

FIXATION DE LA VITAMINE B₁₂ PAR *LACTOBACILLUS LEICHMANNII*
ET APPLICATION AU DOSAGE DE LA VITAMINE B₁₂ COMBINÉE
DANS LES EXTRAITS D'ORGANES

par

R. WOLFF ET S. DUBOST

Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté de Médecine, Nancy (France)

La vitamine B₁₂ peut se combiner en proportions définies avec certaines fractions de protéines contenues dans un extrait aqueux de muqueuse gastrique. Or, la méthode microbiologique de dosage de la vitamine B₁₂, avec *Lactobacillus leichmannii* comme organisme-test, permet seule de mesurer cette vitamine à l'état libre. Cependant un chauffage de la solution à 120° C pendant cinq minutes peut libérer la vitamine de sa combinaison et il devient alors possible d'effectuer le dosage de la forme combinée.

Quand il s'agit de doser la vitamine B₁₂ combinée dans un mélange comportant, en plus de celle-ci de la vitamine B₁₂ libre, on peut soit calculer celle-ci par différence, en mesurant la vitamine B₁₂ totale et celle présente à l'état libre, soit débarrasser la solution de sa composante libre, en fixant celle-ci sur un support et en mesurant dans la solution restante la forme combinée.

D'après le premier procédé, en vue du dosage de la forme libre en présence de la forme combinée il faut s'abstenir de tout chauffage de la solution, afin de respecter la forme combinée, qui est thermolabile. La stérilisation des solutions, en vue du dosage microbiologique, devrait alors être effectuée par filtration sur filtre stérilisant en verre fritté, avec tous les risques de pertes par adsorption que comporterait un tel traitement. Mais l'expérience nous a montré^{1,2} que le dosage microbiologique avec *Lactobacillus leichmannii* peut être effectué correctement sans aucune précaution d'asepsie, le milieu ne subissant pendant la durée de l'incubation (36 h) aucune contamination. La méthode de dosage indirect nous a donné toute satisfaction, mais elle présente les défauts des méthodes par différence pour les cas où le taux de B₁₂ combiné est faible par rapport à celui de B₁₂ libre.

Le procédé de fixation de B₁₂ libre sur un support a été utilisé pour la première fois par HOFF-JØRGENSEN ET BURKHOLDER^{3,4,5}. Ces auteurs ont montré que certaines souches de colibacilles, en milieu glucosé, à l'état non proliférants (resting bacteria) mais consommant de l'oxygène, fixent la vitamine B₁₂ libre et ils ont mis à profit cette propriété pour doser dans un mélange la forme combinée. Mais le traitement avec le colibacille se complique, du fait qu'il doit être effectué sur des solutions stérilisées à froid.

Plus récemment DAVIS ET CHOW⁶ ont constaté que de nombreuses souches microbiennes, notamment *Lactobacillus leichmannii* (ATCC No. 4797), sont susceptibles de fixer d'assez grosses quantités de vitamine B₁₂. Cette fixation s'effectue facilement en solution de NaCl à 8.5 p.mille en milieu non stérile.

Nous montrons dans le présent travail que seule la forme libre est fixée dans ces conditions, que cette fixation est totale et qu'il devient ainsi possible d'effectuer le dosage de la forme combinée sur une solution débarrassée de la vitamine B₁₂ libre.

Préparation de la suspension microbienne. On ajoute à 100 ml de milieu de SKEGGS⁷, à concentration double, le même volume d'une solution de NaCl à 8.5 p.mille, contenant 10 mγ de B₁₂. Le milieu, de pH 6.9-7.0, est maintenu pendant 6 min à l'autoclave à 105°-107° C puis, après ensemencement avec une goutte d'une culture de 24 h de *Lactobacillus leichmannii* (ATCC No. 4797), est porté à 37° pendant 48 h. La culture doit atteindre une densité optique correspondant à la division 400 de l'appareil de Meunier (cuve de 1 cm d'épaisseur). Elle est lavée une fois avec 80 ml de soluté physiologique puis mise en suspension dans 40 ml de la même solution. Une telle suspension microbienne peut être conservée pendant sept jours au réfrigérateur à -4° sans perdre ses propriétés.

