

## SUR L'APTITUDE DÉSULFURANTE DE QUELQUES MICROORGANISMES HOMOLACTIQUES POURVUS OU NON DE FERMENTS HÉMATINIQUES

par

PAULETTE CHAIX ET PAULE FLAMENS

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

L'étude, dans des conditions précises, de la libération d'hydrogène sulfuré à partir de différents substrats soufrés du fait de l'activité enzymatique d'organismes mono-cellulaires ou de tissus a été commencée par TARR<sup>30</sup> en 1933 et poursuivie par FROMAGEOT *et coll.*<sup>2, 4, 5, 10, 11, 12, 13, 14, 15</sup>, SMYTHE<sup>27, 28</sup>, RANSMEIER ET STEKOL<sup>24</sup>, GREENSTEIN ET LEUTHARDT<sup>17</sup>. Elle renseigne sur les propriétés des ferments de désulfuration et sur les mécanismes de dégradation des molécules soufrées; elle pose le problème du destin de l'hydrogène sulfuré libéré et, éventuellement, celui de la nature de la cytochrome-oxydase, quand le système respiratoire cellulaire est de constitution hématinique<sup>1, 2</sup>.

On connaît à l'heure actuelle un grand nombre de bactéries présentant une activité désulfurante vis à vis de la cystéine et de la cystine<sup>2, 4, 5, 11, 14, 18, 24, 25, 30</sup>; toutefois cette activité ne semble pas jusqu'ici avoir été observée dans le cas des bactéries lactiques.

Le présent travail a eu pour but de rechercher, en anaérobiose, l'activité désulfurante de quelques microorganismes homolactiques, vis à vis notamment de la cystéine et de la cystine.

Les microorganismes homolactiques utilisés appartiennent les uns aux bactéries lactiques vraies (ORLA-JENSEN) peu aérophiles ne possédant ni catalase ni ferments respiratoires hématiniques: *Thermobacterium Delbrucki* et *Streptobacterium casei*; les autres s'apparentent à des organismes plus aérophiles, ayant attiré l'attention de DAVIS<sup>8</sup> en 1933 et de WARBURG<sup>31</sup> en 1946 et, dont respiration et fermentation étaient sensibles à l'acide cyanhydrique: Souches C et F<sub>5</sub>.

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

#### CONDITIONS GÉNÉRALES DES EXPÉRIENCES ET TECHNIQUES

##### I. Origine des souches

1. *Thermobacterium Delbrucki* (ou *Thermobacterium cereale* ORLA-JENSEN) — souche lyophilisée provenant de la collection du Professeur A. J. KLUYVER de Delft.

2. *Streptobacterium casei* (No 9595 A.T.C.C.) souche lyophilisée provenant de la collection du Professeur A. J. KLUYVER de Delft.

3. Souches C et F<sub>5</sub> provenant d'anciennes collections bactériologiques dont, avec l'aide du Professeur KLUYVER, nous précisons ici les principaux caractères et dont nous poursuivons l'identification.

##### II. Conditions de conservation des souches

1. *Tbm. Delbrucki* et *Sbm. casei* sont conservés sur un milieu liquide dont la composition est la suivante:

eau de levure double (extrait de levure obtenu à partir d'une suspension de levure de boulangerie

à 20% autoclavé 3 heures à 120° décantée et filtrée) additionnée de 2% de glucose, de 0.5% "Bacto Yeast Extract dehydrated Difco" et de 2% de  $\text{CO}_3\text{Ca}$ . Milieu autoclavé 20 minutes à 120°. L'incubation se fait à 45° pour *Tbm. Delbrucki* et à 38° pour *Sbm. casei*.

2. Les souches C et  $F_6$  sont conservées sur milieu solide incliné de composition suivante:

glucose 5%; peptone pancréatique "Prolabo" 1%; "Bacto Yeast Extract dehydrated Difco" 0.5%;  $\text{CO}_3\text{Ca}$  2%; agar 4%. Milieu autoclavé 20 minutes à 120°. Dans les deux cas l'incubation a lieu à 50°.

### III. Milieux de culture utilisés pour l'obtention des bactéries en grande masse

La composition de ces milieux est la même quelle que soit la souche étudiée. Pour obtenir de grandes masses bactériennes, les bactéries issues d'une culture sur milieu de conservation sont repiquées sur le milieu I.

*Milieu I.* 500 ml d'eau distillée sont portés à l'ébullition et additionnés de 65 g de farine de riz. Le mélange amené à 60° est additionné d'une suspension de un gramme d'amylase dans 10 ml d'eau froide. Le tout, après agitation est maintenu pendant au moins une heure à l'étuve à 50°. On ajoute alors 10 g de pâte d'acides aminés et 40 g de  $\text{CO}_3\text{Ca}$ . Autoclavage de 20 minutes à 120°. Ce milieu ensemencé est maintenu pendant 24 heures dans une étuve à la température optima de la bactérie considérée.

