

## ACKNOWLEDGMENTS

The author's thanks are due to Professor J. A. CHRISTIANSEN and A. LEVIN NIELSEN for much helpful criticism.

## SUMMARY

An explanation is sought for the normal stability of the blood pressure and the variations found in different forms of phaeochromocytoma. A rather simple scheme of reactions involving enzymic degradation of pressor amines and another scheme for production and inactivation of the deaminating enzyme is proposed. By applying the principle of the steady state to the combination of these reactions many clinical facts are explained. Quite similar reaction mechanisms may help to explain other physiological and pathophysiological phenomena.

## REFERENCES

- <sup>1</sup> A. LUND, *Scand. J. Clin. & Lab. Invest.*, 4 (1952) 263, and personal communications (1956).
- <sup>2</sup> M. GOLDENBERG, I. SERLIN, T. EDWARDS AND M. M. RAPPORT, *Am. J. Med.*, 16 (1954) 310.
- <sup>3</sup> L. MICHAELIS AND M. L. MENTEN, *Biochem. Z.*, 49 (1913) 333.
- <sup>4</sup> G. E. BRIGGS AND J. B. S. HALDANE, *Biochem. J.*, 19 (1925) 338.
- <sup>5</sup> U. S. VON EULER, *Scand. J. Clin. & Lab. Invest.*, 5 (1953) 122.
- <sup>6</sup> M. GOLDENBERG, H. ARANOW, A. A. SMITH AND M. FABER, *Arch. Internal Med.*, 86 (1950) 823.
- <sup>7</sup> J. A. CHRISTIANSEN, *Acta Chem. Scand.*, 8 (1954) 909; *Fysisk Tids.*, 53 (1955) 200.
- <sup>8</sup> K. JENSEN, *Danish Med. Bull.*, 4 (1957) 96.

Received April 2nd, 1957

## INFLUENCE DU TAUX DE CROISSANCE SUR LA CONSTITUTION DU SPECTRE HÉMATINIQUE DE *B. SUBTILIS*

P. CHAIX ET J. F. PETIT

*Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, Paris (France)*

Dans deux précédentes publications<sup>1,2</sup>, il a été montré que le spectre de *B. subtilis* cultivé sur bouillon de viande peptoné et gélosé présente d'importantes variations suivant que les bactéries sont récoltées après des temps d'incubation plus ou moins longs. Dans le cas de cultures de longue durée, l'examen spectrographique révèle, à la température ordinaire et à  $-190^{\circ}$ , les trois composantes cytochromiques classiques *aa*, *ba* et *ca*, tandis que, dans le cas de cultures de courte durée, cet examen révèle à la température ordinaire les bandes *aa* et *b<sub>1</sub>a*, cette dernière se scindant à  $-190^{\circ}$  en 4 bandes: *ba* (561 m $\mu$ ), *ya* (556–557 m $\mu$ ), *za* (553–554 m $\mu$ ) et *ca* (548–549 m $\mu$ ).

Ces observations avaient été faites sur des microorganismes s'étant développés dans des conditions difficiles à analyser. Il était donc intéressant de reprendre l'étude du phénomène sur des bactéries obtenues dans des conditions simples, rigoureusement définies.

Pour ce faire nous avons réalisé des cultures de *B. subtilis* sur milieux liquides synthétiques agités en présence d'air dans des conditions telles que l'oxygène ne soit pas facteur limitant de la croissance pendant la durée de l'expérience, et nous avons fait varier la nature du substrat carboné. Les bactéries étant récoltées au cours de

la phase exponentielle de leur croissance, après un nombre donné de divisions, leur spectre hématinique réduit a été spectrographié à la température de l'azote liquide.

La comparaison des variations spectrales de *B. subtilis* cultivé dans ces conditions a conduit à envisager une corrélation entre la forme de son spectre hématinique et la valeur de son taux de croissance, corrélation qui a été confirmée par le spectre de bactéries obtenues par la méthode de cultures continues à taux de croissance limité<sup>3</sup>.

## PARTIE EXPÉRIMENTALE

### I. Conditions des expériences

1. *Souche utilisée*: *B. subtilis*, type Marburg, No. 3610 de "The National Culture Type Collection" Londres, conservée par repiquages dans les conditions précédemment indiquées<sup>2</sup>.

