

AU SUJET DES DÉGRADATIONS ET DES SYNTHÈSES EFFECTUÉES  
PAR *ESCHERICHIA COLI* NON PROLIFÉRANT

par

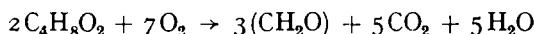
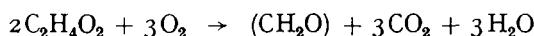
EUGÈNE AUBEL, MARIANNE GRUNBERG-MANAGO ET  
JEKISIEL SZULMAJSTER

*Institut de Biologie Physico-chimique, Paris (France)*

Un grand nombre de travaux ont été consacrés ces dernières années aux problèmes d'assimilation et de synthèse par les microorganismes hétérotrophes: *Bacterium alcaligenes faecalis*<sup>1</sup>, *Escherichia coli*<sup>1-6</sup>, *Azotobacter vinelandi*<sup>7</sup>, *Pseudomonas calco-acetica*, *Spirillum serpens*<sup>2-8</sup>, algues colorées<sup>8</sup>, levure<sup>9, 10</sup>.

Toutes ces recherches ont été faites en utilisant des méthodes manométriques et des suspensions lavées de microorganismes. Les auteurs ont remarqué que la quantité d'oxygène consommé et la quantité d'anhydride carbonique produit au cours de l'oxydation de différents substrats (tels que lactate, acétate, butyrate, glucose, glycérol) correspondent seulement aux  $\frac{2}{3}$  ou aux  $\frac{3}{4}$  des volumes nécessaires pour une oxydation complète. Ce phénomène serait dû à l'assimilation d'une partie du substrat. Les données obtenues par la consommation d'oxygène, la production d'anhydride carbonique et le quotient respiratoire indiquent que le matériel synthétisé a la formule empirique d'un hydrate de carbone  $(\text{HCHO})_n$ .

Ainsi, pour l'oxydation incomplète d'acide acétique et d'acide butyrique on aura respectivement:



WINZLER ET BAUMBERGER<sup>10</sup>, par des mesures de production de chaleur durant la fermentation alcoolique, ont montré en anaérobiose, un phénomène analogue pour la levure en présence de glucose. VAN NIEL ET ANDERSON<sup>11</sup> ont confirmé ce résultat en dosant l'anhydride carbonique produit au cours de la fermentation alcoolique.

Mais les méthodes manométriques seules n'apportent pas de données suffisantes pour indiquer les produits finaux qui sont formés par oxydation ou fermentation. C'est FROMAGEOT ET SAFAVI<sup>12</sup> qui, en 1939, par l'établissement des bilans des produits de la fermentation, ont montré, à l'aide des bactéries propioniques en croissance, l'existence d'une fermentation liée aux synthèses, fondamentalement différente de la fermentation indépendante obtenue à l'aide des masses bactériennes non-proliférantes. En 1943, PICKETT ET CLIFTON<sup>13, 14</sup>, dans un travail sur l'oxydation et l'assimilation par la levure, ont complété leurs expériences manométriques par des dosages chimiques. Ils confirment les résultats déjà obtenus, notamment qu'une suspension lavée de levure "non proliférante" n'est pas capable d'oxyder le glucose complètement.

Ils ont montré, de plus, qu'une partie du substrat (glucose) n'est pas brûlé complètement.

*Bibliographie p. 459/460.*

plètement ni assimilé par la levure, mais converti, au cours de l'oxydation, en produits intermédiaires (tels que glycérol, hexose diphosphate, alcool, acide acétique, acide succinique) non décelables par simple étude manométrique.

L'emploi d'inhibiteurs comme l'azoture de sodium et le 2,4-dinitrophénol permet de confirmer les résultats précédents. Quand ces poisons sont ajoutés à une concentration convenable aux suspensions, on retrouve la quantité théorique d'oxygène et d'anhydride carbonique correspondant à une oxydation complète du substrat. Ainsi, en présence d'azoture de sodium, le quotient respiratoire (QR) atteint la valeur théorique qui était beaucoup plus faible en son absence<sup>2, 3, 5, 6, 15</sup>. L'azoture de sodium à la concentration M/1000, peut inhiber également l'assimilation anaérobique du glucose par la levure sans interférer avec la fermentation<sup>16</sup>. REINER<sup>16</sup> et REINER ET SPIEGELMAN<sup>17</sup> confirment ces expériences. Mais le mécanisme d'action de l'azoture de sodium est encore très obscur, malgré quelques tentatives récentes d'explication<sup>18</sup>.

D'autre part, on n'a, pour toutes les expériences précédentes, aucune idée de la nature des corps synthétisés, en dehors de l'hypothèse, cadrant avec les bilans, d'un corps du type (HCHO). Or, depuis les travaux de WOOD ET WERKMAN<sup>19</sup>, de WERKMAN<sup>20</sup> et de KREBS ET EGGLESTON<sup>21</sup>, on sait que de l'anhydride carbonique peut se fixer sur les corps en C<sub>3</sub>, par suite échapper aux mesures manométriques et participer à des synthèses.

C'est ce qui nous a conduit au présent travail. Nous y montrons l'existence, au cours de la fermentation du glucose ou du pyruvate par une suspension lavée de *E. coli* non proliférante, de synthèse auxquelles participe l'anhydride carbonique, et nous déterminons la nature des produits formés. On verra que, dans nos conditions expérimentales, en outre, ces synthèses peuvent se faire et sont encore plus nettes en présence d'azoture de sodium.

Il faut insister ici, avant de passer à l'exposé des expériences, sur le fait qu'un produit synthétisé n'est pas forcément assimilé. On comprend ainsi que nous ayons pu mettre en évidence des synthèses effectuées par des suspensions bactériennes non proliférantes, sans qu'il s'en suive aucune augmentation de poids sec, ce qui n'était pas le cas dans les expériences de nombreux auteurs.

#### MÉTHODES ET TECHNIQUES

La souche de *E. coli* (souche M) employée provient de l'Institut Pasteur. Elle nous a été donnée par nos collègues J. MONOD ET A. LWOFF, que nous tenons à remercier. Le milieu de culture liquide employé était le suivant: Glucose 1 g, peptone "Byla" 1 g, PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>K<sub>2</sub> 0.2 g, eau distillée pour compléter à 100 ml.

La souche standard est maintenue sur un milieu gélosé contenant les mêmes substances, mais où l'eau est remplacée par de l'extrait de viande de bœuf. Elle est gardée à la glacière.

La suspension bactérienne utilisée dans nos expériences provient de cultures de 16 heures à l'air à 37° sur le milieu liquide cité\*. (Pour 100 ml de milieu on a environ 25 mg de poids sec). Après centrifugation, les bactéries sont lavées une fois avec du chlorure de sodium à 0.9%, puis remises en suspension dans la solution de chlorure de sodium. On y fait passer, comme l'a recommandé QUASTEL, pendant 3/4 d'heure, à l'abri de la lumière, un courant d'air pour brûler les réserves endogènes. Dans les expériences avec inhibiteur, celui-ci est ajouté à la suspension juste avant le passage de l'air. On a ainsi un contact préalable de la suspension avec l'inhibiteur qui réduit les erreurs éventuelles dues à la perméabilité. On recentrifuge ensuite les bactéries et on les met en suspension dans un tampon de phosphate M/15, pH 6.8. Cette suspension est faite immédiatement avant chaque expérience.

\* On ensemence toujours largement (2 ml pour 100 ml) à partir de cultures âgées de 6 heures, en milieu liquide de même composition.

Chaque ballon d'expérience contient: la suspension bactérienne (5 ml) que l'on ajoute au tampon phosphate M/15 pH 6.8 et au substrat, stérilisé à part dans l'eau distillée et neutralisée, s'il y a lieu. Le volume total est de 100 ml. Les conditions d'asepsie sont strictement observées au cours des différentes opérations.

Les ballons sont mis à l'étuve à 37° pendant 22 heures. Au bout de ce temps on réajuste à 100 ml.

