

## A PROPOS DE LA VARIABILITÉ DU SYSTÈME DES CYTOCHROMES CHEZ CERTAINS MICROORGANISMES\*

par

PAULETTE CHAIX ET GASTON RONCOLI

*Laboratoire de Chimie Physiologique de la Faculté des Sciences, Lyon (France)*

### I. INTRODUCTION

On ne décrit en général qu'un seul aspect de spectre réduit des cytochromes pour une espèce cellulaire donnée: soit l'aspect typique classique comprenant les bandes d'absorption  $\alpha$  et  $\beta$  (les bandes  $\gamma$  situées dans la région du bleu sont difficilement visibles) des cytochromes a, b, et c, (exemple: spectre réduit de la levure de boulangerie); soit des aspects atypiques avant tout caractérisés par l'absence des bandes d'absorption des cytochromes b et c et l'existence d'un cytochrome  $b_1$  dont la bande  $\alpha$  occupe une position intermédiaire à celles des bandes  $\alpha$  des cytochromes b et c. Cependant des variations du spectre réduit des cytochromes chez un seul et même microorganisme ont déjà été signalées à plusieurs reprises.

En 1932, H. FINK ET E. BERWALD<sup>6</sup> observèrent la transformation du spectre atypique des levures hautes et basses de brasserie en spectre classique typique à la suite de repiquages des cultures en milieu fortement aérobic. Récemment B. EPHRUSSI ET P. P. SLONIMSKI<sup>5</sup> ET C. H. CHIN<sup>4</sup> montrèrent que la transformation du spectre atypique en spectre typique pouvait se produire en l'absence de toute division cellulaire.

TAMIYA en 1928<sup>11</sup>; TAMIYA ET YAMAGUTCHI en 1933<sup>12</sup> constatèrent que le type spectral de différentes bactéries et moisissures pouvait changer selon les conditions de culture. Des observations analogues furent faites également en 1934 par FREI, RIED-MULLER ET ALMASY<sup>7</sup> à propos de *B. subtilis*; *Bact. tuberculosis*, *Achorion quinckeanum* et *A. schönleinii*. Ces derniers auteurs attribuèrent ces variations spectrales à des causes multiples: âge et degré de sporulation des cultures, propriétés particulières de chaque souche et autres facteurs inconnus.

Les expériences qui vont être décrites ont eu pour objet de préciser les possibilités de variation du spectre de 11 souches de *B. subtilis*, d'une souche de *B. cereus* de *Saccharomyces cerevisiae* (souche Gebrüder Mayer); de *E. coli* (souche Monod) et de chercher à déterminer la signification de ces variations éventuelles.

---

\* Une partie de ce travail a fait l'objet d'une communication à la 18e réunion de l'Association des Physiologistes de Langue française, Bordeaux, 24 Mai 1950, et a été résumée dans le *Journal de Physiologie*<sup>3</sup>.

## II. CONDITIONS DES EXPÉRIENCES ET TECHNIQUE

a. *Provenance et conditions de culture des souches étudiées*1. *B. subtilis* et *B. cereus*:

— *B. cereus* "Caron"\*; *B. subtilis* "Crooco"; *B. subtilis* "Table S.N.C.F."; *B. subtilis* "Ungar"; *B. subtilis* "Champignon"; *B. subtilis* "Hémo-Broussais"; *B. subtilis* "Byline"; *B. subtilis* I.P.; *B. subtilis* "90°". Ces 9 souches proviennent de l'Institut Pasteur de Paris; — *B. subtilis* 85; *B. subtilis* 3610; *B. licheniformis* 2586, provenant de la N.C.T.C. Londres.

Ces souches sont conservées par culture en surface sur le milieu solide suivant: Peptone (Chapoteaut) 20 g; NaCl 5 g; agar 30 g pour 1 litre de bouillon de viande; (pH ajusté à 7.3-7.4); température d'incubation = 37°.

*B. subtilis* est obtenu en masses suffisantes pour permettre une étude spectroscopique ou spectrographique des cytochromes en le cultivant soit sur *milieu solide* identique à celui utilisé pour la conservation des souches mais réparti dans des boîtes de Roux, soit sur *milieu liquide* (de même composition que le milieu solide mais non additionné d'agar) réparti à raison de 100 à 200 ml dans des erlenmeyers de 500 ml. Dans ce dernier cas l'aération et l'homogénéité des cultures sont maintenues constantes par agitation.