2. *Milieu de culture*:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (57.31 g);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (5.44 g);  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5.00 g);  $\text{NaCl}$  (0.01 g);  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.2 g);  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.01 g);  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0.007 g); substrat carboné (5 g);  $\text{H}_2\text{O}$  q.s.p. 1000 ml. Ce milieu est stérilisé pendant 30 minutes à  $120^\circ$ ; toutefois le saccharose, le glucose, le fructose et le ribose sont autoclavés séparément; le pyruvate et le fumarate sont stérilisés séparément par filtration sur un filtre Seitz EKSr. Le pH final du milieu est de 7.0.

3. *Précultures et ensemencements*. Les précultures sont faites dans des erlenmeyers de 100 ml contenant 10 ml du milieu ci-dessus, le glucose étant le substrat carboné. Elles sont ensemencées à partir de cultures sur milieu à l'extrait de viande Liebig peptoné et gélosé<sup>2</sup> et incubées en étant agitées à  $37^\circ$ . Les bactéries destinées à ensemercer la culture sont prélevées dans la période exponentielle de la croissance de la préculture, quand la densité optique de la préculture, mesurée au photomètre de Coleman, correspond à environ 80 unités Coleman\*. La quantité de bactéries ensemencées est telle que la densité optique de la culture, immédiatement après l'ensemencement, corresponde à 0.4 unités Coleman.

4. *Conditions de culture*. La Fig. 1 donne le schéma des récipients utilisés. A chaque fiole F, d'une capacité de 2 litres, a été soudé un tube à néphélométrie adaptable au photomètre de Coleman.

Chaque fiole contient 200 ml de milieu de culture. Elle est placée pendant l'incubation dans une enceinte à  $37^\circ$  sur un plateau animé d'un mouvement de va-et-vient dont l'amplitude est de 4 cm et la vitesse de 130 oscillations par minute.

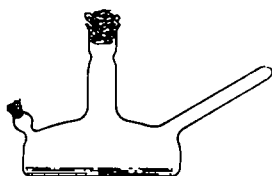


Fig. 1. Récipient F muni d'un tube permettant des mesures néphélométriques, utilisé pour les cultures de *B. subtilis* en milieu non renouvelé.

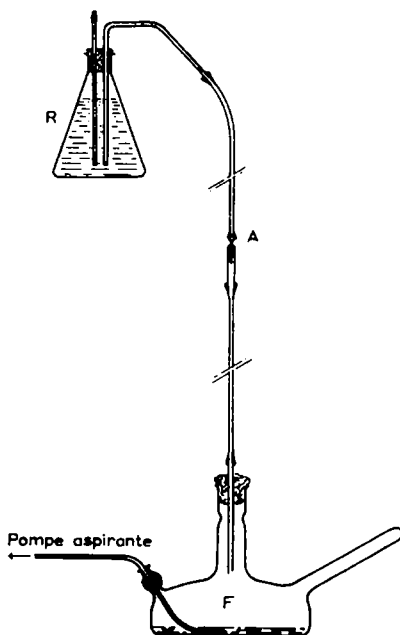


Fig. 2. Dispositif utilisé pour obtenir des cultures continues à taux de croissance limité comprenant: une fiole F contenant la culture; un réservoir R assurant par l'intermédiaire de l'aiguille A un débit faible et régulier du liquide nutritif neuf; un tube branché sur une pompe aspirante d'Henry et Jouvelet assurant l'évacuation continue d'un volume de culture égal au volume de liquide nutritif neuf introduit.

\* Une unité Coleman correspond environ à  $12.5 \mu\text{g}$  de *B. subtilis* (poids sec) par ml.

(a) *Cultures I en milieu non renouvelé.* Le milieu de culture contient le substrat carboné à la concentration relativement élevée de 0.5 % (ainsi il n'est pas facteur limitant de la croissance pendant la durée de l'expérience). Les fioles sont simplement bouchées par un coton. La croissance bactérienne est suivie, au début, par des mesures néphélométriques directes (à l'aide du photomètre Coleman) grâce au tube latéral du flacon dans lequel une fraction de la culture a été momentanément basculée; ensuite, sur des prises d'essai diluées. Quand la densité de la culture atteint environ 50 unités Coleman, les bactéries sont centrifugées à basse température (15 min à 15,000 g) en vue de l'étude spectrographique.

