

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

### IV\*. EFFETS DE LA CARENCE EN STREPTOMYCINE SUR DES MUTANTS BACTÉRIENS STREPTOMYCINO-EXIGEANTS\*\*

par

PIERRE SCHAEFFER

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

#### INTRODUCTION

Depuis 1947, une série d'articles de VON EULER et collaborateurs<sup>1-5</sup> ont signalé l'inhibition de la synthèse de la chlorophylle, observée chez diverses plantes supérieures soumises à l'action de la streptomycine (Sm) au cours de leur germination. Cette importante observation, le blanchiment d'organismes verts par la Sm, s'est trouvée depuis lors confirmée par plusieurs auteurs, travaillant soit sur des plantules ou des tissus végétaux (DE ROPP<sup>6</sup>, BOGORAD<sup>7</sup>), soit sur des algues vertes monocellulaires (PROVASOLI, HUTNER ET SCHATZ<sup>8</sup>; LWOFF ET SCHAEFFER<sup>9</sup>). Si ces faits, discutés dans des revues récentes (GRANICK<sup>10</sup>; PROVASOLI, HUTNER ET PINTNER<sup>11\*\*\*</sup>; LWOFF<sup>12</sup>, HUTNER ET PROVASOLI<sup>13</sup>), sont bien établis, le mécanisme qui les détermine reste obscur et l'on n'est actuellement pas en mesure de faire un choix parmi les hypothèses proposées pour leur explication: action directe de la Sm dans la biosynthèse du pigment; action primaire de l'antibiotique sur le chloroplaste; enfin action sur le plaste induite par l'intermédiaire d'une transformation nucléaire (*cf.*<sup>11</sup>). Un fait est cependant bien établi: chez le flagellé *Euglena gracilis* la streptomycine provoque la perte définitive du pouvoir de synthétiser la chlorophylle.

Dans l'état actuel de nos connaissances, la recherche d'une possible action de la Sm sur la synthèse d'autres pigments tétrapyrroliques, comme par exemple les cytochromes, se trouvait donc amplement justifiée; VON EULER a d'ailleurs noté chez les plantules blanchies par la Sm une activité catalase diminuée<sup>3-5</sup>. La raison pourtant qui nous a conduit à entreprendre le présent travail était entièrement indépendante de ces considérations; étudiant le métabolisme d'un mutant Sm-exigeant de *Bacillus cereus*, nous avions observé d'une part, que la carence en antibiotique avait pour effet immédiat une diminution de l'intensité respiratoire (glucose) des cultures en croissance (SCHAEFFER<sup>14</sup>); d'autre part, que l'intensité fermentaire (glucose) ne diminuait pas lorsque les cultures

\* L'article III de cette série, en collaboration avec B. NISMAN, traite du cas des bactéries anaérobies strictes, et a paru dans les Annales de l'Institut Pasteur [82 (1952) 109].

\*\* Travail effectué avec l'aide d'une subvention de la Fondation S. A. Waksman des Etats-Unis.

\*\*\* Nous remercions le Dr PROVASOLI d'avoir bien voulu nous communiquer son manuscrit avant publication.

étaient privées de Sm au cours de leur croissance anaérobie (SCHAEFFER<sup>\*15</sup>). Il devenait dès lors plausible que la Sm fût, chez un mutant exigeant, nécessaire à la synthèse d'un enzyme intervenant aux stades terminaux de la respiration. (Sous cette forme très générale, l'hypothèse était en accord avec la conception du mode d'action de la Sm proposée par UMBREIT et collaborateurs<sup>16</sup>). Les cytochromes étant, parmi les enzymes respiratoires terminaux, ceux dont la présence est le plus facilement décelable, nous avons entrepris d'étudier les teneurs en cytochromes de notre mutant, selon qu'il avait été ou non préalablement carencé en Sm. Le problème ainsi posé de façon indépendante prenait cependant, et quelque fût le résultat, un intérêt plus général du fait de l'action de la Sm sur la synthèse de la chlorophylle.

#### TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

Souches, milieux et techniques employés ont tous été décrits en détails dans nos précédents articles<sup>14,17</sup>; nous n'y reviendrons pas ici. Sauf indication contraire, les résultats qui suivent ont été obtenus avec le mutant Sm-exigeant de *B. cereus*.

#### RÉSULTATS

##### 1. Système cytochromique des cultures aérobies carencées en Sm

Une note concernant cette partie du travail, faite en collaboration avec SLONIMSKI, est publiée ailleurs<sup>19</sup>; nous répétons ici les résultats obtenus, nécessaires à la compréhension de l'ensemble du travail.

Rappelons tout d'abord, pour pouvoir mettre en valeur les effets de la carence en antibiotique, les données spectroscopiques relatives au mutant exigeant non carencé, en croissance aérobie en présence de Sm en concentration optima (200 à 500 µg/ml de milieu). Les trois composants *a*, *b* et *c* du cytochrome sont présents; la bande *a a* (601-602 mµ à 18° C) est faible, n'étant souvent nettement perçue qu'après immersion dans l'azote liquide; les bandes *a* des cytochromes *b* et *c* se recouvrent en partie, la large bande formée par leur juxtaposition ayant son centre à 557 mµ (18°); cette bande, aisément visible à la température de la pièce sur une suspension bactérienne épaisse de 4 mm, est plus intense sur son côté bleu. Après chauffage de la préparation (20 minutes, 80° C) la bande *ac* s'observe à 550 mµ, une ombre légère subsistant sur son côté rouge. Teneur moyenne en cytochrome *c*: 0.5 micromole par g d'azote bactérien; teneur moyenne en protohème: 1.3 micromoles par g d'azote. Ces résultats ne diffèrent pas de façon significative de ceux obtenus avec la souche parente Sm-sensible (*cf.*<sup>17</sup>).

Si maintenant nous prélevons les cultures aérobies alors que leur croissance vient de s'arrêter faute de Sm, nous obtenons des résultats bien différents. (Tableau I). Prenons l'exemple d'une expérience que nous pensons particulièrement significative: 1. les culots bactériens de centrifugation sont incolores, ceux des cultures normales étant couleur crème; 2. examinée à 18° sous 5 mm d'épaisseur, la suspension bactérienne ne montre aucune bande d'absorption; plongée dans l'azote liquide, elle laisse deviner une bande unique extrêmement faible, centrée vers 556 mµ; 3. le cytochrome *c* est absent, la teneur en protohème intracellulaire est inférieure à 0.28 micromole par g d'azote, soit 1/5 environ de sa valeur normale. Dans d'autres expériences les teneurs en cytochrome *c*

\* L'antibiotique est cependant indispensable à une croissance anaérobie normale<sup>14</sup>.

Bibliographie p. 571.

TABLEAU I

EFFETS COMPARÉS DE LA CARENCE EN Sm SUR *B. cereus* Sm-EXIGEANT,  
SELON LE MODE AÉROBIE OU ANAÉROBIE, DE LA CROISSANCE  
EXAMEN SPECTROSCOPIQUE DES CULOTS BACTÉRIENS

	<i>Culture aérobie</i>	<i>Culture anaérobie</i>
Spectre, observé sous 5 mm à 18° C	absent	absent
Observé à — 196° C	très faible bande 556 m $\mu$	ombre devinée dans le vert
Protohème intracellulaire	< 0.28 $\mu$ M/g N	< 0.16 $\mu$ M/g N

(pour l'explication voir légende de la Fig. 1)

