

calcium est beaucoup plus forte en présence de glycérophosphates que de phosphates. Il en découle que la mise en liberté d'ions phosphoriques au niveau des territoires où évolue la calcification provoque vers ceux-ci un véritable drainage des ions calcium présents dans les humeurs. Dès lors le rôle physiologique de l'enzyme apparaît comme celui d'un agent de concentration locale en ions phosphoriques dans les os, concentration grâce à laquelle s'opère un appel des ions calcium des humeurs et, secondairement, la précipitation d'un phosphate de calcium insoluble, régie par le produit de solubilité de ces ions.

Ce rapide exposé montre la diversité des domaines auxquels s'étend la biochimie des phosphatases et les nombreux problèmes que pose son étude. La description des systèmes phosphatasiques naturels est aujourd'hui très avancée, mais la connaissance des phosphatases en tant que molécules chimiquement définies est à peine ébauchée. C'est dire quelle importance revêt la préparation de phosphatases pures, qui doit être le plus immédiat des buts qu'il convient de chercher à atteindre. Mais l'étude du mécanisme d'action des phosphatases dans de nombreux processus physiologiques conserve aussi un grand intérêt, car elle permettra sans doute d'expliquer les modalités de la formation des phosphates au niveau du rein, de la glande mammaire, et celles de nombreuses réactions phosphorylantes indépendantes de processus couplés (transphosphorylation, actions de la phosphorylase, de la myokinase). Aussi la biochimie des phosphatases se développe-t-elle sans cesse, offrant à la sagacité des chercheurs un champ d'action vaste et fécond.

Laboratoire de Chimie biologique, Faculté de Médecine
et de Pharmacie, 92, Rue Auguste Blanqui, Marseille.

155. Etude sur le potentiel d'oxydo-réduction.

Limite de croissance des bactéries anaérobies

par E. Aubel, A. J. Rosenberg et M. Grünberg.

(25 V 46)

Il a été montré dans une série de travaux¹⁾ sur *Clostridium Saccharobutyricum* et *Clostridium Sporogenes*, qui sont des anaérobies stricts, que l'oxygène n'entrave pas la dégradation des métabolites, donc que la libération de l'énergie nécessaire à l'entretien de la

¹⁾ E. Aubel et J. Houget, C. r. **209**, 259 (1939), et Rev. Canadienne de Biol. **4**, 488 (1945); E. Aubel et E. Perdigon, C. r. **211**, 439 (1940), et Rev. Canadienne de Biol. **4**, 498 (1945); E. Aubel, A. Rosenberg et N. de Chezelles, Bl. Soc. Chim. biol. (trav.) **25**, 1152 (1943), et Rev. Canadienne de Biol. **4**, 502 (1945).

vie du microbe et à sa croissance se produit normalement, même à l'air, et que, par contre, ce même oxygène, en se fixant sur l'hydrogène et d'autres métabolites nécessaires aux synthèses, interdit celles-ci. Par suite, l'oxygène s'oppose à la croissance. Dans les mêmes travaux il avait été dit, à titre d'hypothèse, que, comme les bactéries étudiées sont mal tamponnées au point de vue oxydo-réduction, dès que la vitesse de production de l'hydrogène est inférieure à la vitesse d'arrivée de l'oxygène, d'une part certaines diastases sont partiellement détruites, d'autre part les tampons d'oxydo-réduction sont forcés et les conditions du milieu cellulaire deviennent incompatibles avec les synthèses.

Nous avons donc été amenés à reconsidérer la question du potentiel d'oxydo-réduction limite le plus élevé, compatible avec la croissance des anaérobies. L'idée généralement admise est que, pour leur développement, les anaérobies exigent un potentiel d'oxydo-réduction bas et que l'oxygène s'oppose à un abaissement convenable du potentiel d'oxydo-réduction du milieu. Ce point de vue, qui a été exposé par *Quastel* et *Stephenson*¹⁾ puis par *Aubel* et *Aubertin*²⁾, trouvait un appui dans les recherches de *Clark*³⁾ et ses collaborateurs, qui avaient montré que les cellules vivant en anaérobiose développent un potentiel d'oxydo-réduction plus négatif qu'en aérobiose.