Les conditions d'aérobiose ou d'anaérobiose ont été observées très strictement. L'aérobiose était assurée, soit par passage d'air stérile, soit par agitation dans le thermostat à 37°. Si on laisse simplement le milieu avec la suspension bactérienne à l'étuve sans agitation, il s'établit très vite des conditions de semi-anaérobiose, faussant complètement les résultats. Dans le cas de l'anaérobiose, le milieu est désaéré préalablement par ébullition à l'autoclave ouvert et refroidi, sans agitation. Le vide est fait au moyen d'une pompe à huile, qui donne une pression d'air résiduel de 0.1 mm de mercure. Il reste en général, dans nos milieux, de 0.9 à 1.8 ml d'azote pour un volume de 300 ml du ballon. Nous avons remarqué que le métabolisme varie d'une façon très sensible si on laisse dans le milieu plus de 3 à 5% d'air.

Afin de saisir les produits intermédiaires, nous n'avons jamais travaillé jusqu'à épuisement du substrat, qui est toujours en léger excès.

La densité bactérienne a été évaluée par opacimétrie, à l'électrophotomètre de Meunier avec écran bleu; on prélevait 2 ml de culture que l'on complétait à 5 ml avec de l'eau distillée. Parfois aussi, et à titre de recouplement, on a déterminé le poids sec des bactéries mises en expériences: 20 mg correspondent à une "opacité" de 112 divisions au photomètre.

Pour les dosages, le milieu est centrifugé à 13000 tours pendant 15 minutes; les prélèvements sont faits sur le liquide surnageant.

Naturellement, l'opacité et les dosages initiaux ont été effectués à part, dans les mêmes conditions.

Les sucres réducteurs ont été dosés par la méthode de HAGEDORN ET JENSEN<sup>22</sup>; l'acide lactique par celle de FRIEDEMANN<sup>23</sup>, à l'aide de l'appareil de FUCHS<sup>24</sup>; l'acide pyruvique par celle de WARBURG<sup>25, 26</sup> à la carboxylase; l'acide succinique et l'acide fumarique par celle de KREBS<sup>27, 28</sup> à la succinodéshydrogénase.

L'alcool éthylique est dosé par la méthode de NICLOUX<sup>29</sup>. On prélève une prise distincte de la solution à doser et on fait, dans un appareil rodé, deux distillations successives pour éliminer toutes substances réductrices gênant le dosage. On distille tout d'abord en milieu acide les  $\frac{3}{4}$  de la prise, puis le distillat est complété au volume de la prise initiale avec de l'eau bidistillée bouillie, et on redistille à nouveau les  $\frac{3}{4}$  du volume, en milieu alcalin. Le dosage est fait sur ce dernier distillat.

Le dosage des acides volatils est fait sur une prise distincte, dans un appareil rodé, par entraînement à la vapeur d'eau. La distillation est faite en atmosphère d'azote pour éviter la formation et l'entraînement de traces d'acides volatils provenant de l'oxydation d'impuretés présentes dans le milieu. Cette précaution s'est avérée indispensable. Sur le distillat ainsi obtenu, on dose l'acidité volatile totale, en prenant la précaution d'éliminer l'anhydride carbonique présent. L'acide formique est dosé par la méthode au calomel<sup>30</sup>; l'acide acétique est obtenu par différence. Le dosage de l'anhydride carbonique a été fait de la manière suivante:

*Aérobiose:* L'anhydride carbonique dégagé au cours de l'expérience est déplacé par un courant d'air privé d'anhydride carbonique, et recueilli dans la soude à 10% décarbonatée; il est ensuite dosé par la méthode de DENIGÈS<sup>31</sup>.

*Anaérobiose:* a) Dans certaines expériences, on a voulu absorber l'anhydride carbonique produit au cours de la fermentation. Dans ce but, on a soudé au fond du ballon une cupule de 6 cm de haut et de 2 cm de diamètre environ. 2 ml de soude décarbonatée à 10% sont ajoutés dans cette cupule juste avant le vide. A la fin de l'expérience, on préleve quantitativement la soude dans une fiole jaugée. Le dosage est fait sur une prise par la méthode de DENIGÈS<sup>31\*</sup>. b) Dans toutes les autres

\* La rétention éventuelle de l'anhydride carbonique dans le milieu est mesurée sur une prise, dans l'appareil de Warburg, par déplacement avec de l'acide sulfurique 5 N.

expériences, le dosage était fait par extraction des gaz totaux. Une analyse préliminaire par absorption du mélange du gaz sur gel de silice refroidi à  $-192^{\circ}$ , a montré que la teneur en méthane était inférieure à 1 %; la séparation des constituants de ce mélange par l'air liquide ne se justifiait donc pas. La technique utilisée a été la suivante: 1. Le ballon d'expérience est fixé par son rodage à une trompe à mercure sans joints de nature organique (trompe Delaplace); on fait le vide complet, on ouvre ensuite le robinet et on extrait la totalité des gaz. Ces gaz, recueillis dans une éprouvette, sont mesurés sur la cuve à mercure. 2. Après la mesure du volume total extrait, on laisse les gaz en contact avec quelques pastilles de potasse, jusqu'à volume constant, pour absorber la totalité de l'anhydride carbonique. La différence des valeurs mesurées donne l'anhydride carbonique total. 3. On prend alors 1 ml environ du gaz restant, mesuré dans des jauge de précision au centième (lecture au contact) et on procède comme suit à l'analyse:

Les traces d'oxygène libre sont mesurées préalablement par absorption au pyrogallate de potasse faite *in situ* dans un tube à essais qui sert sur la cuve à mercure de tube d'absorption. Le gaz restant est alors analysé par la technique classique eurométrique, l'oxygène ajouté étant préparé par décomposition dans le vide du permanganate de potassium et passage dans l'air liquide. Le gaz résiduel donne l'azote. La méthode est extrêmement précise: les erreurs sont de l'ordre de 0.2-0.3 %.

Nous avons travaillé, comme il a été dit précédemment, avec des bactéries non proliférantes; il n'y avait donc aucune augmentation de poids, mais plutôt, au contraire, légère autolyse. Pour réduire au maximum les causes d'erreurs dues à l'autolyse des bactéries, nous avons essayé de réduire le temps des expériences. Au bout des 6 premières heures, il ne se produit aucune autolyse en présence du substrat, mais dans ce laps de temps la consommation en substrat est faible et les erreurs qu'on peut faire sur les dosages des petites quantités de produits formés peuvent s'accumuler et devenir non négligeables. Par contre, au bout de 22 heures, la consommation du substrat atteint environ 150 mg et l'autolyse est faible. Pour éliminer au maximum les erreurs dues même à une faible autolyse, nous avons fait des expériences témoins. Celles-ci étaient réalisées, au début, dans les mêmes conditions expérimentales, mais sans substrat. Mais dans ce cas là, l'autolyse est nettement plus forte que dans les expériences avec substrat. Elle se produit déjà 2 heures après la mise en route et on obtient une très forte quantité d'acide acétique et d'alcool dont l'origine reste pour le moment inexpliquée. Ainsi, sans substrat, le métabolisme bactérien est complètement changé; ce n'est donc plus une véritable expérience témoin. Nous avons été amenés à faire ces témoins en laissant les bactéries dans le tampon phosphate  $p_H$  6.8 simplement pendant une heure. A ce moment, la densité optique est sensiblement la même qu'à la fin des expériences. Les dosages des témoins sont faits, après centrifugation, sur le liquide surnageant, et les chiffres trouvés sont retranchés de ceux de l'expérience.

Nous avons exposé en détail les techniques que nous avons employées, car les bilans peuvent varier d'expériences en expériences suivant la souche, la quantité de bactéries, la quantité de substrat utilisé, la durée des expériences, le degré d'aérobiose ou d'anaérobiose. Mais par une standardisation stricte des conditions expérimentales, on arrive à avoir des bilans relativement très constants.

#### RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Dans les premières expériences, on a étudié les produits obtenus lors de la fermentation du glucose dans les conditions normales énoncées précédemment. Le dosage des gaz a été fait par extraction. Les bilans obtenus sont donnés dans le Tableau I, en mg et en % de carbone.

