

## LE RÔLE DE L'ANHYDRIDE CARBONIQUE DANS LES CROISSANCES BACTÉRIENNES

par

J. M. WIAME ET S. BOURGEOIS

*Laboratoire de Microbiologie de l'Université de Bruxelles et Service de Recherche du Centre d'Enseignement et de Recherches des Industries Alimentaires (C.E.R.I.A.), Bruxelles (Belgique)*

### INTRODUCTION

On sait depuis longtemps que le  $\text{CO}_2$  est nécessaire à la croissance bactérienne<sup>1, 2, 3</sup>. Des revues récentes ont traité de cette question<sup>4, 5, 6</sup>. Sur la base des travaux actuels, on peut, dès à présent, distinguer diverses modalités d'action du  $\text{CO}_2$ . Nous rappellerons, parmi les différentes hypothèses émises, celle qui semble actuellement la mieux établie: on a établi que le  $\text{CO}_2$  assimilé se retrouve dans le carbone uréide des pyrimidines<sup>7</sup>. McLEAN ET PURDIE<sup>8</sup> ont pu réduire l'assimilation du  $\text{CO}_2$  chez *Serratia marcescens* en croissance en ajoutant au milieu de culture de l'arginine (ou de la citrulline, mais non pas de l'ornithine) et de l'uracile (de l'uridine, de la cytidine ou de l'acide orotique). On a interprété ces faits en supposant que le  $\text{CO}_2$  serait la source obligatoire du carbone uréide des pyrimidines. Il semble bien qu'il en soit ainsi d'après le travail récent de HEINRICH *et al.*<sup>9</sup>, qui ont établi l'existence de la chaîne métabolique  $\text{CO}_2 \rightarrow \text{C uréide de la citrulline} \rightarrow \text{C uréide des pyrimidines}$ .

Mais ces faits n'expliquent qu'une partie des observations: en effet, LWOFF ET MONOD<sup>2</sup>, AJL ET WERKMAN<sup>3</sup> et McLEAN ET PURDIE<sup>8</sup> ont montré que le  $\text{CO}_2$  peut être partiellement remplacé par des acides dicarboxyliques, comme l'asparagine ou l'acide glutamique. Ces auteurs font l'hypothèse<sup>2</sup> que le  $\text{CO}_2$  est indispensable à la croissance parce que certains métabolites essentiels, catalyseurs de la respiration, ne peuvent être synthétisés que par carboxylation suivant le processus de WOOD ET WERKMAN. AJL ET WERKMAN considèrent que "La fonction du  $\text{CO}_2$  est essentiellement la synthèse de céto-acides qui, par amination, transamination, sont utilisés en remplacement du  $\text{CO}_2$ ; l'acide citrique serait d'une part à l'origine de la synthèse de l' $\alpha$ -céto-glutarate, alors que les acides dicarboxyliques serviraient de précurseurs de l'oxaloacétate.

Que ce soit pour le remplacement de composés catalytiques ou constitutifs de la cellule, le caractère obligatoire de l'assimilation du  $\text{CO}_2$  n'est pas expliqué aussi clairement dans ces cas que dans celui de la synthèse des pyrimidines. La complexité des interprétations est vraisemblablement due aux inter-conversions possibles des substances mises en jeu dans le cycle des acides tricarboxyliques ou, éventuellement, dans le cycle des acides dicarboxyliques.

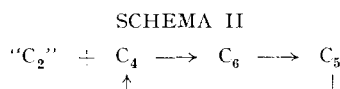
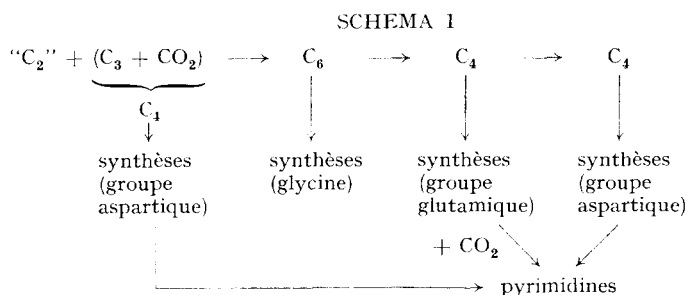
Nous croyons que ces observations se comprennent mieux si on reprend une proposition faite précédemment par KREBS<sup>10</sup>, qui accorde un rôle biosynthétique fondamental au cycle des acides tricarboxyliques. Ce rôle biosynthétique apparaît clairement dans

les études effectuées sur des bactéries en croissance<sup>11, 12, 13, 14</sup>. Alors que le cycle des acides tricarboxyliques se présente comme un mécanisme catalytique lors de son fonctionnement dans l'oxydation terminale des composés ternaires, il prend un caractère tout différent lors d'un fonctionnement synthétique et notre explication du besoin de  $\text{CO}_2$  découle immédiatement de cette remarque.

