

RECHERCHES SUR LE MÉTABOLISME BACTÉRIEN DES
CYTOCHROMES ET DES PORPHYRINES

I. DISPARITION PARTIELLE DES CYTOCHROMES
PAR CULTURE ANAÉROBIE
CHEZ CERTAINES BACTÉRIES AÉROBIES FACULTATIVES

par

PIERRE SCHAEFFER

Service de Physiologie microbienne Institut Pasteur, Paris (France)

INTRODUCTION

Au cours d'un travail ayant pour but d'élucider le rôle de la streptomycine (Sm) chez les mutants Sm — exigeants de *Bacillus cereus*, nous en étions venus à soupçonner une action de l'antibiotique dans la biosynthèse des cytochromes. (voir SCHAEFFER ET SLONIMSKI¹ et l'article IV de cette série²). Pour la mettre en évidence, nous comparions les teneurs en ces pigments des cultures "normales" et "carencées"^{*} de notre mutant. La comparaison était cependant rendue difficile du fait d'une certaine variation, d'une expérience à l'autre, dans la teneur en cytochromes des cultures normales (témoins). Il devint bientôt manifeste que des différences dans l'oxygénéation de nos cultures rendaient compte de cette variation et que nous pouvions la réduire considérablement en maintenant constante et maxima l'oxygénéation en cours de croissance. L'intérêt se fit alors sentir de rechercher jusqu'à quel point une croissance strictement anaérobie affecterait l'équipement en cytochromes de *B. cereus*. Le problème ainsi posé, l'emploi de mutants particuliers ne s'imposait plus: nous avons donc utilisé une souche sauvage de *B. cereus*. Une partie des résultats a fait l'objet d'une note préliminaire³.

Différents auteurs ont, avant nous, recherché, chez les bactéries aérobies facultatives, un effet possible de la croissance anaérobie sur le système cytochromique. Tous ont rapporté des résultats négatifs, c'est-à-dire des spectres d'absorption apparemment identiques, que la culture ait été ou non aérobie. Quoique certains de ces auteurs aient eu une juste prescience du phénomène qu'ils recherchaient, ils ne se sont généralement pas adressés, pour le mettre en évidence, au matériel favorable.

La notion de l'adaptabilité à l'oxygène du système des cytochromes a récemment été clairement établie par EPHRUSSI ET SLONIMSKY^{4,5} qui, ainsi que CHIN⁶ ont travaillé sur la levure.

* Par cultures "normales" nous entendons celles en croissance dans un milieu contenant de la Sm. en concentration optima; par cultures "carencées", celles dont la croissance venait de s'arrêter faute de Sm. (cf. 2).

Bibliographie p. 270.

Nous nous proposons de donner ici une étude comparative des spectres d'absorption des cytochromes de certaines espèces bactériennes aérobies facultatives, selon que la croissance des bactéries a eu lieu en présence ou en absence d'oxygène. Les espèces étudiées ont été *B. cereus* et *E. coli*. Les résultats diffèrent avec l'espèce envisagée: le système cytochromique de *B. cereus* (cytochromes, *a*, *b*, *c*) est sensible à l'absence d'oxygène pendant la croissance, celui de *E. coli* (cytochromes *a₂*, *a₁*, *b₁*)⁷ y est insensible. Les altérations que la croissance anaérobie de *B. cereus* fait subir au spectre d'absorption de cet organisme — le spectre des cultures aérobies étant pris pour référence — sont décrites. Un fait inexplicable est également signalé: les cultures anaérobies de *B. cereus*, en dépit de la déficience de leur système cytochromique, ont une intensité respiratoire (sur glucose) égale ou supérieure à celle des cultures aérobies.

MATÉRIEL ET MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

A. Souches. Nous avons utilisés la souche 'Caron' de *Bacillus cereus* et la souche B/r d'*Escherichia coli*.

B. Milieux. Un milieu salin⁸ glucosé à 5 pour 1000 était utilisé pour les cultures d'*E. coli*. Ce milieu ne convenait pas à la culture de *B. cereus* (KNIGHT⁹) nous avons cultivé cet organisme en ajoutant au milieu salin de la protéose-peptone Difco (1 pour 1000). Dans ces milieux, le pH final des cultures aérobies est voisin de 7, celui des cultures anaérobies par contre varie de 6.0 à 6.5. Pour éviter d'attribuer à l'absence d'oxygène des phénomènes dus peut-être à l'acidité du milieu, le système tampon du milieu salin a fréquemment été doublé (phosphate *M/5*). La croissance bactérienne est alors plus lente, mais le milieu permet d'obtenir des cultures riches dont le pH reste constant jusqu'en fin de croissance, même anaérobiose. Ces précautions étaient d'autant plus nécessaires qu'ELVEHJEM¹⁰ a noté chez la levure la diminution de la respiration cyano-sensible sous l'effet de l'acidification du milieu. Dans nos essais, les résultats ont été les mêmes que fût ou non doublée la concentration en phosphates.

