

## CONTRIBUTION À L'ÉTUDE DU RÔLE BIOSYNTHÉTIQUE DU CYCLE DES ACIDES TRICARBOXYLIQUES

### EFFET DE L'ACIDITÉ SUR LA CROISSANCE BACTÉRIENNE (*B. SUBTILIS*)

par

J. M. WIAME, CH. ROZENBLUM ET S. BOURGEOIS

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

Dans des publications précédentes<sup>1,2</sup>, nous avons montré que le rôle biosynthétique du cycle des acides tricarboxyliques pouvait entraîner une assimilation obligatoire et considérable de  $\text{CO}_2$  au cours de la croissance. Ceci pouvait rendre compte de nombreux faits expérimentaux observés lors de l'étude de la croissance de diverses bactéries (Revue v. réf.<sup>2</sup>) et de plus, pouvait être envisagé dans la croissance de tissus animaux dont la fonction est spécialisée dans les synthèses (foie).

La conclusion essentielle à laquelle nous sommes arrivés peut être exprimée comme suit: l'utilisation à des fins synthétiques (et non simplement énergétiques) d'un membre quelconque du cycle des acides tricarboxyliques entraîne une assimilation stoechiométrique de  $\text{CO}_2$ . Celui-ci, par un processus de synthèse du type  $\text{C}_3 + \text{CO}_2 \rightarrow \text{C}_4$  (oxaloacétate ou malate), permet d'alimenter le cycle des acides tricarboxyliques en fonctionnement synthétique, alors que la fixation de  $\text{CO}_2$  n'est pas requise lorsque le cycle est simplement oxydatif.

La nécessité du  $\text{CO}_2$  n'existe toutefois que dans le cas où la source de carbone utilisée à la croissance est un sucre, du glycérol ou des molécules dont les transformations passent normalement par le stade de molécules en  $\text{C}_3$  ou  $\text{C}_2$ . Dans le cas où l'organisme dispose dans le milieu extérieur de molécules qui sont des constituants du cycle des acides tricarboxyliques, la nécessité du  $\text{CO}_2$  pour la croissance doit être fortement réduite. Ce point a été vérifié expérimentalement<sup>1,2</sup>.

Il faut remarquer que la vérification de ce point nécessite que les substrats ajoutés au milieu de culture atteignent effectivement leur site d'incorporation métabolique et ceci non seulement n'est pas toujours le cas, mais semble varier fortement avec les différentes espèces bactériennes. Alors que l'effet de remplacement du  $\text{CO}_2$  par l'acide glutamique et l'acide succinique fut observé par LWOFF ET MONOD<sup>3</sup> chez *E. coli*, l'acide citrique et l'acide  $\alpha$ -céto glutarique n'avaient pas d'effet dans ce cas. Des conditions identiques semblent se retrouver dans le cas de *Aerobacter aerogenes*<sup>4</sup>, mais chez *Serratia marcescens* l'acide citrique peut effectivement remplacer le  $\text{CO}_2$ <sup>5</sup>. Dans le cas de *Bacillus subtilis*, comme une autre étude le prévoyait<sup>6</sup>, l'ensemble des composants du cycle des acides tricarboxyliques est actif, et ceci a

permis de démontrer que la majeure partie de la nécessité du  $\text{CO}_2$  était liée au fonctionnement synthétique du cycle de Krebs<sup>1,2</sup>.

Il ne faut toutefois pas écarter l'idée que la condensation d'acétate en succinate, qui semble exister chez les moisissures, permettrait d'éliminer cette part de l'exigence en  $\text{CO}_2$ .

En plus de cette exigence due au fonctionnement synthétique du cycle de Krebs, le  $\text{CO}_2$  peut aussi être requis pour les synthèses pyrimidiques.