Suivant le schéma classique de HARDEN<sup>32</sup>, on devrait trouver une quantité équimoléculaire de corps en  $C_1$  et de corps en  $C_2$ :

TABLEAU I  
ACTION DE *E. COLI* SUR LE GLUCOSE EN ANAÉROBIOSE

Concentration du glucose 0.02 M  
Tous les chiffres sont calculés en carbone

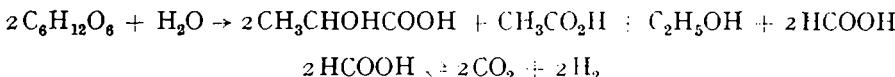
Expérience:	a	b	c*	d*	e
Opacité: initiale	112	75	59	63	100
finale	94	56	30	39	85
Glucose disparu (mg)	48.6	41	26	34	67.4
Produits formés	mg	%	mg	%	mg
Acide succinique	2.3	4.8	3.0	7.3	0.75
Acide lactique	8.8	18.1	10.9	26.5	4.63
Acide pyruvique	1.2	2.5	1.5	3.7	0.78
Alcool	10.7	22	6.6	16.2	4.85
Acide acétique	20.8	41.5	12.4	30.4	12.3
Acide formique	traces		1.0	2.5	1.11
Anhydride carbonique	4.9	10.1	10.2	11.6	2.6
Méthane	0.05	0.1	0.03	0.08	0
Carbone retrouvé	—	99.1	—	95.8	—
Hydrogène en ml pour 100 mg de carbone du glucose disparu	21.4		21.4	—	21.5
Azote résiduel (ml)	1.23		0.81	—	1.17
Oxygène résiduel (ml)	0		0	—	0.58

\* Autolyse notable

TABLEAU II  
ACTION DE *E. COLI* SUR LE PYRUVATE DE SODIUM EN ANAÉROBIOSE  
Concentration du pyruvate 0.025  
Tous les chiffres sont calculés en carbone

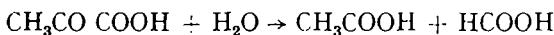
Expérience :	f	g*	h*	i*	k
Opacité: initiale	110	83	94.5	94.5	165
finale	98	61	73	73	149
Pyruvate disparu (mg)	79.2	77.7	67.4	67.4	72
Produits formés	mg	%	mg	%	mg
Acide succinique	1.43	1.8	3.9	5	traces
Acide lactique	1.39	1.75	2.61	3.4	1.49
Alcools	0	0	0	0	0
Acide acétique	57.6	72.8	58.2	74.6	53.6
Acide formique	8.55	11	7.8	10	5.05
Anhydride carbonique	9.85	12.45	23.45	20	10.5
Carbonat retrouvé	—	99.8	—	103	—
Hydrogène en ml pour 100 mg de carbone du glucose disparu		non dosé		104.1	—
Azote résiduel (ml)		1.32			non dosé
Oxygène résiduel (ml)					1.32
					0.24

\* Autolyse notable



ce qui donne deux atomes de carbone correspondant à l'anhydride carbonique pour quatre atomes de carbone correspondant à l'alcool et à l'acide acétique.

On sait, d'autre part, que l'origine de l'acide acétique est expliquée par la réaction:



Or, ceci ne correspond pas du tout aux chiffres du Tableau I. Dans l'expérience *a* par exemple, on devrait, pour 63.5 de C de corps en  $\text{C}_2$ , avoir  $63.5 : 2 = 31.75$  de C de corps en  $\text{C}_1$ ; or, on en obtient 10.2, soit 36% environ de la valeur calculée. En faisant le même calcul pour les autres expériences, on ne retrouve que: 58.5% (expérience *b*), 39% (expérience *c*), 42.3% (expérience *d*), 61% (expérience *e*).

On voit donc qu'il y a toujours un grand écart entre les valeurs théoriques d'anhydride carbonique calculées par rapport aux corps en  $\text{C}_2$  et les valeurs trouvées.

Nous avons répété les mêmes expériences en prenant le pyruvate comme substrat. Les résultats sont donnés par le Tableau II. Les calculs précédents pour le rapport *anhydride carbonique trouvé/anhydride carbonique théorique* (l'anhydride carbonique théorique étant égal à 2 (*somme des corps en  $\text{C}_1$ /somme des corps en  $\text{C}_2$* )) donnent: 65.6% (expérience *f*), 57% (expérience *g*), 58% (expérience *h*), 62% (expérience *i*), 59% (expérience *k*).

Ici, l'écart que nous avons remarqué avec le glucose entre l'anhydride carbonique trouvé et l'anhydride carbonique théorique, se produit également, mais le pourcentage d'anhydride carbonique trouvé par rapport à la valeur théorique est plus fort que lorsqu'on ajoute du glucose comme substrat.

L'examen des bilans montre donc un déficit d'anhydride carbonique. On y constate aussi un déficit parallèle d'hydrogène. Il convient de rechercher la signification de ce phénomène.

Puisque, suivant SPIEGELMAN<sup>18</sup>, CLIFTON<sup>2, 3</sup> et WINZLER<sup>15</sup>, l'azoture de sodium empêche l'assimilation et les synthèses, il était logique de refaire ces mêmes expériences en présence d'azoture de sodium. Les résultats sont donnés dans le Tableau III.

Les résultats de ce tableau montrent la diminution de l'anhydride carbonique et de l'hydrogène en présence d'azoture de sodium, ce qui confirme les résultats déjà obtenus par différents auteurs\*. La diminution de l'anhydride carbonique (expérience *m*, Tableau III) par rapport aux bactéries sans azoture de sodium (expérience *e*, Tableau I) est de 78% et celle de l'hydrogène de 99%. Les expériences *b* et *e* du Tableau I et l'expérience *m* du Tableau III sont faites dans les mêmes conditions avec la même suspension. La diminution des deux gaz est du même ordre dans les différents bilans, même si on abaisse la concentration en azoture de sodium à M/800 et M/1600. Mais il ne faut pas confondre la diminution de l'anhydride carbonique et de l'hydrogène avec l'inhibition de la fermentation. En présence d'azoture de sodium, la fermentation est caractérisée par une augmentation d'acide lactique et, d'autre part, nous voyons que le déficit en anhydride carbonique est beaucoup plus grand qu'en l'absence d'azoture. En effet, le pourcentage de l'anhydride carbonique trouvé par rapport à l'anhydride carbonique théorique, est, dans les deux expériences du Tableau III, de 15%. Ces valeurs

\* Remarquons aussi que l'azoture de sodium diminue l'autolyse; il doit agir, probablement, sur les fermentes protéolytiques.

TABLEAU III

ACTION DE *E. COLI* SUR LE GLUCOSE EN ANAÉROBIOSE ET EN PRÉSENCE D'AZOTURE DE SODIUM  
 Concentration de l'azoture de sodium  
 Concentration du glucose 0.02 M  
 Tous les chiffres sont calculés en carbone

Expérience :	1		m	
<i>Opacité</i> : initiale finale	119 112		100 96	
Glucose disparu (mg)	87.4		55.4	
Produits formés	mg	%	mg	%
Ac. succinique . . . . .	traces		0.29	0.54
Ac. lactique . . . . .	53	60.6	34.9	63
Ac. pyruvique . . . . .	2.54	2.9	1.09	1.97
Alcools . . . . .	10.7	12.3	5.57	10.05
Ac. acétique . . . . .	22.4	25.6 } 37.9	14.28	25.8 } 35.85
Ac. formique . . . . .	1.1	1.26	traces	
Anhydride carbonique . . . . .	1.38	1.58 } 2.84	1.435	2.6 } 2.6
Méthane . . . . .	0	0	0	
Carbone retrouvé . . . . .	—	103.64	—	103.96
Hydrogène en ml pour 100 mg de carbone du glucose disparu		0.64		1.9
Azote résiduel (ml) . . . . .		non dosé		0.42
Oxygène résiduel (ml) . . . . .		non dosé		0.06

sont beaucoup plus faibles que celles que l'on observe dans les expériences sans azoture de sodium\*.