C. Mode de culture. Les ensemencements étaient en général faits au 1/1000 à partir d'une culture de la veille et les récoltes faites après 14 à 18 heures de séjour à 37° C. Les cultures sur milieu solide ont été proscribes; elles livrent en effet un mélange de bactéries d'âge physiologique très variable et différents auteurs (ELVEHJEM¹⁰, CHAIX ET RONCOLI¹¹) ont noté des changements qualitatifs et quantitatifs dans l'équipement en cytochromes des microorganismes au cours du vieillissement.

Les cultures aérobies se faisaient dans des fioles d'Erlenmeyer de 2 litres renfermant 200 ml de milieu liquide. Ces fioles étaient agitées horizontalement (amplitude de 5 cm, 90 oscillations complètes par minute).

Les cultures anaérobies avaient lieu dans des fioles d'Erlenmeyer de 500 ml contenant 400 ml de milieu. Sitôt après l'autoclavage, qui débarrasse le milieu des gaz dissous, les fioles étaient refroidies sous eau courante et recevaient le glucose et l'inoculum; puis on faisait barboter pendant 30 minutes un mélange d'azote et de CO₂ (5%), débarrassé des dernières traces d'oxygène par passage dans un four à cuivre. Le tube de sortie des gaz plongeait dans l'eau pendant toute l'incubation.

D. Récoltes. Lors du prélèvement des cultures, leur densité optique et leur pH étaient mesurés et leur pureté contrôlée sur lame. On centrifugeait les cultures à 0° C; les liquides surnageant étaient filtrés le jour même sur bougie et conservés à la glacière jusqu'au lendemain, où se faisait l'extraction des porphyrines (voir article II de cette série¹²). Les culots bactériens, dont on notait la couleur, étaient lavés une fois à l'eau physiologique, la seconde centrifugation se faisant dans des tubes coniques gradués en 1/10 ml. La lecture directe du volume du culot permettait la préparation de la suspension à 50% dans l'eau physiologique, suspension utilisée pour les examens et dosages spectroscopiques et dont finalement l'azote était dosé par la méthode de Kjeldahl.

E. Examen spectroscopique des suspensions bactériennes. Cet examen se faisait, d'abord à la température du laboratoire puis à celle de l'azote liquide (-196° C), avec un microspectroscope à réversion de HARTRIDGE. L'épaisseur des préparations variait de 2 à 8 mm.

F. Dosage du protohème et du cytochrome c. Pour ces dosages nous avons utilisé le microspectroscope de Zeiss.

a. Protohème. Le protohème total intrabactérien était dosé sous forme de protohémochromogène pyridinique (PHCP), selon la méthode de ELLIOTT ET KEILIN¹³. La suspension bactérienne, selon la technique d'EPHRUSSI ET SLONIMSKI⁶, était diluée par un facteur 5/3. La solution de référence de PHCP, préparée avant chaque dosage à partir d'hémine selon les directives de ELLIOTT ET KEILIN, était étalonnée au spectrophotomètre de Beckman à 556 $\mu\mu$;

b. Cytochrome c. Ce dosage ne concerne que les expériences portant sur *B. cereus*. Les références bibliographiques sont les mêmes que pour le dosage de protohème. La solution étalon est une solution fraîche de cytochrome *c* commercial dans un tampon phosphate *M/20*, pH 7.0, additionnée d'hydro-

sulfite et dosée au Beckman, contre le tampon seul, à 550 m μ . Les extinctions des solutions-étalons qui conviennent le mieux aux dosages sont voisines de $\log \frac{I_0}{I} = 0.100-0.120$ (épaisseur 1 cm; ces valeurs s'entendent à 550 m μ pour le cytochrome c, à 556 m μ pour le PHCP). Dans les dosages les suspensions bactériennes sont toujours, comme la solution-étalon, à la température de la pièce.

G. Expression des résultats des dosages

a. *Cytochrome c*. La valeur de E_{mM} pour le cytochrome c réduit à son maximum d'absorption (550 m μ) est 28.1 (LEMBERG ET LEGGE¹⁴, p. 349) C'est dire qu'une solution de cytochrome c de $E^1 \text{ cm}_{550\text{m}\mu} = 1$ correspond à une concentration de $3.56 \cdot 10^{-2}$ micromole par ml. Si nous appelons D_e la valeur de $E^1 \text{ cm}_{550\text{m}\mu}$ pour la solution-étalon, L_e l'épaisseur en millimètres de cette solution qui donne une bande αc de même intensité que celle donnée par une suspension bactérienne contenant n mg/ml d'azote et vue sous une épaisseur L_b (en millimètres), alors la quantité en micromoles de cytochrome c présente par gramme d'azote bactérien est donnée par l'expression :

$$(1) \text{ Cyt. } c \text{ (en } \mu\text{M/g N)} = 35.6 \times D_e \times \frac{L_e}{L_b} \times \frac{1}{n}$$