furent le dixième, le quart et le septième des valeurs normales, les teneurs en protohème au cours des mêmes expériences étant le huitième, la moitié et le tiers des valeurs obtenues lorsque la Sm était présente. On voit par ces chiffres que si toujours quelque déficience en cytochrome est notable chez les cultures carencées, il s'agit d'un phénomène dont il est difficile de se rendre maître; parfois la culture s'arrête faute de Sm alors que le protohème total n'est réduit que de moitié, ce qui, étant donnée la faible précision des dosages (10-20%), laisse à l'interprétation une faible marge de sécurité. Dans une de nos expériences, le cytochrome *a* a semblé n'avoir pas diminué au cours de la carence; jamais nous n'avons vu le cytochrome *b* complètement disparaître. Nous avons toujours noté le nombre de divisions cellulaires que représentait la croissance résiduelle ainsi que l'aspect microscopique des organismes carencés; ici encore une certaine fluctuation était évidente; l'aspect filamenteux des bactéries, toujours observable, était plus ou moins marqué, le nombre de divisions cellulaires ayant eu lieu en absence de Sm variait de 3 à 12; ce n'était pas toujours les expériences au cours desquelles la croissance résiduelle était la plus importante, ou au cours desquelles l'aspect filamenteux était le plus net, qui donnaient les spectres les plus déficients. Un examen spectroscopique requiert une abondante population bactérienne, au sein de laquelle il faut s'attendre à voir apparaître des mutants spontanés non exigeants, sensibles ou résistants à l'action de la Sm. Ces mutants, même s'ils sont rares, seront puissamment sélectionnés par l'absence d'antibiotique; comme ils ont dans un tel milieu un équipement normal en cytochromes, ils représentent dans notre étude un réel danger, dont nous avons essayé autant que possible de nous garantir:

1. en prélevant les cultures carencées dès que leur densité optique se stabilisait.
2. en contrôlant leur caractère d'exigence par des repiquages.

Au cours de ce contrôle il nous est arrivé d'obtenir, après 2 ou 3 jours d'incubation, en absence de Sm, d'abondantes cultures sensibles ou résistantes; les résultats ont cependant été considérés comme valables, la croissance tardive était prise pour preuve qu'au moment de l'examen la proportion d'organismes non exigeants devait être très faible. En bref, nous pensons que les variations décrites ne doivent pas faire douter de ce résultat: *au cours de la croissance résiduelle de B. cereus Sm-exigeant privé d'antibiotique, les teneurs en protohème et en cytochrome c baissent, et parfois très notablement.* En ce qui concerne les cytochromes *b* et *a*, l'absence de dosage spectroscopique ne nous permet pas de nous faire une opinion précise; l'aspect des spectres suggère qu'ils diminuent eux

aussi dans la cellule. Jamais nous n'avons décelé, chez les bactéries carencées, de bandes d'absorption occupant une position inhabituelle.

## II. Excrétion de porphyrine au cours de la croissance résiduelle aérobie.

Nous avons précédemment signalé que les remaniements du système cytochromique qui accompagnent la croissance anaérobiose de *B. cereus*, vont de pair avec une excréption de porphyrine dans le milieu de culture (SCHAEFFER<sup>18</sup>). En présence des modifications ci-dessus décrites du système des cytochromes chez le mutant Sm-exigeant, on devait se demander si ce mutant excrétait une porphyrine lorsqu'il se trouvait, en aérobiose, carencé en Sm. Nous avons donc recherché, dans les expériences précédentes, la présence de porphyrine dans les milieux de culture, utilisant la méthode déjà décrite<sup>18</sup>. *En aucun cas nous n'avons décelé de porphyrines dans le milieu de cultures aérobies de B. cereus Sm-exigeant, arrêtées par manque de Sm.* La figure I illustre l'une des expériences.

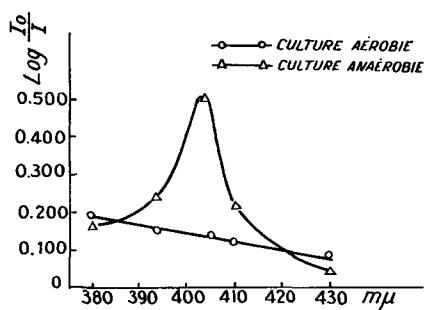


Fig. 1. Effets comparés de la carence en Sm sur *B. cereus* Sm-exigeant, selon le mode aérobiose ou anaérobiose, de la croissance. Examen spectrophotométrique des filtrats de culture après concentration des porphyrines (concentration de 5 fois pour la culture anaérobiose, de 10 fois pour la culture aérobiose). La pré-culture était aérobiose, en présence de 100 µg Sm/ml; lorsqu'elle atteignit une densité optique de 1200, elle fut utilisée pourensemencer les cultures à raison de 1 ml pour 17 ml de milieu; la densité optique initiale était ainsi 70, la concentration maxima en Sm 6 µg/ml. Après 11 heures d'incubation, la densité optique terminale de la culture aérobiose est 950, celle de la culture anaérobiose 980 (on voit l'égale croissance résiduelle, que l'oxygène soit ou non présent).