*En effet, l'utilisation, pour les synthèses, d'une molécule quelconque du cycle de Krebs entraîne un arrêt de celui-ci, à moins qu'une quantité stoechiométrique d'une autre substance du cycle ne soit produite par un processus indépendant.* L'ensemble enzymatique du cycle reste cependant fonctionnel et effectivement utilisable pour les oxydations, telles que nous les mesurons dans le cas des cellules microbiennes non proliférantes ou des tissus. Quand une croissance se produit, un métabolisme non cyclique (non catalytique en soi) se superpose au mécanisme purement oxydatif.

Si la source de carbone dont dispose la cellule est une substance en  $\text{C}_3$  ou une substance passant par ce stade (sucre, glycérol), il en résulte la nécessité de synthèse d'une molécule ayant au moins 4 carbones: c'est le cas de la synthèse de WOOD ET WERKMAN, formant du malate<sup>15</sup> ou de l'oxaloacétate<sup>16, 17, 18</sup>; dans les deux cas, le  $\text{CO}_2$  est obligatoire. Il doit donc résulter de l'utilisation d'une molécule quelconque du cycle une utilisation obligatoire d'une molécule de  $\text{CO}_2$ .

Ce mode synthétique peut être représenté par le schéma I et le mode oxydatif par le schéma II.



La synthèse des pyrimidines dépend du  $\text{CO}_2$  en deux points (schéma I) si on admet le mécanisme proposé par HEINRICH<sup>9</sup>.

Dans le cas où le  $\text{CO}_2$  est absent, le cycle est interrompu dans son rôle synthétique. Ainsi s'explique que, lors d'une forte aération, les synthèses soient arrêtées à la suite de la perte de  $\text{CO}_2$  par diffusion. Toutefois, l'existence de la condensation de l'acétate en succinate de Knopp-Wieland, qui semble exister chez les moisissures<sup>19, 20</sup>, les dispenserait de l'assimilation du  $\text{CO}_2$ , au moins en ce qui concerne les synthèses dérivées du cycle tricarboxylique.

Il a été démontré que chez *Neurospora*<sup>21</sup> et chez *Bacillus subtilis*<sup>22</sup>, le glutamate se forme par amination de l' $\alpha$ -céto-glutarate. L'acide aspartique, chez *Bacillus subtilis*, est le résultat de la transamination oxalo-acétique<sup>13</sup>.

Dans le cas où le cycle tricarboxylique est purement oxydatif, le  $\text{CO}_2$  ne pénètre

dans les métabolites que par échanges; lors du fonctionnement synthétique, il correspond à une assimilation nette. On peut donc prévoir que 1/5 du carbone des nombreux amino-acides dérivant de l'acide glutamique<sup>11,12</sup>, ainsi que 1/4 du carbone des composés en C<sub>4</sub> (la famille des dérivés aspartiques par exemple), dériveront du CO<sub>2</sub> dans le cas d'une culture faite sur des substrats du type glucose ou glycérol. Par cette hypothèse, on rend parfaitement compte de la forte proportion de CO<sub>2</sub> assimilée par *Neurospora* en croissance<sup>23</sup>, ainsi que dans d'autres cas<sup>24</sup>. Les fortes assimilations de CO<sub>2</sub> dans la glycine<sup>25</sup> s'expliquent aussi: elles résulteraient de la décomposition des dérivés tricarboxyliques avec amination<sup>26</sup>.

McLEAN *et al.*<sup>27</sup> ont déjà remarqué que les assimilations du CO<sub>2</sub> chez *Serratia marcescens* varient avec le substrat carboné utilisé. Ceci leur permet de classer ces substances en deux groupes: d'une part, le glucose, le glycérol et le pyruvate et d'autre part le citrate et le malate. Ces auteurs observent également que l'assimilation du CO<sub>2</sub> est fortement accrue dans le cas de cellules en croissance, montrant ainsi que ce phénomène est dû principalement à des processus synthétiques.

Nous donnerons dans ce travail une nouvelle série d'expériences étayant l'hypothèse générale qui vient d'être formulée.

#### MATÉRIEL ET TECHNIQUES

On a utilisé un *Bacillus subtilis*, la souche S<sup>+</sup>. Cette bactérie peut croître, sur un milieu dépourvu d'acides-amino, à partir de sel d'ammonium comme source d'azote.

Le milieu est constitué par les substances suivantes: substrat carboné M/20, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> M/50, NaCl M/100, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> M/100, MgSO<sub>4</sub> M/1000, citrate de Fer M/25,000, tampon aux phosphates M/50.

Le substrat carboné, le pH de la culture, ainsi que l'addition d'autres substances seront précisés pour chaque expérience.

Les croissances se font à 35–36° avec aération par agitation, suivant la technique décrite dans une publication antérieure<sup>28</sup>. La croissance est déterminée par opacimétrie, au moyen du colorimètre Spekker, dans des conditions où la densité optique mesurée est une fonction linéaire de la concentration. Au cours de quelques expériences, la croissance a été simultanément déterminée par le dosage des protéines totales, suivant la méthode de FOLIN<sup>29</sup>.