b. *Protohème total*. De la valeur de l'extinction millimoléculaire du PHCP à son maximum d'absorption ($E_{mM}^{556\text{m}\mu} = 31$; LEMBERG ET LEGGE¹⁴, p. 177), nous tirons qu'une solution de PHCP de $E^1 \text{ cm}_{556\text{m}\mu} = 1$ a une concentration de $3.23 \cdot 10^{-2}$ micromolécules par ml. Cette concentration moléculaire est aussi celle du protohème qui, molécule pour molécule, a donné naissance au PHCP. En conservant la même notation que ci-dessus, (à ceci près que D_e est maintenant la valeur de $E^1 \text{ cm}_{556\text{m}\mu}$ pour la solution-étalon de PHCP) et en tenant compte de la dilution (5/3) apportée par l'addition de soude et de pyridine à la suspension bactérienne, nous avons :

$$(2) \text{ Protohème (en } \mu\text{M/g N)} = 32.3 \times D_e \times \frac{L_e}{L_b} \times \frac{1}{n} \times \frac{5}{3}$$

RÉSULTATS

A. Etude spectroscopique de *B. cereus*

I. Aspect des spectres d'absorption

Le simple examen à l'œil nu des culots bactériens permet de constater que ceux-ci sont de couleur crème dans le cas des cultures aérobies, blancs comme la craie dans celui des cultures anaérobies. La différence se précise lorsque l'on regarde les spectres décrits au Tableau I. On voit sur ce tableau que *la croissance anaérobiose s'accompagne d'une disparition spectroscopiquement complète des cytochromes a et c et d'un affaiblissement notable de la teneur en cytochrome b*; la disparition du composant αc (évidente sur les préparations chauffées) est, pensons-nous, responsable du déplacement vers le rouge de la bande complexe ($\alpha b + \alpha c$) par culture anaérobiose (de 555 à 558.5 m μ à -196° C). Contrairement à ce qu'ont observé EPHRUSSI ET SLONIMSKI^{5,6} chez la levure, l'apparition d'une bande nouvelle b_1 n'est pas nettement suggérée dans ces expériences; nous n'observons pas non plus de bande a_1 (580 m μ) dans nos cultures anaérobies. Ces différences sont toutefois mineures et peut-être plus apparentes que réelles; en effet, le fait que chez *B. cereus* aérobiose les deux bandes αb et αc ne sont pas nettement distinctes suffit à empêcher de déceler comme singulière une bande intermédiaire telle que αb_1 ; que nous n'avons pas décelé la bande a_1 en anaérobiose peut seulement traduire le fait que nos suspensions sont, d'une façon générale, moins riches en cytochromes que les suspensions de levure. Ces différences secondaires ne doivent pas masquer l'accord profond des résultats obtenus avec ceux observés chez la levure, à savoir la disparition spectroscopique complète des cytochromes *a* et *c*.

Bibliographie p. 270.

TABLEAU I
ASPECTS DES SPECTRES D'ABSORPTION DES CYTOCHROMES DE *B. cereus*
SELON LE MODE DE CULTURE

Les suspensions bactériennes à 50% (vol/vol) dans l'eau physiologique sont vues sous une épaisseur de 4 mm dans un spectroscope de HARTRIDGE, après addition d'hydrosulfite.

		<i>Cultures aérobies</i>	<i>Cultures anaérobies</i>
bande $\alpha\alpha$	$\left. \begin{array}{l} 18^\circ \text{C} \\ \hline -196^\circ \text{C} \end{array} \right\}$	à la limite de la visibilité ou absente, sous 8 mm, intensité faible, centrée à 602 m μ . intensité faible à moyenne centrée à 600-601 m μ .	toujours absente, même sous 8 mm d'épaisseur.
	$\left. \begin{array}{l} 18^\circ \text{C} \\ \hline -196^\circ \text{C} \end{array} \right\}$	intensité faible à moyenne, centrée à 557.5 m μ , bords à 549 et 566 m μ , plus intense côté bleu. intensité très forte, centrée à 554-556 m μ , bords à 547 et 564 m μ .	toujours absente, même sous 8 mm d'épaisseur. à la limite de la visibilité, ou très faible, centrée vers 559 m μ .
bande complexe ($\alpha b + \alpha c$)	$\left. \begin{array}{l} 18^\circ \text{C} \\ \hline -196^\circ \text{C} \end{array} \right\}$	intensité faible à moyenne, centrée à 557.5 m μ , bords à 549 et 566 m μ , plus intense côté bleu. intensité très forte, centrée à 554-556 m μ , bords à 547 et 564 m μ .	intensité faible à moyenne, centrée à 558-559 m μ , bords à 551 et 565 m μ .
	$\left. \begin{array}{l} 18^\circ \text{C} \\ \hline -196^\circ \text{C} \end{array} \right\}$	absente faible, centrée à 528 m μ .	absente absente
bande αc (après chauffage)	$\left. \begin{array}{l} 18^\circ \text{C} \\ \hline -196^\circ \text{C} \end{array} \right\}$	intensité moyenne, centrée à 550 m μ , bord bleu net (548 m μ); un faible reste de αb subsiste sur le bord rouge et s'étend jusqu'à 562 m μ . intensité forte, centrée à 548 m μ ; le reste de αb s'étend jusqu'à 559 m μ .	toujours absente même sous 8 mm. Parfois un reste de bande αb , à 560 m μ .
	$\left. \begin{array}{l} 18^\circ \text{C} \\ \hline -196^\circ \text{C} \end{array} \right\}$		toujours absente, même sous 8 mm. Le reste de la bande αb est à 558 m μ ses bords à 550 et 566 m μ .