## III. Spectre des cytochromes et excrétion de porphyrines au cours de la carence anaérobiose

Il devenait intéressant de savoir quel serait le comportement du mutant Sm-exigeant lorsque la carence en Sm interviendrait en absence d'oxygène. On devait s'attendre à ce que le système cytochromique soit en ce cas très déficient, ce que l'expérience confirme; (Tableau I); mais l'excrétion de porphyrines, induite par l'anaérobiose, subsisterait-elle en absence d'antibiotique? L'expérience rapportée Figure I, répond à cette question affirmativement. On verra aussi que la quantité de porphyrines excrétées par unité de densité optique de la culture est la même que la Sm soit ou non présente; les résultats de l'expérience représentée sur le Tableau II en font foi:

TABLEAU II  
SPECTRE DES CYTOCHROMES ET EXCRÉTION DE PORPHYRINES AU COURS  
DE LA CARENCE ANAÉROBIOSE

	Densité optique terminale de la culture	Concentration des porphyrines au cours de l'extraction	Valeur de $D_{403} = \log. I_0/I$	$\mu\text{g de porphyrines par litre de filtrat de culture de densité optique} = 1000$
Culture anaérobiose	normale	920	5	0.514
	carencée	280	10	0.310
				193
				192

On voit que l'absence de Sm n'affecte pas, chez *B. cereus* Sm-exigeant, l'excrétion de porphyrines induite par l'anaérobiose. Nous revenons dans la discussion sur la signification de ce résultat.

Nous avons résumé dans le Tableau synoptique III les résultats obtenus avec *B. cereus*, tant dans ce travail que dans les précédents.

TABLEAU III  
(Récapitulatif)

<i>B. cereus</i> souche	Mode de culture	Streptomycine	Cytochromes	Porphyrine excrétée (copro?)	$QO_2$ (glucose)
Sm-sensible	aérobie	o	<i>a, b, c</i>	o	normal
	anaérobie	o	<i>b</i> (faible)	+	> normal
Sm-exigeante	aérobie	{	+	<i>a, b, c</i>	normal
			o	<i>b</i> (faible) ( <i>a?</i> )	< normal
	anaérobie	{	+	<i>b</i> (faible)	+
			o	<i>b</i> (faible)	+

#### Résultats obtenus avec *E. coli*

Les données en notre possession concernant la souche Sm-exigeante de *E. coli* sont fragmentaires. D'expériences préliminaires il ressort cependant:

1. que le système cytochromique d'*E. coli* Sm-exigeant est insensible à la carence en Sm.
2. qu'il n'y a pas de porphyrines excrétées lorsque ce mutant est carencé en anaérobiose.

Ces résultats indiquent que toute explication du rôle de la Sm chez les mutants exigeants, invoquant la seule biosynthèse des cytochromes, ne saurait être générale. Ils confirment par contre la différence physiologique profonde existant entre les systèmes cytochromiques "type *B. cereus*" et "type *E. coli*". différence qui ressortait déjà de l'étude du comportement anaérobiose<sup>17-18</sup>.

#### DISCUSSION

On ne saurait manquer d'être frappé de l'étrange analogie que présentent dans nos résultats l'action de l'oxygène et celle de la streptomycine: tous deux sont nécessaires, chez *B. cereus* Sm-exigeant, à la formation d'un spectre complet normal, l'absence de l'un ou de l'autre conduisant apparemment au même spectre déficient. Chez le mutant d'*E. coli* d'autre part, oxygène et Sm sont tous deux sans action sur le spectre. Combien superficielle est cette analogie, ressort cependant des différences observées dans l'excrétion de porphyrines d'une part, dans l'intensité de la respiration d'autre part (voir tableau récapitulatif).