Le CO<sub>2</sub> est déterminé par la technique de DOUTCHEFF<sup>30</sup> légèrement modifiée. L'hydroxyde de sodium exempt de CO<sub>2</sub> utilisé pour la capture du CO<sub>2</sub> est préparé à partir de sodium métallique (Treadwell). Le BaCO<sub>3</sub> obtenu est récolté et lavé par centrifugation en présence de kaolin afin d'éviter des pertes de BaCO<sub>3</sub> lors de la séparation du surnageant. Le BaCO<sub>3</sub> est déterminé volumétriquement en présence de bleu de bromophénol.

Les radioactivités du CO<sub>2</sub> sont mesurées par étalement du BaCO<sub>3</sub>. Les corrections d'absorption sont négligeables par rapport aux variations expérimentales étudiées. Les radioactivités des cellules bactériennes sont mesurées par étalement d'un aliquot de celles-ci après deux lavages préalables à l'acide trichloracétique à 5 %, en présence d'une charge de kaolin qui facilite la manipulation des bactéries.

#### RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Nous décrirons une première expérience en détails; la méthode adoptée sera également discutée.

##### *Expérience No. I: Incorporation du CO<sub>2</sub> au cours d'une croissance sur glycérol*

La culture mise en croissance en présence de CO<sub>2</sub> marqué est constituée de:

(a) 43 ml du milieu décrit précédemment, contenant du glycérol M/20; le pH du tampon aux phosphates est de 8.0;

(b) bactéries récoltées par centrifugation d'une culture en croissance active sur le même milieu;

(c) 14 ml d'une solution de  $\text{NaHCO}_3$ ,  $M/13$  équilibrée par barbotage avec  $\text{CO}_2/\text{N}_2$  (5 %) à 35°; le pH de ce mélange est 8,0.

On ajoute ensuite 3 ml d'une solution de  $\text{Na}_2^{14}\text{CO}_3$  correspondant à une activité d'environ  $5 \cdot 10^6$  coups par minute.

La culture ainsi obtenue a un volume de 60 ml et une densité optique de 0,238. Elle est mise en croissance. Lors de la croissance, le  $\text{CO}_2$  total, la radioactivité spécifique et le pH peuvent varier à la suite des échanges gazeux avec l'atmosphère et de la production de  $\text{CO}_2$  métabolique. Les variations de pH pourraient déterminer des variations importantes du rapport des espèces moléculaires  $\text{H}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{--}$ . Cependant, dans les conditions adoptées, ces changements ne se sont pas montrés significatifs (exp. III).

La quantité absolue de  $\text{CO}_2$  présente dans le milieu pouvant également varier, on a déterminé, dans une expérience séparée (III), que ces variations ne peuvent pas influencer l'interprétation des résultats. Les variations de la radioactivité spécifique sont, par contre, importantes pour le calcul du  $\text{CO}_2$  assimilé. C'est pour cette raison que l'on a déterminé la radioactivité spécifique en 4 points de l'évolution de la croissance. Ces 4 points délimitent 3 périodes et la radioactivité spécifique utilisée dans les calculs est la moyenne des 2 radioactivités spécifiques du début et de la fin de chaque période.

Le Tableau I donne les résultats de cette expérience; les données résultent, dans chaque cas, de deux mesures dont on a pris la moyenne.

TABLEAU I

Temps en min	Densité optique (D.O.)	A D.O.	$\text{CO}_2$ total $\mu\text{M/ml}$	Radioactivité spécifique $\text{cps}/\mu\text{M CO}_2$	Radioactivité sp. moyenne	pH
0	0.238	—	17.4	4750	4670	7.9
30	0.270	0.032	17.7	4590		—
60	0.308	0.038	17.0	4590		—
90	0.350	0.042	15.9	4450		8.37
$\Delta\text{D.O. total}$		0.112				

La radioactivité des bactéries en fin de croissance, pour 10 ml de culture, étant de 5,347 cps/min, on peut en déduire que la quantité de  $\text{CO}_2$  assimilée au cours d'une croissance de 0.100 de D.O. est de:

$$\frac{5347}{(0.32 \times 4670) + (0.38 \times 4590) + (0.42 \times 4520)} = \frac{5347}{5138} = 1.04 \mu\text{M}$$

Au cours de la croissance, on voit que la radioactivité spécifique, ainsi que les quantités de  $\text{CO}_2$ , varient très peu et, dans ce cas, les corrections ne sont pas importantes.

Elles deviennent toutefois indispensables dans d'autres expériences.

#### Expérience No. II: Croissance sur citrate

Les résultats sont donnés au Tableau II.

La radioactivité spécifique varie fortement au cours de ces expériences et il faut tenir compte des différentes valeurs pour le calcul de l'assimilation totale de  $\text{CO}_2$ .

