cette même action pour des recherches toxicologiques, nous incitaient depuis longtemps à croire que, bien que constatés dans des domaines fort différents en apparence, ces effets relèvent uniquement des actions enzymatiques.

Encouragé par des essais sporadiques dont les premiers datent de nos études à la Faculté, nous avons entrepris il y a cinq ans des recherches plus suivies ayant pour but d'élucider les phénomènes observés. Au cours de ces travaux, nous avons pu préciser le rôle des produits chimiques en cause, expliquer les réactions observées et leurs processus, les reproduire à notre gré, démontrer que les processus sont bien strictement d'ordre enzymatique, et finalement tirer de nos cou-

(1) Manuscrit remis le 1^{er} mars 1952.

clusions les principes permettant d'appliquer le déclenchement provoqué à tous les processus enzymatiques rencontrés, utilisés ou non en technologie.

Ces applications se sont montrées fructueuses et il en est résulté un *PROCEDE GENERAL DE DECLENCHEMENT ARTIFICIEL ET ACCELERE DES REACTIONS DIASTASIQUES DANS LES PRODUITS VEGETAUX* (1).

Ce procédé a été mis au point avec l'aide scientifique et pratique de l'un des maîtres du vide industriel et des fumigants, dont les nombreux et savants travaux et les ingénieuses réalisations font autorité, notre éminent ami A. L. LEPIGRE, qui ne nous avait d'ailleurs ménagé ni ses affectueux encouragements, ni ses judicieux conseils au cours de nos essais. Il se devait, par un juste retour des choses, de transformer les effets parfois fâcheux de la fumigation en intervention bien-faisante.

EXPOSE

La plupart des observations recueillies sur le sujet, en particulier celles relatives aux accidents consécutifs aux fumigations, de même que celles relevées au cours de nos expériences initiales, nous avaient frappé par une sorte d'incohérence, du moins à première vue, dans le mode, le sens et l'ordre de grandeur des actions observées. Incohérence que les différences dans la qualité ou la quantité des agents employés ne suffisaient pas à expliquer avec assez de netteté à notre gré.

Nous constatons seulement que les produits chimiques en cause sont tous plus ou moins des toxiques généraux, des anesthésiques ou des caustiques.

Nous avons donc tout d'abord cherché à mettre de l'ordre dans ce dont nous pouvions avoir eu connaissance, et nous croyons devoir, pour recréer l'ambiance, en donner un bref exposé.

Les phénomènes décrits relèvent tous de l'action des enzymes ; celle-ci est une réaction biochimique type, à vitesse variable, normalement assez faible ; elle a pour limite un état d'équilibre. La possibilité de la réversibilité de ces réactions a été démontrée.

Les données classiques sur l'évolution biochimique des végétaux peuvent être résumées brièvement en disant que les réactions biochimiques se manifestent par l'altération plus ou moins rapide des cellules végétales : mort au stade maturation de celles appartenant aux

(1) Ce procédé a fait l'objet d'un brevet déposé le 12 février 1951.

organes de soutien et de croissance ; mort au stade germination de celles dont le contenu assure la renaissance de l'espèce ; seul, le germe franchit ces stades sans périr.

Ainsi, dans tous les cas, hormis l'armature cellulosique plus lente à disparaître, les végétaux subissent une série de transformations dans les conditions indiquées ci-après, dont le terme est inéluctablement la destruction des cellules.

Lorsque la fonction chlorophyllienne cesse, la respiration, bien que réduite, continue à dégager de la chaleur ; il y a fixation d'oxygène et dégagement d'anhydride carbonique, même lorsque les organes végétatifs sont détachés de la plante ; on dit que les tissus continuent à vivre aux dépens des substances en réserve qui sont transformées et détruites, du moins en partie, et ceci même en l'absence d'oxygène ambiant, grâce à l'oxygène intracellulaire.

De toute façon, le dégagement d'anhydride carbonique, d'abord relativement plus important que la respiration antérieure, se ralentit et s'accompagne de celui d'éthylène, d'aldéhydes, d'esters ; le dégagement de ces produits devient prépondérant, puis subsiste seul. Enfin, la mort des cellules se manifeste le plus souvent par leur coloration en brun. Il est à noter que certains tissus végétaux prennent, bien avant cette phase terminale de la mort, une coloration à peu près identique par l'oxydation de leurs tannoïdes.

En effet, parallèlement aux dégagements gazeux, on observe des échanges biochimiques qui ne se font pas dans les végétaux vivants et dont ces dégagements sont le résultat et le témoignage ; les fermentations (1) sont quelquefois simultanées ou presque simultanées, celle qui précède libérant la substance sur laquelle agit au fur et à mesure la suivante (hydrolyse des gluco-tanins, oxydation de ces tanins), et ces successions sont parfois répétées. En général, du moins « in vivo », l'hydrolyse précède l'oxydation, mais l'inverse existe ; lorsque les deux chemins sont possibles pour une même substance fermentescible, le produit final est le même quel que soit le sens suivi.

Enfin, les diverses fermentations, qui peuvent prendre naissance dans un même végétal, prennent naturellement le départ dans un ordre défini par le stade réel de végétation et les conditions normales de développement végétatif.

(1) Dans tout ce qui suit, le terme « fermentation » ne doit pas être considéré au sens pastorien, mais comme un synonyme de « processus ou réaction », puisqu'à chaque fois le qualificatif « enzymatique ou diastatique » sera joint ou sous-entendu.

Ce qui précède ne concerne que le minimum de modifications correspondant à la mort naturelle, très lente, des cellules végétales par déshydratation ménagée (dessiccation naturelle spontanée). Cette déshydratation est assez lente pour que les sucres cellulaires se concentrent « in situ », *sans se mélanger* ; dans ces conditions, certaines fermentations peuvent ne pas se produire.

Mais la mort des cellules peut se trouver causée et accélérée brutalement, par exemple par l'action d'une dessiccation plus rapide et, plus généralement, par l'action des agents :

- physiques (chaleur, eau, solvants) ;
- chimiques (anesthésiques, toxiques, caustiques) ;
- mécaniques (écrasement, éclatement, dilacération) ;
- biologiques (microorganismes).

Il y a alors rupture de l'équilibre cellulaire. Si les conditions sont favorables, des échanges biochimiques qui ne se font ni à l'état vivant, ni au cours d'une dessiccation lente, peuvent se produire ; ceux qui s'effectuent normalement s'accélèrent, et l'on peut constater des modifications intenses et profondes.

En effet, les fermentations diastasiques « in vivo » ne peuvent avoir lieu, et, causalement, les produits fermentaires dits « ferments solubles ou inorganisés » (diastases ou enzymes ou encore zymases) ne peuvent entrer en activité que par leur mise en contact avec les substances fermentescibles correspondantes. Or, ces produits sont séparés, qu'ils soient contenus dans les mêmes cellules ou localisés distinctement dans des cellules différentes.

Cette mise en contact est donc plus facile à obtenir et peut même parfois se réaliser spontanément lorsque les substances réagissantes sont contenues dans les mêmes cellules ; elle est évidemment plus difficilement réalisable lorsqu'elles sont réparties dans des cellules distinctes ou encore dans des organes différents.

La vitesse d'apparition des fermentations est donc fonction de la localisation de ces substances.

ETUDE CRITIQUE DES DONNEES PRECEDENTES

Au cours de cette révision, nous avons pressenti la nécessité d'établir une distinction entre la mort « brutale », sinon instantanée, du moins très rapide, dont le processus est difficilement observable, parce que non seulement rapide mais encore grossier (comme par exemple celui faisant suite au broyage des tissus) et la mort « rapide » provoquée par une action moins puissante permettant l'observation du phénomène dans tous ses détails.

En généralisant, on peut même envisager une telle accélération dans le sens le plus large : elle peut en effet être positive ou négative.

D'autre part, nous avons été frappé par :

la nécessité de la présence simultanée de plusieurs agents actifs pour accélérer les fermentations, par exemple l'humidité simple ne peut suffire à elle seule, si sa pénétration n'est pas assurée physiquement, mécaniquement ou biologiquement ;

— la possibilité pour certains agents différents de produire les mêmes effets : ainsi un agent non chimique peut se substituer à un anesthésique ou inversement.

Enfin, en étudiant les produits chimiques à d'autres points de vue, nous n'avons trouvé aucune indication précise en dehors du sens habituel de leur pouvoir accélérateur. Rien sur leur activité comparée, rien sur leur sélectivité, pas l'ombre de principes réellement scientifiques (1) qui permettraient, éventuellement, de trouver de nouveaux corps utilisables en remplacement des empiriques connus.

On ne remarque dans les ouvrages spéciaux, comme élément pouvant concourir à éclaircir le problème, que la magistrale explication de GUIGNARD sur la plasmolyse consécutive à l'anesthésie. Bien des fois, au cours de toute une carrière, et toujours avec succès lorsque les conditions étaient correctes, nous avons appliqué cette méthode, à l'exemple de GUIGNARD, MIRANDE et autres, à la recherche de l'acide cyanhydrique dans les végétaux.

HYPOTHESES DE TRAVAIL

Dans cette bibliographie, un certain nombre de points avaient attiré plus spécialement notre attention.

En particulier, les textes consultés ne mettaient pas assez en évidence, à notre sens, même dans l'explication de la fermentation engendrée par anesthésie et plasmolyse, l'acte même de mise en contact des substances réagissantes, qui constitue le point de départ de la fermentation.

