

## RECHERCHES SUR LE MÉTABOLISME BACTÉRIEN DES CYTOCHROMES ET DES PORPHYRINES

### II. EXCRÉTION DE PORPHYRINES PAR CULTURE ANAÉROBIE CHEZ CERTAINES BACTÉRIES AÉROBIES FACULTATIVES

par

PIERRE SCHAEFFER

*Service de Physiologie microbienne, Institut Pasteur, Paris (France)*

#### INTRODUCTION

Suivant que l'on cultive *Bacillus cereus* en aérobiose ou en anaérobiose, le spectre d'absorption des cytochromes subit des variations notables: les bandes des cytochromes *a* et *c* disparaissent lors de la culture anaérobiose et celle du cytochrome *b* perd de son intensité (SCHAEFFER<sup>1</sup>). Des variations assez semblables ont été décrites chez les levures (EPHRUSSI ET SLONIMSKI<sup>2</sup>, CHIN<sup>3</sup>). Le spectre d'absorption des cytochromes d'*Escherichia coli* est, au contraire, très peu modifié par le mode de culture (FUJITA ET KODAMA<sup>4</sup>, FREI ET COLL.<sup>5</sup>, GALE<sup>6</sup>, SCHAEFFER<sup>1</sup>). Or, avant ces observations, on connaissait un autre moyen de faire disparaître les cytochromes dans un microorganisme: la carence en fer (ELVEHJEM<sup>7</sup>; WARING ET WERKMAN<sup>8</sup>; PAPPENHEIMER<sup>9</sup>). PAPPENHEIMER, travaillant sur le bacille diphtérique, a relié de la façon que l'on sait la disparition des cytochromes et l'excrétion de porphyrines et de toxine. Observant à notre tour une semblable disparition, mais provoquée par la croissance anaérobiose, nous avons été naturellement conduit à rechercher si elle s'accompagnait aussi d'excrétion de porphyrines. Ce sont les résultats de cette étude, effectuée parallèlement sur *B. cereus* et sur *E. coli* qui font l'objet de ce travail. Les expériences ici décrites sont celles mêmes au cours desquelles furent constatées les modifications du système cytochromique.

#### MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

##### *Souches, milieux, conditions de culture et récoltes des bactéries*

On trouvera dans un précédent article<sup>1</sup> les détails expérimentaux.

##### *Extraction et dosage des porphyrines*

A. *Extraction.* Après centrifugation des cultures et étude spectroscopique des culots bactériens (voir I), les liquides surnageant étaient filtrés sur bougie pour éliminer avec certitude tous les corps bactériens. Puis était appliquée la méthode classique d'extraction par l'éther d'un milieu acétique, suivie d'une réextraction par l'acide chlorhydrique de la solution éthérée lavée (voir bibliographie dans LEMBERG ET LEGGE<sup>10</sup>). Si des *uroporphyrines* sont excrétées, leur présence n'est pas révélée par cette méthode: elles sont en effet insolubles dans l'éther. La technique à laquelle nous sommes arrivé tient compte des observations de PAPPENHEIMER<sup>9</sup>, ZEILE<sup>11</sup>, et LEMBERG<sup>10</sup>, p. 87). La voici: 40 ml de filtrat de culture, additionnés d'un volume égal de HCl concentré, sont portés au bain-marie

bouillant pendant 10 minutes. Après refroidissement, de la lessive de soude est ajoutée, par fraction et en refroidissant, jusqu'à pH 7-7.5. On ajoute alors 8 ml d'acide acétique glacial; ensuite viennent 3 extractions successives à l'éther (60, 20 et 20 ml), puis 4 lavages des solutions éthérrées rassemblées par l'acétate de soude  $M/10$  (4 fois 10 ml). La solution éthérrée lavée est évaporée au quart de son volume puis extraite 4 fois par 1.7 ml chaque fois de 1 N HCl saturé d'éther. On ajuste le volume à 8 ml par addition de quelques gouttes d'HCl. Une telle extraction concentre 5 fois les porphyrines éthéro-solubles. Parfois nous avons en extrayant voulu atteindre une concentration de 10 fois; l'évaporation de l'éther était alors poussée jusqu'à un volume de 15 ml environ et le volume d'HCl à chaque extraction élémentaire était de 0.8 ml, le volume terminal étant ajusté à 4 ml. Lorsque nous avons voulu étudier le "nombre HCl" des porphyrines extraites, nous avons utilisé successivement des concentrations en HCl de 0.1, 0.6, 3.6, et 5%. Dans ce cas, l'extraction par HCl 0.1%, par exemple, comprend évidemment les 4 extractions élémentaires successives décrites ci-dessus.