La croissance est beaucoup plus lente dans ce cas. Il en résulte une dilution plus importante du  $\text{CO}_2$  radioactif. On verra, par l'étude de la croissance sur glutamate,

que la vitesse de la croissance ne peut pas être considérée comme une cause de la faible incorporation de CO<sub>2</sub>.

TABLEAU II

Essais n°	Substrat	Durée de l'expérience	pH		radioactivité spécifique		μM CO <sub>2</sub> assimilé
			init.	fin.	init.	fin.	
1	citrate	400	7.9	8.9	6.050	2.450	0.15
2	citrate	335	7.8	8.7	5.141	2.902	0.26

### Expérience No. III:

#### Croissance sur glucose et glutamate et influence de la concentration en CO<sub>2</sub>

La méthode est identique à celle utilisée dans les expériences précédentes, sauf toutefois pour la concentration en CO<sub>2</sub> totale du milieu. Nous ne reprenons, dans le Tableau III, que les résultats essentiels à l'interprétation.

TABLEAU III

Essais n°	Substrat carboné	Durée expérience min	pH		Concentration moyenne en CO <sub>2</sub> μM/ml	Radioactivité spécifique		μM CO <sub>2</sub> assimilé
			init.	fin.		init.	fin.	
1	glucose	115	7.7	7.9	3.8	17,900	4,500	0.84
2	glucose	115	7.8	8.3	7.7	10,500	4,200	1.0
3	glucose	115	7.9	8.5	14.9	5,800	5,150	0.73
4	glutamate	150	7.9	8.2	3.6	16,950	9,250	0.13
5	glutamate	150	7.9	8.4	5.6	11,000	8,850	0.11
6	glutamate	150	7.9	8.6	12.2	5,600	5,250	0.08

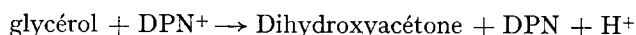
La croissance sur du glucose entraîne une assimilation du même ordre de grandeur que celle qui a été constatée lors de la croissance sur glycérol. D'autre part, la croissance sur le glutamate se présente, à cet égard, comme celle obtenue sur citrate.

On peut également signaler que des variations du pH, de la vitesse de la croissance et de la quantité absolue de CO<sub>2</sub>, ne modifient pas l'ordre de grandeur des résultats.

### Expérience No. IV: Influence d'un donneur d'hydrogène

Quel que soit le mécanisme de l'assimilation du CO<sub>2</sub>, il implique une réduction. On pouvait dès lors penser que la faible assimilation dans le cas des acides tri- ou dicarboxyliques ou de leurs dérivés pourrait provenir de la nature généralement plus oxydée de certains de leurs groupements et, d'autre part, de la pauvreté en groupes hydroxyles donneurs d'hydrogène. Quoique cette objection ne puisse pas être formulée d'une façon tout-à-fait générale, nous avons cependant réalisé une expérience qui permet d'apprécier sa valeur.

Cette expérience a été faite sur une souche différente de *Bacillus subtilis*, la souche M<sub>2</sub><sup>-</sup>. Dans cette souche<sup>31</sup>, le glycérol est métabolisé suivant l'équation:



La dihydroxyacétone n'est plus transformée ultérieurement et elle est entièrement

rejetée dans le milieu. Ce mécanisme est donc exclusivement donneur d'hydrogène.

En réalisant une croissance d'une part sur glutamate et d'autre part sur glutamate + glycérol, en présence de quantités identiques de  $\text{CO}_2$  marqué, l'incorporation de  $\text{CO}_2$  a correspondu respectivement à 2,600 et 2,900 cps/min, malgré l'activité considérable de la glycéroldéshydrogénase. L'écart est très faible par rapport à celui qui existe entre une croissance sur glutamate et une croissance sur glycérol, lorsque ce dernier est la source de carbone (souche  $\text{S}^+$ ).

#### Expérience No. V: Généralisation à d'autres substrats

Les expériences précédentes ont montré que l'assimilation du  $\text{CO}_2$  est caractéristique

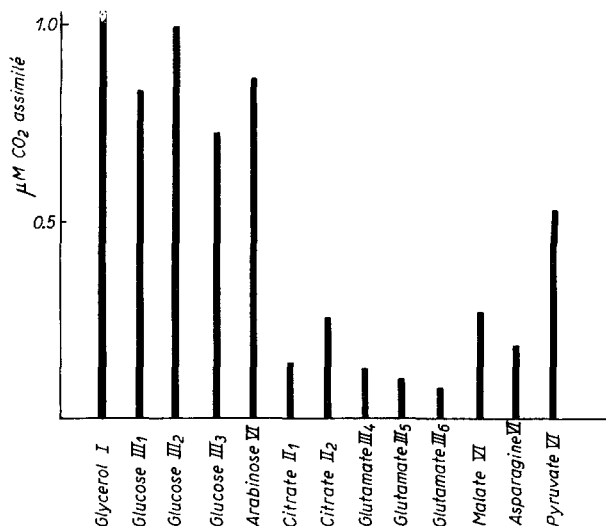


Fig. 1. Assimilation du  $\text{CO}_2$  en  $\mu\text{M}$  pour 10 ml de culture ayant crû d'une quantité correspondant à 0.1 de densité optique. Les sources carbonées présentes dans le milieu sont indiquées en abscisse. Les conditions sont indiquées dans le détail de chaque expérience correspondant au n° d'ordre accompagnant le substrat carboné.