La culture ainsi obtenue est repiquée dans un ballon contenant 4 litres du milieu II.

<i>Milieu II.</i>	mélange A:	glucose	200 g
		carbonate de calcium	80 g
		eau	3.500 l
	mélange B:	Difco	20 g
		Peptone	8 g
		eau	0.5 l

Les mélanges A et B, stérilisés séparément 20 minutes à 120° sont mélangés immédiatement avant l'ensemencement.

### IV. Récolte bactérienne et préparation des essais fermentaires

Après 18 à 22 heures d'incubation sur le milieu II et élimination du carbonate de calcium par une centrifugation rapide, les bactéries sont séparées par une centrifugation prolongée (20 minutes à 4.000 t/min). La récolte bactérienne ainsi obtenue est lavée par centrifugation à deux reprises dans une solution NaCl 0.9% et finalement est mise en suspension dans un volume donné (20 à 30 ml suivant les cas) de chlorure de sodium 0.9%. La concentration en bactéries de cette suspension-mère à partir de laquelle seront préparés les essais fermentaires est estimée par poids sec, compte tenu du chlorure de sodium.

Les essais fermentaires sont réalisés dans des récipients de type antérieurement décrit<sup>4</sup>. Le tampon utilisé est une solution de bicarbonate 1.12%; l'atmosphère est saturée de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{pH} = 6.4$ . Le volume liquide total est de 20 à 25 ml. Les masses bactériennes mises en jeu dans un essai ont varié d'environ 50 à 400 mg (poids sec). Les molécules soufrées, substrat de désulfuration, ont été introduites (sauf mention spéciale) à une concentration de  $6.35 \cdot 10^{-3} M$ ; les substrats de fermentation lactique à une concentration de  $2.78 \cdot 10^{-2} M$ . Les essais sont agités dans un bain-marie de température constante pendant toute la durée des fermentations.

### V. Technique des dosages permettant de suivre l'évolution des réactions fermentaires

L'hydrogène sulfuré après avoir été quantitativement déplacé dans de l'acétate de zinc, est dosé par iodométrie dans les conditions habituelles. Les dosages d'acide lactique<sup>7,8,9</sup> de glucose<sup>26,29</sup>, lactose ou galactose<sup>29</sup> sont effectués après arrêt de la fermentation par addition de  $\text{SO}_4\text{H}_2$  et élimination des bactéries et autres substances insolubles par centrifugation. Les dosages de sucre sont perturbés de façon importante d'une part si l'acidification des essais a été faite avec de l'acide trichloracétique, d'autre part si les essais contiennent des substances réductrices autres que le glucose, telles que la cystéine ou le glutathion en particulier. Pour éviter les erreurs dues à la présence d'acide trichloracétique, l'acidification des essais a été faite exclusivement à l'aide d'acide sulfurique. Pour effectuer des dosages corrects de glucose dans les essais contenant glucose + cystéine ou bien la cystéine a été éliminée par le procédé au cadmium indiqué par DUMAZERT<sup>6</sup> ou bien le résultat du dosage du glucose sur les essais contenant glucose + cystéine a été corrigé en tenant compte du pouvoir réducteur d'un essai témoin, exempt de glucose, contenant de la cystéine à une concentration voisine de celle des essais réels.

### VI. Isolement de l'acide lactique sous forme de lactate de zinc

Suivant la technique indiquée par NEUBERG ET GORR<sup>21,22</sup>.

### VII. Procédés de mise en évidence de pigments hématiniques chez les bactéries étudiées

1. Catalase. Procédé manométrique de FUJITA ET KODAMA<sup>16</sup>.

Bibliographie p. 48.

2. *Cytochromes ou pigments apparentés.* La présence de ces pigments est détectée par des examens spectroscopiques à l'aide du spectroscope de poche de ZEISS ou du spectroscope à réversion de HARTRIDGE.

Ces examens sont effectués sur la pâte bactérienne obtenue par centrifugation (20 minutes à 5.000 t/min) d'une fraction de la suspension-mère des bactéries ayant servi à la préparation des essais. Cette pâte placée entre deux disques de verre séparés par un anneau de SCHEIBE est généralement examinée sous une épaisseur de 2,5 mm.

Que l'examen spectroscopique permette ou non de distinguer un spectre hématinique, une fraction de la pâte bactérienne est traitée par  $S_2O_4Na_2$  et pyridine en vue de provoquer la formation de l'hémochromogène de pyridine des pigments hématiniques apparents ou inapparents dont le spectre est accentué.

## RÉSULTATS

### I. Caractères homolactiques des souches

*Streptobacterium casei* et *Thermobacterium Delbrücki* sont des souches homolactiques de collection.

Le caractère homolactique des souches *C* et *F<sub>5</sub>* a été vérifié en se servant de masses bactériennes non proliférantes, en anaérobiose (atmosphère de  $CO_2$  pur) dans les conditions simples décrites au paragraphe IV (p. 39).