II. Dosages de cytochrome c et de protohème

Les résultats de ces dosages, qui figurent au tableau II, montrent que les bactéries obtenues par culture anaérobie contiennent en moyenne 0.2 mg de protohème par gramme d'azote bactérien, soit environ 5 fois moins que les bactéries cultivées en aérobiose*. Quant au cytochrome c de *B. cereus* anaérobie, nous n'avons pu le doser faute d'avoir vu sa bande α d'absorption; mais nous pouvons essayer de fixer à sa concentration dans les bactéries une limite supérieure, imposée par la limite de sensibilité de notre méthode

d'observation. Une solution de cytochrome c d'extinction $E_{550 \text{m}\mu}^{1 \text{cm}} = 0.041$, observée à 18° C au spectroscope de ZEISS, cesse de produire une bande appréciable à l'oeil lorsque son épaisseur est inférieure à 6 mm. Introduisant ces valeurs de D_e et L_e dans la formule 2 rapportée plus haut, nous obtenons pour les expériences a_1 à a_6 du Tableau II, des teneurs maxima en cytochrome c allant de 0.11 à 0.15 μM (soit 1.8 à 2.5 mg) par g d'azote bactérien. Nous pouvons donc affirmer que la teneur en cytochrome c chez *B. cereus* anaérobie est inférieure au cinquième de sa valeur aérobie. Mais, même lorsque les suspensions "anaérobies" sont observées à la température de l'azote liquide, la bande

* La levure "anaérobie" contient le tiers du protohème de la levure "aérobie" (EPHRUSSI ET SLONIMSKI loc. cit.).

TABLEAU II

TENEURS EN CYTOCHROME C ET EN PROTOHÈME DE *B. cereus* "CARON",
SELON QU'IL EST CULTIVÉ EN AÉROBIOSE OU EN ANAÉROBIOSE

Mode de culture	No de l'expérience	Cyt. c par g d'Az. bactérien exprimé		Protohème par g d'Az. bactérien exprimé	
		en μM	en mg*	en μM	en mg**
Aérobiose	A ₁	0.72	11.9	1.51	0.93
	A ₂	0.55	9.1	1.74	1.07
	A ₃			1.57	0.97
Anaérobiose	$a_1 \left. \begin{array}{l} a_2 \\ a_3 \end{array} \right\}$ 1er passage		pas de cytochrome	0.38	0.23
	a_3		c décelable	1.80 ***	1.11 ***
	a_4 2ème passage		spectroscopiquement	0.24	0.15
	$a_5 \left. \begin{array}{l} a_6 \end{array} \right\}$ 3ème passage			0.24	0.15
				0.47	0.29
				0.19	0.12

* En admettant un poids moléculaire de 16,500 (THEORELL¹⁶).

** Poids moléculaire 618.

*** Nous nous expliquons mal ces valeurs typiquement "aérobies" des teneurs en protohème dans une expérience où par ailleurs les cytochromes a et c n'étaient pas décelables et où des porphyrines ont été excrétées (cf. SCHAEFFER¹²). Il semble difficile d'invoquer une anaérobiose imparfaite; peut-être la récolte des bactéries est-elle intervenue cette fois à un moment différent du trouble métabolique qui suit le passage de l'aérobiose à l'anaérobiose? Ce résultat n'a été obtenu qu'une fois.

α du cytochrome c reste invisible. Si l'on admet avec KEILIN ET HARTREE¹⁵ que l'intensité des bandes d'absorption du cytochrome réduit est multipliée par un facteur 6 lorsque l'examen est fait à la température de l'azote liquide, c'est à moins d'un trentième de sa teneur "aérobie" qu'il faut estimer la teneur "anaérobie" en cytochrome c de *B. cereus*. Encore n'est-il pas exclu que ce cytochrome fasse totalement défaut*.

B. Intensité respiratoire de *B. cereus* en fonction du mode de culture

Les résultats spectroscopiques exposés ci-dessus ont été contrôlés par des mesures manométriques de la respiration. La technique de ces expériences appelle quelques observations:

1. Il est nécessaire de laver les bactéries destinées aux mesures, sinon la respiration des suspensions obtenues après culture anaérobiose est artificiellement élevée**.