(b) *Cultures II contenues à taux de croissance limité*<sup>3</sup>. Le dispositif utilisé est représenté sur la Fig. 2. Le milieu de culture contenu dans la fiole F et dans le réservoir R a une concentration en hydrates de carbone abaissée à 0.15 %. Quand, après ensemencement de la fiole F dans les conditions habituelles, la densité de la culture a atteint une valeur de 45 unités Coleman, on fait parvenir goutte à goutte à l'aide de l'aiguille A, d'une façon continue, avec un débit de 41.4 ml/heure, du milieu nutritif provenant du réservoir R dans le récipient F; le volume de la culture est maintenu constant en évacuant, simultanément, à l'aide d'une pompe aspirante\* un volume de culture bactérienne égal au volume du milieu de culture neuf introduit à chaque instant.

Cette méthode de culture, à taux de croissance limité par la concentration du substrat carboné, permet d'abaisser le taux de croissance  $\mu^{**}$  de *B. subtilis* dans la proportion, par exemple, de 1 à 0.3.

Après avoir maintenu un taux de croissance constant pendant 7 heures, la culture contenue dans le récipient F est centrifugée (15 min à 15,000 g) et les bactéries ainsi récoltées sont spectrographiées.

5. *L'étude spectrographique* des culots bactériens à l'état réduit, dans la zone visible du spectre, est faite par la méthode précédemment décrite<sup>4</sup>. Rappelons que la méthode est basée sur le principe suivant: on photographie, successivement et dans des conditions identiques, d'une part le spectre donné par une pâte des microorganismes, et d'autre part ceux donnés par une série d'écrans neutres Wratten (Kodak) de densités connues et choisies de telle sorte qu'elles permettent de constituer une échelle de référence recouvrant l'ensemble des densités correspondant au spectre de la suspension des microorganismes. A l'aide d'un microphotomètre enregistreur de Moll (Kipp et Zonen, Delft, Hollande), on enregistre le noircissement de chacun des spectres précédents sous forme de courbes. Le noircissement du spectre de la pâte des microorganismes est traduit en densité vraie par comparaison, pour chaque longueur d'onde, du noircissement de ce spectre avec le noircissement des écrans de référence. Dans le présent travail, les pâtes bactériennes sont spectrographiées sous une épaisseur de 0.8 mm, et, dans tous les cas, après immersion dans l'azote liquide ( $t = -196^\circ$ ). A titre d'exemple la Fig. 3 donne la courbe de noircissements  $n_3$  correspondant à la courbe de densités No. 3 de la Fig. 5, et la Fig. 4 donne la courbe de noircissements  $n_{2b}$  correspondant à la courbe de densités No. 2b de la Fig. 6. La méthode permet d'apprécier d'une façon précise les densités optiques relatives des différentes composantes aa, ba, va, za, ca d'un même spectre. Mais l'irrégularité du tassement des différents culots bactériens spectrographiés rend incertaine la comparaison des densités optiques absolues des différents spectres. Autrement dit la comparaison des différents spectres obtenus n'est pas ici quantitative mais seulement qualitative. Elle permet néanmoins de classer sans hésitation les spectres suivant des types différents d'après la prédominance de telles ou telles de leurs composantes.

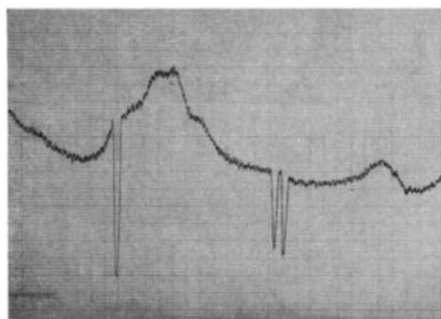


Fig. 3. Courbe de noircissements  $n_3$  ayant servi à établir le spectre 3, Fig. 5.