C'est que, déjà, nos recherches préliminaires avaient fait ressortir à nos yeux l'importance capitale du « déclenchement » ou « démarrage » ou encore « départ » de la fermentation. Cet acte est en effet indispensable, ne serait-ce que par définition : *sans mise en contact, il n'y a pas de travail diastatique possible*. Le déclenchement est, de

(1) C'est ainsi que l'anaérobiose a été considérée comme la cause déterminante de la « stimulation chimique », peut-être parce que l'on a le plus souvent fait appel à des produits inertes ou réducteurs (carbures par exemple) et qu'un sujet d'étonnement a été l'emploi de l'eau oxygénée.

plus, assez net et assez différent du travail diastasique pour devoir en être distingué, ainsi qu'il était apparu lors de nos premières expériences.

Nous avons donc été fondé à considérer deux phases dans le processus enzymatique :

- le déclenchement,
- le travail enzymatique proprement dit.

Logiquement, ces deux phases sont nettement séparées, mais elles s'enchaînent étroitement par définition. Toutes deux peuvent être influencées (favorablement ou défavorablement) par des agents extérieurs mécaniques, biologiques, physiques ou chimiques (1). De ce qu'elles ne sont plus confondues, il découle que ces agents ne peuvent plus être dénommés en bloc « catalyseurs des transformations » ou « activateurs des fonctions enzymatiques », ni employés indistinctement du commencement à la fin des opérations de fermentation.

Certains, parmi les dits agents, interviennent *uniquement* « *in vivo* » pour *mettre en contact* les substances réagissantes et déclencher ou amorcer plus ou moins rapidement les phénomènes dus au travail diastasique ; d'autres interviennent « *in vivo* » *comme* « *in vitro* » pour *influencer* positivement ou négativement le *travail diastasique*.

Aussi, dans le but de bien délimiter et de mieux préciser le rôle des promoteurs, nous avons appelé :

— **DECLENCHEURS, DEMARREURS** ou encore mieux **STARTERS** ceux qui établissent le contact entre les liquides réagissants et donnent ainsi le départ ; ils n'ont ultérieurement aucune autre action, ou bien leur action secondaire est indépendante de celle de l'amorçage ;

— **ACCELERATEURS** ceux qui agissent sur la vitesse du déclenchement, sans participer ni à celui-ci, ni au travail diastasique ; ce sont des accélérateurs au sens rigoureux du terme ;

— **ACTIVEURS** ceux qui ont une influence directe sur le travail diastasique en participant aux réactions biochimiques composant les fermentations ;

(1) A vrai dire, l'action produite par les agents mécaniques s'explique aisément ; celles provenant des agents biologiques et des agents physiques n'ont jamais été définies bien clairement ni vérifiées exactement ; celle des agents chimiques franchement méconnue. L'acte de « déclenchement » a cependant été senti et jusqu'ici dénommé, sans explication satisfaisante, « préparation du terrain », « rupture d'équilibre dans la cellule », « rupture de la vie latente », « break down des membranes cellulaires », « perméabilisation », etc. Les actions appelées « stimulation », « accélération », « forçage », ont été appliquées à l'ensemble du phénomène.

--- ACCELERATEURS ceux qui agissent sur la vitesse du travail diastatique sans participer à ce dernier.

Nous avons immédiatement remarqué que, si les starters d'une part et les activeurs d'autre part sont bien des agents d'activation, les accélérateurs sont plus exactement des « conditionneurs des processus » : ils sont d'ailleurs communs aux deux phases et nous les avons dès lors délibérément confondus.

Notre classification des agents extérieurs, réduite à ces trois groupes, évite d'employer le terme de « catalyseurs » qui doit être réservé, en ce qui concerne les processus enzymatiques, aux véritables et seuls catalyseurs de ces réactions : les diastases.

LES STARTERS.

Si nous examinons en détail les starters, qui sont fort nombreux, nous trouvons des agents :

--- *physiques* :

la chaleur, lorsqu'elle provoque par vaporisation et éclatement des cellules le contact recherché,

le froid, lorsqu'il produit le même effet par congélation et éclatement,

l'eau, lorsqu'elle donne des dilutions qui peuvent traverser les membranes du fait de leur faible concentration.

les solvants, lorsqu'ils donnent des solutions pouvant diffuser à travers les parois des cellules ;

--- *chimiques*, sous la réserve déjà formulée qu'ils ne prennent pas part aux réactions ou que cette action secondaire soit envisagée à part puisqu'elle fait alors partie de l'activation :

les anesthésiques, qui provoquent la plasmolyse, abaissent la tension superficielle des liquides cellulaires ; ceux-ci entrent alors en contact par diffusion, avec ou sans osmose,

les toxiques, dont les propriétés rappellent celles des précédents,

les caustiques, qui, par mécanismes un peu différents mais analogues, produisent les mêmes effets ;

--- *mécaniques* :

l'écrasement - l'éclatement - la dilacération - le broyage des tissus et des cellules qui permettent aux liquides cellulaires de se mélanger rapidement ;

biologiques :

les microorganismes qui, en milieu suffisamment aqueux, gonflent et désagrègent les cellules et leurs parois, donnent liberté aux liquides fermentaires et fermentescibles d'entrer en contact (Ces microorganismes peuvent aussi et au contraire modifier les liquides réagissants et les détruire, donnant des résultats très différents de la fermentation diastasique).

LES ACTIVEURS.

Les activeurs, du fait qu'ils doivent prendre part aux réactions, sont certainement peu nombreux. Ce ne peuvent être que des produits chimiques. Leur action dans les tissus est comparable à celle qu'ils montreraient « in vitro » sur les substances réagissantes extraites de ces mêmes tissus, sans qu'intervienne de leur part une modification *directe* de ces substances. Bien entendu, certains activeurs peuvent modifier la tension superficielle, mais, puisqu'ils font ainsi preuve de qualités mixtes d'activeurs et de déclencheurs, chacune des deux doit être étudiée à part.

Par contre, les produits qui pourraient provoquer un retard rentreraient également dans ce groupe.

A la vérité, nous n'avons pu pour le moment envisager qu'un seul activeur des oxydations diastiques : l'oxygène (sous toutes ses formes).

Aux activeurs pourraient se rattacher des *conditionneurs d'ambiance*, comme par exemple les gaz inertes destinés à remplacer l'air atmosphérique dans les réactions réductrices.

LES ACCÉLÉRATEURS.

Les accélérateurs sont :

— physiques :

la chaleur ou le froid modérés, qui peuvent avancer ou retarder les fermentations entre les limites à partir desquelles se produisent les actions brutales indiquées ci-dessus ;

— mécaniques :

la pénétration - l'agitation - le brassage - qui facilitent le contact ;

— biologiques :

les fermentations, autres que celles en cause, qui peuvent par dégagement de chaleur et d'humidité avoir une influence sur le travail diastasique.

DEMONSTRATIONS EXPERIMENTALES

Nous avons voulu à la fois vérifier nos hypothèses et mieux connaître les phénomènes faisant suite à l'action des starters chimiques (auxquels nous avons pour l'instant restreint nos recherches).

Le champ d'expérimentation était vaste : les starters « possibles » sont très nombreux ; le nombre et la diversité des ferments et des substances fermentescibles sont considérables, leur spécificité fréquente et la coexistence de plusieurs presque constante.

Aussi, sans étudier à nouveau le développement proprement dit, déjà connu « *in vitro* », des fermentations (1), n'avons-nous envisagé que le déclenchement « *in vivo* » de celles-ci, sous la réserve que les différents cycles végétatifs soient considérés isolément et que chacun d'eux le soit au moment où il est physiologiquement à son optimum de fermentescibilité.

Notre premier programme d'expérimentation était :

- a) d'une part, de comparer l'action des produits chimiques sur doublet (ferment soluble + substance fermentescible correspondante), dans les mêmes conditions physiques et chimiques, en notant et en mesurant tout ce qui peut se mesurer ;
- b) d'autre part, de faire varier pour chaque produit chimique actif, sur le même doublet, les conditions physiques en présence de gaz actifs et inertes, et en faisant les mesures correspondantes comme ci-dessus ;
- c) enfin, de reprendre tous les essais en faisant intervenir différents doublets connus.

Malheureusement, nos modestes moyens n'étaient pas en rapport avec l'ampleur de ce programme. Pour ne pas éparpiller nos efforts, nous avons dû limiter nos expériences à quelques fermentations typiques, et nos mesures à quelques tests caractéristiques.

Dans ce cadre restreint, nous avons pu faire néanmoins nombre d'observations utiles.

Profitant de l'expérience déjà acquise en ce qui concerne le dédoublement des hétérosides cyanogénétiques, phénomène assez lent pour permettre de bonnes observations, nous avons pris celui-ci comme base principale de nos essais et envisagé les cas suivants.

(1) Ces fermentations ont déjà été l'objet de nombreuses études « *in vitro* » : elles représentent une infinité de cas particuliers.

QUAND LES AGENTS CHIMIQUES ACTIFS VARIENT

Les starters chimiques proviennent de toutes les familles chimiques. Cependant, l'examen par famille ne peut servir de guide pour établir un choix : en effet, *la fonction de starter est indépendante des fonctions chimiques et ne peut être définie que par ses effets.*

Nous avons donc procédé aux essais de beaucoup de produits, en commençant par ceux qui avaient fait l'objet des remarques signalées plus haut.