2. Les surnageants de la première centrifugation des cultures étaient conservés pour y doser les porphyrines (cf. 12). L'absence de porphyrines dans les milieux de culture aérobiose, leur présence dans les milieux de culture anaérobiose, fournissaient un précieux contrôle des conditions d'oxygénation ayant effectivement prévalu pendant la croissance.

3. Lorsque des culots bactériens étaient repris dans un simple tampon-phosphate (le substrat glucose étant ajouté à partir du diverticule de la fiole de WARBURG au temps zéro), les respirations endogènes des fioles témoin sans glucose étaient extrêmement élevées. L'explication en est trouvée dans la lyse partielle que subit rapidement une suspension de *B. cereus* en état de jeûne glucidique et qui fait respirer les bactéries survivantes sur un lysat complexe. On ne peut donc pratiquement pas mettre une "respiration endogène" en évidence chez cet organisme. (MONOD le premier a décrit la lyse par jeûne glucidique chez *Bacillus subtilis*, organisme voisin du nôtre¹⁷). En conséquence ces culots bactériens furent repris dans un tampon glucosé (5 pour 1000) et les valeurs des QO₂ données

* Le rapport correspondant chez la levure est estimé à 1/50ème (EPHRUSSI ET SLONIMSKI loc. cit.).

** L'acide lactique accumulé au cours de la croissance anaérobiose est présumé responsable de la consommation accrue d'oxygène.

ci-dessous s'entendent non corrigées pour la respiration endogène. Une heure environ s'écoulait entre la mise en contact des bactéries avec le tampon glucosé et le début des mesures manométriques.

4. Ces mesures étaient faites à 37° C sur 2.5 ml de suspension bactérienne contenant de 80 à 100 µg N/ml.

Les QO₂(N) (nombre de ml d'oxygène consommés au cours de la première heure à 37° par mg d'azote bactérien) furent de 380 pour les cultures aérobies et de 456 pour les cultures anaérobies*. On voit qu'en dépit de la déficience spectroscopique du système de KEILIN-WARBURG présentée par les cultures anaérobies celles-ci ont un QO₂ (glucose) égal ou même supérieur à celui des cultures aérobies. Ce phénomène inattendu n'est pas dû à une synthèse de cytochrome au cours de l'expérience. Chez la levure, au contraire, la disparition des cytochromes *a* et *c*, induite par croissance anaérobie, s'accompagne d'une diminution très notable de l'intensité respiratoire (EPHRUSSI ET SLONIMSKI⁶). Il est d'ailleurs généralement admis que l'intensité respiratoire est fonction de la teneur des cellules en cytochromes.

Nous nous sommes demandé si la croissance anaérobie de notre germe ne s'accompagnait pas d'une hyperproduction d'un système auto-oxydable de nature différente, qui viendrait compenser, et au-delà, la perte d'activité respiratoire due à la carence du système cytochromique. Les résultats de PETT¹⁸ pouvaient nous encourager dans cette voie, puisque cet auteur observe chez la levure que la teneur en flavines augmente plus de deux fois par culture anaérobie et près de quatre fois par culture en présence d'HCN, inhibiteur de la cytochrome-oxydase. L'étude comparée de la cyano-sensibilité de la respiration sur nos cultures aérobies d'une part, anaérobies d'autre part s'imposait pour mettre l'hypothèse à l'épreuve. Les résultats de cette étude figurent au Tableau III.

TABLEAU III
CYANO-SENSIBILITÉ DE LA RESPIRATION DE *B. cereus* SUR GLUCOSE
SELON LE MODE AÉROBIE OU ANAÉROBIE DE CROISSANCE

	QO ₂	QO ₂ (CN ⁻) -	Inhibition %
Cultures aérobies	29	5.6	81
Cultures anaérobies	52	10.2	80.5

Les QO₂ (ml O₂/60 min/mg poids sec) s'entendent non corrigés pour la respiration endogène (voir texte). Concentration en HCN: M/300.

La cyano-sensibilité étant, comme on le voit, indépendante du mode de culture, l'hypothèse d'une respiration vicariante par les flavoprotéines tombe d'elle-même.

Nous reviendrons dans la discussion sur l'interprétation de ces faits.

C. Etude spectroscopique d'*Escherichia coli*

I. Aspect du spectre d'absorption

Le spectre réduit d'*E. coli*, cultivé en aérobiose, ne nous a permis de déceler que deux bandes (*cf.* 4):

1. la bande $\alpha\beta_1$, forte, centrée à 561 m μ , ayant ses bords à 569 et 554 m μ (18°). (Ces chiffres se modifient comme suit à la température de l'azote liquide: centre à 559 m μ ,

* L'addition d'hémine aux suspensions bactériennes ne modifie pas ces chiffres.

bords à 566 et 551 m μ). Le refroidissement ne comporte pas de dédoublement net de la bande).

2. La bande β , faible, vers 530 m μ (18°) ; nous n'avons jamais décelé, dans les cultures aérobies de la souche B/r, les bandes $\alpha\alpha_1$ et $\alpha\alpha_2$.