2. *Saccharomyces cerevisiae* Gebrüder MAYER.

Souche conservée sur milieu solide au moût de bière à 8° Balling, gélosé à 3.5%; température 30°.

Les cultures en grosses masses sont obtenues soit sur milieu solide, de même composition, réparti dans des boîtes de Roux; soit sur milieu liquide, de même composition mais glucosé à 2% et sans agar réparti dans des erlenmeyers pour réaliser des cultures agitées comme dans le cas de *B. subtilis*.

3. *E. coli* (souche Monod) de l'Institut Pasteur de Paris. Les conditions de cultures sont les mêmes que pour *B. subtilis*. Température 37°.

Les récoltes de ces différents microorganismes sont effectuées dans les mêmes conditions que celles précédemment indiquées<sup>3</sup>. La récolte lavée et centrifugée se présente sous forme d'une pâte crémeuse. C'est sur cette pâte placée entre deux disques de verre séparés par un anneau de Scheibe d'épaisseur définie qu'est effectuée l'étude du spectre des cytochromes.

b. *Examens spectroscopiques et spectrographiques*

La pâte de microorganisme étant maintenue dans un système clos, le spectre se trouve toujours à l'état réduit. Le spectroscopie de poche de ZEISS ou le spectroscopie à réversion de HARTRIDGE sont utilisés pour les examens spectroscopiques. Dans un grand nombre de cas le spectre a été photographié à l'aide du spectrographe type A de la Société Générale d'Optique et, après enregistrement avec le microphotomètre enregistreur de MOLL, a été analysé suivant la technique décrite antérieurement<sup>1</sup>.

## III. RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

1. *B. subtilis*

Cet organisme aérobie a été classé en 1925 par KEILIN<sup>6</sup> dans le groupe de ceux

\* *B. cereus* "Caron" avait été désigné précédemment<sup>2</sup> sous le nom de *B. subtilis* "Caron".

possédant un spectre de cytochromes classique typique. En 1934 FREI, RIEDMULLER ET ALMASY<sup>7</sup> ont signalé des variations spectrales; en 1943 P. CHAIX ET TCHEN PAU KIUN<sup>8</sup> ont décrit un spectre atypique dans le cas de 3 souches; en 1947 KEILIN ET HARTREE<sup>10</sup> ont retrouvé un spectre typique sur la souche 85 (N.C.T.C. London) et des spectres atypiques sur les souches 2586 et 3610 (N.C.T.C. London).

Nos expériences ont essentiellement consisté à cultiver toutes les souches de *B. subtilis* et de *B. cereus* dont nous disposions (comprenant notamment les 3 souches utilisées en 1947 par KEILIN ET HARTREE<sup>10</sup>) dans des conditions identiques *fortement aérobies* et à étudier le spectre des cytochromes d'une même souche en fonction du temps d'une part et le spectre des cytochromes des différentes souches sur des cultures de même durée d'autre part. Les premiers résultats de ces expériences ont déjà fait l'objet d'une communication<sup>3</sup>.

Dans le cas de chacune des souches de *B. subtilis* considérées il nous a été possible d'observer au cours du développement des cultures, constamment maintenues en forte aérobiose, deux types de spectre: un spectre atypique d'abord et ensuite un spectre classique visible tant que la sporulation n'a pas rendu complètement opaques les bactéries.

La Fig. 1 indique en combien de temps le spectre passe du stade atypique (cytochromes  $a + b_1$ ) au stade typique (cytochromes  $a + b + c$ ) dans les cas les plus contro-

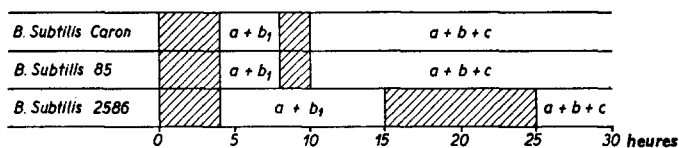


Fig. 1. Spectre atypique ( $a + b_1$ ) et spectre typique ( $a + b + c$ ) des cytochromes de trois souches de *B. subtilis* en fonction du temps de culture en aérobiose. Les zones hachurées correspondent à des temps de cultures non étudiés.

versés de *B. cereus* "Caron", de *B. subtilis* 85 et 2586 (N.C.T.C.) et met en évidence (toutes choses égales d'ailleurs) une différence de vitesse d'évolution de la souche 2586 par rapport aux deux autres. Cette différence de vitesse d'évolution explique comment KEILIN ET HARTREE ont pu observer des spectres différents pour *B. subtilis* 85 et 2586 cultivés dans les mêmes conditions pendant des temps égaux.