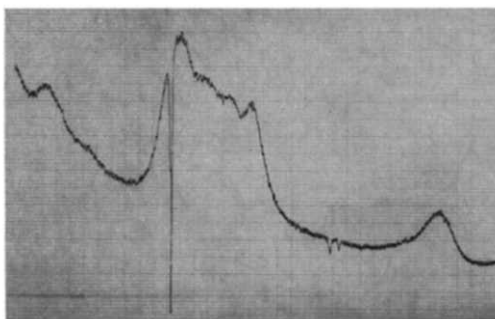


Fig. 4. Courbe de noircissements  $n_{2b}$  ayant servi à établir le spectre 2b, Fig. 6.

\* Pompe Henry et Jouvelet.

\*\* Le taux de croissance  $\mu$  est égal au nombre de divisions par heure.

## II. Résultats expérimentaux

1. *Variation du spectre en fonction de la nature du substrat carboné.* Ces premières expériences ont consisté à comparer les spectres des bactéries récoltées en phase exponentielle de croissance sur un milieu non renouvelé en fonction du substrat carboné présent dans ce milieu.

*B. subtilis* est capable de croître à partir des sources carbonées suivantes: saccharose, glucose, gluconate, fructose, ribose, glycérol, pyruvate, fumarate, succinate et citrate. Les spectres correspondants aux bactéries recueillies à partir de cultures faites en présence de ces différents substrats carbonés sont représentés dans la Fig. 5; on reconnaît sur tous la présence des bandes *aa*, *ba*, *ya*, *za* et *ca*. D'après la prédominance des bandes *ya* et *za* d'une part ou de la bande *ca* d'autre part, on peut les classer en trois groupes:

*Groupe I:* Spectres 1, 2, 3, 4, 5, 6 correspondant aux cultures sur saccharose, glucose, gluconate, fructose, glycérol et pyruvate, dont les bandes *ya* et *za* sont prépondérantes.

*Groupe II:* Spectres 9 et 10 correspondant aux cultures sur succinate et citrate, dont les bandes *ca* et *ba* sont accentuées, alors que les bandes *ya* et *za* sont à peine visibles.

*Groupe III:* Spectres correspondant aux cultures sur fumarate et ribose et qui ont un aspect intermédiaire entre ceux des spectres des groupes I et II.

Ces expériences montraient pour la première fois qu'il est possible de faire varier le spectre hématinique de *B. subtilis* (examiné en phase exponentielle de croissance) par le simple changement du substrat carboné, et *indépendamment de toute action inductive de l'oxygène*.