B. *Dosage*. Le dosage spectrophotométrique a été préféré au dosage fluorimétrique pour des raisons de facilité. Il était effectué avec un spectrophotomètre de Beckman (cuves de silice de 1 cm, lampe à hydrogène) réglé pour qu'une transmission de 100% corresponde à la transmission d'une cuve témoin contenant du 1 N HCl saturé d'éther\*. La région spectrale la plus étudiée allait de 385 à 420  $\mu\mu$  de façon à encadrer le maximum d'absorption trouvé à 403  $\mu\mu$  (bande de Soret).

C. *Expression des résultats*. Comment exprimer le résultat d'un dosage de porphyrines, alors qu'on ignore la nature et le nombre des porphyrines dosées. PAPPENHEIMER<sup>9</sup> a procédé de la façon suivante: s'étant assuré que la courbe d'absorption des porphyrines qu'il dosait était identique à celle de l'hématoporphyrine pure, il a déterminé l'absorption spécifique de ce corps et exprimé ses résultats en concentration d'hématoporphyrine. Il s'agit là d'un mode d'expression conventionnel, *ne préjuguant pas de la nature des porphyrines excrétées*. (D'une façon analogue on admet communément l'expression du pouvoir réducteur d'une solution en concentration de glucose, sans préjuger de la nature des substances réductrices effectivement présentes). Certains auteurs ont cependant interprété cette façon de faire comme signifiant que PAPPENHEIMER croyait avoir affaire à l'hématoporphyrine. Nous nous sommes étendu sur ce point pour éviter semblable méprise. Nous avons en effet adopté le procédé de PAPPENHEIMER, le complétant seulement sur un point: lorsque l'on extrait un milieu suffisamment riche en porphyrines (de l'ordre de 100  $\mu\text{g}$  par litre et au-dessus) la solution chlorhydrique obtenue est assez pure, avec les milieux que nous avons employés, pour qu'il ne soit pas nécessaire de retrancher de la densité optique lue au maximum d'absorption ( $D_{403}$ ) celle due aux impuretés; autrement dit, si  $P_{403}$  est l'absorption propre des porphyrines à 403  $\mu\mu$ , nous avons pratiquement:  $P_{403} = D_{403}$ . Il n'en allait pas ainsi cependant dans nos filtrats de cultures aérobies, très pauvres en porphyrines: le calcul direct de la concentration en porphyrines à partir de  $D_{403}$  aurait conduit à des valeurs près de deux fois trop fortes. Dans ces cas, nous avons appliquée une formule de correction que nous avons établie sur de l'hématoporphyrine pure \*\*, exactement comme l'avait fait RIMINGTON<sup>12</sup>, à la publication duquel nous renvoyons pour la justification de ce type de correction. Voici notre formule, qui s'applique à l'hématoporphyrine en solution dans l'HCl normal:

$$P_{403} = \frac{2 D_{403} - (D_{395} + D_{410})}{1.083}$$

(D représente la densité optique, lue sous 1 cm d'épaisseur, à la longueur d'onde indiquée en  $\mu\mu$  par l'indice et  $P_{403}$  la contribution des porphyrines à l'absorption à 403  $\mu\mu$ ). Si nous n'avons pas fait usage de la formule même de RIMINGTON, c'est que nous n'en avons eu connaissance qu'à la fin de notre travail et qu'il nous manquait, dans plusieurs expériences, les valeurs expérimentales  $D_{395}$  et  $D_{410}$  qu'utilise cet auteur.

Nous sommes enfin en mesure d'exposer comment sont calculés nos résultats:

1. *Cas des cultures anaérobies de B. cereus*. Les porphyrines sont abondantes, la formule de correction inutile. Du coefficient d'extinction molaire de l'hématoporphyrine donné par PAPPENHEIMER (*loc. cit.*),  $E_M = 3.46 \cdot 10^5$ , il résulte qu'une solution contenant 1.73  $\mu\text{g}$  d'hématoporphyrine par litre a une densité optique  $D_{403}^{1\text{cm}} = 0.001$ . (Cette correspondance est valable, d'après le graphique de PAPPENHEIMER, pour des extinctions lues comprises entre 0.050 et 0.400, valeurs extrêmes que nous avons respectées). De la valeur lue  $D_{403}$ , on calcule directement la concentration en "hématoporphyrine": concentration que l'on corrige: 1. pour la concentration apportée par la méthode

\* Le témoin représenté par l'extrait chlorhydrique du milieu neuf risque d'être trompeur, surtout en milieu complexe (peptoné), des substances autres que des porphyrines et absorbant vers 400  $\mu\mu$ , pouvant être consommées ou excrétées par les bactéries. L'utilisation de 1 N HCl comme témoin fait évidemment apparaître une absorption de base plus élevée, mais nous verrons que l'emploi que nous faisons d'une formule de correction nous permet d'éliminer l'intervention de cette base dans le résultat final.