Les Figures 2, 3 et 4 donnent en fonction de la longueur d'onde les courbes des densités optiques des spectres de *B. cereus* "Caron", *B. subtilis* 85 et de *B. subtilis* 2586 photographiés à différents stades de l'évolution de ces bactéries. Le fait que des phénomènes de diffusion s'ajoutent au phénomène d'absorption empêche bien entendu une évaluation de la teneur en pigments hématiniques. Le principal intérêt de ces courbes réside exclusivement en ce qu'elles fixent d'une façon précise la longueur d'onde de l'absorption maximum. On voit que ce maximum d'absorption passe de 557  $m\mu$  pour les cultures de 4 à 6 heures en milieu liquide agité, à 550  $m\mu$  pour les cultures de plus longue durée en milieu liquide agité ou sur milieu solide.

Le cytochrome  $b_1$  apparaît comme un précurseur des cytochromes  $b$  et  $c$ .

La variation du spectre correspond à une évolution naturelle des pigments hématiniques en aérobiose. La variété de la souche, la composition du milieu de culture et son degré d'aération, la température d'incubation étant autant de causes influençant la vitesse de cette évolution il n'est pas surprenant que ces différentes circonstances aient été invoquées pour expliquer les variations spectrales.

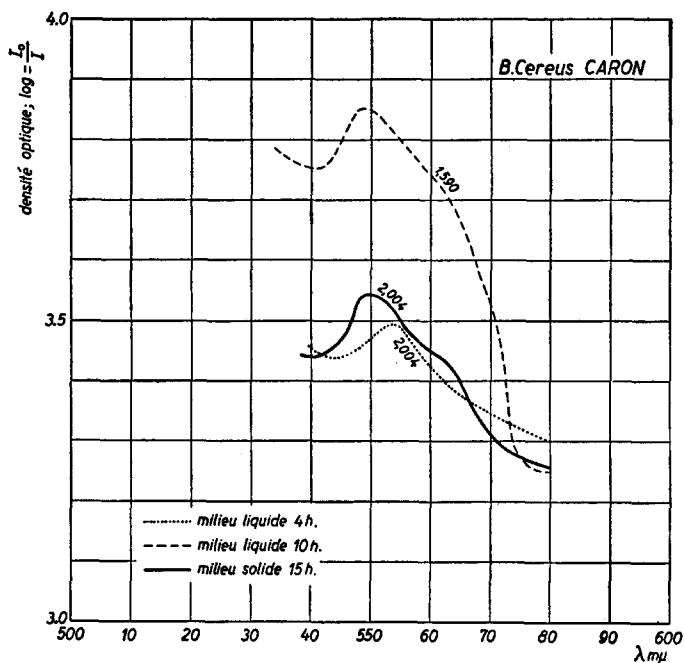


Fig. 2. Spectres, à l'état réduit, de cultures aérobies, plus ou moins vieilles, de *B. cereus*. L'épaisseur, en mm, de la préparation bactérienne spectrophotographiée est mentionnée sur chaque courbe.

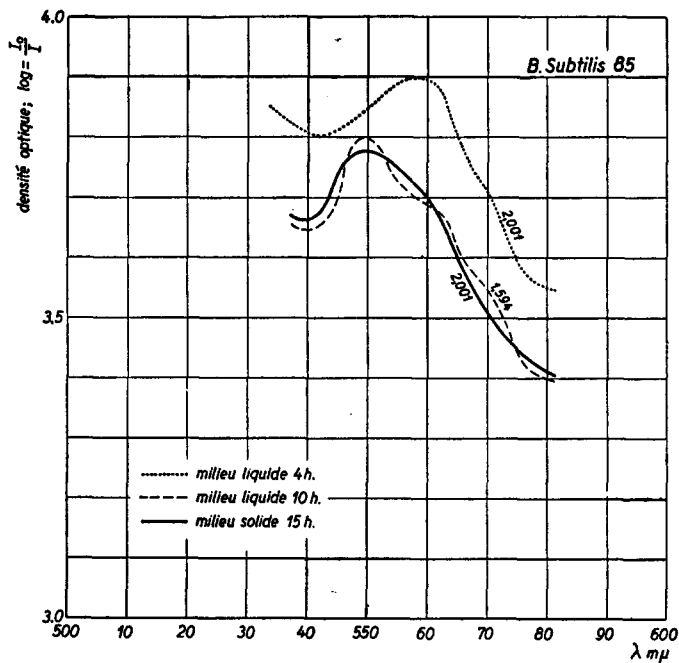


Fig. 3. Spectres, à l'état réduit, de cultures aérobies, plus ou moins vieilles, de *B. subtilis* 85 (N.C.T.C. London). L'épaisseur, en mm, de la préparation bactérienne spectrophotographiée est mentionnée sur chaque courbe.