Il est à peine besoin de faire remarquer que les starters chimiques sont plus sûrs et plus faciles à manier que tous les autres, que ce soit sous les formes de solutions, d'aérosols, de vapeurs ou de gaz. Ces deux dernières offrent le plus de facilités ; elles sont les plus élégantes puisqu'elles n'abîment pas le végétal. Ce sont elles que nous avons le plus souvent employées, en particulier pour les premiers essais courants en utilisant des liquides à saturation de vapeur à la température de l'essai.

Nous avons pu déduire de nos essais antérieurs que, pour un même doublet, toutes conditions physiques et chimiques étant égales, le « pouvoir de déclenchement » pouvait être exprimé par l'inverse du temps mis à obtenir un test, chacun des agents étudiés étant pris dans les mêmes conditions de quantité.

En utilisant le doublet cyanogénétique, nous avons donc eu d'emblée une méthode simple de classement des produits essayés en notant le temps d'apparition du dégagement de l'acide cyanhydrique.

Pratiquement, l'opération dans le cas le plus simple consistait à :

— Préparer une série de tubes à essai (type à culture sur pomme de terre) garnis d'un bouchon de liège fendu suivant un diamètre de la petite base sur quelques millimètres de hauteur pour maintenir une bandelette de papier picro-sodé à la partie supérieure du tube ;

Mettre au fond de chaque tube un excès de l'un des liquides générateurs des vapeurs à étudier, sauf pour l'un des tubes qui servait de témoin ;

Refermer les tubes ;

— Préparer une série d'amandes (ou feuilles ou autres parties de végétaux cyanogénétiques) prises dans un même lot et, autant que possible, de mêmes forme, volume et poids ;

Très rapidement, sinon simultanément, garnir chaque tube d'une amande et le refermer, de manière que la différence de temps entre le premier et le dernier soit négligeable ;

- Noter l'heure de cette fermeture puis, pour chacun des tubes, celle de l'apparition de la couleur rouge spécifique de l'acide cyanhydrique sur une même longueur de la bandelette de papier et avec la même intensité (1) :
- Déduire le temps caractéristique, pour chaque agent chimique, de son pouvoir de déclenchement dans les conditions de l'expérience.

Nous avons effectué de très nombreuses expériences de cet ordre : les résultats obtenus par l'une d'elles sont relatés dans le Tableau I.

Dans l'ensemble de nos essais, les comparaisons sont constantes et permettent d'aboutir à des classements voisins. Comme d'ailleurs nous ne pouvons prétendre du point de vue biologique à nous replacer exactement dans des conditions identiques à chaque opération, nous pouvons conclure ainsi : pour une fermentation de nature donnée, l'action des divers starters diffère notablement. Mais, dans les conditions d'une expérience, il est possible d'établir une échelle d'activité de ces starters.

Au surplus, une précision plus grande dans un tel classement aurait exigé la certitude qu'il n'y avait pas d'action secondaire ou spéciale de ces agents chimiques pouvant le fausser. Nous ne saurions l'affirmer, en nous souvenant par exemple de l'action défavorable du chloroforme et de l'éther signalée au sujet de certaines fermentations « *in vitro* ».

En outre, la spécificité possible des agents vis-à-vis des fermentations, ou plus vraisemblablement vis-à-vis des éléments cellulaires, peut modifier le classement qui n'est valable que pour une seule des fermentations, s'il y en a plusieurs en présence. Enfin, il serait nécessaire de respecter la condition de quantité pour tous les starters mis en expérience, ce qui n'est que rarement réalisable en raison, par exemple, des différences dans les tensions de vapeur. D'autre part, en ce qui concerne la question de quantité d'un même starter, interviennent des considérations qui font l'objet du Chapitre suivant ; pour des starters différents, cette question apparaît a fortiori plus complexe encore.

(1) Nous éprouvons un scrupule à écrire « la même intensité ». Dans nos essais en effet, nous avons souvent constaté que les papiers picrosodés acquerraient une intensité sensiblement égale, mais que la nuance en différait légèrement. Ne faut-il pas voir là une action directe du starter sur le test ?... ou une action secondaire ? C'est pourquoi le Tableau I comporte à la fois le test de coloration et le test olfactif. (l'odeur de l'essence dégagée au cours de la fermentation est presque toujours perceptible malgré celle du starter) qui confirme le premier.

TABLEAU I

*CLASSIFICATION DE QUELQUES STARTERS
d'après leur pouvoir de déclenchement sur amandes
cyanogénétiques fraîches*

(Amandes de bibassier pelées et traitées 5 jours après)

Température ambiante : 23/24° C.

PRODUITS	TEMPS d'appari- tion de la coloration (en heures)	INTEN- SITE de la couleur (1)	TEMPS d'appari- tion de l'odeur (en heures)	INTEN- SITE de l'odeur (1)	POUVOIR de déclen- chement x 100
Témoin	—	—	—	—	0
Oxyde d'éthylène	3	2	3	6	33,0
Éther éthylique	3	2	3	6	33,0
Bromure de méthyle	3	1	3	6	33,0
Oxyde de propylène	—	0	3	6	33,0
Sulfure de carbone	4	5	4	6	25,0
Chlorure d'éthyle	4	3	4	6	25,0
Tétrachlorure de carbone..	5	4	12	6	20,0
Dichloréthylène	5	2	5	5	20,0
Chloroforme	8	6	8	6	12,5
Trichloréthylène	9	6	9	6	11,0
Dichloréthane	11	5,5	11	6	9,1
Benzène	12	6	12	6	8,3
Acétate d'éthyle	12	2	12	6	8,3
Pentachloréthane	14	5	14	6	7,1
Alcool éthylique	15	3	15	4	6,6
Éther de pétrole	16	2	16	5	6,2
Acide formique	—	0	18	1	5,5
Toluène	20	3	20	5,5	5,0
Acétate d'amyle	20	2	20	5	5,0
Acétone	20	1	20	5,5	5,0
Perchloréthylène	24	5,5	24	6	4,2
Xylène	24	2	24	4	4,2
Acide acétique	—	0	24	3	4,2
Nitrate d'éthyle (Sol. al- coolisée)	—	0	90	4	1,1
Eau	—	0	—	0	0,0

(1) Arbitraire.

Nous avons fait, à titre de contrôle, les mêmes essais avec d'autres doublets, celui de la sulfhydricogénèse et celui de l'oxydation des tannoïdes. Ils ont donné lieu à des observations semblables.

Au cours des recherches, nous avons noté qu'une fois déclenchées, les fermentations deviennent en général très actives, avec dégagement

de vapeur d'eau. Ce phénomène pourrait faire croire à une accélération des fermentations par l'agent actif ; nous nous sommes assuré qu'il n'en est rien car, *lorsque l'atmosphère du tube est renouvelée de manière à éliminer le starter, la fermentation se produit si elle a été suffisamment amorcée* : la chaleur dégagée est seule en cause dans l'accélération du travail diastasique constatée.

Cette expérience suffirait à elle seule pour confirmer que la phase déclenchement précède le travail diastasique tout en s'en montrant indépendante et distincte.

QUAND LA QUANTITE D'AGENT CHIMIQUE ACTIF VARIE

En introduisant des quantités différentes d'un même produit dans des tubes préparés comme précédemment, on peut faire varier le pourcentage de sa vapeur depuis 0 jusqu'à saturation, les autres conditions étant sans changement.

Les résultats ne sont pas proportionnels aux quantités introduites : on constate en effet que le départ individuel des fermentations possibles dans un même végétal, pour des doses croissantes entrant à son contact, est le plus souvent retardé d'abord, parfois même inhibé, puis accéléré d'une manière assez progressive au delà d'une certaine dose : il y a en quelque sorte un *seuil d'accélération positive*, dont nous avons recherché l'origine.

En faisant la part des expériences non probantes, nous citerons celle que nous avons appelé de la « vague » : une feuille d'iris longue de plusieurs décimètres, tout juste flétrie mais non jaunie, placée dans un tube de verre étroit, est soumise dans sa longueur à l'action d'un starter puissant, admis très lentement par l'une des extrémités du tube ; on observe alors un changement de coloration dû aux transformations des substances fermentescibles. Si l'on interrompt le courant de starter et laisse l'oxydation se terminer (pratiquement), on obtient finalement dans le sens de la vague une coloration dégradée du vert foncé au jaune brun plus ou moins clair, parce que le taux du starter venu au contact de la feuille a diminué progressivement par suite de sa sorption par celle-ci.

Nous avons évité les causes pouvant provoquer dans cette expérience ce que l'on observe parfois après action totale et uniforme du starter sur les végétaux : des dessins plus ou moins accusés donnant en particulier aux feuilles la même apparence de dégradé. Ces des-

sins sont en réalité le schéma exact des zones à cellules dont le contenu est susceptible de réagir (1).

Nous avons dû également éviter les erreurs possibles en deçà et à hauteur du seuil, la présence des gaz dégagés pouvant, en raison de la faible teneur en vapeurs actives, modifier sensiblement la composition du mélange gazeux en contact avec les tissus végétaux, ou pouvant, comme l'anhydride carbonique, jouer un rôle important dans l'arrêt de certaines oxydations ; on connaît en effet son influence sur le potentiel rédox et l'état d'équilibre de ces réactions.