\*\* Produit synthétisé par Mr PARROD, Institut de Biologie physico-chimique, Paris, sur la demande de P. SLONIMSKI, qui nous en a cédé une partie. Nous les remercions tous deux bien vivement.

d'extraction; 2. pour tenir compte de la richesse de la culture lors de son prélèvement. Le résultat s'exprime finalement en  $\mu\text{g}$  d'hématoporphyrine par litre de filtrat d'une culture de densité optique 1000 (électrophotomètre de MEUNIER écran bleu, cuve de 1 cm). Une telle densité optique correspond environ à  $10^9$  bactéries viables, soit un poids sec de l'ordre de 1  $\mu\text{g}$ , par ml).

2. Cas où seules des traces de porphyrines sont présentes (3 à 25  $\mu\text{g/l}$ ). Le calcul est le même, mais s'applique à la valeur corrigée  $P_{402}$  donnée par la formule indiquée ci-dessus.

## RÉSULTATS

### I. *Bacillus cereus*

1. *Cultures aérobies.* Lorsqu'après extraction des filtrats de cultures aérobies on

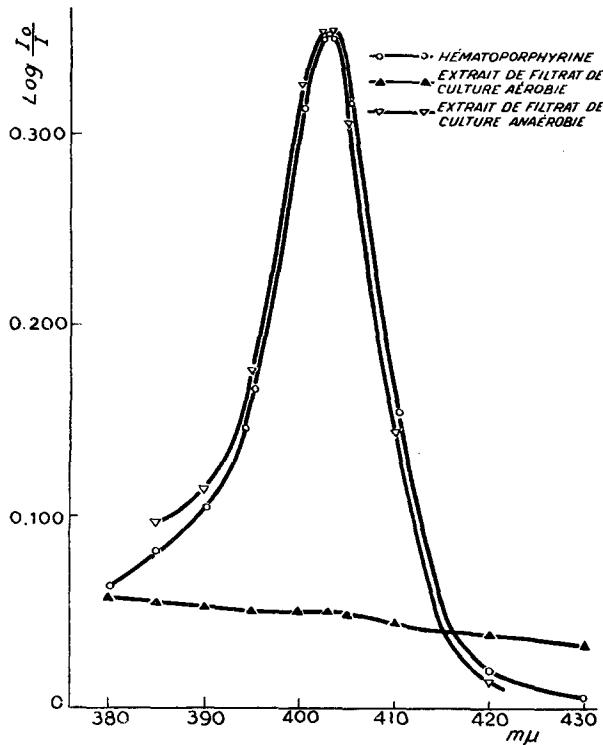


Fig. 1. Excrétion de Porphyrine par *B. cereus* cultivé en anaérobiose.

cherche à déceler la présence de porphyrines par spectrophotométrie, on ne trouve en général aucun maximum aux alentours de 400  $\text{m}\mu$ . Parfois cependant, surtout semble-t-il lorsque la densité optique terminale de la culture est élevée, et que donc l'oxygène disponible par bactérie peut n'être plus en excès, des traces de porphyrines sont identifiables. Au cours de 12 expériences de ce genre, 9 fois la courbe d'absorption de l'extrait a été régulièrement décroissante entre 380 et 420  $\text{m}\mu$  (voir Fig. 1) les trois autres fois on pouvait calculer que la concentration en porphyrines exprimée en hématoporphyrine, était de 3, 5 et 5  $\mu\text{g}$  par litre de filtrat d'une culture de d.o. = 1000.

2. *Cultures anaérobies.* Lorsque la culture était anaérobiose les extraits, d'ailleurs visiblement colorés, montraient un maximum d'absorption extrêmement net à 402-

Bibliographie p. 368.