A l'occasion des études précédentes, nous avons montré que l'acide citrique, employé comme source de carbone en remplacement du glycérol, réduit l'assimilation du  $\text{CO}_2$ ; lorsqu'il est ajouté à un milieu contenant du glycérol, il diminue fortement la sensibilité des cultures à l'acidité. Nous avons mis en parallèle cet effet avec le rôle de l'acide citrique comme remplaçant du  $\text{CO}_2$ . Alors que l'effet de réduction de l'assimilation du  $\text{CO}_2$  avait été étendu à plusieurs membres du cycle, l'effet de ceux-ci sur la sensibilité à l'acidité n'avait été étudié que pour l'acide citrique.

Dans ce travail, nous montrons que cet effet peut être généralisé à plusieurs membres du cycle.

Ces observations non seulement nous donnent une explication simple de divers phénomènes que l'on rencontre journellement en microbiologie, mais peuvent également faciliter la réalisation expérimentale de cultures bactériennes. Un effet favorable de l'acide citrique a déjà été observé lors de cultures de *Bacillus subtilis* destinées à la production de subtiline. Il est vraisemblable que l'on a affaire dans ce cas à un fait similaire.

#### MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Dans l'ensemble le matériel et les techniques employés ont été décrits dans un travail précédent<sup>3</sup>. La souche bactérienne utilisée est *Bacillus subtilis* souche S<sup>+</sup>, pouvant croître avec un sel d'ammonium comme seule source d'azote. Les croissances sont effectuées à 35-36°C avec aération par agitation. Les croissances sont exprimées en opacités lues à l'opacimètre Coleman. Le milieu est constitué des substances suivantes; glycérol M/20,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  M/50, NaCl M/100,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  M/100,  $\text{MgSO}_4$  M/1000, citrate de fer M/25.000, tampon aux phosphates M/50. Les différents pH sont obtenus par l'ajoute, en proportions variables, de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; cette ajoute est faite stérilement au milieu précédent stérile et exempt de phosphates. Les substances additionnelles, membres du cycle de Krebs ou dérivés de ceux-ci, sont ajoutées stérilement de façon à réaliser la concentration M/100; elles sont également portées au préalable au pH désiré. Le pH du mélange est mesuré avant la mise en culture.

L'inoculum est constitué de bactéries récoltées par centrifugation d'une culture préalable en phase exponentielle. L'inoculum, identique dans chaque fiole d'une même expérience, est tel que le trouble initial est visible.

L'acide arginosuccinique a été préparé enzymatiquement selon WALKER ET MYERS<sup>7</sup> et l'acide uréidosuccinique par la méthode de NYC ET MITCHELL<sup>8</sup>.

#### RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

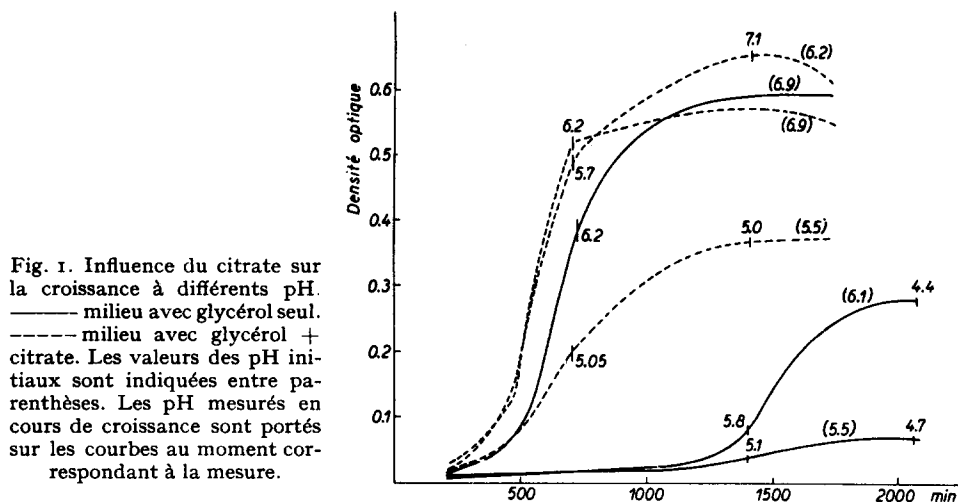
##### Expérience No. 1: Influence du citrate

La Fig. 1 reprend les résultats obtenus avec citrate tels qu'ils furent observés dans une première expérience.