Nous envisagerons maintenant spécialement le cas de *B. cereus* Sm-exigeant: le premier but de ce travail était d'éprouver l'hypothèse faisant de la Sm un agent indispensable de la synthèse d'un système cytochromique normal. Nous pensons évidemment que la constatation d'une déficience cytochromique, secondaire à la carence en Sm, résoudrait la question en faveur de l'hypothèse. Or il se trouve que nous aboutissons au résultat escompté, sans qu'il nous permette de tirer aucune conclusion: dans l'intervalle en effet est apparu un fait nouveau: la déficience du spectre cytochromique chez les cultures anaérobies ne s'accompagne pas d'une diminution de la respiration<sup>17</sup>. Ceci étant, nous n'avons plus le droit d'expliquer la déficience respiratoire de *B. cereus* exigeant carencé par la déficience de son spectre. Même si nous avions pu le faire d'ailleurs, nous n'aurions pas encore tenu une explication satisfaisante du mode d'action de la Sm, puisque cet antibiotique est également indispensable, et aux mêmes concentrations, à la croissance anaérobie.

Que la déficience en cytochromes, observée chez le mutant aérobio carencé, rende compte ou non de sa respiration affectée, elle n'en constitue pas moins en soi un phénomène qu'il nous faut essayer d'analyser, ce que nous ferons en discutant des questions suivantes:

I. *La carence en Sm entraîne-t-elle un trouble dans la synthèse des porphyrines?* Nous sommes en possession des faits suivants:

a. Le besoin en Sm des souches Sm-exigeantes est le même en aéro- et en anaérobiose, ce qui se comprend mal si la Sm n'intervient que dans la synthèse des porphyrines.

b. Une source de protohème (hémine, sang laqué, cytochrome c) ajoutée à des cultures de *B. cereus* Sm-exigeant dépourvues de Sm, ne permet pas leur croissance normale, elle n'augmente même pas l'importance de leur croissance résiduelle en présence de faibles quantités de Sm<sup>18</sup>.

c. Enfin et surtout, dans les expériences de carence anaérobiose, une (copro?) porphyrine est excrétée, donc synthétisée, en absence de Sm. Si l'on admet avec LEMBERG<sup>21</sup> ET GRANICK<sup>10</sup>, que la coproporphyrine est un précurseur biologique de la protoporphyrine, ce résultat laisse subsister la possibilité d'une action de la Sm dans la transformation copro → proto, c'est-à-dire dans la décarboxylation oxydative de deux restes propioniques de la coproporphyrine. Il n'empêche que les chances d'une intervention de la Sm dans la biosynthèse du protohème semblent minimes. Nous pensons donc que ce n'est pas dans la synthèse des porphyrines que l'antibiotique intervient. C'est abandonner une hypothèse suggérée par le rapprochement entre l'action apochlorogène connue de la Sm sur les organismes chlorophylliens et nos propres résultats concernant l'effet de la carence en Sm sur le système cytochromique de *B. cereus* exigeant, hypothèse en laquelle nous avons cru pendant deux années, et à laquelle VON EULER, qui l'a indépendamment formulée, semble toujours accorder crédit (*cf.* 5).

2. *La carence en Sm entraîne-t-elle un trouble dans la synthèse des parties protéiques des cytochromes?* Avant d'envisager cette délicate question, rapportons brièvement quelques faits relatifs à d'autres protéines-enzymes.

a. Chez *E. Coli* Sm-exigeant, une adaptation enzymatique (lactose, arabinose) est possible en l'absence de Sm exogène<sup>20\*</sup>.

\* Cependant si cette adaptation est normale au début de la croissance résiduelle, elle est lente et faible lorsque cette croissance s'arrête faute de Sm; il n'est donc pas exclu que l'adaptation enzymatique ne soit possible en l'absence de Sm exogène que pour autant qu'il subsiste dans les cellules quelque matériel stocké alors que l'antibiotique était présent.

b. Chez *B. cereus* Sm-exigeant, plusieurs activités déshydrogénasiques sont du même ordre de grandeur dans les cultures carencées et dans les cultures normales<sup>20</sup>. Ces faits semblent indiquer que la synthèse de certaines protéines spécifiques se fait normalement en l'absence d'antibiotique.