Ayant pris toutes les précautions en notre pouvoir, ayant fait usage du vide préalable pour atteindre toutes les cellules en surface comme en profondeur dans un minimum de temps, avec un gros volume gazeux à taux uniforme de starter, nous avons pu donner le départ, simultanément ou presque, dans tout le végétal à toutes les cellules à contenu fermentescible : la fermentation dans ces conditions devient très active et atteint son maximum presque aussi rapidement qu'« in vitro ». Il est alors possible de faire varier les facteurs qui modifient le travail diastasique.

Il résulte de ces essais qu'en raison, soit de la fixation par les tissus, soit de la mauvaise pénétration, soit de l'inhibition des parois cellulaires, le test n'apparaît que lorsque la quantité de starter a été suffisante pour atteindre un seuil ; à partir de celui-ci, les différences dans les temps d'apparition sont en relation avec les taux de starter. Cette relation se rapproche, toutes choses égales d'ailleurs, du rapport

$$\text{Quantité agissante de starter} / \text{Quantité de végétal}$$

le numérateur de ce rapport ne pouvant lui-même être mis sous la forme :

$$\text{Quantité absolue de starter} \times \text{Temps d'exposition}$$

sans vérification préalable. Nous avons en effet constaté qu'il n'y avait pas toujours concordance d'action entre l'exposition rapide à dose forte et l'exposition longue à dose faible. Il faut peut-être en voir la raison dans les difficultés de pénétration, elles-mêmes fonction du

(1) A ce sujet, nous rappelons que les expériences n'ont volontairement porté que sur des produits végétaux ayant atteint le plein développement physiologique de leur stade évolutif. Auparavant, on pourrait provoquer, ainsi que nous l'avons constaté, des réactions diastases différentes, caractéristiques de l'un des stades intermédiaires ; ce serait la preuve que, pour chacun d'eux, il y a en présence, non seulement les produits de transition — eux-mêmes fermentescibles — mais encore les enzymes correspondantes. Il en résulterait que nous pourrions, grâce à notre artifice de déclenchement provoqué, bloquer à l'un des stades de la synthèse biochimique des constituants d'un végétal la dite synthèse, et déceler la présence de l'un ou des produits intermédiaires de ce stade.

temps d'exposition. Cette concordance, enfin, ne pourrait être vérifiée que dans des limites relativement très étroites de part et d'autre d'une moyenne.

Nous avons étudié le cas particulier des fermentations dégageant en totalité ou en partie le produit ayant servi à l'amorçage initial : on sait que, dans cette conjoncture, la fermentation s'accélère ou, plus exactement, s'étend très rapidement, le déclenchement étant réellement accéléré par les doses auto-croissantes du starter libérées par la réaction.

Si l'on pouvait soustraire le produit actif au fur et à mesure de sa naissance pour ne laisser subsister que la dose initiale déclencheuse, la fermentation se propagerait alors, en fonction de l'introduction de cet agent, « linéairement » pour emprunter le langage mathématique. Sans cette soustraction, la propagation serait logarithmique.

Or, s'il nous a été impossible de réaliser un dispositif permettant d'effectuer cette opération, nous avons cependant pu démontrer indirectement la théorie précédente en reprenant sous une autre forme l'expérience « de la vague » :

- a) Nous avons rempli de graines à tannoïdes (dont l'oxydation très visible sert de test) un tube de verre assez long, de diamètre juste suffisant pour contenir une seule semence ; ces graines constituent donc une chaîne sur laquelle on fait arriver des doses croissantes de starter ; on constate que le nombre d'unités-tests ayant viré est proportionnel aux doses introduites. Lorsque l'admission cesse, la propagation s'arrête pratiquement, sauf toutefois une très légère progression provenant de la libération d'une petite quantité d'agent actif par la chaleur de fermentation ;
- b) La même expérience étant effectuée avec un doublet à starter auto-accelérateur, la propagation s'étend de plus en plus rapidement tant qu'il y a admission, puis se ralentit lorsque l'admission cesse ; elle reprend progressivement ensuite d'elle-même son allure initiale, s'accéléralant en fonction du nombre de tests qui entrent en fermentation ;
- c) Dans ces expériences, si nous coupons la chaîne par interposition d'un sorbant, il y a arrêt net à cet endroit, puis reprise lorsque le sorbant est saturé.

De l'ensemble de ces diverses observations, il y a lieu de déduire que :

1° au delà d'un seuil plus ou moins net, le déclenchement a lieu de proche en proche, en fonction de la pénétration des tissus, et ce

phénomène ne peut être confondu avec une accélération de travail enzymatique proprement dit ;

2° comme corollaire, si le déclenchement et le travail diastasique ne peuvent être confondus, c'est qu'ils constituent deux phases distinctes du processus enzymatique ;

3° la loi exponentielle du mûrissement bien connu des pommes en espace confiné et sans sorption des gaz dégagés est l'illustration typique et désastreuse de l'action d'un starter auto-accélérateur. Cette fermentation met en effet en liberté au moins un ester de l'alcool amylique ; or, l'un de ceux-ci, l'acétate d'amyle, figure parmi les agents chimiques actifs cités dans la première partie de ce travail.

De plus, ces observations confirment que nombre de fermentations doivent être obligatoirement déclenchées pour avoir lieu, mais que les starters dans les limites indiquées n'ont pas d'action sur le travail diastasique proprement dit ; leur apparence d'accélérateurs de ce travail est due à l'intensité et à la profondeur de leur action de déclenchement.

4° au delà d'une quantité variable avec chaque starter, il se produit — surtout avec les starters facilement hydrolysables — des actions toxiques partielles et sélectives ou totales des tissus. Mais, passé cette limite, nous abordons le domaine des actions brutales.

QUAND LES CONDITIONS CHIMIQUES VARIENT

Ainsi que nous l'avons déjà dit, nous n'avons pu étudier jusqu'ici qu'une seule condition chimique proprement dite, celle de la teneur en oxygène dans les fermentations oxydantes.

Après avoir répété sur le végétal vivant, en l'adaptant, l'essentiel de ce qui a fait l'objet de très nombreux travaux sur les ferments isolés et « in vitro », nous avons été convaincu de ce que l'influence des gaz actifs ou inertes sur les fermentations « in vivo » est, à la pénétration dans les tissus près, sensiblement la même et ne constitue qu'une condition chimique de milieu réactionnel.

On le prouve par les expériences suivantes :

- a) Soumettons les amandes à la fois oxydables et cyanogénétiques du bibassier ou néffier du Japon (*Eriobotrya japonica*), pelées avec soin pour ne pas blesser l'épiderme, à pression atmosphérique, à un courant de balayage par un gaz inerte qui vient remplacer l'air ambiant ; puis introduisons le starter : il y a *oxydation et cyanogénèse*. L'oxydation a lieu un peu plus lentement et plus faiblement qu'en présence d'oxygène ;

- b) Soumettons de ces mêmes amandes à un vide préalable et ramenons-les à pression atmosphérique à l'aide d'un gaz inerte, cette opération étant renouvelée plusieurs fois de manière à évacuer au maximum l'oxygène intracellulaire. Rien ne se produit dans le temps que dure l'observation (dans la suite, on pourrait constater une très légère oxydation due à l'oxygène intracellulaire résiduel) ;
- c) Effectuons exactement la même opération b), puis introduisons le starter : il y a *cyanogénèse, mais non oxydation*. Toutefois, cette dernière reste parfaitement déclenchable par la suite en introduisant simplement de l'oxygène ; nous constatons alors que l'oxydation est d'autant plus intense que la proportion d'oxygène venant remplacer le gaz inerte est plus élevée, soit que sa présence en plus grande quantité ait une influence directe, soit qu'elle ait une influence sur la pénétration dans les tissus, soit les deux.

De ces trois expériences, il résulte que l'oxygène est bien un activateur selon notre définition.

Si nous répétons ces expériences à titre de contrôle à l'aide de starters non chimiques (écrasement par exemple), nous constatons les mêmes effets.

C'est donc que, quels que soient le starter et l'intensité du déclenchement qu'il provoque, il n'y a travail diastasique que si les conditions chimiques correspondantes sont réalisées.

Et c'est une fois de plus vérifier ainsi, d'une manière indirecte, que le déclenchement et le travail diastasique sont distincts, bien qu'étroitement liés pour un résultat commun.

En ce qui concerne le contact de l'oxygène avec les tissus végétaux, nous devons indiquer ici que la pression de l'oxygène dans les limites qui seront définies ci-après au sujet des conditions physiques a été considérée, dans nos expériences, plus comme un moyen de faire varier la quantité d'oxygène que comme un facteur de pression proprement dit.

Nous rappelons à propos des expériences b) et c) que les tissus végétaux, comme du reste les tissus animaux, continuent à subir des transformations bien qu'ayant été stérilisés dans les conditions habituelles. Transformations très lentes, mais réelles. Nous n'en voulons pour preuve que le « vieillissement » des conserves végétales ou animales, même les mieux préparées, des préparations de consommation ou pharmaceutiques à Palcool (macérations, teintures, boyaux pour sutures), des produits stabilisés. Ces modifications lentes prouvent que

les ferments solubles ne sont pas tous détruits ou intégralement détruits lors des opérations auxquelles ils ont été soumis. L'état de stabilité apparente peut, dans certains cas, être suivi d'une modification rapide et profonde si les conditions nécessaires sont à nouveau remplies. Ne serait-ce pas, par exemple, celui de l'altération rapide des conserves exposées à l'air après ouverture des récipients ?