403 m $\mu$ . Nous avons comparé la courbe d'absorption obtenue avec celle de l'hématoporphyrine pure dont la concentration était calculée pour que les absorptions maxima fussent très voisines (Fig. 1). Les deux courbes sont superposables. Au cours de 12 expériences, les valeurs extrêmes des concentrations en porphyrines ont été 97 et 193  $\mu\text{g}/\text{l}$  et la valeur moyenne 140  $\mu\text{g}/\text{l}$ . Au cours de 4 de ces expériences nous avons procédé, en plus de l'extraction habituelle par HCl à 3.6%, à des extractions successives de la solution éthérée de porphyrines par des solutions de HCl de concentrations croissantes (0.1, 0.6, 3.6 et 5%) afin de fixer le "nombre HCl" de la porphyrine excrétée. On sait en effet que cette caractéristique fournit une indication quant à la nature des porphyrines. Dans les 4 cas les porphyrines se sont partagées entre les extraits à 0.1 et 0.6% d'HCl, les extractions ultérieures n'extrayant plus rien. L'une de ces expériences est représentée, Fig. 2. Le rapport des porphyrines extraites par HCl à 0.1% aux porphyrines extraites par HCl à 0.6% n'a pas été constant d'une expérience à l'autre. Ce point n'ayant pas

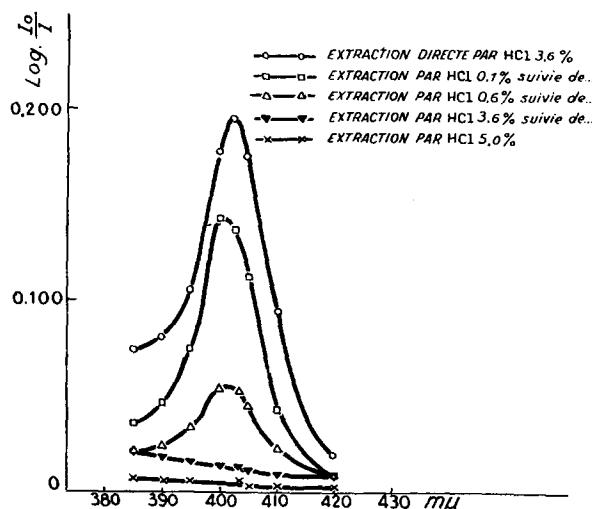


Fig. 2. "Nombre HCl" de la porphyrine excrétée par *B. cereus* anaérobiose.

fait l'objet d'une étude soigneuse, il est possible que l'absence de fixité de ce rapport soit due au fait que l'extraction par HCl à 0.1% n'était pas complète lorsque commençait l'extraction par HCl à 0.6%. On trouvera discutée plus loin l'interprétation de ces données expérimentales. Des autres maxima d'absorption des hémato et coproporphyrines (550, 594 et 575 m $\mu$ ) seul était décelable dans nos extraits, le maximum à 550 m $\mu$ ; pour les autres la concentration était trop faible.

En résumé, l'excration de porphyrines, nulle ou insignifiante dans les cultures aérobies est constante et élevée dans les cultures anaérobies de *B. cereus*. Cette excration a subsisté inchangée au cours de 3 repiquages successifs en l'absence d'oxygène. Il s'agit donc d'une caractéristique permanente du métabolisme anaérobiose de certaines bactéries aérobies facultatives et non d'un trouble métabolique transitoire associé au passage de l'aérobiose à l'anaérobiose.

## II. *Escherichia coli*

1. *Cultures aérobies.* Dans les cultures aérobies de cet organisme, nous n'avons pas  
*Bibliographie p. 368.*

décelé la présence de porphyrines (3 expériences) et ce, malgré une concentration de 12 fois apportée par la méthode d'extraction. *E. coli* se comporte donc ici comme *B. cereus*.

2. *Cultures anaérobies*. Les deux espèces diffèrent cependant dans leur comportement anaérobiose. Dans 3 cultures s'étant développées en anaérobiose aucune trace de porphyrine n'a pu être décelée au spectrophotomètre, malgré un traitement correspondant à une concentration éventuelle de 12 fois; dans 3 autres expériences, des porphyrines étaient présentes, mais en faibles quantités: 11, 20 et 24  $\mu\text{g/l}$ . La libération de porphyrines par culture anaérobiose est donc, chez *E. coli*, un phénomène contingent et de toute façon discret. Ici encore les repiquages successifs en anaérobiose ne changent rien aux résultats obtenus. La différence entre métabolismes aérobiose et anaérobiose semble, du point de vue qui nous intéresse ici, bien moindre chez *E. coli* que chez *B. cereus*. Ce résultat prend toute sa valeur lorsqu'on le rapproche de ceux des dosages de protohème intracellulaire.