TABLEAU I  
CARACTERE HOMOLACTIQUE DES SOUCHES *C* ET *F<sub>5</sub>*  
Essais effectués à 50°

	Souche <i>C</i>		Souche <i>F<sub>5</sub></i>
Bactéries mises en jeu (mg poids sec)	269	3790	3672
Volume total de l'essai en ml	20	300	300
Durée des essais en minutes	210	120	270
Glucose en mg { au temps 0 — au temps <i>t</i>	100 —	1500 0	1500 0
Acide lactique (en mg) apparu au temps <i>t</i>	123*	1652*	1648*
Glucose disparu (en mg) au temps <i>t</i>	—	1500	1500

\* Le surplus d'acide lactique par rapport à la quantité théorique (calculée d'après le glucose initial) provient des réserves bactériennes et est dosable sur des essais témoins sans glucose.

Comme le montre le Tableau I, les souches *C* et *F<sub>5</sub>* transforment la totalité du glucose présent en acide lactique. Le surplus d'acide lactique trouvé à la fin de la fermentation par rapport à la quantité théorique calculée d'après le glucose initial dépend de l'acide lactique formé à partir des substance des réserves bactériennes; cet acide lactique provenant des réserves bactériennes est dosable sur des essais témoins sans glucose.

Le caractère homolactique des souches *C* et *F<sub>5</sub>* est confirmé par les expériences d'isolement de l'acide lactique sous forme de lactate de zinc résumées dans le Tableau II.

Signalons que l'addition de cystéine ( $6.25 \cdot 10^{-3} M$ ) ou de cystine, aux essais de fermentation du glucose ne modifie en rien la transformation du glucose en acide lactique.

TABLEAU II

ISOLEMENT SOUS FORME DE LACTATE DE ZINC  
DE L'ACIDE LACTIQUE PRODUIT PAR LES SOUCHES C ET  $F_5$ ,  
APRÈS FERMENTATION TOTALE DU GLUCOSE; ACTIVITÉ OPTIQUE DE CET ACIDE LACTIQUE

Fermentation du glucose dans les conditions décrites au paragraphe IV (p. 39) par des masses bactériennes non proliférantes (souche C, 3.79 g poids sec; souche  $F_5$ , 3.67 g poids sec); volume total des essais 300 ml; durée de fermentation = 120 minutes dans le cas de la souche C et 270 minutes dans le cas de la souche  $F_5$ ; température = 50° dans les deux cas.

	Souche C	Souche $F_5$
Acide lactique total dosé (en mg)	1470	1388
Lactate Zn déshydraté total obtenu en mg	1920	1536
Acide lactique calculé à partir du lactate de zinc isolé en mg	1425	1138
% de ZnO obtenu après calcination du lac- tate de zinc déshydraté (33.44% théorique)	33.51	34.46

Activité optique de  $(C_5H_5O_3)_2 \cdot Zn, 2H_2O$ , isolé:

Souche C:  $[\alpha]_D = -6^\circ.88$  ( $\alpha = -0^\circ.85, l = 3, C = 4.12\%$ , sol. aqueuse)

Souche  $F_5$ :  $[\alpha]_D = -7^\circ.30$  ( $\alpha = -0^\circ.70, l = 3, C = 3.20\%$ , sol. aqueuse)

Ces expériences permettent de conclure que les souches C et  $F_5$  trans-  
forment pratiquement la totalité du glucose en acide L(+) lactique<sup>22</sup>.

## II. Activité optique de l'acide lactique produit par les différentes souches étudiées

*Tbm. Delbrücki* forme à partir du glucose de l'acide D (—) lactique<sup>23</sup>; *Sbm. casei* forme à partir du glucose un mélange d'acide lactique dextrogyre et d'acide lactique levogyre<sup>23</sup>.

Les souches C et  $F_5$  forment de l'acide L (+) lactique (Tableau II).

## III. Substrats de fermentation lactique des souches étudiées

Dans les conditions expérimentales indiquées au paragraphe IV (p. 39) au cours d'essais d'une durée de 1 à 3 heures, la souche C ne produit d'acide lactique ni à partir de la glycérine ou de l'acide pyruvique, ni à partir de pentoses tels que xylose et arabinose, ni à partir du mannitol ou du raffinose. Au contraire elle forme de l'acide lactique à partir du glucose, du lévulose, du mannose, du saccharose et du maltose. En ce qui concerne le galactose les résultats négatifs obtenus dans le cas d'essais de 1 heure en anaérobiose, avec des bactéries à l'état de masses non proliférantes, deviennent légèrement positifs dans le cas d'essais avec des bactéries en croissance pendant 54 heures en semi-anaérobiose (Tableau III).

Il n'y a pas d'acide lactique formé à partir du lactose par la souche C (essais en croissance sur lait tournesolé ou sur eau de levure additionnée de lactose; essais à l'état de masse non proliférantes en anaérobiose) ni par la souche  $F_5$  (essais sur lait tournesolé et à l'état de masses non proliférantes) comme le montrent les Tableaux III et IV).