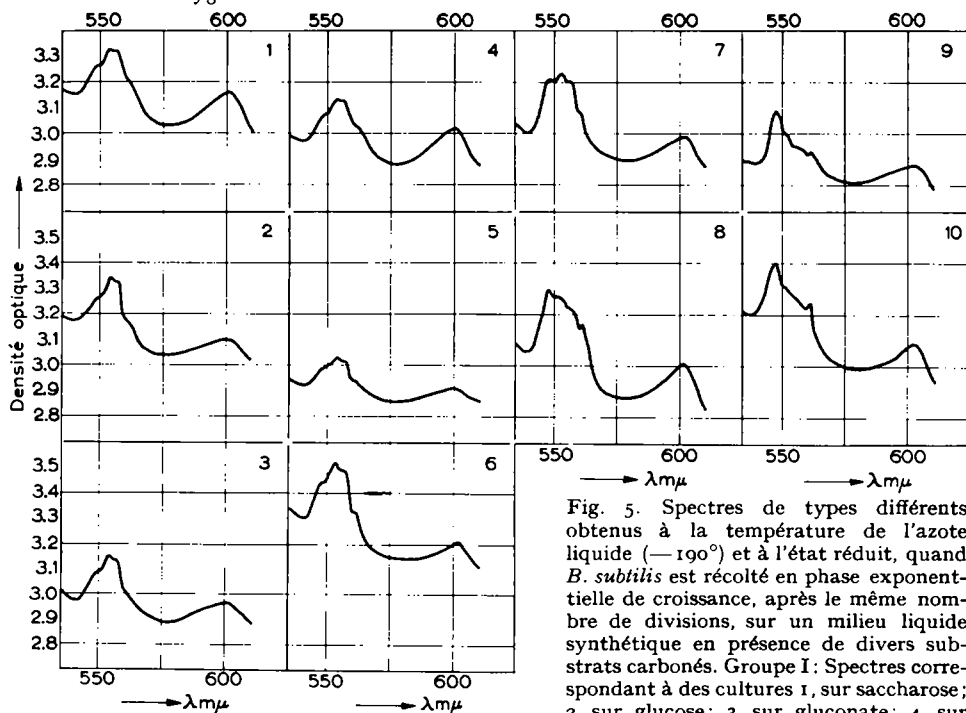


Fig. 5. Spectres de types différents obtenus à la température de l'azote liquide ( $-190^{\circ}$ ) et à l'état réduit, quand *B. subtilis* est récolté en phase exponentielle de croissance, après le même nombre de divisions, sur un milieu liquide synthétique en présence de divers substrats carbonés. Groupe I: Spectres correspondant à des cultures 1, sur saccharose; 2, sur glucose; 3, sur gluconate; 4, sur glycérol; 5, sur fructose; 6, sur pyruvate. Groupe II: Spectres correspondant à des cultures 9, sur citrate; 10, sur succinate. Groupe III: Spectres intermédiaires à ceux des groupes I et II correspondant à des cultures 7, sur fumarate; 8, sur ribose.

2. *Corrélation entre le type du spectre hématinique de B. subtilis cultivé sur différents substrats carbonés et son taux de croissance.* Mais, comme le montre le Tableau I, les spectres du groupe I correspondent à des substrats carbonés pour lesquels le taux de croissance  $\mu$  est compris entre 0.75 et 1.2; ceux du groupe II à des substrats pour lesquels le taux de croissance est de l'ordre de 0.3; et ceux du groupe III à des substrats pour lesquels le taux de croissance est compris entre 0.4 et 0.7; ceci semble indiquer une certaine corrélation entre type du spectre et taux de croissance.

TABLEAU I

COMPARAISON ENTRE LE TAUX DE CROISSANCE  $\mu$  DE *B. subtilis* CULTIVÉ SUR DIFFÉRENTS SUBSTRATS CARBONÉS ET LE TYPE DE SON SPECTRE HÉMATINIQUE

Sauf dans le cas des valeurs marquées d'un astérisque (correspondant à des cultures continues à taux de croissance limité),  $\mu$  a été mesuré pendant la phase exponentielle de cultures sur milieu non renouvelé, après le même nombre de divisions.

Substrat carboné	$\mu$	Spectres réduits examinés à $-190^{\circ}$
1. Saccharose	1.2	Groupe I
2. Glucose	1.2	
3. Gluconate	1.1	
4. Glycérol	1.0	
5. Fructose	1.0	
6. Pyruvate	0.75	Groupe III
7. Fumarate	0.65	
8. Ribose	0.5	
9. Citrate	0.34	Groupe II
10. Succinate	0.27	
2b. Glucose*	0.3*	
4b. Glycérol*	0.3*	

Remarquons que le faible taux de la croissance de *B. subtilis* cultivé sur succinate ne semble pas dépendre de phénomènes de perméabilité cellulaire. En effet des mesures de respiration effectuées sur des cellules non proliférantes obtenues à partir de cultures de 20 heures sur milieu à l'extrait de viande Liebig peptoné et gélosé<sup>2</sup> donnent des valeurs de  $Q_{O_2}$  du même ordre ( $Q_{O_2}$  voisin de 100) quand le substrat est le glucose ou le succinate; dans le cas du citrate au contraire, la respiration de base ( $Q_{O_2}$  voisin de 30) n'est pratiquement pas accélérée par l'addition de citrate, le taux de croissance faible dépend donc probablement de phénomènes de perméabilité.

Ces premiers résultats nous incitèrent à chercher s'il était possible, en utilisant un même substrat, de provoquer des variations du spectre en faisant varier le taux de croissance.