L'effet de l'acide citrique est très marqué et il disparaît si le pH est élevé, puisque le  $\text{CO}_2$  métabolique est retenu dans le milieu. Les variations les plus importantes de la croissance en fonction du pH et en absence de citrate, se situent dans la zone de variation de l'ionisation  $\text{H}_2\text{CO}_3 \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$  ( $\text{pK} = 6.5$ ). Ceci pourrait indiquer que l'ion  $\text{HCO}_4^-$  est la forme effectivement active dans le processus d'assimilation.

Les croissances en milieu alcalin sans citrate ont généralement une phase de latence plus grande que celles avec citrate au même pH; ceci peut se comprendre par la faible teneur en  $\text{CO}_2$  des milieux frais. Toutefois, l'allure générale de la croissance, une fois dépassée la phase de latence, est parallèle à celle en présence de citrate (voir aussi Fig. 5).

La solubilité du  $\text{CO}_2$  en dessous de pH 4.5 et les diverses formes sous lesquelles peut se trouver le  $\text{CO}_2$  ne sont plus influencées par le pH et, par conséquent, les effets de l'acidité en dessous de ce pH ne concernent plus le métabolisme du  $\text{CO}_2$ .



### Expérience No. 2: Les effets comparés du citrate et du glutamate

La Fig. 2 montre que le glutamate a un effet comparable au citrate. Le glutamate du milieu dispense la cellule de la synthèse de l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique par la voie du cycle au même titre que le citrate.

### Expérience No. 3: Les effets du malate et de l'aspartate

Comme on peut le prévoir, si le phénomène peut être généralisé, le malate et l'aspartate ont également une action du même type que celle du citrate (Fig. 3).

Cependant, quoique la vitesse de croissance au début est égale à celle en présence de citrate, la vitesse de croissance est plus élevée par après et la croissance totale est supérieure. Ceci peut être dû à ce que la quantité d'aspartate ou de malate réellement disponible par la cellule, atteignant le site d'utilisation, est plus élevée que pour le citrate. L'étude de la compétition isotopique entre le  $\text{CO}_2$  et l'asparagine étudiée précédemment<sup>2</sup> a montré un effet supérieur de l'asparagine comparé au citrate.

L'effet de l'aspartate et de l'oxaloacétate sur la sensibilité à l'acidité avait été observée par POTTER ET ELVEHJEM<sup>9</sup> chez *Lactobacillus arabinosus*. Si ces auteurs n'ont pas observé l'effet des autres membres du cycle, cela peut provenir des différences de pénétrations ou encore d'un métabolisme différent, le *Lactobacillus arabinosus* étant dépourvu du système respiratoire présent chez *Bacillus subtilis*. POTTER ET ELVEHJEM ont également interprété l'action de l'acidité par le manque de  $\text{CO}_2$  qu'elle entraîne.

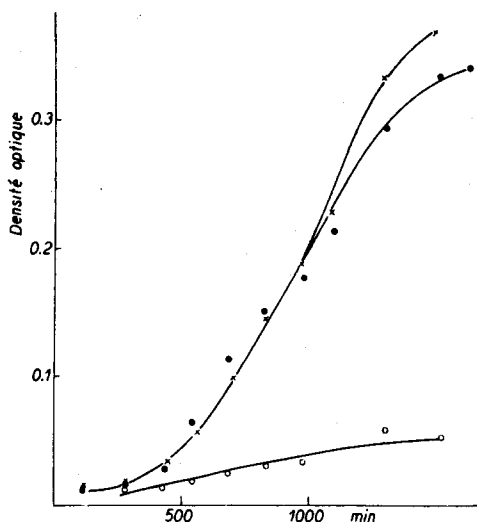


Fig. 2. Effets comparés du citrate et du glutamate. ○ milieu avec glycérol seul pH 5.65. × milieu avec glycérol + citrate pH 5.75. ● milieu avec glycérol + glutamate pH 5.62.