Le Tableau IV résume les principaux caractères fermentaires des souches utilisées.

*Sbm. casei* se distingue nettement des trois autres souches; la souche C s'apparente très étroitement à *Tbm. Delbrücki*; les quelques investigations relatives à la souche  $F_5$  (comme l'étude d'autres caractères le confirme dans la suite) indiquent déjà que cette souche est voisine de la souche C.

TABLEAU III

FORMATION D'ACIDE LACTIQUE PAR LA SOUCHE *C* EN CROISSANCE  
SUR DE L'EAU DE LEVURE DOUBLE +  $\text{CO}_2\text{Ca}$  PENDANT 54 HEURES A  $50^\circ$ ,  
EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTS SUCRES

Conditions semi anaérobies

Substrat	Acide lactique formé après 54 heures (en mg)
Glucose (0.111 M)	15.7
Galactose (0.111 M)	741.4
Lactose (0.055 M)	79.2
	22.5

TABLEAU IV

COMPARAISON ENTRE QUELQUES CARACTÈRES FERMENTAIRES  
DES MICROORGANISMES HOMOLACTIQUES ÉTUDIÉS

	<i>Strepto- bacterium casei</i>	<i>Thermo- bacterium Delbrücki</i>	Souche <i>C</i>	Souche <i>F<sub>5</sub></i>
Température optima	$38^\circ$	$45^\circ$	$50^\circ$	$50^\circ$
Acide lactique formé à partir du glucose	D et L	D	L	L
Croissance sur lait tournesolé	+ { coagulation, acidification	o	o	o

Formation d'acide lactique  
à partir de différents substrats

Glycérine	o	o	o	o
Acide pyruvique	o	o	o	o
Xylose	o	o	o	o
Arabinose	o	o	o	o
Mannitol	+	+	+	+
Lévéulose	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+
Galactose	+	±	±	o
Saccharose	±	+	+	o
Maltose	+	+	+	o
Lactose	+	o	o	o
Raffinose	o	±	o	o

#### IV. Aptitudes désulfurantes des organismes considérés

##### 1. Désulfuration de la L-cystéine

Les résultats des expériences préparées dans les conditions précisées au paragraphe IV (p. 39) et résumées dans le Tableau V, montrent que *Tbm. Delbrücki* et *Sbm. casei* sont incapables de désulfurer la L-cystéine en anaérobiose, en présence ou absence de glucose. Par contre les souches *C* et *F<sub>5</sub>* libèrent  $\text{SH}_2$  à partir de la L-cystéine. Ce phénomène dépend de la présence dans ces microorganismes d'une cystéine désulfhydrase puisqu'il est supprimé quand on substitue aux bactéries vivantes des bactéries soumises pendant 10 minutes à une température de  $100^\circ$ .

Bibliographie p. 48.

TABLEAU V  
DÉSULFURATION DE LA L-CYSTÉINE EN PRÉSENCE OU EN L'ABSENCE  
DE GLUCOSE PAR LES DIFFÉRENTES SOUCHES ÉTUDIÉES

Concentration en L-cystéine =  $6.25 \cdot 10^{-3} M$

Concentration en glucose =  $2.78 \cdot 10^{-2} M$

Souches	Température	Bactéries mg. pds sec par essai	Durée en minutes	$Q_{SH_2}^*$	
				sans glucose	avec glucose
<i>Tbm. Delbrücki</i> (souche lyophilisée)	45°	217	60	0	0
		174	120	0	0
<i>Sbm. casei</i> (souche lyophilisée)	37°	205	60	0	0
		289	210	0	0
Souche $F_5$ (non lyophilisée)	50°	225	120	—	1.26
	37°	450	60	0.34	0.49
Souche C (souche lyophilisée)	50°	382	60	0.73	0.89
Souche C (non lyophilisée)	50°	233	60	0.91	1.45
		146	60	—	1.37
		280	60	—	1.20
		306	60	—	2.02
		197	60	—	2.1
		391	60	—	1.03
		283	60	0.69	1.05
		294	60	0.68	1.41
		276	60	—	1.4

\*  $Q_{SH_2}$  =  $\mu g$   $SH_2$  libéré par mg (poids sec) de bactéries et par heure

Les souches de *Tbm. Delbrücki* et *Sbm. Casei* nous ayant été envoyées de Delft à l'état lyophilisé il a paru nécessaire de procéder à la lyophilisation d'au moins une de nos souches désulfurantes\* (souche C) et de comparer l'aptitude désulfurante de cette même souche lyophilisée ou non; ces essais permettent de constater que la souche lyophilisée a une activité désulfurante un peu moindre (Tableau V).