Avec la même souche cultivée en *anaérobiose*, nous avons toujours observé une bande αb_1 non affectée dans son intensité, mais légèrement déplacée dans son ensemble vers les courtes longueurs d'onde: 558 m μ à 18° , 556 à -196° C; nous avons souvent observé la bande $\alpha\alpha_2$ difficilement décelée à 18° (629–630 m μ) mais nette quoique faible à -196° (627–628 m μ); parfois, et seulement à la température de l'azote liquide, nous avons aperçu la très faible bande $\alpha\alpha_1$ (vers 594 m μ). Ces bandes $\alpha\alpha_2$ et surtout $\alpha\alpha_1$ étant souvent à la limite de la visibilité, nous n'osons pas affirmer que le fait que nous ne les ayons décelées que dans des cultures anaérobies soit significatif; le serait-il en vérité, que nous ne saurions en proposer d'explication. Par contre le déplacement de la bande αb_1 nous semble au-delà des erreurs de mesure; il se retrouve dans toutes nos expériences; sa signification nous échappe.

En résumé, *l'absence d'oxygène en cours de croissance n'entraîne pas, chez E. coli, de bouleversement du spectre des cytochromes*; conclusion d'ailleurs énoncée par d'autres auteurs (voir discussion).

2. Dosages de protohème

Les culots de centrifugation des cultures de *E. coli* sont uniformément de couleur rosée, que l'oxygène ait ou non été présent au cours de la croissance. Les dosages de protohème sont en accord avec cette observation. Nous reproduisons à titre d'exemple le résultat d'une expérience type:

a. *Culture aérobie.* La suspension bactérienne (11, 6 mg, N/ml), traitée à la soude et à la pyridine (d'où une dilution de 5/3) et examinée sous une épaisseur de 1.9 mm, fournit une bande (556–557 m μ) d'intensité équivalente à celle d'une solution étalon de densité optique $E_{556 \text{ m}\mu}^{1 \text{ cm}} = 0.090$, traversée sous une épaisseur de 16 mm. En appliquant la formule 2 ci-dessus nous avons:

$$32.3 \cdot 0.090 \cdot \frac{16}{1.9} \cdot \frac{1}{11.6} \cdot \frac{5}{3} = 3.5 \mu\text{M de protohème/g N bactérien}$$

b. *Culture anaérobie.* La résultat du dosage, effectué le même jour à l'aide de la même solution-étalon, conduit de même à l'expression:

$$32.3 \cdot 0.090 \cdot \frac{13}{2.0} \cdot \frac{1}{8.3} \cdot \frac{5}{3} = 3.8 \mu\text{M de protohème/g N bactérien.}$$

La différence entre les deux chiffres obtenus, inférieure à 10%, n'est pas significative, compte tenu de la précision de la méthode. Elle s'est cependant retrouvée au cours de deux autres expériences semblables.

On voit donc que l'examen qualitatif du spectre et les teneurs en protohème indiquent que *le mode aérobie ou anaérobie, de culture, n'affecte que très peu l'équipement cytochromique de E. coli*.

DISCUSSION

Les premières études des cytochromes bactériens ont porté sur la description des spectres d'absorption chez les différentes espèces et ont tenté d'établir la signification des bandes observées. Elles ont permis de constater le parallélisme existant entre la richesse des espèces en cytochromes et leur activité respiratoire. On a plus tard recherché

si la teneur en ferments respiratoires de bactéries aérobies facultatives dépendait du mode aérobie ou anaérobiose de leur culture. On peut se demander pourquoi une telle influence n'avait pas été reconnue* jusqu'à ce jour.

Pour ce qui est des travaux de FREI et coll.¹⁹ et de MANN (cité par GALE²⁰) la réponse est simple : ces auteurs ont travaillé sur *E. coli* dont le système cytochromique, nous l'avons ici confirmé, est très peu sensible au mode de culture. De nombreuses espèces par contre ont été étudiées à ce point de vue par FUJITA ET KODAMA²¹ qui pourtant ne décèlent aucune action de l'oxygénation au cours de la croissance. *Bacillus subtilis*, *B. anthracis* (germes qui, comme *B. cereus* ont les 3 cytochromes *a*, *b*, et *c*) figurent parmi les espèces étudiées. Il faudrait donc admettre, si les résultats de ces auteurs sont exacts, que le cas de *B. cereus* est très particulier. Nous penchons plutôt à croire que des conditions peu rigoureuses de culture sont à incriminer dans le travail des auteurs japonais. L'agitation des cultures en couche mince est une pratique assez récente chez les bactériologues, qui ont fréquemment considéré comme aérobie toute culture au cours de laquelle ils n'avaient pas sciemment éliminé l'oxygène, et notre expérience de *B. cereus* est qu'une culture liquide de quelques centimètres d'épaisseur, au contact de l'air, mais non agitée, est quant à son spectre, proche de l'aspect anaérobiose. Quoiqu'il en soit, nous avons étudié deux germes, *B. cereus* et *E. coli* et nous fondant sur l'aspect de leur spectre, nous les avons trouvés différents dans leur réponse à l'oxygène. Nous verrons dans un prochain article²² que l'étude de critères autres que la teneur en cytochromes conduit à la même conclusion. Il existe donc deux types de bactéries aérobies facultatives : l'un, type *B. cereus*, qui par passage d'un mode de croissance à l'autre change profondément son métabolisme et subit des remaniements évidents ; l'autre, type *E. coli*, pour lequel nous n'avons pas d'indice de tels bouleversements. (*cf.* à ce propos les conclusions d'AUBEL ET SZULMAJSTER²³ et le travail de FOWLER²⁴).