du substrat et qu'elle varie peu avec les autres conditions expérimentales. Dans les expériences décrites ci-dessous, nous ne donnerons pas les détails expérimentaux, parce que les conditions adoptées sont voisines de celles qui ont été réalisées au cours des expériences III, essais No. 6. Les résultats sont donnés dans la Fig. 1, où nous avons repris, pour comparaison, l'ensemble des résultats expérimentaux précédents.

Les substrats sont clairement répartis en deux catégories; il faut cependant remarquer que le pyruvate donne un résultat intermédiaire, qui ne peut pas recevoir actuellement d'explication simple. Ce problème est à l'étude en ce moment.

#### Expérience No. VI: Compétition isotopique

L'addition de substances du cycle tricarboxylique réduit fortement l'assimilation du  $\text{CO}_2$ . Jusqu'à présent, ces substances ont été chacune employées comme seul substrat carboné. On doit s'attendre à ce que, lors d'une croissance se produisant simultanément en présence d'un substrat donneur de molécules à 3 carbones et de molécules du cycle tricarboxylique, la consommation de  $\text{CO}_2$  soit moins importante. Cette méthode de "compétition isotopique", déjà employée avec succès par ABELSON *et al.*<sup>11</sup>, a donné également dans ce cas des résultats intéressants. Ils sont repris dans la Fig. 2.

On voit que l'addition d'asparagine réduit effectivement l'assimilation du  $\text{CO}_2$  dans une proportion considérable. Cependant, la réduction est moins marquée en présence de glutamate et elle est encore plus faible en présence de citrate. La raison de ces différentes compétitions se comprend aisément: on constate en effet que chacun des substrats du cycle tricarboxylique agit effectivement en fonction de la vitesse de croissance qu'il provoque lorsqu'il est le seul substrat utilisable. La croissance sur de l'acide

citrique comme seul substrat carboné est très lente, le temps de génération était de 970 min; sur glutamate, il est de 353 min et sur asparagine de 314 min. Chacune de ces substances n'est pas utilisable avec la même intensité et, dans ces circonstances, le CO<sub>2</sub> n'est pas remplacé intégralement; il y a effectivement compétition et non pas exclusion de l'utilisation du CO<sub>2</sub>.

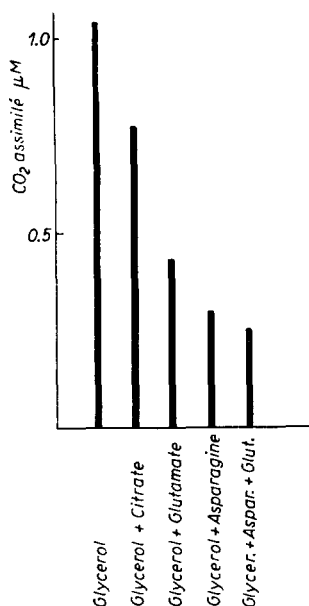


Fig. 2. Compétition de différents substrats carbonés avec l'assimilation du CO<sub>2</sub>. Coordonnées semblables à celles de la Fig. 1.

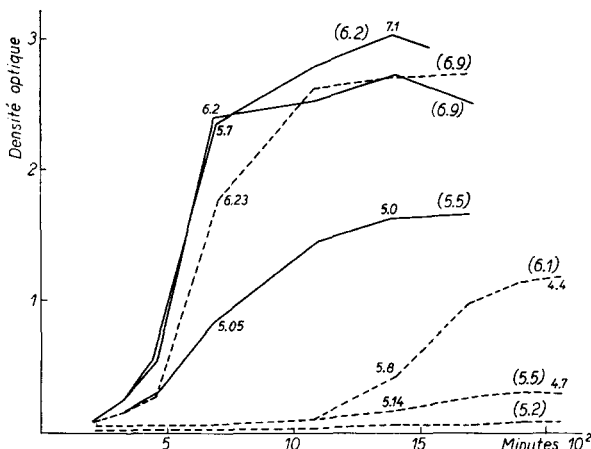


Fig. 3. Influence du citrate sur la croissance à différents pH. — milieu avec glycérol + citrate; ---- milieu avec glycérol seul. Les valeurs des pH initiaux sont indiquées entre parenthèses. Les pH mesurés en cours de croissance sont portés sur les courbes au moment correspondant à la mesure.