La vitesse de désulfuration de la L-cystéine  $Q_{SH_2}$  ( $\mu g$   $SH_2$  libérés par mg bactéries poids sec et par heure) égale 1.4 (en moyenne) pour la souche C et est du même ordre de grandeur pour la souche  $F_5$ . Cette vitesse est donc la même que celle antérieurement trouvée pour *Proponibacterium pentosaceum*<sup>5</sup>; environ 10 fois plus faible que celle de *B. subtilis*<sup>14</sup>, et environ 18 fois plus faible que celle de *E. coli* adapté<sup>4</sup>. Elle varie avec la température; elle est accrue en présence de glucose.

L'activité enzymatique désulfurante de la souche C a fait l'objet des expériences les plus nombreuses et les plus précises. Ces expériences montrent que la vitesse de désulfuration de la L-cystéine en présence de glucose, mesurée en l'espace d'une demi-heure est sensiblement proportionnelle à la masse bactérienne mise en jeu (Tableau VI) et que, pour une masse bactérienne donnée, la vitesse de désulfuration croît avec la concentration de la L-cystéine initialement présente dans le milieu (Tableau VII).

\* Nous remercions ici le Professeur SOHIER qui a bien voulu mettre à notre disposition son appareil à lyophilisation.

TABLEAU VI

VITESSE DE LA DÉSULFURATION DE LA L-CYSTÉINE  $6.35 \cdot 10^{-3} M$  EN FONCTION  
DE LA MASSE BACTÉRIENNE MISE EN JEU, EN PRÉSENCE DE GLUCOSE

Glucose =  $2.78 \cdot 10^{-2} M$

Bactérie: souche C

Durée de l'expérience:  $\frac{1}{2}$  heure

Bactéries mg poids sec par essai	$\mu g$ SH <sub>2</sub> libérés
45.7	13
91.4	70
137.1	114
182.8	207

TABLEAU VII

VITESSE DE DESULFURATION DE LA SOUCHE C EN FONCTION DE LA CON-  
CENTRATION EN L-CYSTÉINE, EN PRÉSENCE DE GLUCOSE ( $2.78 \cdot 10^{-2} M$ )

Durée des expériences: 1 heure

mg bact. (poids sec) par essai	L-cystéine		SH <sub>2</sub> libéré en $\mu g$	Q <sub>SH<sub>2</sub></sub>
	mg par essai	SH <sub>2</sub> max. libérable en $\mu g$		
306	1	216	82	0.268
	2	432	125	0.41
	5	1080	257	0.84
197.5	10	2160	330	1.67
306	20	4320	618	2.02
197.5	20	4320	418	2.12
197.5	40	8640	514	2.6

TABLEAU VIII

ABSENCE DE SPÉCIFICITÉ OPTIQUE

DE LA CYSTÉINE-DÉSULFHYDRASE DE LA SOUCHE C

Essais en l'absence et en présence de glucose ( $2.78 \cdot 10^{-2} M$ )

Concentration en cystéine =  $6.35 \cdot 10^{-3} M$

Bactéries (mg poids sec) contenues dans chaque essai = 233 mg

Durée = 60 minutes

Essais	$\mu g$ SH <sub>2</sub> libérés en présence de	
	L-cystéine	D-cystéine
Sans glucose	213	241
Avec glucose	338	362

## 2. Désulfuration de la D-cystéine

L'expérience rapportée dans le Tableau VIII montre que la D-cystéine est désulfurée de la même façon que la L-cystéine.

Contrairement à ce qui a été antérieurement observé à propos de *E. coli*<sup>11</sup> et de *B. subtilis*<sup>14</sup>, la cystéine désulfhydrase de la souche C ne présente aucune spécificité

Bibliographie p. 48.

optique; elle se comporte de la même façon que la cystéine-désulhydrase de *Propionibacterium pentosaceum*<sup>5</sup>.

Si l'on compare l'influence exercée par différentes molécules hydrocarbonées telles que glucose, acide pyruvique, glycérine, lactose, et galactose sur la vitesse de désulfuration de la cystéine par la souche C (Tableau IX), il est intéressant de constater que glucose et glycérine ont un effet accélérateur; que lactose et galactose sont sans effet accélérateur. L'acide pyruvique à la concentration considérée ( $2.78 \cdot 10^{-2} M$ ) a un effet *inhibiteur* comme dans le cas de la désulfuration de la cystéine par *Propionibacterium pentosaceum*; il s'agit peut-être d'une inhibition par compétition avec un groupement  $-CO$ -actif du ferment<sup>12, 13, 14</sup>.