Les mêmes expériences ont été répétées en remplaçant le glucose par le pyruvate. Mais ce dernier est mal attaqué en anaérobiose en présence d'azoture de sodium; l'autolyse était très forte, ce qui faussait les bilans.

Nous avons refait les mêmes expériences à l'air. Les résultats sont donnés dans le Tableau IV.

D'après les chiffres, nous voyons qu'à l'air, en présence ou en l'absence d'azoture, avec le glucose ou le pyruvate comme substrat, le pourcentage d'anhydride carbonique par rapport aux corps en C<sub>2</sub> est, aux erreurs d'expérience près, celui qu'on devrait obtenir théoriquement. D'autre part, à l'air, il y a une augmentation d'acide pyruvique en présence d'azoture et la consommation du substrat est toujours augmentée.

L'ensemble des résultats des expériences précédentes s'explique si l'on admet 1. qu'en anaérobiose, en présence ou en absence d'azoture de sodium, une partie du gaz carbonique et de l'hydrogène est réutilisée pour des synthèses, tandis qu'à l'air ces synthèses sont supprimées dans les deux cas; 2. que l'azoture de sodium n'inhibe pas plus la respiration que la fermentation de *E. coli*; dans le premier cas, il y a augmentation d'acide pyruvique, dans le second cas, d'acide lactique.

Il reste donc à savoir ce que devient l'anhydride carbonique en anaérobiose. La première idée qui vient à l'esprit, c'est que, suivant WERKMAN ET WOOD<sup>19, 20</sup>, l'anhydride carbonique se combine à un corps en C<sub>3</sub> en donnant l'acide succinique qui, à son

\* Nous nous sommes assurés qu'il ne s'agit pas d'une mutation, ni d'une adaptation de *E. coli* à l'azoture de sodium, en repiquant les bactéries sur un milieu contenant l'azoture.

## TABLEAU IV

ACTIONS COMPARÉES DE *E. COLI* SUR LE GLUCOSE ET LE PYRUVATE EN AÉROBIOSE, EN PRÉSENCE ET EN ABSENCE D'AZOTURE DE SODIUM

Concentration du glucose 0.02 M

Concentration du pyruvate 0.025 M

Concentration de l'azoture de sodium 0.003 M

Tous les chiffres sont calculés en carbone

Expérience :	n glucose seul	o glucose + azoture	p pyruvate seul	q pyruvate + azoture
Opacité: initiale finale	111.5 93	111.5 97	115.5 107	115.5 104
Substrat disparu (mg)	70.6	121.2	43.8	71.5
Produits formés	mg	%	mg	%
Acide succinique	2.84	4	0	0
Acide lactique	4.25	6	8.13	6.7
Acide pyruvique	18.97	27	49.9	41
Alcool	0	0	0	—
Acide acétique	28.96	41	46.2	38.1
Acide formique	0	0	0	0
Anhydride carbonique	14.1	20	21.8	18
Carbone retrouvé		98	103.8	94.94
				87.88

tour, se décomposeraient en donnant deux molécules d'acide acétique suivant la réaction étudiée par SLADE ET WERKMAN<sup>33</sup> sur *Aerobacter indologenes*



ce qui expliquerait l'excès d'acide acétique par rapport à l'anhydride carbonique et l'excès d'acide par rapport à l'alcool qui, suivant l'équation de HARDEN<sup>32</sup>, devrait être en proportion équimoléculaire.

Pour vérifier cette réaction sur *E. coli*, nous avons refait nos expériences en anaérobiose, en prenant comme substrat l'acide succinique.

Le Tableau V montre que l'acide succinique se dégrade faiblement en anaérobiose en donnant l'acide fumarique, un pourcentage assez grand de corps en C<sub>2</sub> et presque pas d'anhydride carbonique, ni d'hydrogène; l'hydrogène provenant de la transformation d'acide succinique en acide fumarique a donc été utilisé probablement suivant la réaction de SLADE ET WERKMAN<sup>33</sup>.

On peut alors penser que l'augmentation de corps en C<sub>2</sub> par rapport aux corps en C<sub>1</sub> observée dans nos premières expériences en anaérobiose, provient de la scission d'acide succinique. Mais il faut noter que les expériences faites avec l'acide succinique comme substrat ne sont pas concluantes, car peu de substrat a disparu et on observe toujours, comme dans le bilan du Tableau V, une forte autolyse. Or, dans ce cas, comme nous l'avons déjà souligné, une grande partie de l'acide acétique pourrait provenir de l'autolyse.

Pour déterminer la quantité d'acide acétique qui provient de la scission du succinate, nous avons répété ces mêmes expériences en ajoutant un inhibiteur comme le

TABLEAU V  
ACTION DE *E. COLI* SUR L'ACIDE SUCCINIQUE EN ANAÉROBIOSE

Concentration de l'acide succinique 0.07 M  
Tous les chiffres sont calculés en carbone

Expérience :	r
Opacité: initiale finale	112 56
Succinate disparu (mg)	18.5
Produits formés	mg %
Acide lactique . . . . .	0 0
Acide pyruvique . . . . .	0 0
Alcool . . . . .	0 0
Acide acétique . . . . .	12.7 69
Acide formique . . . . .	0.16 0.86
Anhydride carbonique . . . . .	0.33 1.73
Acide fumarique . . . . .	7.28 39.4
Carbone retrouvé . . . . .	110.99
Hydrogène en ml pour 100 mg de carbone du succinate disparu	0
Azote résiduel (ml) . . . . .	1.82
Oxygène résiduel (ml) . . . . .	0.18
Autolyse notable	

malonate. Mais ces expériences se sont avérées impossibles, l'autolyse étant beaucoup plus forte, les conditions expérimentales deviennent complètement différentes. Nous avons ajouté aussi un pourcentage faible de glucose au succinate, mais sans résultats concluants; néanmoins, les expériences avec succinate donnent une indication en faveur de la scission d'acide succinique en acide acétique. Nous avons essayé aussi de prendre comme substrat un autre diacide en C<sub>4</sub>, le malate, mais il n'a pas été du tout attaqué par *E. coli* dans nos conditions expérimentales.

Il était donc indispensable de recouper nos résultats par une autre méthode afin de voir l'influence directe de l'anhydride carbonique sur la fermentation. Dans ce but, nous avons absorbé l'anhydride carbonique dans les ballons d'expériences avec la technique décrite au début en présence et en absence d'azoture de sodium. Si notre raisonnement est exact, nous devrons trouver l'anhydride carbonique théorique correspondant aux corps en C<sub>2</sub> dont le pourcentage doit diminuer. Les expériences e (Tableau I), m (Tableau III), e' et m' (Tableau VI) ont été faites avec une même suspension bactérienne dans des conditions expérimentales identiques. Dans le Tableau VII, on a reproduit les moyennes de 7 expériences (le substrat utilisé était toujours le glucose).

On voit immédiatement que le métabolisme est différent en présence ou en l'absence d'anhydride carbonique (ceci attire l'attention sur les erreurs qu'on peut faire pour la détermination des rapports *anhydride carbonique/hydrogène* dans l'appareil de Warburg en calculant l'anhydride carbonique, comme il est souvent admis, par la méthode directe). Les différences s'expriment surtout par l'augmentation de l'anhydride carbonique et la diminution d'acide lactique quand on absorbe l'anhydride carbonique. Pour

TABLEAU VI

ACTION DE *E. COLI* SUR LE GLUCOSE EN ANAÉROBIOSE EN ABSENCE D'ANHYDRIDE CARBONIQUE, AVEC OU SANS AZOTURE DE SODIUM

Concentration en glucose: 0.02 M

Concentration en azoture: 0.003 M

CO<sub>2</sub> absorbé au fur et à mesure de sa production

Expérience:	e'		m'
Opacité: initiale finale	100 80		100 95
Glucose disparu (mg)	67.4		62.6
Produits formés	mg	%	mg
Acide succinique . . . . .	5.5	8.16	0
Acide lactique . . . . .	8.07	12	28.8
Acide pyruvique . . . . .	2.39	3.56	3.2
Alcool . . . . .	15.85	23.5	7.79
Acide acétique . . . . .	18.78	27.8	18.7
Acide formique . . . . .	traces	51.3	traces
Anhydride carbonique . . . . .	14.2	21	5.74
Carbone retrouvé . . . . .	—	96.02	102.55
Hydrogène en ml pour 100 mg de carbone du glucose disparu		non dosé	non dosé

les bactéries sans inhibiteur, diminution de 51% d'acide lactique, quantité d'anhydride carbonique environ doublée; pour les bactéries en présence d'azoture, diminution de 15% d'acide lactique, quantité d'anhydride carbonique environ quadruplée. Quand on absorbe l'anhydride carbonique, on observe dans le cas des bactéries sans inhibiteur une légère diminution de corps en C<sub>2</sub>; en présence d'azoture, la proportion des corps en C<sub>2</sub> reste la même avec ou sans absorption du gaz carbonique.