Fixation de B₁₂ libre sur la suspension microbienne. On mélange dans un tube à centrifuger 1 ml de suspension microbienne avec 5 ml d'une solution physiologique, dont le titre en B₁₂ libre ne devra pas dépasser 200 mγ %. Les tubes sont agités pendant ½ h à température ordinaire et sont ensuite centrifugés. Le liquide surnageant est alors exempt de vitamine B₁₂ libre, mais contient la totalité de la forme combinée.

On a constaté dans trente essais sur des solutions de vitamine B₁₂ pure, que celle-ci est éliminée par un tel traitement. Sur des solutions contenant un mélange des deux formes de vitamine B₁₂ on constate de même que ce traitement permet d'éliminer la totalité de la vitamine B₁₂ libre (Tableau I).

Enfin le dosage de la vitamine B₁₂ combinée, par les deux méthodes, fournit un accord satisfaisant et montre que le taux de la vitamine B₁₂ combinée n'est pas modifiée par le traitement avec *Lactobacillus leichmannii*.

TABLEAU I

DOSAGE DE B₁₂ COMBINÉ PAR LA MÉTHODE DIFFÉRENTIELLE [(b), (c), (b)-(c)]
ET PAR LA MÉTHODE DIRECTE APRÈS FIXATION DE B₁₂ LIBRE SUR *Lactobacillus leichmannii* [(d), (e)]

Échantillon	B ₁₂ Total γ/g	B ₁₂ libre γ/g	B ₁₂ combiné calculé γ/g	B ₁₂ libre après traitement % de B ₁₂ libre	B ₁₂ combiné trouvé γ/g	Différence %
(a)	(b)	(c)	(b)-(c)	(d)	(e)	(f)
31	256	50.4	205.6	0	201	— 2.2
25	339	96	243	2	266	+ 9.5
18	347	15	332	3	336	+ 1.2
15a	281	107	174	0	158	— 10
369	359	3	356	2	366	+ 2.8
37	313	14.5	298.5	2	274	— 12.1
38	367	9	358	1	346	— 2.9
39	352	0	352	3	352	0
40	198	0	198	0	187	— 1.8

Ces résultats permettent de conclure que le dosage de la vitamine B₁₂ combinée peut être effectué dans un mélange où sont présentes les deux formes, libre et combinée de cette vitamine, après élimination de la forme libre par un traitement avec *Lactobacillus leichmannii*.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ R. WOLFF ET R. KARLIN, *Compt. rend. Soc. Biol.*, 146 (1952) 1008.
- ² R. WOLFF ET R. KARLIN, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 35 (1953) 1409.
- ³ E. HOFF-JØRGENSEN, A. P. SKONBY AND J. GAD ANDERSEN, *Nordisk Medicin*, 48 (1952) 1754.
- ⁴ E. HOFF-JØRGENSEN, *Arch. Biochem.*, 36 (1952) 235.
- ⁵ P. R. BURKHOLDER, *Arch. Biochem.*, 39 (1952) 322.
- ⁶ R. L. DAVIS AND B. F. CHOW, *Science*, 115 (1952) 351.
- ⁷ H. R. SKEGGS, H. M. NEPPLE, K. A. VALENTIK, J. W. HUFF AND L. D. WRIGHT, *J. Biol. Chem.*, 184 (1950) 211.

Reçu le 20 avril 1954

THE INCORPORATION OF ¹⁵N-LABELLED NITROUS OXIDE BY NITROGEN FIXING AGENTS*

by

MILTON M. MOZEN AND R. H. BURRIS

Department of Biochemistry, College of Agriculture, University of Wisconsin, Madison, Wis. (U.S.A.)

While studying the effects of various gases on the nitrogen fixing system of *Azotobacter vinelandii*, MOLNAR *et al.*¹ found N₂O to be a specific inhibitor of nitrogen fixation. Independent studies by REPASKE AND WILSON², and by WILSON AND ROBERTS³ indicated that this inhibition is competitive. With manometric tests the latter investigators⁴ could demonstrate no assimilation of N₂O by the *Azotobacter*, nor could they show such assimilation by supplying N₂O and testing for isotopic dilution in *Azotobacter* cells which had previously been grown on ¹⁵N₂. The most sensitive way to detect incorporation of N₂O by a nitrogen fixing organism is to supply the organism with ¹⁵N labelled N₂O and then to test it for its ¹⁵N excess. We wish to report here the results of such tests.

* Published with the approval of the Director of the Wisconsin Agricultural Experiment Station. Supported in part by a grant from the Atomic Energy Commission.