TABLEAU IX

INFLUENCE DE DIFFÉRENTES MOLÉCULES HYDROCARBONÉES, AUTRES QUE LE GLUCOSE SUR LA DÉSULFURATION DE LA L-CYSTÉINE PAR LA SOUCHE C

Concentration en L-cystéine =  $6.35 \cdot 10^{-3} M$

Concentration des différentes substances ajoutées =  $2.78 \cdot 10^{-2} M$

Durée de l'expérience = 1 heure

Substances ajoutées	(poids sec) mg bactéries par essai	$Q_{SH_2}$
Glucose	241	0.75 *
Acide pyruvique	241	0
0	294	0.68
Glucose	294	1.4
Glycérine	294	1.2
Glucose	391	1.06
Lactose	391	0.93
0	283	0.69
Glucose	283	1.05
Glucose	(bactéries bouillies)	0
Lactose	283	0.65
Galactose	283	0.74

\* récolte bactérienne conservée 4 h à la glacière avant usage

### 3. Désulfuration de la "L" et de la "DL" cystine

La souche C en absence de glucose est incapable de libérer  $SH_2$  de la L-cystine. En présence de glucose cette désulfuration devient possible mais ne se manifeste qu'après une période d'induction (Tableau X). Ceci permet de supposer que la désulfuration de la cystine n'a lieu qu'après réduction préalable de la cystine en cystéine.

Contrairement à ce qui se passe pour *Propionibacterium pentosaceum* il ne semble pas ici que la quantité d' $SH_2$  libéré puisse atteindre 100% de la quantité théoriquement possible. Dans le cas de la cystine comme dans celui de la cystéine la désulfuration s'arrête quand la quantité de  $SH_2$  dégagé atteint environ 30% de la quantité théorique possible.

La DL cystine paraît moins rapidement attaquée que la L-cystine.



TABLEAU X

DÉSULFURATION DE LA L ET DE LA DL-CYSTINE COMPARÉE A CELLE DE LA L-CYSTÉINE  
PAR LA SOUCHE C EN PRÉSENCE OU EN L'ABSENCE DE GLUCOSE

Concentration en glucose =  $2.78 \cdot 10^{-2} M$

Bactéries mg poids sec	Durée en heures	Glucose	Cystine			L-cystéine	
			L ou DL μg SH <sub>2</sub> libérables	L	DL	μg SH <sub>2</sub> libérables	μg SH <sub>2</sub> libérés
				μg SH <sub>2</sub> libérés			
146	1	o	5650	o	„	4320	„
		+	5650	4	„	4320	200
280	1	+	4800	46	„	4320	„
	8	o	4800	44	„	4320	„
		+	4800	450	„	4320	792
242	3	+	1080	349	212	1080	„
	5	+	1080	289	248	1080	314

#### 4. Désulfuration de molécules soufrées autres que cystine et cystéine

La souche C ne désulfure ni l'acide thioglycolique, ni l'acide thiobutyrique, ni l'acide thiomalique, ni la méthionine, ni le glutathion réduit.

### V. Recherche des ferments hématiniques dans les quatre souches étudiées

#### 1. Catalase

La présence ou l'absence de catalase ont été vérifiées ou recherchées sur les quatre souches étudiées: les expériences confirment l'absence de catalase dans les souches de *Tbm. Delbrücki* et *Sbm. casei* et révèlent la présence de catalase dans la souche C lyophilisée ou non, et dans la souche *F<sub>5</sub>*.

#### 2. Cytochromes ou pigments apparentés

A l'occasion de chaque récolte bactérienne a été effectué un examen spectroscopique de la pâte bactérienne obtenue par centrifugation d'une fraction de la suspension-mère utilisée à la préparation des essais fermentaires; le même examen a été répété après traitement de la pâte bactérienne par la pyridine et l'hydrosulfite de sodium.

Dans le cas de *Tbm. Delbrücki* et de *Sbm. casei* ces examens spectroscopiques ne permettent de déceler la présence d'aucun spectre hématinique, même après traitement à la pyridine.

Il en est tout autrement pour les souches C et *F<sub>5</sub>*.

a. *Souche C*. Suivant les cas, la pâte bactérienne éclairée par de la lumière blanche sous une épaisseur de 2.5 mm présente une teinte variable allant de l'orange pâle au rouge vif.

Avant le traitement par la pyridine, l'examen spectroscopique révèle ou bien l'absence de spectre hématinique ou bien la présence d'un spectre hématinique dont la bande  $\alpha$ , plus ou moins nette, se trouve aux environs de 565 m $\mu$ . Après traitement par la pyridine la teinte de la préparation vue à travers de la lumière blanche varie de

l'orange pâle au rouge sang; dans tous les cas apparaît un spectre hématinique dont le centre de la bande  $\alpha$  a une position variant entre 545 et 549 m $\mu$ .

b. *Souche F<sub>5</sub>*. La coloration de la préparation vue à travers la lumière blanche varie du blanc verdâtre au rouge en passant par différents tons de jaunes orangés. Comme dans le cas de la souche *C*, on constate suivant les récoltes ou bien une absence de spectre hématinique ou bien la présence d'un spectre hématinique dont la bande  $\alpha$  est centrée dans des positions variables: 565 m $\mu$ ; 570 m $\mu$ . Après traitement par la pyridine, il y a, dans tous les cas, apparition du spectre d'un hémochromogène de pyridine dont la bande  $\alpha$  est centrée environ sur 549 m $\mu$ . La préparation traitée par la pyridine vue à travers une source de lumière blanche a une coloration toujours plus rouge que la préparation non traitée.