Comme ils sont cependant insuffisants pour exclure une intervention de la Sm dans la synthèse des "apocytochromes", Mlle H. IONESCO a essayé d'obtenir une réponse directe à la question qui nous occupe. Nous résumons ici brièvement son travail, destiné à rester inédit pour les raisons que l'on va lire\*. Se basant sur les travaux de PAPPENHEIMER<sup>22</sup>, suggérant que la toxine du bacille diphtérique n'est autre que la partie protéique du cytochrome *b* de cet organisme, H. IONESCO a isolé un mutant Sm-exigeant de *C. diphtheriae* (souche P.W. 8). Son but était de rechercher si, dans un milieu limitant en fer, la production de toxine par le mutant dépendait de la présence de l'antibiotique. Bien que jamais les cultures carencées en Sm n'aient produit de toxine, les résultats devaient rester ininterprétables, car:

1. la production de toxine par la souche mutante était faible et inconstante,
2. la souche exigeante était peu stable, réversant fréquemment vers la Sm-sensibilité lorsque l'antibiotique était omis. L'étude du seul matériel permettant à l'heure actuelle — si l'on admet la conception de PAPPENHEIMER — de trancher la question posée, n'est donc pas concluante.

3. Tentative d'interprétation du mode d'action de la streptomycine. Des deux hypothèses qui, à première vue, s'offraient à nous, pour expliquer l'action de la Sm sur le système cytochromique de *B. cereus* Sm-exigeant, l'une se trouve écartée, l'autre invérifiable. Le seul réconfort nous vient de cette constatation que l'une ou l'autre de ces hypothèses, si même elle se trouvait confirmée par l'expérience, ne nous apporterait encore qu'une compréhension incomplète: la nécessité de la Sm en anaérobiose resterait à expliquer, de même que le mécanisme d'action chez les souches exigeantes d'*E. coli*. Sans doute convient-il d'essayer d'imaginer une hypothèse plus générale qui puisse rendre compte de tous les faits observés. Pour bâtir cette hypothèse, prenons pour point de départ l'étude cytologique faite par VON EULER, BRACCO ET HELLER<sup>4</sup> sur les chloroplastes des feuilles d'orge rendu apochlorotique par germination en présence de certaines concentrations de Sm: la base de la première feuille formée est blanchie alors que son sommet est encore vert. Les auteurs suédois, étudiant la structure des chloroplastes de la base au sommet, observent tous les stades de développement du plaste, depuis le chondriosome jusqu'au plaste vert. Ils concluent de leur étude que la Sm, réagissant avec les acides nucléiques de certains chondriosomes, agit en empêchant leur division et leur différenciation. Une variante possible de leur interprétation serait de supposer une action de la Sm sur les acides nucléiques des noyaux, conduisant à un métabolisme cellulaire incompatible avec le développement de certains chondriosomes. Dans les deux cas le résultat final s'exprimerait par ce que nous proposons d'appeler une action "granulostatique" de l'antibiotique. Cette notion ne mérite-t-elle pas, en effet, à titre d'hypothèse de travail, d'être étendue et généralisée, étant admis jusqu'à preuve du contraire que la Sm, quelque soit son action, rend possible chez les organismes exigeants les phénomènes même qu'elle inhibe chez les organismes sensibles.

Ne peut-on donc admettre que:

1. chez les bactéries comme chez les cellules animales, les éléments du système cyto-

\* Nous remercions chaleureusement Mlle IONESCO de nous autoriser à mentionner ici ce travail inédit.

chromique soient liés à des granules intracytoplasmiques riches en nucléoprotéines.

2. la multiplication de ces granules bactériens producteurs de cytochromes soit stoppée par la Sm (ou son absence chez les organismes Sm-exigeants), comme l'est celle des chloroplastes.