Enfin, l'extrême importance des conditions physico-chimiques des fermentations diastasiques, pH et rH, démontrée « in vitro », n'est pas moindre « in vivo » comme nous avons pu nous en assurer. Mais les circonstances rendues très particulières par le fait de la pénétration, si variables avec les végétaux, ne nous ont pas permis une étude générale de la question. Nous ne citerons donc pas les essais faits à ce sujet.

Leurs résultats nous permettent cependant de rappeler que l'on devrait prendre en plus grande considération que cela n'a peut-être été fait jusqu'ici, du moins dans la pratique, les réactions d'oxydo-réduction, dont la phase réduction est souvent moins apparente que la phase oxydation.

QUAND LES CONDITIONS PHYSIQUES VARIENT

L'influence de la lumière n'a pas fait l'objet d'expériences.

La chaleur concourt à maintenir les conditions de perméabilité et de diffusion à leur optimum. Elle intervient en outre dans le travail diastatique, chaque fermentation se développant au mieux à une température qui lui est propre.

Le froid intervient de deux manières distinctes. D'une part, il stimule la reprise de la végétation qui suit immédiatement son action. D'autre part, il agit en sens inverse de la chaleur pour retarder et même stabiliser les échanges intra et intercellulaires et, par suite, le déclenchement ; il retarde également le travail enzymatique.

Jusqu'ici, nos études ne nous permettent aucune conclusion s'appliquant au premier cas. Par contre, elles nous permettent d'affirmer que les anesthésiques ne produisent pas les mêmes effets que le froid pour réaliser un hiver artificiel précédant le réveil de la végétation (1).

C'est donc l'action de déclenchement de ces produits et leur ma-

(1) En prenant pour exemple le forçage par éthérisation, on constate que l'éther vaporisé à raison de 300 g./m³ dans un local qui est à la température de 14/18°C. ne peut réaliser un « hiver artificiel », mais agit strictement en qualité de starter ; le seuil de son action est d'autant plus marqué que l'humidification n'intervient qu'ultérieurement en terre, alors qu'il est déjà désorbé en majeure partie.

nière d'agir qui créent vraisemblablement la confusion entre le retard dû au froid et le seuil d'action des starters ; au surplus, la stimulation spéciale due au froid n'a lieu qu'*après* son action, le déclenchement par les anesthésiques se produit *pendant* leur action.

Par ailleurs, nous avons vérifié que le déclenchement et la fermentation à froid sont plus lents qu'à chaud, sans qu'il y ait, comme de juste, de limite entre le froid et la chaleur modérés.

En fait, nous avons confirmé que la chaleur ou le froid, en dehors du cas spécial indiqué ci-dessus, ainsi d'ailleurs que la pression, agissent sur les fermentations diastasiques « in vivo » dans les limites respectant l'intégrité des cellules, des membranes ou des liquides, comme « in vitro ». En dehors de ces limites, il y a actions brutales qui s'apparentent aux actions mécaniques avec, à leur suite, mise en contact rapide des liquides réactionnels ou bien blocage définitif des cellules, ou encore destruction des substances réagissantes.

Il en est de même lorsqu'il s'agit des solvants.

L'humidité a beaucoup retenu notre attention. Nous avons tout d'abord constaté que, toutes choses égales d'ailleurs, le test des fermentations apparaissait d'autant plus lentement que le végétal était plus sec ; nous en avons conclu que ce retard était dû à un blocage progressif des membranes et à une augmentation progressive de la viscosité des liquides réactionnels.

Le blocage des membranes par dessiccation peut d'ailleurs être réversible si le séchage n'a pas été poussé trop loin et les tissus végétaux maintenus trop longtemps en cet état : une simple réhumidification suffit alors le plus souvent pour remettre le doublet en état de réagir. Par contre, une forte dessiccation, la chaleur dans la zone des actions brutales, certains produits chimiques, bloquent irrémédiablement les membranes, détruisent également les ferments et interdisent les fermentations diastasiques endogènes ultérieures.

Inversement, lorsque l'hydratation devient suffisante, tous les produits réactionnels sont dilués, ils traversent les membranes dès que la tension superficielle le permet, se mélangent ; nous assistons alors à des échanges plus ou moins massifs et rapides dont nous connaissons déjà les résultats.

Le taux global d'humidité des végétaux correspond en réalité à trois taux différents que nous adoptons avec les définitions suivantes :

1° *Eau de constitution*, quantité déterminée sur les tissus végétaux détachés de la plante, après flétrissage normal et en équilibre avec l'atmosphère ambiante à humidité moyenne. C'est la quantité d'eau

correspondant à la végétation passive. Elle correspond sensiblement à l'eau « liée », augmentée de l'humidité résultant de l'équilibre avec l'atmosphère ambiante ;

2° *Eau de gonflement*, quantité déterminée sur les tissus végétaux immédiatement après avoir été détachés de la plante, cette opération étant effectuée en atmosphère ambiante moyenne non pluvieuse. C'est la quantité correspondant à l'état de végétation active ;

3° *Eau de mouillage*, quantité évaluée en soustrayant de la quantité totale d'eau que l'on peut extraire des tissus végétaux le taux moyen de l'eau de constitution ou de l'eau de gonflement selon le cas correspondant au prélèvement.

Dans le premier cas, le taux d'humidité est le plus généralement tité totale d'eau que l'on peut extraire des tissus végétaux le taux quelles sont de ce fait relativement moins actives, et insuffisant pour permettre des fermentations bactériennes et cryptogamiques. Dans ce cas, comme dans le deuxième, bien qu'alors l'humidité soit suffisante, certaines fermentations enzymatiques ne peuvent même pas démarrer spontanément ; on ne constate comme travail diastasique que celui, extrêmement lent, des stocks de végétaux en conservation prolongée. C'est ainsi que, dans la recherche toxicologique de l'acide cyanhydrique des haricots à l'aide de starters chimiques, nous n'avons eu d'insuccès que lorsque les graines étaient trop sèches.

Dans le deuxième cas, et bien davantage dans le troisième, les végétaux sont facilement envahis par une flore bactérienne et cryptogamique qui donne lieu, par destruction des parois cellulaires, à des fermentations de tous ordres dont l'aboutissement est la destruction des tissus, plus généralement, la formation de « fumiers ».

Dans les deux premiers cas, le mélange des liquides réactionnels est régi par les lois de la diffusion. Celle-ci est sans osmose dans les échanges intracellulaires du type oxydation superficielle, donc très facile. Elle est avec osmose dans les échanges intercellulaires, ce qui implique la miscibilité des liquides réagissants et le mouillage de la cloison ou de la membrane par l'un d'eux au moins. Enfin, il convient de rappeler que, pour une même membrane, l'osmose varie quantitativement avec la température, la nature des liquides et leur concentration.

Il semble constant que, naturellement, les liquides réactionnels à dilution convenable remplissent la première condition de l'osmose (miscibilité). Ils ne satisfont pas, le plus souvent, à la deuxième (mouillage des parois, d'où nécessité d'un départ artificiel par des starters modifiant la tension superficielle des liquides. La température, troisiè-

me condition, facilite l'osmose mais ne la provoque pas. Elle influence par contre le travail diastasique. La concentration, qui représente la cinquième condition, n'est en réalité qu'une résultante de la température et surtout de l'humidité, ce qui explique parfaitement le rôle de la dessiccation vis-à-vis des solutions, la dessiccation des membranes étant indiscutablement de moindre importance.

Remarquons que, dans tout ce qui précède, l'agent chimique n'apparaît que comme starter ; les autres agents et principalement l'humidité ne sont que des accélérateurs du travail diastasique.

L'étude plus spéciale des conséquences de la variation du taux d'humidité nous a permis une vérification intéressante.

Avec des amandes de bibassier fraîches, oxydables et cyanogénétiques, pelées soigneusement pour ne pas blesser l'épiderme, il y a brunissement immédiat ou presque par oxydation superficielle sous l'action des déclencheurs puissants, puis, après un intervalle de temps relativement court, dégagement d'acide cyanhydrique. Par contre, avec des amandes du même lot, à demi séchées, traitées dans les mêmes conditions, le test de brunissement n'apparaît qu'au bout de deux heures environ et celui du dégagement d'acide cyanhydrique ne devient visible qu'au bout de 18 à 24 heures.

En prenant des amandes à divers degrés d'humidité, nous avons fait varier le décalage entre les deux tests et obtenu la gamme complète entre le zéro (pratique) ou minimum et le maximum réalisable avec chaque lot.

A cette occasion, nous avons pu constater tout d'abord que les deux fermentations ne sont pas naturellement simultanées puisque l'oxydation seulement peut se développer et que la cyanogénèse doit être provoquée. Ceci correspond bien à la localisation très différente de leurs ferments. D'autre part, le brunissement ne gagne en profondeur et très lentement qu'après consommation de l'oxygène intracellulaire, par absorption de l'oxygène ambiant. Enfin, le décalage est d'autant plus difficile à saisir que le starter est plus actif et que les conditions d'ambiance sont plus favorables.

Pour fixer les idées en ce qui concerne le taux d'humidité, nos expériences ont confirmé qu'il doit y avoir un optimum variable avec les fermentations, et que la plupart peuvent prendre correctement le départ entre 15 et 25 % d'eau.