#### Expérience No. VII: Influence du citrate sur la croissance à différents pH

La croissance de la souche S<sup>+</sup> sur le milieu décrit précédemment avec du glycérol comme source de carbone, est rapidement bloquée dès que le milieu devient légèrement acide. Une différence sensible se manifeste déjà entre les pH 7.00 et 6.40. La phase de latence est nettement plus importante à pH 6.40 qu'à pH 7.00; elle augmente encore à des pH plus bas et, dans ces cas, la croissance totale est d'autant plus faible que le pH initial est plus bas.

Lorsque du citrate M/100 est présent dans les cultures, la croissance devient largement indépendante du pH: elle est pratiquement constante jusque pH 5.75. La mesure des pH au cours de la croissance, montre que l'action du citrate ne peut pas être attribuée à un effet tampon, ni à une alcalinisation provenant de l'oxydation de celui-ci. Un effet du tampon citrate ne peut se manifester que lorsque les cultures deviennent très acides. Dans les cultures sans citrate, non seulement la croissance est beaucoup plus lente qu'au même pH en présence de citrate, mais elle cesse même par une acidification du milieu; dans ce cas, le citrate peut intervenir par un effet sur le pH.

Dans la Fig. 3, nous reproduisons quelques courbes de croissance caractéristiques.

#### CONCLUSIONS ET DISCUSSION

La Fig. 1 donne le résumé des observations que nous avons faites sur l'assimilation du CO<sub>2</sub> extracellulaire au cours de la croissance sur différents substrats. Il apparaît

clairement que les membres du cycle tricarboxylique, ou les substrats qui peuvent y conduire par une réaction de décomposition, entraînent une réduction massive de l'assimilation du  $\text{CO}_2$  par rapport à celle obtenue en présence des substrats qui passent par les stades  $\text{C}_3$  ou  $\text{C}_2$  avant leur utilisation dans les synthèses.

Nous pouvons expliquer ces faits par l'hypothèse faite dans l'introduction de ce travail, à savoir que *le rôle biosynthétique du cycle des acides tricarboxyliques fonctionnant à partir de composés en  $\text{C}_3$  ou  $\text{C}_2$  implique une assimilation obligatoire et stoechiométrique de  $\text{CO}_2$* . Quoique cette proposition résulte du simple examen du bilan métabolique, elle ne semble pas avoir été formulée clairement auparavant.

Cette hypothèse rend compte, non seulement de l'aspect qualitatif des résultats, mais aussi de l'importance quantitative de l'assimilation du  $\text{CO}_2$ .

En considérant que le cycle de Krebs participe pour 50% aux synthèses protéiques<sup>11,12</sup> et que 1 carbone pour 4 à 5 carbones doit provenir du  $\text{CO}_2$ , on peut estimer que celui-ci devrait intervenir pour 11% du carbone protéique; on trouve expérimentalement la valeur moyenne de 8.5%.

Le mécanisme d'assimilation du  $\text{CO}_2$  dont nous avons traité n'est évidemment pas le seul existant. Un mécanisme différent se présente lors de la synthèse des pyrimidines et vraisemblablement dans des réactions dont la nature reste à préciser, mais dont l'existence peut être soupçonnée à la suite des observations de LWOFF ET MONOD<sup>2</sup>, de AJL AND WERKMAN<sup>3</sup> et de GERHARDT ET WILSON<sup>32</sup>, montrant que les substances précitées ne peuvent pas remplacer entièrement le  $\text{CO}_2$ .

L'effet du citrate sur la sensibilité des cultures à l'acidité se comprend si on admet que le  $\text{CO}_2$  métabolique diffuse assez rapidement dans le milieu pour descendre à un taux intracellulaire incompatible avec sa fonction essentielle dans les synthèses. A pH acide, le taux du  $\text{CO}_2$  dissous, en équilibre avec le  $\text{CO}_2$  atmosphérique, serait insuffisant pour maintenir le  $\text{CO}_2$  intracellulaire à une concentration permettant les synthèses. L'effet particulièrement marqué sur la phase de latence s'explique aisément par la réduction de la production métabolique du  $\text{CO}_2$  dans ces conditions.

Cette interprétation est en accord avec les observations de POTTER ET ELVEHJEM<sup>33</sup> faites sur *Lactobacillus arabinosus*. Ces auteurs ont montré que cet organisme peut croître à pH 5.4 à la condition que de l'aspartate ou de l'oxaloacétate soit présent dans le milieu de culture; lorsque ces substrats sont absents, la croissance est pratiquement nulle, déjà à pH 5.8. Si dans leurs expériences les autres membres en  $\text{C}_4$  du cycle tricarboxylique ne manifestent pas cet effet, cela doit être attribué aux complications dues à la pénétration de ces substances jusqu'à leur site métabolique. Ces complications qui ne se présentent pas chez *Bacillus subtilis*<sup>14</sup> ont été clairement analysées récemment par KREBS<sup>10</sup>, KOGUT<sup>34</sup> et CAMPBELL<sup>35</sup>. On a déjà signalé que la croissance des bactéries lactiques était favorisée par la présence de  $\text{CO}_2$ <sup>36</sup>. Nos expériences montrent que l'insensibilité à l'acidité ne s'étend pas à des pH inférieurs à 5.0.