Il nous faut maintenant discuter la question suivante : la transformation observée dans le système catalytique respiratoire de *B. cereus* avec le mode de croissance est-elle une modification phénotypique d'une population bactérienne génotypiquement stable, ou au contraire une substitution par mutation, à la population initiale, d'une population génétiquement différente. La manière la plus simple de trancher la question consiste à répéter l'expérience dans des conditions excluant la croissance. Des cultures anaérobies de *B. cereus* ont été remises en suspension dans un tampon glucosé et soumises à une aération puissante et prolongée. Des parties aliquotes de la suspension, prélevées à des temps variables ont été examinées au spectroscope. Même après 24 heures d'oxygénation le résultat fut négatif : en absence de croissance, contrairement à ce qu'ont observé EPHRUSSI ET SLONIMSKI chez la levure, *B. cereus* "anaérobiose" ne synthétise pas notablement les cytochromes dont il est dépourvu**. Nous ne pensons cependant pas qu'il faille interpréter ce résultat comme infirmant l'hypothèse de la transformation phénotypique, mais seulement comme illustrant une fois de plus le fait bien connu que les bactéries, organismes pauvres en réserves, sont quasi incapables d'adaptation enzymatique en l'absence d'une source exogène d'azote. Le levure au contraire s'adapte aisément dans ces conditions. Encore que la preuve expérimentale nous fasse défaut, nous pensons donc que, chez *B. cereus* comme chez la levure, le passage de l'aérobiose à l'anaérobiose

* Seule, apparemment STEPHENSON admet cette influence dans son traité²² mais sans appuyer son opinion sur des références bibliographiques. Nous n'avons pas connaissance de travaux publiés qui aient pu justifier cette opinion, à moins que l'auteur n'ait eu à l'esprit le cas de la levure.

** L'addition de protohème au tampon glucosé ne modifie pas le résultat.

et vice-versa a seulement pour effet de provoquer l'établissement d'un nouvel équilibre métabolique.

Nous avons pour terminer à revenir sur le fait que l'activité respiratoire de *B. cereus*, notamment appauvri en cytochromes par culture anaérobie est néanmoins (sur glucose, seul substrat utilisé) égale ou supérieure à celle du même organisme porteur d'un système respiratoire spectroscopiquement complet. Ce fait va à l'encontre de la relation généralement admise entre la teneur des cellules en cytochromes et l'intensité de leur respiration. La levure obéit à cette relation puisqu' EPHRUSSI ET SLONIMSKI⁶ trouvent, pour le QO_2 de leurs cultures anaérobies, une valeur 80 fois inférieure à celle du QO_2 des cultures aérobies. La sensibilité de la respiration au cyanure n'étant pas modifiée par le mode de culture, force est donc d'invoquer dans les cellules aérobies de *B. cereus* la possibilité d'un excès considérable de cytochromes; ainsi ce système pourrait-il ne pas limiter la vitesse des oxydations, même lorsqu'il est quantitativement diminué au point de n'être plus perceptible spectroscopiquement. La seule autre issue possible serait dans l'existence, chez *B. cereus* "anaérobie", d'une respiration cyano-sensible autre que celle des cytochromes. Ces conclusions peu orthodoxes sont exactement celles auxquelles sont arrivés WARING ET WERKMAN²⁵ dans leur étude de la respiration *d'Aerobacter aerogenes* privé de son système cytochromique par culture dans un milieu où le fer représentait le facteur limitant.

RÉSUMÉ

1. Alors que les cultures aérobies de *B. cereus* montrent les bandes d'absorption des cytochromes *a*, *b*, et *c*, les cultures anaérobies de cet organisme sont spectroscopiquement dépourvues des composants *a* et *c*.
2. Les teneurs en cytochrome *c* et en protohème total de *B. cereus* cultivé en absence d'oxygène représentent au maximum 1/30ème et 1/5ème, respectivement, des valeurs correspondantes trouvées pour les cultures aérobies.
3. La preuve expérimentale que ces transformations se font à génotype constant n'a pu être apportée.
4. En dépit de l'altération de leur système cytochromique les cultures anaérobies de *B. cereus* possèdent une activité respiratoire sur glucose un peu supérieure à celle des cultures aérobies.
5. L'aspect du spectre d'absorption et les résultats des dosages de protohème ne décèlent pas de perturbations majeures du système cytochromique de *E. coli*, lorsqu'il passe de la croissance aérobie à la croissance anaérobie ou vice-versa.