Au-dessus, certaines fermentations semblent s'accélérer dangereusement, risquant en outre de provoquer des accidents par action secondaire éventuelle des starters ; au-dessous, les fermentations prennent le départ de moins en moins facilement, et le travail diastasique,

provoqué ou non, tend vers l'allure extrêmement lente de la mort biochimique des végétaux, dont la durée peut définir celle de leur conservation naturelle (végétation passive).

Il résulte de l'ensemble de nos observations relatives à l'humidité qu'elle ne peut être confondue avec les starters et qu'elle doit seulement être considérée comme la condition primordiale des réactions diastasiques, avec minimum, optimum et maximum propres à chacune des fermentations. Comme conséquence, nous pouvons à notre gré, en faisant varier le taux d'humidité, déclencher et étaler dans le temps des fermentations dont le départ est, soit spontané, soit provoqué par des starters.

Si nous faisons à nouveau les expériences relatives à l'humidité avec des starters non chimiques, broyage par exemple, nous pouvons également étaler dans le temps les fermentations ainsi déclenchées. Encore une nouvelle preuve de l'indépendance du déclenchement et du travail diastasiq.ue.

L'illustration typique du fait est la préparation au moment voulu, soit de la moutarde condiment, soit mieux encore du cataplasme de moutarde à l'aide de poudre de moutarde sèche (désuillée dans le deuxième cas), dont par conséquent la phase de déclenchement est terminée depuis longtemps.

L'humidification de cette poudre donne lieu au départ instantané du travail diastasiq.ue, alors que les graines de moutarde humidifiées ne fermentent pas spontanément. A noter que la moutarde a été en fait soumise à deux starters : broyage et solvant (1).

Dans le cadre des diverses actions brutales déjà signalées à plusieurs reprises, nous indiquerons en vue de l'application de nos travaux :

1° des destructions rapides, le plus souvent par excès d'agent actif sur des tissus frais et jeunes (a fortiori sur des plantes vivantes), gorgés d'eau, mais aussi parfois par des réactions qui semblent hors de proportion avec la dose employée. Ces destructions peuvent avoir comme origine l'hydrolyse du produit chimiq.ue, peut-être favorisée par certains ferments des végétaux, ainsi que par les conditions d'ambiance, avec mise en liberté d'un toxiq.ue (par exemple acide halogéné). Ces destructions peuvent également résulter de fermentations déclenchées, le taux d'humidité nécessaire étant atteint, par le produit chimiq.ue ; ce dernier peut lui-même entrer en réaction secondai-

(1) Les solvants employés — le plus souvent trichloréthylène — sont des starters puissants, en admettant que leur action et leur fixation aient été assez intenses pour prédéclencher sans humidification préalable ou à sec, ce que nous n'avons jamais constaté.

re, directement ou à la faveur des conditions d'ambiance (excès d'eau, de chaleur). Cette observation donne, à notre avis, l'explication de dégâts survenus lors de fumigations de semences dans des conditions pouvant favoriser de telles actions brutales ou des fermentations anormales rapidement destructrices.

Les remèdes à ces accidents : agir sur la dose de l'agent actif, et, mieux encore s'il est possible, le remplacer par un moins énergique -- modifier le taux d'humidité et la température, sont logiques, mais appliqués empiriquement. Nos travaux permettront de les utiliser scientifiquement et de déterminer l'ordre non moins important des opérations.

2° De graves désordres peuvent être provoqués par des produits actifs non toxiques ou moins toxiques à l'état de vapeurs, ou dont l'action à cet état est plus lente et plus faible, mis à l'état liquide en contact avec les végétaux ; ils déterminent, soit une plasmolyse intense et quasi instantanée, soit une dissolution.

Il en résulte des blocages définitifs des membranes cellulaires par dessiccation, par coagulation des protéines (1), ou par dissolution des liquides et imprégnation des parois voisines devenues imperméables de ce fait (2).

RETOUR SUR LA DIFFUSION

Toutes les observations qui précèdent ont fait ressortir que la diffusion des liquides ou des sucres cellulaires est la condition nécessaire au départ des fermentations diastasiques « in vivo ». Il devient opportun de réviser nos connaissances sur la plasmolyse consécutive à l'anesthésie, connaissances cependant bien profitables, puisque sans elles nous n'aurions pas entrepris nos travaux.

En effet, à la lumière de ceux-ci, s'il y a effectivement anesthésie, la plasmolyse ne nous paraît pas, par contre, être la cause exacte du phénomène.

Ce faisant, nous ne mettons pas en doute les hypothèses des auteurs classiques qui subsistent intégralement, mais nous nous permettons de substituer osmose et diffusion à plasmolyse, certains qu'ils le feraient eux-mêmes en présence des acquisitions nouvelles.

(1) C'est ainsi que la poudre de moutarde déshuilée par des solvants inhibiteurs de la myrosine est beaucoup moins active que celle déshuilée par pression ou par des solvants inactifs sur la myrosine.

(2) On a reproché à la farine de moutarde ordinaire d'être moins active que la farine déshuilée en raison de l'inhibition de la myrosine par l'huile. Nous croyons que le mécanisme réel de cette inhibition réside dans le blocage des membranes cellulaires par l'huile.

Ces dernières, alors que nous n'avons, pas plus que les auteurs précités, pu expliquer par la plasmolyse « comment le fait s'est produit », nous font l'attribuer à la diffusion pour les raisons exposées au cours de cette étude et que nous précisons ci-dessous.

Rappelons que la plasmolyse — selon DE VRIES (d'après J. DUCLAUX) — est la rétraction du protoplasme consécutive à la pénétration d'une solution hypertonique à travers les parois cellulaires. Dans ces conditions, la contraction du protoplasme est le résultat d'une déshydratation par osmose, mais non d'une perte de substance. En outre, le protoplasme ne mélange pas, du moins immédiatement, ses sucs au liquide hypertonique qui baigne la cellule.

Voyons ces hypothèses :

« On peut préparer les diastases par plasmolyse des tissus : des fragments de champignons, mis en présence de chloroforme, laissent écouler, par exsudation, un liquide riche en ferments » (G. BERTRAND, d'après A. GORIS, A. LIOT et André GORIS).

« Les cellules anesthésiées par le chloroforme, l'éther ou le chlorure d'éthyle, subissent la plasmolyse. Le protoplasme se trouve détaché de la membrane cellulaire, il est plus ou moins contracté, comme s'il y avait eu déshydratation. C'est au cours de cette rupture d'équilibre dans la cellule, au cours de cette déshydratation, que la substance fermentaire a rencontré la substance labile et a pu manifester son action ; nous ne pouvons savoir comment le fait s'est produit, mais la réaction est brutale, car on la constate immédiatement » (GUIGNARD, d'après A. GORIS, A. LIOT et André GORIS).

La première a trait à une action brutale sur les produits végétaux fraîchement récoltés, analogue à celles dues à la chaleur, au froid, ou encore mécaniques. On assiste à l'extravasation des sucs cellulaires, avec rétraction plus ou moins nette du protoplasme et remplacement, postérieur au phénomène et indépendant de celui-ci, plus ou moins complet des sucs cellulaires au sein du protoplasme par le liquide starter en excès ; or, ce dernier — chloroforme — n'est pas une solution hypertonique pouvant donner lieu à des échanges osmotiques.

Dans la deuxième, il n'y a même plus de liquide, mais seulement des vapeurs dont le condensat, parfois en quantité infime, sur les membranes ou dans les sucs cellulaires ne saurait constituer un liquide hypertonique.

Bien plus, certains starters sont des produits non seulement réputés non anesthésiques ou très peu, mais encore pratiquement insolubles dans les liquides aqueux, tout en présentant une activité assez forte. Nous avons constaté que la déshydratation s'oppose à la réali-

sation du phénomène. Il y a mélange des sucs cellulaires à l'intérieur même des tissus, vraisemblablement par double courant osmotique, si bien que la rétraction du protoplasme, lorsqu'elle est visible, ne peut être que la conséquence du phénomène et non sa cause.

Nous avons aussi noté dans le deuxième cas qu'il y avait au début du phénomène un temps d'arrêt (1) dont la cause peut être rapportée à l'inhibition temporaire des membranes, ou bien à la durée de leur pénétration par les vapeurs du starter, ou encore à celle de la dissolution de ces mêmes vapeurs dans les liquides cellulaires. Nous continuerons donc, quelle qu'en soit la cause exacte, à considérer ce temps d'arrêt comme la phase anesthésique des cellules.

Enfin, nous devons insister sur le fait qu'au début du phénomène les sucs cellulaires sont à l'optimum de concentration. A cet état, qui est vraisemblablement celui de coacervation, on ne sait pas exactement si la matière protoplasmique est dissoute ou précipitée, mais on sait que sa stabilité est précaire.

Pour toutes ces raisons, il était difficile de comprendre, surtout lorsque les liquides ne sont pas contenus dans la même cellule, comment la déshydratation et la rétraction du protoplasme peuvent permettre à ces liquides d'entrer en contact.

On ne pouvait pas davantage, par la plasmolyse seulement, se rendre compte de la cause déterminant le seuil d'action que nous venons de signaler et, surtout, l'action enzymatique intense qui lui fait suite.