Ainsi, nous voyons d'après les résultats des Tableaux VI et VII qu'avec les bactéries sans inhibiteur, lorsqu'on absorbe le gaz carbonique nous retrouvons les pourcentages théoriques d'anhydride carbonique correspondant aux corps en C<sub>2</sub>, mais, contrairement à ce que l'on attendait, ceci est dû, non pas à une diminution de corps en C<sub>2</sub>, mais à une grande augmentation de l'anhydride carbonique.

Or, si seule était en cause la synthèse d'acide succinique\* à partir d'un corps en C<sub>3</sub> par fixation d'anhydride carbonique et ensuite décomposition en deux corps en C<sub>2</sub>, on devrait observer, dans les expériences avec absorption, une augmentation d'acide lactique et d'anhydride carbonique correspondante et parallèlement une forte diminution de corps en C<sub>2</sub>.

Il faut donc admettre qu'à côté de la réaction de WERKMAN, il y a un autre mode d'utilisation de l'anhydride carbonique par sa fixation sur un corps en C<sub>2</sub> avec formation de corps en C<sub>3</sub>, l'absorption de l'anhydride carbonique empêchant les deux catégories de synthèses. En outre, la quantité d'anhydride carbonique utilisée pour former une partie de l'acide lactique doit être plus grande que celle qui aboutit à la formation d'acide

\* Les pourcentages d'acide succinique sont environ les mêmes avec ou sans absorption d'anhydride carbonique, donc, une partie de l'acide succinique, comme nous l'avons déjà dit, doit provenir, suivant la réaction de SLADE ET WERKMAN, de la condensation de deux molécules d'acide acétique.

## TABLEAU VII

ACTION DE *E. COLI* SUR LE GLUCOSE EN ANAÉROBIOSE, EN PRÉSENCE OU EN ABSENCE D'ANHYDRIDE CARBONIQUE, AVEC OU SANS AZOTURE DE SODIUM. MOYENNE DE 7 EXPÉRIENCES

Concentration en glucose: 0.02 M

Concentration en azoture: 0.003 M

Tous les chiffres sont calculés en % de carbone. pH final 6.8

Produits formés calculés pour 100 mg de carbone du glucose disparu	Sans azoture		Avec azoture	
	CO <sub>2</sub> non absorbé	CO <sub>2</sub> absorbé	CO <sub>2</sub> non absorbé	CO <sub>2</sub> absorbé
Ac. succinique	4.9	5.5	traces	traces
Acide lactique	22.63	11	61	51.8
Acide pyruvique	1.71	1.37	4.59	5.27
Alcools	19.85 } 55.95	18.4 } 51.4	9.8 } 37	12.1 } 40.2
Acide acétique	36.1	33	27.2	28.1 } 40.2
Acide formique	1.97 } 12.79	0. } 26.8	1.36 } 2.87	2.07 } 10.64
Anhydride carbonique	10.82 }	26.8 }	1.51 }	8.57 }
Carbone retrouvé	97.98	96.07	105.46	107.91
Hydrogène (ml)	22	non dosé	1	non dosé

succinique. Dans ce cas, en absorbant le gaz carbonique, on doit diminuer la quantité d'acide lactique, ce qui est en accord avec nos expériences, tandis que les corps en C<sub>2</sub> ne doivent diminuer que légèrement. En effet, la diminution des corps en C<sub>2</sub>, qui aurait dû se produire par suite de la réaction de SLADE ET WERKMAN, se trouve compensée par la non-formation de corps en C<sub>3</sub> à partir de corps en C<sub>2</sub>. Nous voyons que l'anhydride carbonique mesuré au cours d'une fermentation normale du glucose ne correspond qu'à 40% environ de l'anhydride carbonique total dégagé par les bactéries, et trouvé par absorption. Les 60% d'anhydride carbonique restant sont utilisés pour les deux sortes de synthèses que nous avons indiquées: formation de corps en C<sub>3</sub> et de corps en C<sub>4</sub>.

En présence d'azoture de sodium, quand on absorbe le gaz carbonique, on observe, comme nous l'avons déjà noté, une diminution d'acide lactique, le pourcentage des corps en C<sub>2</sub> restant environ le même. Il y a également une très forte augmentation de l'anhydride carbonique par rapport au témoin avec azoture et sans absorption. Mais on ne retrouve pas, cependant, la quantité d'anhydride carbonique correspondant aux corps en C<sub>2</sub>. C'est peut-être une question de vitesse de réaction. En présence d'azoture, les synthèses se feraient plus vite que l'anhydride carbonique ne serait absorbé et il est impossible d'empêcher la totalité des synthèses. Nous avons vu, en effet, dans nos expériences initiales, qu'en présence d'azoture, les synthèses par fixation d'anhydride carbonique sont plus grandes, puisqu'on ne retrouve que 15% de l'anhydride carbonique théorique. Il faut également noter qu'en présence d'azoture, nous obtenons en général des bilans supérieurs à 100, quoique l'autolyse soit toujours très faible; peut-être l'azoture permet-il l'utilisation d'une source de carbone contenue dans les bactéries elles-mêmes. Ceci reste à étudier.

Nous avons essayé de démontrer directement la possibilité de la fixation d'anhydride carbonique sur les corps en C<sub>2</sub> en mettant les bactéries en présence d'acétate ou d'alcool et d'anhydride carbonique. UTTER, LIPMANN ET WERKMAN<sup>34</sup> et LIPMANN ET TUTTLE<sup>35</sup> avaient pu mettre en évidence la formation d'acide pyruvique à partir

TABLEAU VIII

ACTION DE *E. COLI* SUR L'ACÉTATE, EN ANAÉROBIOSE, EN PRÉSENCE OU EN ABSENCE D'ANHYDRIDE CARBONIQUE, AVEC OU SANS AZOTURE DE SODIUM. MOYENNE DE CINQ EXPÉRIENCES

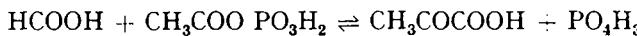
Concentration du glucose: 0.02 M

Concentration de l'azoture de sodium: 0.003 M

pH = 6.9

	Sans CO <sub>2</sub>		Avec CO <sub>2</sub> (atmosphère de N <sub>2</sub> + 5% CO <sub>2</sub> , solution de bicarbonate 0.005 M)	
	Sans azoture	Avec azoture	Sans azoture	Avec azoture
<i>Opacité: initiale finale</i>	137 103	130 105	137 115	130 112
Acétate disparu (mg)	15.8	7.7	15.8	7.7
	mg	%	mg	%
Somme des corps en C <sub>3</sub> formés (acide lactique + acide pyruvique)	0	0	0	0.63
				4
				0.7
				9.2

du formiate et de l'acétylphosphate par un extrait de *E. coli* à l'aide de l'isotope C<sup>14</sup> suivant la réaction réversible:



L'équilibre de cette réaction étant dans le sens acétylphosphate et formiate, il se forme des quantités extrêmement faibles d'acide pyruvique<sup>38</sup>.