SUMMARY

1. Although aerobic cultures of *B. cereus* show absorption bands of cytochromes *a*, *b* and *c*, the anaerobic cultures of this organism are spectroscopically devoid of the components *a* and *c*.
2. The maximal quantities of cytochrome *c* and total protoheme of *B. cereus* grown in the absence of oxygen are 1/30 and 1/5, respectively, of that in aerobic cultures.
3. We have not been able to demonstrate that these changes are non-genetic in nature.
4. In spite of the fact that anaerobic cultures of *B. cereus* have an altered cytochrome-system, their respiratory activity on glucose is greater than that of the aerobic cultures on this substrate.
5. The absorption spectrum and the total protoheme estimations failed to show any definite change in the cytochrome system of *E. coli* when it is transferred from aerobic to anaerobic cultural conditions and vice-versa.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Während die aeroben Kulturen von *B. cereus* Absorptionsbanden der Zytochrom *a*, *b* und *c* zeigen, sind anaerobe Kulturen dieses Organismus spektroskopisch ohne die Komponenten *a* und *c*.
2. Der Gehalt an Zytochrom *c* und an Gesamtprototüm von *B. cereus*, in Abwesenheit von Sauerstoff gewachsen, stellt höchstens 1/30 beziehungsweise 1/5 der für aerobe Kulturen gefundenen Werte dar.

3. Wir konnten den Beweis nicht erbringen, dass diese Änderungen einem konstanten Genotyp entsprechen.

4. Trotz den Störungen in ihrem Zytochromsystem zeigen die anaeroben Kulturen von *B. cereus* eine etwas grösse Atmungsaktivität mit Glucose als die aeroben Kulturen.

5. Das Absorptionsspectrum und die Bestimmungen des Gesamtprotohäms zeigen keine wichtigen Störungen des Zytochromstoffwechsels in *E. coli* beim Uebergang vom aeroben zum anaeroben Wachstum und umgekehrt.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ P. SCHAEFFER ET P. P. SLONIMSKI, *Compt. rend.*, 233 (1951) 1692.
- ² P. SCHAEFFER, *Biochim. Biophys. Acta* (Article IV), 1952, sous presse.
- ³ P. SCHAEFFER, *Compt. rend.*, 231 (1950) 381.
- ⁴ B. EPHRUSI ET P. P. SLONIMSKI, *Compt. rend.*, 230 (1950) 685.
- ⁵ B. EPHRUSI ET P. P. SLONIMSKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 256.
- ⁶ C. CHIN, *Nature*, 165 (1950) 926.
- ⁷ D. KEILIN ET C. H. HARPLEY, *Biochem. J.*, 35 (1941) 688.
- ⁸ P. SCHAEFFER, *Ann. Inst. Pasteur*, 78 (1950) 624.
- ⁹ B. C. J. G. KNIGHT ET H. PROOM, *J. gen. Microbiol.*, 4 (1950) 508.
- ¹⁰ C. A. ELVEHJEM, *J. Biol. Chem.*, 90 (1931), III.
- ¹¹ P. CHAIX ET G. RONCOLI, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 268.
- ¹² P. SCHAEFFER, *Biochim. Biophys. Acta* (Article II), 1952, sous presse.
- ¹³ K. A. C. ELLIOTT ET D. KEILIN, *Proc. Roy. Soc., London, B*, 114 (1934) 210.
- ¹⁴ R. LEMBERG ET J. W. LEGGE, *Hematin compounds and bile pigments*, Interscience Publishers Inc., New York, 1949.
- ¹⁵ D. KEILIN ET E. F. HARTREE, *Antonie van Leeuwenhoek*, *J. Microbiol. Serol.*, 12 (1947) 115.
- ¹⁶ H. THEORELL, *Biochem. Z.*, 285 (1936) 207.
- ¹⁷ J. MONOD, *Ann. Inst. Pasteur*, 68 (1942) 444.
- ¹⁸ L. B. PETT, *Biochem. J.*, 29 (1935) 937.
- ¹⁹ W. FREI, L. RIEDMULLER, ET F. ALMASY, *Biochem. Z.*, 274 (1934) 253.
- ²⁰ E. F. GALE, *Biochem. J.*, 33 (1939) 1025.
- ²¹ A. FUJITA ET T. KODAMA, *Biochem. Z.*, 273 (1934) 186.
- ²² M. STEPHENSON, *Bacterial Metabolism*, Longmans Green & Co., 3ème éd. 1949, p. 20.
- ²³ E. AUBEL ET J. SZULMAJSTER, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 515.
- ²⁴ C. B. FOWLER, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 563.
- ²⁵ W. S. WARING ET C. H. WERKMAN, *Arch. Biochem.*, 4 (1944) 75.

Reçu le 20 decembre 1951