3. ces mêmes granules, ou d'autres également affectés par la Sm, aient d'autres activités métaboliques, soupçonnées ou insoupçonnées, indispensables à la vie de la bactérie, même en anaérobiose?

L'action de la Sm se laisse difficilement localiser à un métabolisme élémentaire chez *E. coli*. UMBREIT<sup>16</sup> fait porter l'action de la Sm sur un enzyme permettant l'établissement d'un cycle respiratoire terminal; chez l'orge rendu apochlorotique par la Sm, non seulement la chlorophylle fait défaut, mais la catalase et les caroténoides\*; chez le mutant Sm-exigeant de *B. cereus*, les cytochromes sont affectés par la carence, mais il faut admettre qu'un autre système, indispensable à la vie anaérobiose, est également touché; chez une souche Sm-exigeante de *Bacillus megatherium* (souche lysogène 899) la carence en Sm affecte non seulement la production de cytochromes, mais aussi celle d'un pigment jaune de nature certainement non héminique<sup>20\*\*</sup>. L'hypothèse de travail que nous proposons a l'avantage de permettre de comprendre que des fonctions très diverses, sans relation apparente entre elles, puissent être affectées par la Sm (ou son absence, selon le type d'organisme), le lien déterminant entre ces fonctions étant leur localisation dans certains granules cytoplasmiques sensibles à l'antibiotique.

## RÉSUMÉ

1. Cultivé en présence de streptomycine en concentration optima un mutant streptomycino-exigeant de *Bacillus cereus* possède les trois cytochromes *a*, *b*, et *c* et n'excrète pas de porphyrines dans le milieu, pourvu que la culture soit aérobie; en anaérobiose par contre, une porphyrine est excrétée et le spectre d'absorption des bactéries se réduit à une faible bande de cytochrome *b*. La souche mutante en présence de streptomycine se comporte donc comme la souche parente streptomycino-sensible.

2. Lorsque la croissance de la souche mutante s'arrête faute de streptomycine, le spectre d'absorption des bactéries est nettement déficient, que l'oxygène ait ou non été présent pendant la croissance. La streptomycine semble donc nécessaire, chez la souche mutante, à la synthèse des cytochromes.

3. L'excrétion de porphyrine induite par le mode anaérobiose de croissance subsiste inchangée chez la souche exigeante lorsque la streptomycine est absente. L'antibiotique n'est donc pas nécessaire à la synthèse de certaines, au moins, des porphyrines.

4. Une hypothèse est proposée qui essaie de rendre compte des faits connus relatifs au mode d'action de la streptomycine.

## SUMMARY

1. A streptomycin-dependant mutant of *Bacillus cereus*, grown in the presence of the antibiotic in optimal concentration, shows the three cytochromes *a*, *b*, and *c*, and does not release any porphyrin into the medium, provided the culture is aerobic; but under anaerobic conditions, a porphyrin is released and the spectrum is then reduced to a feeble band of cytochrome *b*. The mutant strain, in the presence of streptomycin, therefore behaves like the streptomycin-sensitive parent strain.

2. At the time the growth of the mutant strain stops from lack of streptomycin, the absorption spectrum of the cells is markedly deficient, whether or not oxygen was present during growth. The streptomycin seems therefore to be necessary for the mutant strain to synthesize the cytochromes.

3. The porphyrin excretion induced by the anaerobic type of growth remains unchanged in

\* Nous citons ici von Euler à travers une publication de PROVASOLI<sup>11</sup> ne pouvant nous procurer l'article original au moment de notre rédaction.

\*\* Bande très large et très intense centrée à 502-504 m $\mu$  à 196° C (en présence d'hydroxulfite).

the dependent strain when the streptomycin is omitted. The antibiotic is therefore not required for the synthesis of at least some porphyrins.

4. An hypothesis is proposed in an attempt to account for the known facts pertaining to the mode of action of streptomycin.