Nous avons fait nos expériences sur des bactéries intactes en les mettant en suspension, soit dans un tampon phosphate dans les conditions de nos expériences précédentes, soit dans un tampon de phosphate auquel on ajoute du bicarbonate (concentration finale M/20), dans une atmosphère d'azote contenant 5% de gaz carbonique (Tableau VIII).

Puisque les bactéries sans substrat produisent seulement des traces de corps en C<sub>3</sub>, on pouvait se permettre de faire dans ces expériences des témoins dans les mêmes conditions expérimentales, c'est-à-dire mettant en jeu des bactéries sans substrat avec ou sans anhydride carbonique, laissées 22 heures à l'étuve à 37°. Les chiffres très faibles obtenus dans ces conditions sont retranchés des résultats du Tableau VIII.

Nous voyons, d'après ces résultats, qu'il ne se forme aucun corps en C<sub>3</sub> (somme acide lactique + acide pyruvique) avec les bactéries en présence d'acétate sans anhydride carbonique, tandis que lorsqu'on ajoute de l'anhydride carbonique, il y a un pourcentage notable de corps en C<sub>3</sub>. Nous avons essayé de remplacer le bicarbonate par le formiate, mais les quantités de corps en C<sub>3</sub> obtenues étaient difficilement dosables. Nous avons répété ces mêmes expériences en présence d'azoture de sodium (Tableau VIII). Nous retrouvons les résultats précédents, c'est-à-dire que l'azoture n'empêche pas la synthèse des corps en C<sub>3</sub> par fixation d'anhydride carbonique sur les corps en C<sub>2</sub>.

Nous considérons que les pourcentages obtenus de corps en C<sub>3</sub> en présence ou en l'absence d'azoture sont relativement élevés. Il ne faut pas oublier, en effet, que nous travaillons avec des bactéries intactes et que les substrats ajoutés de l'extérieur ne sont pas utilisés avec la même intensité que lorsqu'ils sont formés au cours du métabolisme.

TABLEAU IX

ACTION DE *E. COLI* SUR L'ALCOOL ÉTHYLIQUE ET SUR LE PHOSPHATE D'ÉTHYLE EN ANAÉROBIOSE,  
EN PRÉSENCE OU EN ABSENCE D'ANHYDRIDE CARBONIQUE

Concentration en alcool ou en phosphate d'éthyle: 0.017 M

pH = 6.9

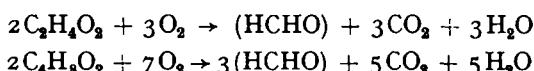
Les expériences avec l'anhydride carbonique sont faites en présence de bicarbonate de sodium 0.05 M, en atmosphère N<sub>2</sub> + 5 % CO<sub>2</sub>

	Expérience I				Expérience II			
	Alcool		Phosphate d'éthyle		Alcool		Phosphate d'éthyle	
	Sans CO <sub>2</sub>	Avec CO <sub>2</sub>						
Opacité: initiale finale	146 121	146 132	146 118	146 127	161 112	161 121	161 108	161 118
Produits formés (mg)								
Acide lactique + acide pyruvique	0	1.76	0.43	4.02	0	0.3	0.65	1.87

Avec l'alcool comme substrat, les résultats obtenus ne sont pas constants, du fait que l'alcool n'est pas toujours attaqué par *E. coli* dans nos conditions expérimentales. On obtient pourtant, dans quelques expériences, une formation de corps en C<sub>3</sub> en présence d'anhydride carbonique. Peut-être y a-t-il une question de phosphorylation, car le phénomène est beaucoup plus net lorsqu'on remplace l'alcool éthylique par le phosphate d'éthyle\* (Tableau IX). Il faut noter, d'ailleurs, qu'avec le phosphate d'éthyle, il se synthétise, en plus, probablement, d'autres corps. En effet, dans ce cas, lorsqu'on fait le dosage d'acide pyruvique par la carboxylase, on observe un dégagement d'anhydride carbonique, alors même que le dosage d'acide pyruvique est terminé. Suivant KREBS<sup>27</sup>, ceci est dû à la présence d'autres corps comme l'acide oxalactique ou l'acide *a*-cétoglutarique.

#### DISCUSSION

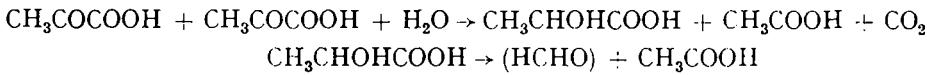
Depuis WURMSER<sup>38</sup>, on distingue les fermentations liées aux synthèses, des fermentations indépendantes. Et la justification de cette conception a été apportée, entre autres, par FROMAGEOT ET SAFAVI<sup>12</sup> et par CLIFTON<sup>2, 3</sup> et CLIFTON ET LOGAN<sup>4, 6</sup>. Mais les produits synthétisés peuvent avoir deux devenirs: comme CLIFTON l'a fait remarquer, ils peuvent être assimilés, ce qui se traduit par une augmentation du poids des matières vivantes, ou rester dans le milieu de culture. D'après les auteurs dont nous venons de parler, le produit assimilé répond à la formule (HCHO)<sub>n</sub>. Il provient, soit de l'oxydation incomplète dans les expériences de CLIFTON, de l'acide butyrique ou de l'acide acétique, par exemple:



\* Le phosphate d'éthyle était préparé dans notre laboratoire, selon la méthode de O. BAilly<sup>37</sup> par R. SUTRA, que nous sommes heureux de remercier ici.

Bibliographie p. 459/460.

soit de la dégradation fermentaire incomplète de l'acide lactique dans les expériences de FROMAGEOT ET SAFAVI:



$$\text{au total } 2\text{CH}_3\text{COCOOH} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CH}_3\text{COOH} + (\text{HCHO}) + \text{CO}_2$$

On pourrait interpréter de façon analogue les résultats de WINZLER ET BAUMBERGER<sup>10</sup> et de VAN NIEL ET ANDERSON<sup>11</sup>. Tout cela est hors de doute et parfaitement cohérent. Mais dans ces expériences, il y avait formation de matière vivante. Lorsque les auteurs travaillaient avec des bactéries non proliférantes, il n'était plus question de ce corps  $(HCHO)_n$  qui devait être assimilé.

Or, dans nos expériences, faites précisément avec des bactéries à l'état non proliférant, si les bilans faits en aérobiose montrent qu'aucune synthèse n'a été constatée, il n'en est pas de même en anaérobiose et précisément le corps synthétisé, mais non assimilé dans notre cas, est l'acide lactique ( $\text{HCHO}_3$ ), du moins pour la part la plus importante, car, on le verra, il y a aussi de l'acide succinique et de l'acide pyruvique synthétisés.

Cet acide lactique provient, comme l'acide pyruvique, d'ailleurs, d'une fixation d'anhydride carbonique sur les corps en C<sub>2</sub>. L'origine de ces deux acides est donc double: la dégradation du glucose selon le schéma classique, et la synthèse. Quant à l'acide succinique, comme WERKMAN l'a déjà montré, il provient pour une part de la condensation de l'acide acétique suivant la réaction de THÜNBERG<sup>39</sup>, et, pour une autre part, de la fixation de l'anhydride carbonique sur les acides en C<sub>4</sub>.

Il est possible, d'après nos résultats expérimentaux (Tableaux VI et VII), de calculer approximativement les quantités d'anhydride carbonique utilisées pour chaque synthèse.

Appelons  $x$  le pourcentage de carbone du glucose qui, à l'état d'anhydride carbonique se fixe sur les corps en  $C_6$  et  $y$  celui qui se fixe sur les corps en  $C_3$ .