Mais, lorsque l'on rapproche des données qui précèdent les faits constatés au cours de nos essais, en se rappelant qu'il y a eu succession dans les diverses parties des phénomènes observés, on peut concevoir que la matière protoplasmique peut prendre spontanément ou sous l'action d'une faible augmentation d'humidité — la forme dissoute ; puis qu'une influence exogène (2) — abaissement de la tension superficielle par exemple — peut provoquer le passage de ces solutions de vacuole à vacuole, de cellule à cellule, à travers les membranes qui les séparent, par « perméabilisation » de celles-ci.

Cette action, qui ne pourrait avoir lieu si, du fait du traitement subi (3), les membranes, le protoplasme et son contenu avaient été profondément altérés, n'est donc pas de la plasmolyse, mais bien de

(1) Ce temps d'arrêt est également fonction du taux d'hydratation des produits végétaux.

(2) Celle-ci est parfois inutile, mais alors la fermentation apparaît toujours dans un temps plus éloigné.

(3) Pour d'autres raisons que la déshydratation ; dans ce dernier cas, il faut au préalable réhydrater les tissus, si la limite de réversibilité n'a pas été atteinte.

la diffusion au fur et à mesure que se produit l'osmose à travers les membranes.

On arrive également à concevoir que les starters à l'état liquide, tels le chloroforme, puissent provoquer la même action dont le résultat visible est l'exsudation des sucres cellulaires lors du recueil des enzymes à partir de végétaux frais.

Nous pourrions conclure de ce retour sur la diffusion que l'arrêt momentané de toutes les manifestations biologiques paraît être un phénomène provoqué, en dehors d'autres causes, par des quantités relativement faibles des agents chimiques déclencheurs ; passé ce seuil, leur action sur les végétaux (1) s'exerce le plus généralement dans un sens favorable à la diffusion et à ses conséquences. Au delà d'un maximum, la cellule subit des modifications profondes et souvent définitives, résultant de l'effet toxique ou caustique.

RESULTATS

Les résultats obtenus au cours de ces expériences confirment l'hypothèse de l'existence de deux phases distinctes DECLenchement et TRAVAIL DIASTASIQUE dans le processus enzymatique « in vivo ».

Ils justifient notre classification des agents actifs sur les processus enzymatiques.

Ils confirment ou démontrent en outre les propositions suivantes.

Certaines fermentations peuvent s'amorcer naturellement. D'autres doivent être amorcées par action exogène. Le départ des unes et des autres peut être artificiellement déclenché par des agents extérieurs ne prenant pas part à la réaction, mais provoquant la diffusion des liquides réagissants ; ils sont dénommés STARTERS, c'est-à-dire que *leur unique rôle est de déclencher, d'amorcer ces réactions.*

Il existe des starters très différents. Les starters chimiques, qui n'en représentent qu'une fraction, sont eux-mêmes nombreux. Ils proviennent de toutes les familles ; *la propriété de starter n'a aucune relation avec la fonction chimique et ne peut être définie que par ses effets.* Ils sont plus réguliers, plus faciles à doser que tous les autres, et particulièrement commodes à manier sous forme de vapeurs, d'aérosols, de solutions ou de poudres.

(1) Nous n'avons relaté dans cet exposé que les réactions observées dans les tissus végétaux ; quelques faits nous donnent à penser que des conclusions semblables pourront être tirées, « mutatis mutandis », d'expériences sur les micro-organismes isolés (levures par exemple) et peut-être même sur les produits animaux.

Sous ces formes, ils permettent, sans toucher à l'armature cellulaire des végétaux, et par conséquent sans porter la plus légère atteinte à ceux-ci, de provoquer la diffusion des liquides intra- et intercellulaires, qui, sans leur intervention, ne pourraient dans de nombreux cas se mélanger.

La fermentation ainsi déclenchée *se poursuit après élimination du starter* si elle a été suffisamment amorcée.

Le départ des fermentations étant dû au contact du ferment et de la substance fermentescible par diffusion, le pouvoir accélérateur de déclenchement des starters peut être positif par modification de la tension superficielle et amélioration de la perméabilité des parois cellulaires ou d'organismes distincts (levures). Il peut être négatif directement par inhibition temporaire ou définitive de ces mêmes parois ou organismes, ou indirectement par suspension temporaire ou définitive de l'activité des microorganismes qui, normalement, détruiraient les cellules et libéreraient les substances réagissantes qu'elles contiennent.

Le pouvoir accélérateur des starters est donc positif ou négatif, avec possibilité d'inhibition temporaire ou définitive, suivant leur action sur les membranes cellulaires et les conditions d'emploi.

L'intensité de ce pouvoir est variable avec les agents actifs et, pour un même agent, avec la localisation des produits réagissants, sa sorption par ces produits et les conditions d'emploi. Il résulte de ce qui précède que certains starters peuvent paraître sélectifs, dans une certaine mesure tout au moins.

Lorsque plusieurs fermentations sont coexistantes, cas général, chacune d'elles, dans la mesure où leur différenciation et les conditions ci-dessus le permettent, prend le départ comme si elle se développait isolément de façon plus ou moins active ou ne le prend pas. Une conséquence de cet état de choses peut être la suppression réelle ou apparente de certaines fermentations ou le renversement de leur ordre naturel de départ. On peut même provoquer le développement de fermentations qui ne se produisent habituellement pas.

Le travail diastasique proprement dit peut, lui aussi, être influencé par des « activeurs » qui prennent part à la réaction biochimique indépendamment de toute autre action (1).

(1) Il est possible que des activeurs à fonctions déterminées puissent être employés et qu'à cette occasion des réactions énormes ou secondaires aient lieu ; ce sont des cas particuliers d'extension grâce aux enzymes qui peuvent catalyser ces réactions.

Le déclenchement et le travail diastasique sont, l'un et l'autre, « accélérés » par des agents chimiques, mécaniques ou physiques, en dehors d'actions pouvant rattacher ces derniers aux deux groupes précédents. Les accélérateurs ne prennent donc pas part au déclenchement et ne modifient chimiquement pas le milieu réactionnel.

De ce que des fermentations peuvent se poursuivre si lentement que leurs manifestations ne sont pas visibles, il résulte des états en apparence stables dans les conditions de l'observation ; ces états peuvent être différents pour un même végétal selon les agents employés et le mode d'action. L'activité de certains ferments peut reprendre si de nouvelles conditions d'ambiance le permettent.

La confusion qui existe actuellement dans nombre d'applications empiriques et méconnues des actions que nous avons expliquées entre « déclenchement » et « travail diastasique », ainsi qu'entre « starter », « activateur » et « accélérateur », doit disparaître et faire place à des règles précises destinées à améliorer ces applications.

RESUME

En résumé, laissant de côté les actions brutales telles que nous les avons définies, expliquées et notées en vue des applications ultérieures de nos recherches, nous avons expérimenté sur un doublet type et confirmé sur d'autres doublets l'action de nombreux agents chimiques.

Nous avons, ce faisant, mis en évidence que tout processus enzymatique dans le végétal à l'état de vie ralenti se compose de deux phases : le déclenchement d'abord, puis le travail diastasique proprement dit.

Nos recherches ont démontré que les produits chimiques en cause ont une influence spécifique sur le déclenchement du processus ; nous avons précisé leur mode d'action suivant les conditions d'emploi (quantité, ambiance), en faisant ressortir l'importance de l'humidité du végétal, et, de là, celle de la diffusion.

Enfin, dans certains cas où il pouvait y avoir doute entre fermentation bactérienne et processus enzymatique, il nous a été possible de lever définitivement ce doute en utilisant des starters antiseptiques qui annihilent les microorganismes avant de déclencher la réaction diastasique.

CONCLUSIONS

La diffusion étant le facteur essentiel des fermentations diastatiques « in vivo », son action peut être influencée par des produits chimiques indépendants de la réaction ; cette influence peut être favorisante, défavorisante ou inhibitrice.

Le travail diastatique reste sous la dépendance des conditions physiques et chimiques de la réaction.

L'emploi successif et raisonné des starters, des activateurs et des accélérateurs en fonction des fermentations considérées nous acquiert la maîtrise de ces processus « in vivo ».

APPLICATIONS

Les applications technologiques de ces principes, en tenant compte des remarques faites au cours de notre exposé, sont générales et très nombreuses.

Tous les cas possibles ne peuvent être recensés par une simple revue des industries agricoles ; certaines applications sont encore et resteront peut-être longtemps insoupçonnées ; mais, toutes les fois qu'il y a possibilité de fermentation diastatique, on peut supposer qu'il existe au moins un starter convenable correspondant, connu ou inconnu.

Pratiquement, pour déclencher artificiellement et conduire à son gré un processus diastatique dans les végétaux à l'état de vie résiduelle, il suffit d'effectuer les opérations suivantes :

Humidification, si le produit végétal ne contient pas naturellement le taux d'humidité nécessaire fixé par des essais préalables, en fonction de la vitesse désirée pour la fermentation (variable avec les produits et leur qualité) ;

Déclenchement, qui commence et se poursuit intensément sous l'action en profondeur du starter choisi, employé à la dose déterminée par les mêmes essais ;

Activation (facultative) par addition de l'activateur en quantité juste suffisante pour l'effet recherché. Cette opération est précédée, si la pratique l'exige, de l'évacuation du starter non fixé par le produit végétal ;

Maintien de la température correspondant à l'effet recherché, pendant le temps nécessaire à la fermentation. Ce temps est fonction de la vitesse désirée.

L'ordre ci-dessus des opérations n'est pas absolument obligatoire, mais seulement à préférer dans la plupart des cas.