Ceci a conduit à de nombreuses études sur l'importance du potentiel d'oxydo-réduction du milieu dans la croissance des anaérobies (*Coulter*⁴⁾, *Dubos*⁵⁾, *Aubel*, *Aubertin* et *Genevois*⁶⁾, *Plotz* et *Geloso*⁷⁾, *Fildes*⁸⁾, *Knight* et *Fildes*⁹⁾, *Prevost*¹⁰⁾, *Kliger* et *Guggenheim*¹¹⁾, *Vennesland* et *Hanke*¹²⁾, *Kanel*¹³⁾, *Hanke* et *Katz*¹⁴⁾), mais la signification réelle et l'importance de la valeur mesurée restent obscures. C'est d'ailleurs la conclusion qui ressort des travaux de *Broh-Kahn* et *Mirsky*¹⁵⁾ et de *Knaysi* et *Dutky*¹⁶⁾.

Ceci nous a incité à faire les expériences dont nous allons donner les résultats.

1) *Quastel* et *Stephenson*, *Biochem. J.* **20**, 1125 (1926).

2) *Aubel* et *Aubertin*, *C. r. Soc. Biol.* **97**, 1729 (1927).

3) *Clark*, *J. Wash. Ac. Sc.* **14**, 123 (1924).

4) *Coulter*, *J. Gén. Phys.* **12**, 139 (1928).

5) *Dubos*, *J. Exp. Med.* **49**, 559 (1929).

6) *Aubel*, *Aubertin* et *Genevois*, *Ann. Phys. et Phys.-Chim. Biol.* **5**, 1 (1929).

7) *Plotz* et *Geloso*, *Ann. Inst. Pasteur* **45**, 613 (1930).

8) *Fildes*, *Brit. J. Path. Bact.* **10**, 151 (1929).

9) *Knight* et *Fildes*, *Biochem. J.* **24**, 1496 (1930).

10) *Prevost*, *Bl. Soc. Phil.* **121**, 80 (1938).

11) *Kliger* et *Guggenheim*, *J. Bact.* **35**, 141 (1938).

12) *Vennesland* et *Hanke*, *J. Bact.* **39**, 139 (1940).

13) *Kanel*, *Microb.* **6**, 254 (1937). Tirage 2.

14) *Hanke* et *Katz*, *Arch. Bioch.* **2**, 185 (1943).

15) *Broh-Kahn* et *Mirsky*, *J. Bact.* **35**, 455 (1938).

16) *Knaysi* et *Dutky*, *J. Bact.* **31**, 137 (1936).

Partie technique et résultats.

Le milieu de culture employé était celui de *Weinberg-Prevost*. On mélange 3 kg $\frac{1}{2}$ de viande hachée et 1 kg $\frac{1}{2}$ de foie haché, que l'on verse dans 16 litres d'eau à 53°. Le milieu prend alors une température de 48° environ. On ajoute 150 cm³ d'HCl concentré et 10 g de pepsine 500 V.P. On laisse le mélange 20 heures à l'étuve à 48°. Après ce séjour, on chauffe 20 minutes à 90° le mélange et l'on filtre. On répartit dans les ballons ou les tubes et l'on stérilise. Ne pas dépasser 110° lors de la stérilisation. Pour les cultures de *Clostridium Saccharobutyricum*, on ajoute au milieu précédent $\frac{5}{60}$ d'extrait de pomme de terre obtenu en faisant bouillir 20 minutes 400 g de pommes de terre coupées en morceaux avec un litre d'eau. Centrifuger, puis filtrer le liquide auquel on a ajouté du talc. Les cultures de *Cl. Sporogenes* se font à p_H 7,4, celles de *Cl. Saccharobutyricum* à p_H 6,8¹⁾.

Dans les expériences faites en tubes de gélose, on répartit 9 cm³ de milieu solidifié avec 2% de gélose dans des tubes de 18 cm de long et 1 cm. de diamètre.

I. EXPÉRIENCES FAITES AVEC DES COLORANTS.

1° *Expériences faites sur milieu solidifié par la gélose.*

Avant stérilisation, on ajoute 1 cm³ de colorant 0,0005 M. L'ensemencement est fait de façon à avoir des colonies nombreuses, mais séparées. On conserve deux tubes témoins, non ensemencés, pour chaque colorant. Les colorants utilisés sont:

Bleu de méthylène	. $E'_0 p_H$	7 = + 0,011 v.
Indigo tétrasulfonate	. $E'_0 p_H$	7 = - 0,046 v.
Indigo trisulfonate	. $E'_0 p_H$	7 = - 0,081 v.