#### ZUSAMMENFASSUNG

1. Eine in Gegenwart von Streptomycin in optimaler Konzentration gezüchtete Streptomycin-abhängige Mutante des *Bacillus cereus* besitzt die Zytchrome *a*, *b*, *c* und scheidet keine Porphyrine in das Milieu aus, wenn die Kultur aerob ist; in anaerober Kultur dagegen werden Porphyrine ausgeschieden und das Spektrum verringert sich zu einer schwachen Bande des Zytochroms *b*. Der mutierte Stamm verhält also, in Gegenwart von Streptomycin, wie der Streptomycin-empfindliche elterliche Stamm.

2. In Kulturen dieser Mutante, deren Wachstum wegen Mangel an Streptomycin eben aufhört, ist das Spektrum der Bakterien schwach und mangelhaft, und zwar sowohl in Gegenwart oder Abwesenheit von Sauerstoff während des Wachstums. Das Streptomycin scheint demnach für den mutierten Stamm zur Synthese der Zytchrome notwendig zu sein.

3. Die durch anaerobes Wachstum hervorgerufene Ausscheidung von Porphyrinen wird beim abhängigen Stamm unverändert beibehalten, selbst in Abwesenheit von Streptomycin. Das Antibiotikum ist also zur Synthese von gewissen Porphyrinen nicht nötig.

4. Eine Hypothese wird vorgeschlagen, welche die bekannten, die Wirkungsweise des Streptomyzins betreffenden Tatsachen darzustellen versucht.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> H. VON EULER, *Kem. Arb.*, 11, 9 (1947) 1.
- <sup>2</sup> M. BRACCO ET H. VON EULER, *Kem. Arb.*, 11, 10 (1947) 1; *ibid.* 11, 10 (1948) 1.
- <sup>3</sup> H. VON EULER, *Arkiv. Kem. Mineral. Geol.*, 25 A (1948) 1.
- <sup>4</sup> H. VON EULER, M. BRACCO, ET L. HELLER, *Compt. rend.*, 227 (1948) 16.
- <sup>5</sup> H. VON EULER, *Z. Naturforsch.*, 5 B (1950) 448.
- <sup>6</sup> R. S. DE ROOP, *Nature*, 162 (1948) 459.
- <sup>7</sup> L. BOGORAD, *Botan. Gaz.*, 14 (1950) 221; *Am. J. Botany*, 37 (1950) 676.
- <sup>8</sup> L. PROVASOLI, S. H. HUTNER, ET A. SCHATTZ, *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, 69 (1948) 279.
- <sup>9</sup> A. LWOFF ET P. SCHAEFFER, *Compt. rend.*, 228 (1949) 779.
- <sup>10</sup> S. GRANICK, *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 2 (1951) 115.
- <sup>11</sup> L. PROVASOLI, S. H. HUTNER, ET I. J. PINTNER, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, 1951, sous presse.
- <sup>12</sup> A. LWOFF, *New Phytologist*, 49 (1950) 72.
- <sup>13</sup> S. H. HUTNER ET L. PROVASOLI, 1951, *The Phytoflagellates*, in *Biochemistry and Physiology of Protozoa*, ed. A. LWOFF, pp. 27-128, New York, Academic Press.
- <sup>14</sup> P. SCHAEFFER, *Ann. Inst. Pasteur*, 78 (1950) 624.
- <sup>15</sup> P. SCHAEFFER, *Compt. rend.*, 229 (1949) 1032.
- <sup>16</sup> W. W. UMBREIT, P. H. SMITH, ET E. L. OGINSKI, *J. Bact.*, 61 (1951) 595.
- <sup>17</sup> P. SCHAEFFER, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 261.
- <sup>18</sup> P. SCHAEFFER, *ibid.*, 9 (1952) 362.
- <sup>19</sup> P. SCHAEFFER ET P. P. SLONIMSKI, *Compt. rend.*, 233 (1951) 1692.
- <sup>20</sup> P. SCHAEFFER, résultats inédits.
- <sup>21</sup> R. LEMBERG ET J. W. LEGGE, *Hematin Compounds and Bile Pigments*, Interscience New York, 1949 (XIII, 8-2).
- <sup>22</sup> A. M. PAPPENHEIMER Jr., *J. Biol. Chem.*, 167 (1947) 251.

Reçu le 20 décembre 1951