### CONCLUSIONS

L'ensemble des expériences décrites montre d'une part l'existence d'une cystéine-désulphydrase chez deux organismes (souches *C* et *F<sub>5</sub>*) homolactiques (ac. L (+) lactique), pourvus de catalase et de pigments hématiniques type cytochrome, et d'autre part, l'absence de ce ferment chez deux autres organismes homolactiques: *Tbm. Delbrücki* formant ac. D (—) lactique et *Sbm. casei* formant un mélange d'ac. D (—) et L (+) lactique, dépourvus de catalase et de pigments hématiniques type cytochromes.

Au premier abord il semble paradoxal que le ferment de désulfuration de la cystéine soit présent chez les organismes conservés dans les conditions les plus aérobies, pourvus de ferments respiratoires hématiniques, et soit absent chez les organismes conservés dans les conditions les moins aérobies, exempts de ferments respiratoires hématiniques.

Il est toutefois remarquable que *Tbm. Delbrücki* présente de nombreux caractères communs avec les souches *C* et *F<sub>5</sub>* (Tableau V).

Si l'on tient compte des conclusions tirées par WARBURG<sup>31</sup> des expériences de DAVIS<sup>3</sup>: "il est évident que les bacilles lactiques perdent graduellement leur système enzymatique de respiration quand ils sont cultivés en anaérobiose", on peut se demander si l'équipement enzymatique des organismes homolactiques étudiés ne serait pas capable de se transformer suivant les conditions de vie aérobie ou anaérobie, l'activité désulfurante subissant un destin parallèle à l'activité respiratoire. Ces différentes questions seront abordées dans de prochaines recherches.

### RÉSUMÉ

Quatre souches homolactiques ont été étudiées comparativement en ce qui concerne leur aptitude à désulfurer la cystéine et leur teneur en pigments hématiniques.

*Tbm. Delbrücki* et *Sbm. casei*, peu aérophiles, forment l'un de l'acide D (—) lactique et l'autre un mélange des acides D et L lactiques. Ces organismes sont incapables l'un et l'autre de désulfurer la cystéine et ne contiennent ni ferments respiratoires hématiniques, ni catalase.

Par contre les organismes aérophiles *C* et *F<sub>5</sub>* formant de l'acide L (+) lactique, contiennent une cystéine-désulphydrase analogue à celle de *Propionibacterium pentosaceum*<sup>5</sup>, de la catalase et un pigment hématinique type cytochrome. De nombreuses autres propriétés fermentaires rapprochent cependant les souches *C* et *F<sub>5</sub>* de *Tbm. Delbrücki*.

La question se pose de savoir dans quelle mesure les conditions de vie aérobie ou anaérobie de ces organismes commandent les synthèses de leurs systèmes enzymatiques de respiration et de désulfuration.

*Bibliographie p. 48.*

## SUMMARY

4 Micro-organisms have been compared for their ability to remove sulphur from cysteine and for their content of haematin-like pigments.

*Tbm. Delbrücki* and *Sbm. casei*, only slightly aerophilic, form respectively D(—)-lactic acid and a mixture of D- and L-lactic acids. These organisms are incapable of eliminating sulphur from cysteine and they contain neither haematin-like respiratory pigments nor catalase.

On the other hand, the aerophilic organisms *C* and *F<sub>5</sub>* form L(+)-lactic and they contain a cysteine-desulphhydrase analogous to that of *Propionibacterium pentosaceum*, catalase, and a pigment of the cytochrome type. Many other of the enzyme properties of the *C* and *F<sub>5</sub>* organisms, however, are similar to those of *Tbm. Delbrücki*.

The question is the extent to which the aerobic or anaerobic conditions of life of these organisms govern their enzyme systems which are responsible for the respiration and the removal of sulphur.

## ZUSAMMENFASSUNG

4 Stämme von Mikroorganismen wurden vergleichsweise auf ihre Fähigkeit Cystein zu entschwefeln und auf ihren Gehalt an hämatinartigen Pigmenten untersucht.

Die wenig aerophilen Mikroorganismen *Tbm. Delbrücki* und *Sbm. casei* bilden respektive D(—) Milchsäure und eine Mischung von D- und L-Milchsäure. Diese Organismen sind beide nicht im Stande, Cystein zu entschwefeln und enthalten weder hämatinartige Atmungsfermente noch Catalase.

Dagegen enthalten die aerophilen Organismen *C* und *F<sub>5</sub>*, welche L(+) Milchsäure bilden, eine Cystein-Desulphhydrase, analog derjenigen von *Propionibacterium pentosaceum*, Catalase und ein Pigment vom Typus Cytochrom. Viele andere Fermenteigenschaften der Stämme *C* und *F<sub>5</sub>* ähneln aber denjenigen von *Tbm. Delbrücki*.