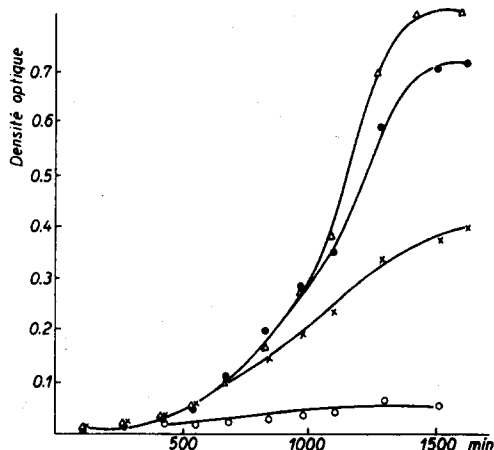


Fig. 3. Effets comparés du citrate, de l'aspartate et du malate. ○ milieu avec glycérol seul pH 5.65. × milieu avec glycérol + citrate pH 5.75. ● milieu avec glycérol + aspartate pH 5.56. △ milieu avec glycérol + malate pH 5.62.

#### Expérience No. 4: Influence d'un hydrolysât d'acides nucléiques

Si l'effet de l'acidité peut être compensé par un des membres du cycle de Krebs, en fonction de sa répercussion sur la nécessité du  $\text{CO}_2$ , un effet comparable devrait être trouvé dans le cas de l'ajoute d'une substance intervenant comme intermédiaire de toute réaction qui résulte de la fixation de  $\text{CO}_2$  telles que les pyrimidines. L'effet

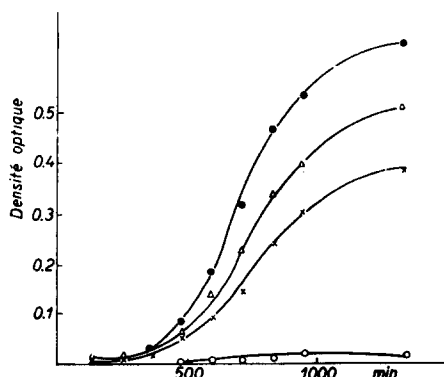


Fig. 4. Influence d'un hydrolysât d'acides nucléiques à pH acide. ○ milieu avec glycérol seul pH 5.4. × milieu avec glycérol + citrate pH 5.5. △ milieu avec glycérol + citrate + hydrolysât d'acides nucléiques  $M/1,000$  en azote pH 5.5. ● milieu avec glycérol + citrate + hydrolysât d'acides nucléiques  $M/500$  en azote pH 5.5.

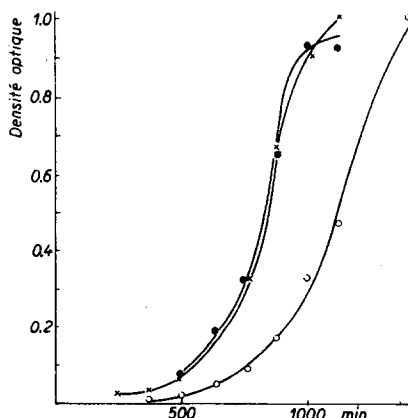


Fig. 5. Influence d'un hydrolysât d'acides nucléiques à pH alcalin. ○ milieu avec glycérol seul pH 7.45. × milieu avec glycérol + citrate pH 7.4. ● milieu avec glycérol + citrate + hydrolysât d'acides nucléiques  $M/500$  en azote pH 7.4. △ milieu avec glycérol + citrate + hydrolysât d'acides nucléiques  $M/500$  en azote pH 7.4.

sera évidemment le reflet de l'importance massique des substances à synthétiser, ainsi que de la relation qui lie la vitesse de la réaction d'assimilation de  $\text{CO}_2$  avec la concentration de la forme active de celui-ci dans la cellule ( $\text{H}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{HCO}_3^-$  ou  $\text{CO}_3^{--}$ ). Ces relations ne sont pas encore connues en général, mais l'importance massique des synthèses de substances telles que les pyrimidines étant assez élevée, nous avons étudié l'influence de l'ajoute d'un hydrolysât d'acides nucléiques (parties égales de RNA et DNA hydrolysés pendant une heure à  $100^\circ\text{C}$  dans  $\text{HCl}$  10 N) sur la sensibilité à l'acidité. L'effet doit s'ajouter à celui du citrate étant donné qu'un nouveau besoin en  $\text{CO}_2$  est supprimé. Cet effet doit s'annuler à pH alcalin, comme dans le cas du citrate. Les Figs. 4 et 5 montrent qu'il en est bien ainsi.