Grâce à la technique des cultures continues à taux de croissance contrôlé (bactogène)<sup>3</sup>, nous avons pu diminuer à volonté le taux de croissance, dans le cas de substrats donnant un taux de croissance élevé. Il a été ainsi possible d'obtenir sur glucose et sur glycérol des cultures continues à taux de croissance limité voisin de 0.3. La Fig. 6 donne les spectres correspondant à de telles cultures maintenues à ce faible taux de croissance pendant 7 heures. Comme à partir de ce moment là les bactéries commencent à sporuler, nous n'avons pas prolongé la durée de la culture continue.

La comparaison des spectres des bactéries cultivées sur un même substrat (glucose: spectres 2 et 2b; glycérol: spectres 4 et 4b) avec deux taux de croissance

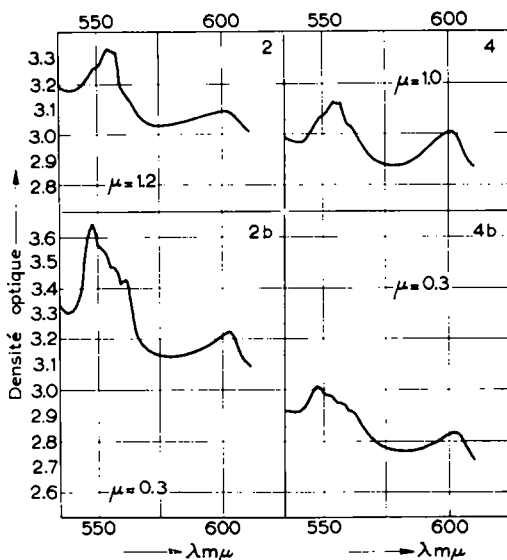
Fig. 6. Spectres de types différents obtenus à la température de l'azote liquide ( $-190^{\circ}$ ) et à l'état réduit, quand *B. subtilis* croît avec deux taux de croissance différents sur un milieu contenant un même substrat carboné: glucose (2 et 2b); glycérol (4 et 4b). Spectres correspondant à des taux de croissance élevés dans le cas de récoltes de *B. subtilis* en phase exponentielle de croissance sur un milieu non renouvelé:

2  $\rightarrow \mu = 1.2$       4  $\rightarrow \mu = 1.0$

Spectres correspondant à des taux de croissance faibles dans le cas de récoltes à partir de cultures continues à taux de croissance limité:

2b  $\rightarrow \mu = 0.3$       4b\*  $\rightarrow \mu = 0.3$

\*Ce spectre correspond à une préparation bactérienne spectrographiée sous une épaisseur de 0.5 mm.



différents, montre que la variation du taux de croissance est associée à une modification profonde du spectre hématinique qui passe de la forme des spectres du groupe I pour un taux de croissance élevé à la forme des spectres du groupe II pour les taux de croissance bas.

L'ensemble de nos expériences sur *B. subtilis* confirme la notion de variabilité du spectre hématinique d'un même microorganisme, et met pour la première fois en évidence que cette possibilité est sous la dépendance du taux de croissance.

La signification de cette corrélation entre spectre et taux de croissance reste encore obscure. En particulier, la question se pose de savoir si les composantes  $\gamma a$  et  $z a$ , prépondérantes quand le taux de croissance est élevé, sont des précurseurs des cytochromes *b* ou *c*, ou s'il s'agit de substances fonctionnelles intervenant dans les réactions de synthèse associées à la croissance bactérienne.

## RÉSUMÉ

Il est possible de faire varier la constitution du spectre hématinique de *B. subtilis* (analysé en phase exponentielle de croissance sur milieu synthétique) par simple variation du taux de croissance.

## SUMMARY

It is possible to obtain a modification of the hematin compounds absorption spectrum of *B. subtilis* (studied during the exponential growth phase in a synthetic medium) by simple variation of the growth rate.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> P. CHAIX ET G. RONCOLI, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 268.
- <sup>2</sup> P. CHAIX ET J. F. PETIT, *Biochim. Biophys. Acta*, 22 (1956) 66.
- <sup>3</sup> J. MONOD, *Ann. inst. Pasteur*, 79 (1950) 390.
- <sup>4</sup> P. CHAIX ET CL. FROMAGEOT, *Bull. soc. chim. biol.*, 24 (1942) 1259.

Reçu le 13 avril 1957