### III. Autres organismes

Nous avons à peine amorcé le travail consistant à rechercher parmi les aérobies facultatives, quelles espèces bactériennes, partagent le comportement de *B. cereus* et quelles celui de *E. coli*. Nous savons seulement que la souche Oxford de *Staphylococcus* n'excrète pas de porphyrines en aérobiose; dans une unique expérience anaérobiose, cette souche a excreté 44  $\mu\text{g}$  d'"hématoporphyrine" par litre de filtrat. Ajoutons enfin que chez la levure de boulangerie, SLONIMSKI (communication verbale) a retrouvé l'excrétion de porphyrines par culture anaérobiose.

### DISCUSSION

Quelle peut être la nature des porphyrines excretées par *B. cereus*? Nous savons qu'elles sont présentes en totalité dans les extraits à 0.1 et 0.6% d'HCl; nous ne pouvons en toute rigueur parler de "nombre HCl", notre technique d'extraction ne correspondant pas à celle incluse dans la définition de cette constante (WILSTATTER, cité in LEMBERG<sup>10</sup>, p. 69). Mais il subsiste qu'au moins une fraction importante de cette porphyrine doit avoir un nombre HCl inférieur ou égal à 0.1 et donc être soit de la copro- soit de l'hématoporphyrine (LEMBERG p. 69). Celle-ci cependant ne semble jouer aucun rôle physiologique; elle n'a d'ailleurs, jusqu'à présent, jamais été trouvée dans des produits naturels (LEMBERG p. 61). *La majeure partie, sinon la totalité, de la porphyrine libérée doit donc être une coproporphyrine*. Rappelons que la porphyrine excretée par *C. diphtheriae* carencé en fer est principalement la coproporphyrine III, identifiée par GRAY ET HOLT<sup>13</sup>. En ce qui concerne la porphyrine de *B. cereus* une certitude sur sa nature et l'identification de son type (I ou III) devront attendre l'isolement et la caractérisation de la substance. Si la nature exacte de cette porphyrine prête pour l'instant à discussion, un fait par contre semble acquis: *il ne s'agit pas de protoporphyrines*, puisque leur extraction de l'éther par HCl ne commence que lorsque la concentration de cet acide dépasse 2% et que l'extraction de la porphyrine qui nous occupe est complète déjà avec HCl à 0.6% (Fig. 2).

Ces résultats se prêtent sans doute à l'évocation des discussions sur le métabolisme des porphyrines, l'antériorité dans la biosynthèse de telle ou telle d'entre elles ou leur dérivation à partir d'un précurseur commun (LEMBERG<sup>10</sup>, p. 627-645; HALE et col.,<sup>14</sup>, GRANICK<sup>15</sup>). En particulier mention peut-être faite des travaux de GRANICK ET GILDER<sup>16</sup>

sur la nécessité des groupements vinyl pour l'introduction du fer dans les porphyrines et donc, indirectement, pour leur fixation sur l'apoenzyme; on peut aussi rappeler l'antagonisme compétitif entre différentes porphyrines dont ces auteurs ont montré l'existence. Ces faits suggèrent des mécanismes possibles du phénomène exposé dans cet article. Mais comme d'une part les faits décrits ici ne nous paraissent clairement résoudre dans l'immédiat aucune des questions depuis longtemps posées, comme d'autre part, nos résultats peuvent a priori s'interpréter aussi bien comme une perturbation dans la synthèse des parties protéiques des cytochromes que comme un trouble du métabolisme de leur groupement prosthétique, les hypothèses possibles sont trop nombreuses, notre ignorance trop grande, et nous préférions laisser à nos résultats leur allure de fait brut.

Nous avons constaté au cours de ce travail que *B. cereus* (qui active l'oxygène) ne synthétise pas certains cytochromes (SCHAEFFER<sup>1</sup>) et libère des porphyrines au cours de sa croissance anaérobiose; au contraire *E. coli*, dépourvu de cytochrome-oxydase (KEILIN ET HARPLEY<sup>17</sup>) et qui d'après AUBEL ET SZULMAJSTER<sup>18</sup>, n'active pas l'oxygène, synthétise ses cytochromes ( $a_2$ ,  $a_1$ ,  $b_1$ ) en anaérobiose et n'excrète pas de porphyrines. On est donc en droit de se demander, mais c'est là une simple question, s'il existe une relation entre la présence de tel ou tel pigment respiratoire hématique et la synthèse anaérobiose des cytochromes. Il est vrai qu'il pourrait aussi bien s'agir d'une différence entre deux espèces dont la nature nous échappe. De toute façon la question se pose de savoir si l'excrétion de porphyrines est l'effet d'un trouble du métabolisme des cytochromes ou si au contraire le défaut de synthèse de ces pigments est secondaire à un trouble de la synthèse du protohème.