Es fragt sich nun, inwiefern die aeroben oder anaeroben Lebensbedingungen dieser Organismen die Synthesen ihrer Enzymsysteme, welche für die Atmung und für die Entschwefelung verantwortlich sind, beherrschen.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> P. CHAIX ET C. FROMAGEOT, *Bull. soc. chim. biol.*, 24 (1942) 1125.
- <sup>2</sup> P. CHAIX ET TCHEN PAU KIUN, *Bull. soc. chim. biol.*, 25 (1943) 1374.
- <sup>3</sup> J. G. DAVIS, *Biochem. Z.*, 265 (1933) 90; 267 (1933) 357.
- <sup>4</sup> P. DESNUELLE ET C. FROMAGEOT, *Enzymologia*, 6 (1939) 80, 242, 387.
- <sup>5</sup> P. DESNUELLE, E. A. WOOKEY ET C. FROMAGEOT, *Enzymologia*, 8 (1940) 225.
- <sup>6</sup> C. H. DUMAZERT, *Thèse de Pharmacie*, Marseille 1936.
- <sup>7</sup> T. E. FRIEDEMANN, M. COTONIO ET P. A. SHAFFER, *J. Biol. Chem.*, 73 (1927) 335.
- <sup>8</sup> T. E. FRIEDEMANN ET J. B. GRAESER, *J. Biol. Chem.*, 100 (1933) 291.
- <sup>9</sup> T. E. FRIEDEMANN ET A. J. KENDALL, *J. Biol. Chem.*, 82 (1929) 23.
- <sup>10</sup> C. FROMAGEOT ET P. DESNUELLE, *Bull. soc. chim. biol.*, 24 (1942) 1269.
- <sup>11</sup> C. FROMAGEOT, P. DESNUELLE ET L. GRAND, *Bull. soc. chim. biol.*, 25 (1943) 1227; 26 (1944) 1001.
- <sup>12</sup> C. FROMAGEOT ET R. GRAND, *Enzymologia*, 11 (1943) 81; 11 (1944) 235.
- <sup>13</sup> C. FROMAGEOT ET R. GRAND, *Bull. soc. chim. biol.*, 25 (1943) 1128.
- <sup>14</sup> C. FROMAGEOT ET TCHEN PAU KIUN, *Bull. soc. chim. biol.*, 23 (1941) 1471; 25 (1943) 1006 et 1141.
- <sup>15</sup> C. FROMAGEOT, E. A. WOOKEY ET P. CHAIX, *Enzymologia*, 9 (1940) 198; *Compt. rend.*, 209 (1939) 1019.
- <sup>16</sup> A. FUJITA ET T. KODAMA, *Biochem. Z.*, 232 (1931) 20.
- <sup>17</sup> J. P. GREENSTEIN ET LEUTHARDT, *J. Natl. Cancer Inst.*, 5 (1945) 209, 223, 249; 6 (1946) 197; 8 (1947) 35.
- <sup>18</sup> M. KONDO, *Biochem. Z.*, 136 (1923) 198.
- <sup>19</sup> M. LASKOWSKI ET C. FROMAGEOT, *J. Biol. Chem.*, 140 (1941) 663.
- <sup>20</sup> J. M. LAWRENCE ET C. V. SMYTHE, *Arch. Biochem.*, 2 (1943) 225.
- <sup>21</sup> C. NEUBERG ET G. GORR, *Biochem. Z.*, 173 (1926) 476.
- <sup>22</sup> C. OPPENHEIMER, *Die Methodik der Fermente*, 3 (1929) 1259.
- <sup>23</sup> S. ORLA-JENSEN, *The Lactic Acid Bacteria*, Ejnar Munksgaard, Copenhagen, 1943.
- <sup>24</sup> J. C. RANSMEIER ET J. A. STEKOL, *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 51 (1942) 85, 88, 92.
- <sup>25</sup> T. SASAKI ET I. OTSUKA, *Biochem. Z.*, 39 (1912) 208.
- <sup>26</sup> P. A. SHAFFER ET A. F. HARTMANN, *J. Biol. Chem.*, 45 (1921) 349.
- <sup>27</sup> C. V. SMYTHE, *J. Biol. Chem.*, 140 (1941) 118; 142 (1942) 387.
- <sup>28</sup> C. V. SMYTHE ET D. HALLIDAY, *J. Biol. Chem.*, 144 (1942) 237.
- <sup>29</sup> H. R. STILES, W. R. PETERSON ET E. B. FRED, *J. Bact.*, 12 (1926) 427.
- <sup>30</sup> H. L. A. TARR, *Biochem. J.*, 27 (1933) 136; 759; 1869.
- <sup>31</sup> O. WARBURG, *Schwermetalle als Wirkungsgruppen von Fermenten*, Werner Saenger, Berlin 1946, p. 26; 79.

Reçu le 3 mars 1951