Par exemple, lorsque certains starters mettent les substances réagissantes des produits végétaux en état de pouvoir diffuser dès la moindre humidification (broyage en poudre fine - sorption suffisante de starter chimique), rien ne s'oppose à l'interversion des opérations 1 et 2.

De même, si l'activeur et le starter n'ont aucun effet réciproque, on peut les ajouter simultanément.

Enfin, il n'y a pas d'inconvénient à amener le produit végétal à la température voulue dès le début des opérations.

Nous citerons comme déjà justiciables de la méthode :

l'élimination de l'acide cyanhydrique des amandes, grains, racines et tourteaux contenant des produits cyanogénétiques, élimination facilitée au maximum par l'emploi du procédé ; de même celle de l'acide sulfhydrique et de ses dérivés ;

la maturation artificielle du tabac que nous avons réalisée avec plein succès uniquement par diastases, dans un minimum de temps et à n'importe quelle époque ;

la préparation simple, régulière, homogène, du thé noir, du cacao, de la vanille ;

le vieillissement du café en peu de temps et dans les meilleures conditions de conservation ;

l'ensilage des fourrages uniquement par processus enzymatique, réalisé jusqu'ici par empirisme ;

la germination accélérée ;

le forçage chimique des plantes ;

la maturation artificielle des fruits ;

(pour ces trois dernières applications, il a déjà été proposé empiriquement des starters chimiques dans certains cas particuliers ; chacun de ceux-ci serait à réviser à la lumière des nouvelles données) ;

la production de certaines essences qui ne se développent qu'après récolte de la plante (essence d'amandes amères, d'iris, etc.) ;

et bien d'autres encore. Ainsi est-il plus que probable que la technique de la fumigation des semences (1) aura intérêt à tenir grand

(1) Proposition confirmée par note ci-après, présentée à l'Académie d'Agriculture depuis la rédaction du présent travail : Actions de la monochlorhydrine du glycol et du bromure de méthyle utilisés sous pression atmosphérique et sous vide partiel sur la période de vie latente et sur la germination des semences de pommes de terre (P. Frezal et G. Gerbinot, C.R. Acad. Agr. 1951, n° 15, p. 556).

compte de nos remarques. Il en sera de même pour les opérations du séchage des végétaux.

Prenons deux exemples qui, d'ores et déjà, s'imposent par leurs conséquences technologiques et leur importance commerciale.

1° On sait que l'on peut extraire l'huile d'amandes douces (huile de noyaux), soit des amandes amères, soit des noyaux d'abricots, soit de bien d'autres noyaux à amande cyanogénétique. Le meilleur procédé actuel consiste à broyer grossièrement ou à contuser les amandes, à les additionner de quatre à cinq fois leur volume d'eau que l'on change toutes les deux heures, à maintenir la masse à la température de 40 à 50° C. ; puis, après élimination de l'eau en excès, à procéder à l'extraction de l'huile comme de coutume.

La récupération éventuelle de l'essence et du gaz dégagés est pratiquement impossible, les volumes d'eau et la quantité de calories d'apport nécessaires sont importants.

En suivant nos directives, les amandes sont humidifiées par une quantité d'eau juste suffisante pour les gonfler, on fait agir un starter approprié, on l'évacue, on maintient à la température de 40 à 50° C. pendant la fermentation le volume par conséquent restreint de la masse ; puis, on distille sous vide, permettant ainsi la récupération des sous-produits ; on poursuit enfin l'extraction comme de coutume, absolument comme s'il s'agissait d'amandes douces.

2° La fermentation du tabac est encore empirique du fait que sa nature : microbienne - diastasique - ou catalytique, n'a pas été établie jusqu'ici d'une manière irréfutable : il a même été dit que le processus pourrait fort bien être de nature mixte.

Les procédés actuellement en usage ou proposés de la fermentation naturelle, de la fermentation dite « artificielle », de la fermentation dite « accélérée », de la fermentation des tabacs préréprouvés par divers moyens, etc., s'ils ont permis ou doivent permettre une fermentation acceptable quoique non régulière ni suffisamment homogène et parfois incomplète, n'ont pas apporté de démonstration convaincante en faveur de l'une quelconque des trois hypothèses.

On opère le plus généralement ainsi, suivant les procédés autres que la fermentation naturelle : on additionne le tabac stérilisé ou même non stérilisé de cultures bactériennes sélectionnées ou d'extraits

(1) Pour l'exemple choisi qui est celui des tabacs dits « noirs ». Du point de vue général, notons que, suivant le type, la qualité désirée et par suite selon les conditions opératoires, ce chauffage peut être inutile ou exclusivement endogène, en utilisant au mieux les calories dégagées par la fermentation, ou encore mixte par l'appoint d'un chauffage artificiel.

de tabac brut et on fait fermenter, ou bien on conditionne le tabac en lui ajoutant humidité et « activateur chimique » et l'on chauffe.

Ce que l'on a appelé « préparation du terrain pour l'action diastatique », n'a été ni mis en évidence d'une manière précise, ni démontré. Dans tous les cas, les opérations qui ne sont pas exactement connues ne peuvent être réellement conduites au gré de l'usager : la fermentation dure de 4 à 10 jours, quand elle veut bien « partir », et, quand elle part, on ne sait ni pourquoi, ni comment, ni combien de temps elle durera.

En suivant pour chaque opération les directives détaillées résultant de l'étude générale qui précède, nous avons pris du tabac, nous l'avons humidifié ; puis, nous avons fait agir en profondeur un starter fongicide, insecticide et microbicide, avec toutes les précautions en usage pour éviter un réensemencement.

Toujours avec les mêmes précautions, nous avons évacué le starter qui a été remplacé par un activateur d'oxydation — air ambiant suroxygéné (les autres réactions étant naturellement pourvues du nécessaire) ; enfin, nous avons chauffé uniformément la masse tout en maintenant l'humidité au taux fixé.

En deux jours au maximum de chauffage à 50/60° C., nous avons obtenu une maturation du tabac, parfaite de l'avis des spécialistes.

Remarquons que cette opération a pu être effectuée avec succès quelle que soit la durée écoulée entre la cueillette et le traitement, et que de tout aussi bons résultats ont été acquis sur des qualités qui, normalement, « ne partent pas ».

En utilisant pour déclencher la fermentation un starter microbicide éprouvé, avec toutes les précautions pouvant éviter un réensemencement microbien (le taux d'humidité étant d'autre part lui-même insuffisant pour permettre un développement microbien actif), nous avons éliminé toute possibilité de fermentation par microorganismes, ainsi que celle de sécrétion de diastases par ceux-ci. En opérant à température ne dépassant pas 60° C., nous avons éliminé la possibilité de catalyses purement chimiques.

Nous avons donc à la fois démontré que *l'ensemble des fermentations ayant pour résultat la maturation du tabac est uniquement de nature enzymatique*, que les réactions nécessaires partent et se développent à notre gré, à n'importe quelle époque, même dans des tabacs réputés infermentescibles, que nous les menons à bien en moins de deux jours, en évitant toutes les fermentations nuisibles.

Nous pouvons tout aussi bien, après avoir déclenché le processus, ne le laisser se poursuivre, puisqu'il se développe à notre gré, qu'avec

une vitesse correspondant au type désiré, comme par exemple la maturation en boucauts (Kentucky), ou celle en balles (Orient), mettant ainsi en évidence le rôle de l'oxygène intra-cellulaire.

Nous devons ajouter que la maturation obtenue est une phase active ; une phase ralentie lui fait suite comme cela a lieu dans tous les stocks, quel que soit le mode initial de fermentation. Cette phase se confond alors avec la phase ultime du processus de la vie résiduelle, naturelle et spontanée, des végétaux, dite encore végétation passive, qui se poursuit lentement jusqu'à disparition intégrale de tout phénomène vital dans les tissus végétaux.

BIBLIOGRAPHIE

- BARFA. Mesőgaz d. Kutat. t. XIII, n° 9, p. 266, 1940.
 G. CAPUS, F. LEULLIOT et E. FOEX. Le Tabac, 1929.
 M. CORMIER. Revue Internationale des Tabacs, n° 184, mai 1918.
 J. DUCLAUX. Traité de Chimie Physique Appliquée à la Biologie, 1938.
 W. G. FRANKENBURG. Advances in Enzymology, Vol. 6, p. 309, 1946.
 W. G. FRANKENBURG. Advances in Enzymology, Vol. 10, p. 325, 1950.
 A. GORIS, A. LIOT et André GORIS. Pharmacie galénique.
 C. E. GUTEMAN et R. M. SMOCK. Chimie et Industrie, Vol. 57, p. 87.
 KREBSER. Chimie et Industrie, Vol. 61, p. 254.
 A. L. LEPIGRE. Annales Industrie Agricole d'Algérie, t. II, Fasc. I, Nov. 1915, p. 6.
 A. L. LEPIGRE. Bull. Soc. Encour. p. l'Ind. Nation., août-oct. 1938, p. 367.
 MØLDE. Jørgøteren, t. L, n° 52, p. 57, 1941.
 E. PERUCCI. Il Tabacco, n° 581, déc. 1947.
 L. ROLLIN. Agricola, n° 136, déc. 1948.
 U. ROSSI. Il Tabacco, n° 577, août 1947.
 TALON. Chimie et Industrie, Vol. 57, p. 331.