C'est effectivement ce que nous devons obtenir, étant donné que, en dessous de ce pH, le  $\text{CO}_2$  dissous est entièrement sous forme non ionisée le  $\text{pK}$  de la première fonction acide de l'acide carbonique est de 6.5 et à pH 5, il ne subsiste que 2% de la forme  $\text{HCO}_3^-$ . On sait que certains microorganismes tels que les levures et les moisissures sont nettement moins sensibles à l'acidité que la majorité des bactéries.

Cette propriété fut déjà utilisée par PASTEUR pour la purification des levures. Il est possible que cette insensibilité soit réalisée par la condensation  $\text{C}_2 \rightarrow \text{C}_4$  signalée par FOSTER *et al.*<sup>19,20</sup>.



Des facteurs physiques, touchant la vitesse de diffusion du CO<sub>2</sub> métabolique, pourraient également intervenir. Si nous admettons que la vitesse de diffusion est proportionnelle à la surface, alors que la production métabolique de CO<sub>2</sub> est proportionnelle à la masse totale, dans ce cas, les organismes de plus grande taille comme les levures et moisissures doivent être plus résistants à l'acidité que les bactéries et les actinomycètes. L'origine de la résistance extraordinaire d'organismes tels que les *Thiobacillus thioxydans*, pouvant croître à pH 1.0, est évidemment d'une autre nature.

Le rôle du cycle des acides tricarboxyliques dans les oxydations cellulaires des tissus animaux est actuellement hors de doute. A partir de données obtenues principalement chez les micro-organismes, on est amené à penser qu'il joue un rôle biosynthétique essentiel. Il est vraisemblable que cette fonction biosynthétique existe également dans les tissus animaux. A l'appui de cette idée, on peut remarquer que les tissus animaux à fonction synthétique, les cellules du foie par exemple, manifestent une assimilation de CO<sub>2</sub> beaucoup plus intense que les tissus à spécialisation essentiellement énergétique, tels que le muscle<sup>5</sup>.

On peut penser que les deux modes de fonctionnement du cycle des acides tricarboxyliques offrent une possibilité d'évolution du fonctionnement des tissus au cours du développement. Des études établissant cette différenciation tissulaire, au niveau métabolique, semblent souhaitables. Récemment, COHEN<sup>37</sup> et FLICKINGER<sup>38</sup> ont étudié l'incorporation du CO<sub>2</sub> dans les composés protéiques, nucléiques et acido-solubles des oeufs et des premiers stades du développement des Batraciens. Dans l'ensemble, leurs résultats indiquent une participation importante des composés du cycle tricarboxylique au processus d'assimilation du CO<sub>2</sub>; de plus, l'incorporation du CO<sub>2</sub> dans les protéines et les acides nucléiques augmente lors des stades plus avancés du développement (neurula). Dans ce cas cependant, l'interprétation des résultats est compliquée par la possibilité de remaniements moléculaires à partir des réserves plutôt que d'une synthèse nette. L'étude d'oeufs oligolécitiques ou d'embryons à un stade plus avancé du développement permettrait sans doute de préciser le rôle du CO<sub>2</sub> dans la synthèse des tissus animaux.

## RÉSUMÉ

On présente une explication permettant de rendre compte d'une partie importante des exigences en CO<sub>2</sub> au cours de la croissance des organismes hétérotrophes. Cette exigence résulte du fonctionnement biosynthétique du cycle des acides tricarboxyliques.

Cette hypothèse permet de rendre compte de nombreux faits déjà signalés auparavant, ainsi que de ceux présentés dans ce travail.

Le rôle énergétique et synthétique du cycle des acides tricarboxyliques dans les tissus animaux est discuté.

## SUMMARY

A hypothesis is presented, which gives an explanation of a major part of the need of CO<sub>2</sub> in the growth of heterotrophic organisms. This need results from the biosynthetic function of the tricarboxylic cycle.

The hypothesis explains the numerous facts previously reported in the literature, as well as those presented here.

The energetic and synthetic functions of the tricarboxylic acids cycle in animal tissues are discussed.

*Bibliographie p. 278.*

## ZUSAMMENFASSUNG

Es wird eine Erklärung vorgeschlagen, welche es ermöglicht, einem bedeutenden Teil der  $\text{CO}_2$  Bedürfnisse im Laufe des Wachstumes von heterotrophen Organismen Rechnung zu tragen. Dieses Bedürfnis ergibt sich aus den biosynthetischen Funktionen des Trikarboxylsäurezyklus.

Durch diese Hypothese können viele bereits gemeldete, sowie die in der gegenwärtigen Arbeit mitgeteilten Ergebnisse erklärt werden.