#### RÉSUMÉ

1. Cultivé en anaérobiose, *Bacillus cereus* excrète une porphyrine dans le milieu de culture; cette excrétion est absente lorsque la croissance est aérobiose.
2. Le "nombre HCl" de la porphyrine excrétée indique qu'il s'agit principalement, sinon uniquement, de coproporphyrine.
3. Même en anaérobiose *Escherichia coli* n'excrète pas ou très peu de porphyrines.
4. Ces résultats prennent toute leur signification par confrontation avec ceux de l'étude du système cytochromique à l'intérieur des bactéries.

#### SUMMARY

1. Grown under anaerobic conditions, *Bacillus cereus* releases a porphyrin in the culture medium; no such release takes place during aerobic growth.
2. According to its "HCl number", this porphyrin seems to be principally, if not exclusively, coproporphyrin.
3. Even when grown anaerobically, *Escherichia coli* does not release, or hardly releases, any porphyrin in the medium.
4. These results have their whole meaning when compared with those of the study of the cytochrome-system inside the cells.

#### ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei anaerobem Wachstum scheidet *Bacillus cereus* ein Porphyrin in das Kulturmödium ab; keine Abscheidung ist festzustellen bei aerobem Wachstum.
2. Die Chlorwasserstoffzahl dieses Porphyrins zeigt, dass es sich hauptsächlich, oder ausschliesslich, um Koproporphyrin handelt.
3. Selbst in Anaerobiose sondert *Escherichia coli* keine oder sehr wenig Porphyrine ab.
4. Die volle Bedeutung dieser Ergebnisse zeigt sich, wenn man sie mit dem Studium des Zytosystems im Innern der Zelle vergleicht.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> P. SCHAEFFER, *Compt. rend.*, 231 (1950) 381; *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 261.
- <sup>2</sup> B. EPHRUSI ET P. P. SLONIMSKI, *Compt. rend.*, 230 (1950) 685; *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 256.
- <sup>3</sup> C. H. CHIN, *Nature*, 165 (1950) 926.
- <sup>4</sup> A. FUJITA ET T. KODOMA, *Biochem. Z.*, 273 (1934) 186.
- <sup>5</sup> W. FREI, L. RIEDMULLER, ET F. ALMASY, *Biochem. Z.*, 274 (1934) 253.
- <sup>6</sup> E. F. GALE, *Biochem. J.*, 33 (1939), voir p. 1025.
- <sup>7</sup> C. A. ELVEHJEM, *J. Biol. Chem.*, 90 (1931) 111.
- <sup>8</sup> W. S. WARING ET C. H. WERKMAN, *Arch. Biochem.*, 4 (1944) 75.
- <sup>9</sup> A. M. PAPPENHEIMER, JR, *J. Biol. Chem.*, 167 (1947) 251, and 171 (1947) 701.
- <sup>10</sup> R. LEMBERG ET J. W. LEGGE, *Hematin compounds and bile pigments*, Interscience Publishers Inc., New York, 1949.
- <sup>11</sup> K. ZEILE ET B. RAU, *Z. physiol. Chem.*, 250 (1937) 197.
- <sup>12</sup> C. RIMINGTON ET S. L. SVEINSSON, *Scandin. J. clinic. labor. Invest.*, 2 (1950) 209.
- <sup>13</sup> C. H. GRAY ET L. B. HOLT, *J. Biol. Chem.*, 169 (1947) 235; *Biochem. J.*, 42 (1948) viii; *ibid.* 43 (1948) 191.
- <sup>14</sup> J. H. HALE, W. A. RAWLINSON, C. H. GRAY, L. B. HOLT, C. RIMINGTON, ET W. SMITH, *Brit. J. Exptl Path.*, 31 (1950) 96.
- <sup>15</sup> S. GRANICK, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 2 (1951) 115.
- <sup>16</sup> S. GRANICK ET H. GILDER, *Advances in Enzymol.*, 7 (1947) 305; and *J. Gen. Physiol.*, 31 (1947) 103.
- <sup>17</sup> D. KEILIN ET C. H. HARPLEY, *Biochem. J.*, 35 (1941) 688.
- <sup>18</sup> E. AUBEL ET J. SZULMAJSTER, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 515.

Reçu le 20 décembre 1951