On constate (Tableau VII) que, dans le cas où l'anhydride carbonique est absorbé, donc ne peut pas réagir, il y a, par rapport aux expériences sans absorption, une augmentation du pourcentage en carbone des corps en  $C_1$  de  $26.8 - 12.79 = 14$ . Nous pouvons donc écrire:

$$x + y = 14$$

Mais lorsqu'on吸orbe l'anhydride carbonique, les corps en  $C_2$  augmentent par suite de la non-fixation de l'anhydride carbonique pour les transformer en corps en  $C_3$ . Ceci représente un pourcentage en carbone de  $2x$ . Mais nous avons vu que l'acide succinique est, lui aussi, générateur de corps en  $C_2$ . La non-fixation de l'anhydride carbonique sur les corps en  $C_3$  diminue de  $4y$  le pourcentage en carbone des corps en  $C_2$  qui se forment à partir de l'acide succinique. Comme l'expérience montre que, dans le cas de non-emploi de l'anhydride carbonique, on a une différence pour les corps en  $C_2$  de  $51.4 - 55.95 = -4.5$ , nous pouvons écrire:

$$2x - 4y = -4.5$$

Des deux équations on tire:

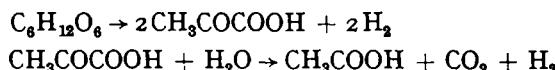
$$x = 8.6 \quad y = 5.4$$

A l'aide de ces deux valeurs, on peut calculer la diminution d'acide lactique qui doit exister quand on absorbe l'anhydride carbonique, et comparer cette valeur avec celle trouvée expérimentalement. Les deux résultats sont concordants.

Comme on a au total 14% de carbone de l'anhydride carbonique utilisé pour les synthèses, et comme la valeur de  $x$  est 8.6 et celle de  $y$  est 5.4, on peut calculer les pourcentages respectifs d'anhydride carbonique utilisé pour chaque sorte de synthèse. Pour la synthèse des corps en  $C_4$ , il y en a  $5.4 : 14 = 38\%$  environ, et pour la synthèse des corps en  $C_3$ , 62% environ.

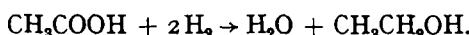
Voici une vérification: Dans les expériences e et e' (Tableaux I et VI), on voit qu'il y a 7% (21 — 14.28) environ de carbone de l'anhydride carbonique utilisé pour les synthèses. Pour la synthèse des corps en  $C_3$ , le pourcentage de carbone de l'anhydride carbonique utilisé sera de:  $7 (62 : 100) = 4.3$ . Celui utilisé pour la synthèse des corps en  $C_4$ :  $7 (38 : 100) = 2.7$ . On devrait donc avoir, dans le cas de l'absorption de l'anhydride carbonique, une diminution des corps en  $C_3$  correspondant à:  $3 (4.3 - 2.7) = 5\%$  environ, et pour les corps en  $C_2$  une diminution de:  $(2 \cdot 4.3) - (4 \cdot 2.7) = 2.2\%$  environ. Or, dans l'expérience, nous observons pour les corps en  $C_3$  une diminution de 6% et pour les corps en  $C_2$  une diminution de 2%.

La quantité d'hydrogène trouvée dans nos expériences ne correspond pas, elle non plus, à la quantité théorique qu'on peut calculer suivant les réactions de la fermentation classique:

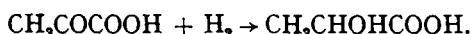


Il devrait y avoir, pour 100 mg de carbone du glucose disparu (Tableau VII), 114 mg d'hydrogène. Or, on ne retrouve que:

37 ml d'hydrogène utilisé pour former l'alcool suivant la réaction:



14 ml d'hydrogène utilisé pour former l'acide lactique suivant la réaction:

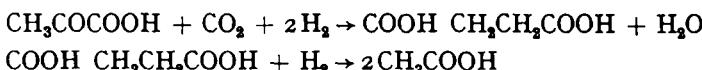


3.6 ml d'hydrogène restant sous forme d'acide formique.

22 ml d'hydrogène dégagé pendant la fermentation.

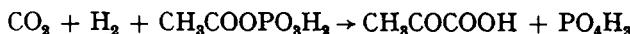
Donc, au total, 76.6 ml, ce qui correspond seulement à 67% de la quantité de l'hydrogène théorique.

Quand on admet les calculs précédents pour les deux synthèses que nous avons mises en évidence, on peut expliquer l'utilisation de l'hydrogène manquant dans le bilan. En effet, la formation d'acide acétique par le schéma de WOOD ET WERKMAN, et de SLADE ET WERKMAN exige de l'hydrogène:



Le pourcentage du carbone provenant de l'acide acétique formé par cette voie est de  $5.4 \cdot 4 = 21.6$ , puisque le pourcentage de carbone de l'anhydride carbonique fixé sur les corps en  $C_3$  est de 5.4 (voir les calculs précédents). L'hydrogène utilisé dans cette réaction est de:  $(67.2 \cdot 25.6) : 48 = 32$  ml.

La formation d'acide pyruvique par fixation d'anhydride carbonique sur les corps en  $C_2$  exige également de l'hydrogène:



Le pourcentage du carbone de l'anhydride carbonique fixé sur les corps en  $C_3$  étant de

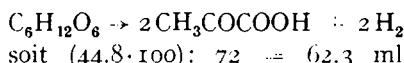
Bibliographie p. 459/460.

8.6, le pourcentage du carbone de l'acide pyruvique formé selon ce schéma est de:  $8.6 \cdot 3 = 25.8$ . L'hydrogène utilisé est de:  $(22.4 \cdot 25.8) : 36 = 16$  ml.

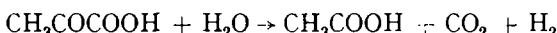
On retrouve donc au total 124 ml d'hydrogène utilisé.

D'autre part, la quantité d'hydrogène produite par fermentation quand on admet les calculs cités plus haut pour les deux synthèses, est égale à:

1. celle dégagée lors de la formation d'acide pyruvique

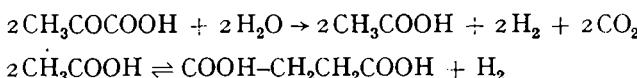


2. celle dégagée lors de la formation des corps en  $\text{C}_2$  par le schéma classique:



Le pourcentage du carbone provenant de la quantité totale de corps en  $\text{C}_2$  formé est de:  $55.95 + 17.2 = 73.12$  (17.2 étant le pourcentage du carbone des corps en  $\text{C}_2$  formés qui ont été utilisés pour la synthèse des corps en  $\text{C}_3$ , soit 8.6 · 2). Comme 21.6% du carbone provient des corps en  $\text{C}_2$  formés par la réaction de SLADE ET WERKMAN, on a:  $73.12 - 21.6 = 51.52\%$  du carbone provenant des corps en  $\text{C}_2$  formés par le schéma classique. La quantité d'hydrogène produit est donc:  $(22.4 \cdot 51.52) : 24 = 48.5$  ml.

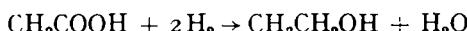
3. la quantité d'hydrogène dégagé lors de la formation d'acide succinique par la réaction réversible de SLADE ET WERKMAN



qui est égale à:  $(67.2 \cdot 4.9) : 48 = 6.8$  ml.

La quantité d'hydrogène totale produite par ces trois réactions est de 118 ml, donc en accord avec celle trouvée dans l'expérience: 124 ml.

On sera peut-être surpris de voir que nous considérons que l'alcool est produit par la réaction:



Mais il y a de bonnes raisons pour qu'il en soit ainsi. L'origine de l'alcool par décarboxylation de l'acide pyruvique en acétaldéhyde et réduction de l'acétaldéhyde ne se produit pas avec *E. coli*. VIRTANEN ET TIKKA<sup>40, 41</sup> l'ont montré. D'autre part, OSBURN, BROWN ET WERKMAN<sup>42</sup>, MICKELOSON ET WERKMAN<sup>43</sup> et PEYNAUD<sup>44</sup> ont montré la réduction bactérienne d'acides en alcool, et en particulier, SLADE ET WERKMAN<sup>33</sup> ajoutant dans un milieu où le glucose fermente sous l'action d'*Aerobacter indologenes* de l'acide acétique  $\text{CH}_3\text{C}^{13}\text{OOH}$ , contenant 2.39% de  $\text{C}^{13}$ , retrouvent dans l'alcool éthylique 1.64% de carbone 13. Nous-mêmes avons des expériences indicatives permettant de penser que le processus de formation de l'alcool éthylique par *E. coli* est une réduction de l'acide acétique.