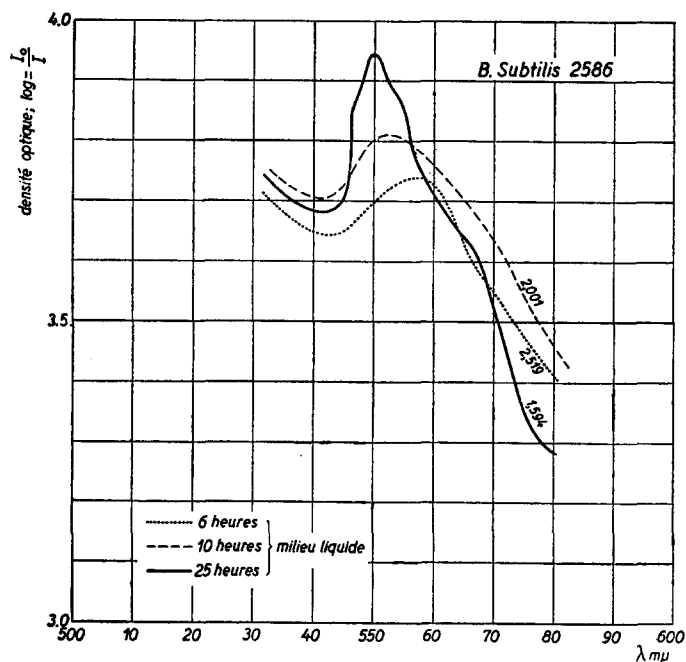


Fig. 4. Spectres, à l'état réduit, de cultures aérobies, plus ou moins vieilles, de *B. subtilis* 2586 (N.C.T.C. London). L'épaisseur, en mm, de la préparation bactérienne spectrophotographiée est mentionnée sur chaque courbe.

## 2. *Saccharomyces cerevisiae* Gebrüder MAYER.

L'étude des cytochromes de cette levure effectuée en fonction du temps de culture sur des milieux constamment maintenus dans de bonnes conditions d'aération montre que :

— les cultures âgées de 4 heures ne présentent aucun spectre hématinique visible sous une épaisseur de 2.5 mm ;

— les cultures de 10 heures présentent une large bande unique centrée sur 555 mμ s'étendant de 548 à 562 mμ (autrement dit débordant nettement la position 550) sensiblement homogène ;

— les cultures de 15 et 25 heures présentent un spectre de cytochromes typiques dont les bandes *ba* et *ca* tout nettement distinctes.

Ces examens du spectre en fonction du temps permettent là encore de saisir en aérobiose les stades préliminaires obligatoires de la synthèse des cytochromes classiques.

## 3. *E. coli* souche Monod

Dans le cas de *E. coli* l'évolution du spectre suit un cours très notablement différent de celui décrit pour *B. subtilis* ou *Saccharomyces cerevisiae* : sur les cultures de 4 à 10 heures le spectre de *E. coli* est tel qu'il a été décrit par KEILIN ET HARPLEY<sup>9</sup> : bande unique dans la zone du vert à 560 mμ (toutefois la bande *a*<sub>2</sub> à 628 mμ dépendant d'un ferment hématinique autoxydable n'est pas visible) ; après 25 heures et plus la bande *a*<sub>2</sub> à 628 mμ est nette mais, dans la zone du vert, la bande *b*<sub>1</sub> à 560 mμ reste inchangée sans qu'on puisse soupçonner une évolution dans le sens de la formation d'une bande *ca* typique.

## IV. CONCLUSIONS

Les cultures étant constamment effectuées dans des conditions fortement aérobies, il est possible d'observer sur un seul et même microorganisme (*B. subtilis* ou *Saccharomyces cerevisiae*) deux types de spectres de cytochromes suivant que la culture a été de courte ou de longue durée. Le premier spectre est atypique avec une seule bande dans la zone du vert, le second est typique avec, dans la zone du vert, deux bandes  $b_a$  et  $c_a$  nettement distinctes. Le cytochrome  $b_1$  apparaît comme un précurseur des cytochromes  $b$  et  $c$  au cours de l'évolution aérobie de ces microorganismes.