Des résultats identiques pourraient être attendus des différents précurseurs des pyrimidines qui succèdent à l'assimilation du  $\text{CO}_2$ . D'une façon générale, les effets obtenus ont été faibles ou douteux. Les substances essayées furent : les bases pyrimidiques libres, leurs nucléosides, l'acide orotique, l'acide arginosuccinique et la citrulline. L'acide uréidosuccinique, au cours d'une expérience, a montré une inhibition. Toutes ces substances étaient ajoutées à la molarité  $M/250$ .

Des essais de compétitions isotopiques entre le  $^{14}\text{CO}_2$  et ces différentes substances ont confirmé ces résultats.

TABLEAU I

ASSIMILATION DE  $^{14}\text{CO}_2$  EN PRÉSENCE DE  
DÉRIVÉS PYRIMIDIQUES

Substances ajoutées	$\mu\text{M } ^{14}\text{CO}_2$ assimilé
—	0.350
Hydrolysât d'acides nucléiques (RNA + DNA)	0.158
Cytosine + uracile + thymine	0.403
Cytidine + thymidine + uridine	0.320

à un accroissement de densité optique de 0.1. La source de carbone est, dans chaque cas, le glycérol + citrate.

Seul l'hydrolysât d'acides nucléiques réduit de façon sensible l'assimilation du  $^{14}\text{CO}_2$ . La méthode de détermination du  $^{14}\text{CO}_2$  incorporé a été décrite précédemment<sup>2</sup>. Les résultats des essais sont consignés au Tableau I.

$\mu\text{M } ^{14}\text{CO}_2$  assimilé par les bactéries de 10 ml de culture au cours d'une croissance correspondant

## RÉSUMÉ

L'ensemble des résultats confirme l'hypothèse que l'acidité inhibe la croissance bactérienne en réduisant le  $\text{CO}_2$  assimilable. Cet effet de l'acidité peut donc être compensé par l'ajoute au milieu de culture des substances dont la synthèse est obligatoirement liée à l'utilisation du  $\text{CO}_2$ , notamment les substances membres du cycle de Krebs et les dérivés nucléiques.

## SUMMARY

The results confirm the theory that acidity inhibits bacterial growth by reducing the assimilable  $\text{CO}_2$ . This effect of acidity can therefore be compensated by addition to the culture medium of substances whose synthesis is bound obligatorily to the utilisation of  $\text{CO}_2$ , especially substances which play a part in the Krebs cycle, and nucleic derivatives.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. M. WIAME ET S. BOURGEOIS, *Arch. intern. physiol. biochim.*, 63 (1955) 270.
- 2 J. M. WIAME ET S. BOURGEOIS, *Biochim. Biophys. Acta*, 18 (1955) 269.
- 3 A. LWOFF ET J. MONOD, *Ann. inst. Pasteur*, 73 (1947) 323.
- 4 S. J. AJL AND C. H. WERKMAN, *Arch. Biochem.*, 19 (1948) 483.
- 5 D. J. MCLEAN, N. H. ROBINSON AND E. F. PURDIE, *J. Bacteriol.*, 61 (1951) 617.
- 6 J. M. WIAME AND S. BOURGEOIS, *Nature*, 172 (1953) 310.
- 7 J. B. WALKER AND J. MYERS, *J. Biol. Chem.*, 208 (1953) 143.
- 8 J. F. NYC AND H. K. MITCHELL, *J. Am. Chem. Soc.*, 69 (1947) 1382.
- 9 R. L. POTTER AND C. ELVEHJEM, *J. Biol. Chem.*, 172 (1948) 531.

Reçu le 27 octobre 1955