En ce qui concerne nos expériences avec l'azoture de sodium, celui-ci, loin d'inhiber la réaction de fixation de l'anhydride carbonique sur les corps en  $\text{C}_2$  ou en  $\text{C}_3$ , favorise au contraire des réactions synthétiques. Comme cet inhibiteur empêche la croissance de *E. coli*<sup>\*</sup>, il faut en conclure, ce qui est en accord avec CLIFTON ET LOGAN<sup>4-6</sup> et SPIEGELMAN<sup>18</sup>, que l'azoture inhibe les phénomènes d'assimilation.

\* Nous avons isolé pourtant un mutant de *E. coli*, qui peut se développer en présence d'azoture de sodium à la concentration M/350.

## RÉSUMÉ

L'examen des bilans de produits de fermentation du glucose par *Escherichia coli* à l'état non proliférant, montre, en anaérobiose, un déficit d'anhydride carbonique et d'hydrogène qui s'explique par un réemploi de ces corps pour des synthèses. En particulier, on a montré la fixation de l'anhydride carbonique sur les corps en C<sub>2</sub>, acide acétique, alcool, phosphate d'éthyle, pour donner des acides en C<sub>3</sub>, et sur des acides en C<sub>3</sub> pour donner des diacides en C<sub>4</sub>. Il est possible de calculer la part de l'anhydride carbonique utilisé pour chacune des synthèses. Celles-ci sont favorisées par l'azide.

## SUMMARY

The examination of the distribution of the products of the fermentation of glucose by non-proliferating *Escherichia coli* shows, under anaerobic conditions, a deficit of CO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>. This can be explained by the re-use of these substances for syntheses. In particular, it has been shown that CO<sub>2</sub> combines with C<sub>2</sub>-compounds such as acetic acid, alcohol, ethyl phosphate to give C<sub>3</sub>-acids, and with C<sub>3</sub>-acids to give dibasic C<sub>4</sub>-acids. It is possible to calculate the amount of CO<sub>2</sub> used for each of these syntheses which are favoured by azide.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Bilanz der Produkte der Vergärung von Glucose durch nicht proliferierende *Escherichia coli* in Anaerobiose, ergibt einen Defizit an Kohlendioxyd und Wasserstoff der sich durch erneute Verarbeitung dieser Substanzen in Synthesen erklären lässt. Insbesondere wurde die Bindung von Kohlendioxyd an C<sub>2</sub>-Verbindungen, wie Essigsäure, Alkohol, Äthylphosphat, unter Entstehung von C<sub>3</sub>-Säuren und die Bindung und C<sub>3</sub>-Säuren unter Entstehung von zweibasischen C<sub>4</sub>-Säuren gezeigt. Es ist möglich, die für jede dieser Synthesen verbrauchte Menge Kohlendioxyd zu berechnen. Die Synthesen werden durch Azid gefördert.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 R. P. COOK ET M. STEPHENSON, *Biochem. J.*, 22 (1928) 1368.
- 2 C. E. CLIFTON, *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, 34 (1936) 291.
- 3 C. E. CLIFTON, *Enzymologia*, 4 (1937) 246.
- 4 C. E. CLIFTON ET W. A. LOGAN, *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, 38 (1938) 619.
- 5 C. E. CLIFTON ET W. A. LOGAN, *J. Bact.*, 37 (1939) 523.
- 6 C. E. CLIFTON ET W. A. LOGAN, *Advances in Enzymol.*, 6 (1946) 269.
- 7 H. LINEWEAVER, *J. Biol. Chem.*, 99 (1933) 575.
- 8 H. A. BARKER, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 8 (1936) 231.
- 9 T. J. B. STIER, I. NEWTON ET H. SPRINCE, *Science*, 89 (1939) 85.
- 10 R. J. WINZLER ET J. P. BAUMBERGER, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 12 (1938) 183.
- 11 C. B. VAN NIEL ET E. H. ANDERSON, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 17 (1941) 49.
- 12 C. FROMAGEOT ET R. SAFAVI, *Enzymologia*, 6 (1939) 57.
- 13 M. J. PICKETT ET C. E. CLIFTON, *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, 46 (1941) 443.
- 14 M. J. PICKETT ET C. E. CLIFTON, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 21 (1943) 77.
- 15 R. J. WINZLER, *Science*, 99 (1944) 327.
- 16 J. M. REINER, *Proc. Soc. Biol. Med.*, 63 (1946) 81.
- 17 J. M. REINER ET S. SPIEGELMAN, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 30 (1947) 347.
- 18 J. M. SPIEGELMAN, M. D. KAMEN ET M. SUSSMAN, *Arch. Biochem.*, 18 (1948) 409.
- 19 H. G. WOOD ET C. H. WERKMAN, *Biochem. J.*, 30 (1936) 481 et 618; 32 (1938) 1262; 34 (1940) 7.
- 20 C. H. WERKMAN ET H. G. WOOD, *Advances in Enzymol.*, 2 (1942) 135.
- 21 H. A. KREBS ET L. V. EGGLESTON, *Biochem. J.*, 34 (1940) 1386; 35 (1941) 676.
- 22 H. C. HAGEDORN ET B. N. JENSEN, *Biochem. Z.*, 135 (1923) 46.
- 23 T. E. FRIEDEMANN ET A. I. KENDALL, *J. Biol. Chem.*, 82 (1929) 23.
- 24 H. S. FUCHS, *Z. physiol. Chem.*, 221 (1933) 271.
- 25 O. WARBURG, F. KUBOWITZ ET W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.*, 227 (1930) 252.
- 26 H. WESTERKAMP, *Biochem. Z.*, 263 (1933) 239.
- 27 H. A. KREBS, *Biochem. J.*, 31 (1937) 2095.
- 28 H. A. KREBS, D. H. SMITH ET E. A. EVANS, *Biochem. J.*, 34 (1940) 1041.
- 29 M. NICLOUX, *Bull. soc. chim. biol.*, 13 (1931) 857.
- 30 K. BERNHAUER, *Gärungchemisches Praktikum*, J. Springer, Berlin 1939, p. 180.

- <sup>31</sup> G. DENIGÈS, *Précis de Chimie Analytique*, N. Maloine, Paris 1930, t. I., p. 548.
- <sup>32</sup> A. HARDEN, *J. Chem. Soc.*, 79 (1901) 610.
- <sup>33</sup> H. D. SLADE ET C. H. WERKMAN, *Arch. Biochem.*, 2 (1945) 97.
- <sup>34</sup> M. F. F. UTTER, F. LIPMANN ET C. H. WERKMAN, *J. Biol. Chem.*, 158 (1945) 521.
- <sup>35</sup> F. LIPMANN ET L. C. TUTTLE, *J. Biol. Chem.*, 158 (1945) 505.
- <sup>36</sup> N. O. KAPLAN ET F. LIPMANN, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 459.
- <sup>37</sup> O. BAILLY, *Bull. soc. chim. biol.*, 25 (1919) 251.
- <sup>38</sup> R. WURMSER, *Bull. soc. chim. biol.*, 5 (1923) 506.
- <sup>39</sup> T. THUNBERG, *Skand. Arch. Physiol.*, 1 (1920) 40.
- <sup>40</sup> J. TIKKA, *Biochem. Z.*, 279 (1935) 264.
- <sup>41</sup> A. I. VIRTANEN ET J. TIKKA, *Biochem. Z.*, 228 (1930) 407.
- <sup>42</sup> O. L. OSBURN, R. W. BROWN ET C. H. WERKMAN, *Iowa State Coll. J. Sci.*, 12 (1938) 275.
- <sup>43</sup> M. N. MICKELSON ET C. H. WERKMAN, *J. Bact.*, 37 (1939) 619.
- <sup>44</sup> E. PEYNAUD, *Ann. fermentations*, 5 (1939) 321 et 385.

Reçu le 15 février 1949