Les cultures de *E. coli* effectuées dans des conditions fortement aérobies ne donnent pas lieu au même phénomène. L'aspect du spectre des cytochromes de cultures de 4, 10, 25 et 96 heures se maintient inchangé, la bande  $b_1$  à 560  $m\mu$  notamment persiste.

Ces expériences conduisent à penser qu'il n'est pas injustifié de décrire une seule forme de spectre de cytochromes pour un même microorganisme à condition de préciser qu'il s'agit du spectre correspondant au stade d'évolution complète de cellules végétaives s'étant constamment développées dans des conditions fortement aérobies.

## RÉSUMÉ

Se développant dans des conditions nettement aérobies, les cultures jeunes de *B. subtilis* et de *Saccharomyces cerevisiae* ne présentent pas le même spectre de cytochromes que les cultures plus âgées; dans le cas de ces deux microorganismes l'évolution aboutit à la formation des cytochromes  $a$ ,  $b$ ,  $c$  typiques.

Dans les mêmes conditions, les cytochromes de *E. coli* n'évoluent pas jusqu'à la formation des cytochromes  $b$  et  $c$ .

Nos expériences permettent de définir d'une façon plus précise le spectre des cytochromes caractérisant un microorganisme.

## SUMMARY

Young cultures of *B. subtilis* and *Saccharomyces cerevisiae* grown under strictly aerobic conditions do not show the same cytochrome spectrum as older cultures; in the cases of these two microorganisms, however, evolution continues until the typical cytochromes  $a$ ,  $b$  and  $c$  are formed.

Under the same conditions, the cytochromes of *E. coli* do not reach the stage of formation of the cytochromes  $b$  and  $c$ .

Our experiments permit a more precise definition of the cytochrome spectrum which is characteristic of a given microorganism.

## ZUSAMMENFASSUNG

Junge Kulturen von *B. subtilis* und *Saccharomyces cerevisiae*, die unter rein aeroben Bedingungen gewachsen sind, zeigen nicht dasselbe Cytochrom-Spektrum wie ältere Kulturen. In den Fällen dieser beiden Mikroorganismen entwickeln sich schliesslich die typischen Cytochrome  $a$ ,  $b$  und  $c$ .

Unter den gleichen Bedingungen schreitet die Entwicklung der Cytochrome von *E. coli* nicht bis zur Bildung der Cytochrome  $b$  und  $c$  fort.

Unsere Versuche erlauben das für einen Mikroorganismus charakteristische Cytochrom-Spektrum genauer zu definieren.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> P. CHAIX ET CL. FROMAGEOT, *Bull. soc. chim. biol.*, 24 (1942) 1259.
- <sup>2</sup> P. CHAIX ET TCHEN PAU KIUN, *Bull. soc. chim. biol.*, 25 (1943) 1374.
- <sup>3</sup> P. CHAIX ET G. RONCOLI, Communication faite à la 18ème Réunion de l'Association des Physiologistes de Langue française; 24 Mai 1950; *J. physiologie* 42 (1950) (sous presse).
- <sup>4</sup> C. H. CHIN, *Nature*, 165 (1950) 926.
- <sup>5</sup> B. EPHRUSSI ET P. P. SLONIMSKI, *Compt. rend.*, 230 (1950) 685.
- <sup>6</sup> H. FINK ET E. BERWALD, *Biochem. Z.*, 258 (1933) 141.
- <sup>7</sup> W. FREI, L. RIEDMULLER ET F. ALMASY, *Biochem. Z.*, 274 (1934) 253.
- <sup>8</sup> D. KEILIN, *Proc. Roy. Soc. London B.*, 98 (1925) 312.
- <sup>9</sup> D. KEILIN ET C. H. HARPLEY, *Biochem. J.*, 35 (1941) 688.
- <sup>10</sup> D. KEILIN ET E. F. HARTREE, *Antonie Van Leeuwenhoek*, 12 (1947) 115.
- <sup>11</sup> H. TAMIYA, *Acta Phytochim.*, 4 (1928) 215.
- <sup>12</sup> H. TAMIYA ET S. YAMAGUTCHI, *Acta Phytochim.*, 7 (1933) 233.

Reçu le 31 juillet 1950