Die energetische und synthetische Rolle des Trikarboxylsäurezyklus in tierischen Geweben wird erörtert.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> G. P. GLADSTONE, P. FILDES AND G. M. RICHARDSON, *Brit. J. Exp. Path.*, 16 (1935) 335.
- <sup>2</sup> A. LWOFF ET J. MONOD, *Ann. Inst. Pasteur*, 73 (1947) 323.
- <sup>3</sup> S. J. AJL AND C. H. WERKMAN, *Arch. Biochem.*, 19 (1948) 483.
- <sup>4</sup> D. HERBERT, *Symposia Soc. Exptl. Biol.*, V (1951) 52.
- <sup>5</sup> H. A. KREBS, *Symposia Soc. Exptl. Biol.*, V (1951) 1.
- <sup>6</sup> H. G. WOOD, *Symposia Soc. Exptl. Biol.*, V (1951) 9.
- <sup>7</sup> M. R. HEINRICH AND D. W. WILSON, *J. Biol. Chem.*, 186 (1950) 447.
- <sup>8</sup> D. J. MCLEAN AND E. F. PURDIE, *J. Biol. Chem.*, 197 (1952) 539.
- <sup>9</sup> M. R. HEINRICH, V. C. DEWEY AND G. W. KIDDER, *J. Am. Chem. Soc.*, 76 (1954) 3102.
- <sup>10</sup> H. A. KREBS, S. GURIN AND L. V. E. EGGLESTON, *Biochem. J.*, 51 (1952) 614.
- <sup>11</sup> P. H. ABELSON, E. BOLTON, R. BRITTEN, D. B. COWIE AND R. B. ROBERTS, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 39 (1953) 1020.
- <sup>12</sup> R. B. ROBERTS, D. B. COWIE, R. BRITTEN, E. BOLTON AND P. H. ABELSON, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 39 (1953) 1013.
- <sup>13</sup> J. M. WIAME, R. STORCK AND S. BOURGEOIS, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 627.
- <sup>14</sup> J. M. WIAME AND S. BOURGEOIS, *Nature*, 172 (1953) 310.
- <sup>15</sup> S. OCHOA, A. M. MEHLER AND A. KORNBURG, *J. Biol. Chem.*, 174 (1948) 979.
- <sup>16</sup> M. F. UTTER AND K. KURAHASHI, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 758.
- <sup>17</sup> M. F. UTTER AND K. KURAHASHI, *J. Biol. Chem.*, 207 (1954) 787.
- <sup>18</sup> R. S. BANDURSKI AND C. M. GREINER, *J. Biol. Chem.*, 204 (1953) 781.
- <sup>19</sup> J. W. FOSTER *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 35 (1949) 663.
- <sup>20</sup> J. W. FOSTER AND S. F. CARSON, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 36 (1950) 219.
- <sup>21</sup> J. R. S. FINCHAM, *J. Gen. Microbiol.*, 5 (1951) 793.
- <sup>22</sup> J. M. WIAME, J. COLLETTE AND S. BOURGEOIS, *Arch. intern. physiol. biophys.*, 73 (1955) 271.
- <sup>23</sup> J. Q. HEPLAR AND E. L. TATUM, *J. Biol. Chem.*, 208 (1954) 489.
- <sup>24</sup> M. TOMLINSON AND H. A. BARKER, *J. Biol. Chem.*, 209 (1954) 585.
- <sup>25</sup> A. G. MARR AND J. B. WILSON, *Arch. Biochem. Biophys.*, 34 (1951) 442.
- <sup>26</sup> J. J. R. CAMPBELL, R. A. SMITH AND B. A. EAGLES, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 594.
- <sup>27</sup> D. J. MCLEAN, N. H. ROBINSON AND E. F. PURDIE, *J. Bacteriol.*, 61 (1951) 617.
- <sup>28</sup> J. M. WIAME AND R. STORCK, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 268.
- <sup>29</sup> O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARRAND, R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- <sup>30</sup> L. DOUTCHEFF, *Bull. soc. chim. biol.*, 35 (1953) 685.
- <sup>31</sup> J. M. WIAME, S. BOURGEOIS AND R. LAMBION, *Nature*, 174 (1954) 37.
- <sup>32</sup> P. GERHARDT AND J. B. WILSON, *J. Bacteriol.*, 59 (1950) 311.
- <sup>33</sup> R. L. POTTER AND C. ELVEHJEM, *J. Biol. Chem.*, 172 (1948) 531.
- <sup>34</sup> M. KOGUT AND E. P. PODOSKI, *Biochem. J.*, 55 (1953) 800.
- <sup>35</sup> J. J. CAMPBELL AND F. N. STOKES, *J. Biol. Chem.*, 190 (1951) 853.
- <sup>36</sup> C. M. LYMAN, O. MOSELEY, S. WOOD, B. BUTLER AND F. HALE, *J. Biol. Chem.*, 167 (1947) 177.
- <sup>37</sup> S. COHEN, *J. Biol. Chem.*, 211 (1954) 337.
- <sup>38</sup> R. A. FLICKINGER, *Exp. Cell. Research*, 6 (1954) 172.

Reçu le 1 avril 1955