L'évolution de la coloration des tubes témoins se fait de la façon suivante: aussitôt après la stérilisation, alors que le milieu est totalement désaéré, les tubes sont entièrement décolorés, puis, lorsque l'on abandonne les tubes refroidis à l'air, on observe, après 24 heures, à la partie supérieure des tubes, une zone fortement colorée. En dessous de cette zone, le bleu de méthylène est complètement décoloré, les indigos recolorés, le tétrasulfonate partiellement, le trisulfonate presque complètement. Ainsi donc, après la stérilisation, lorsque le milieu s'est trouvé ainsi désaéré, le potentiel du milieu est inférieur à $E'_0 = -0,081$ v à p_H 7, puis, lorsque la recoloration s'est produite, donc après la diffusion de l'oxygène, environ 24 heures après le refroidissement, le potentiel du milieu est compris entre $E'_0 = -0,046$ v et $E'_0 = -0,081$ v à p_H 7.

Dans les tubes ensemencés voici ce que l'on observe:

a) avec *Cl. Sporogenes* — 24 heures après l'ensemencement, l'aspect des tubes ensemencés, comparés aux tubes témoins, est semblable: un anneau coloré fortement à la surface, de même hauteur, puis une zone complètement décolorée en ce qui concerne le bleu, partiellement recolorée en ce qui concerne les indigos. Si l'on a eu soin d'ensemencer comme il a été dit, on observe à la limite inférieure des anneaux fortement colorés, des colonies, petites, dans les trois colorants. Si l'ensemencement a été fait de façon à avoir des colonies confluentes, les anneaux superficiels sont plus ou moins décolorés et des colonies se voient près de la surface.

48 heures après l'ensemencement, l'anneau coloré se décolore partiellement ou totalement, et dans la partie décolorée se développent alors de nouvelles colonies.

Exceptionnellement il arrive que l'on observe de très rares colonies dans la partie colorée du bleu de méthylène et des indigos. Ces colonies, très rares, demeurent petites, et ne grossissent que lorsque la décoloration envahit la zone colorée.

La décoloration de la zone supérieure est due certainement à des substances réductrices sécrétées par les bactéries, car les témoins présentent, au contraire, une recoloration importante due à la diffusion de l'oxygène, et, en outre, dans les tubes ensemencés, alors

¹⁾ Les souches provenaient de la collection de Monsieur *Prevost* que nous tenons à remercier ici.

que la zone supérieure n'est pas encore décolorée, on voit apparaître dans cette zone de petites bulles gazeuses.

b) avec Cl. Saccharobutyricum — les résultats observés sont comparables à ceux obtenus avec Cl. Sporogenes. Là encore, il a été possible d'observer une décoloration des zones superficielles précédant l'apparition des colonies, et aussi la présence exceptionnelle de très rares colonies dans la zone superficielle colorée. Ceci nous a incité à expérimenter avec un colorant supplémentaire, le 1-naphtol-2-Na-sulfonate-indo-2,6-dichlorophénol de $E_0' = +0,123$ v à p_H 7. Même dans ce colorant, à 4 mm de la surface, on a vu une petite colonie. Repiquée, cette colonie s'est parfaitement développée en anaérobiose. Il s'agissait bien, ainsi que nous nous en sommes assurés, de Cl. Saccharobutyricum, poussant à un potentiel de l'ordre de $E_0' = +0,123$ v p_H 7.

De l'ensemble de ces résultats, on peut conclure que les anaérobies produisent dans le milieu de culture des substances réductrices en quantité telle qu'elles s'opposent non seulement à la recoloration du leucodérivé par l'oxygène, mais encore décolorent les colorants en présence d'oxygène, et ceci de telle manière que les bactéries peuvent ensuite pousser abondamment. En outre, il y a parmi les bactéries ensemencées un certain nombre de bactéries mieux adaptées à lutter contre l'oxygène, ce qui leur permet de se développer dans un milieu de potentiel $E_0' = +0,123$ v p_H 7. Mais il s'agit là de cas exceptionnels, et il ne faut pas, en outre, oublier qu'au moment de l'ensemencement, le potentiel du milieu est tel que les colorants réduits lors de la stérilisation ne sont pas encore recolorés.

2° Influence de la concentration en bactéries sur la vitesse de décoloration des divers colorants à potentiel d'oxydo-réduction défini.

On partait pour ces expériences de cultures de 16 heures. Les bactéries, après séparation du milieu de culture par centrifugation à l'abri de l'air, sont lavées deux fois avec une solution de NaCl à 90/00 stérile et privée d'air. Après le deuxième lavage, elles sont diluées dans un tampon de phosphate stérile à p_H 7, de façon à avoir des concentrations 1, $1/4$, $1/8$, $1/16$. On prélève ensuite stérilement 8 cm³ de chaque suspension que l'on met dans des tubes à essais stériles, on ajoute dans chaque tube 0 cm³, 4 de colorant 0,0005 M et 1 cm³ de substrat, de façon à avoir une concentration en substrat (alanine pour Cl. Sporogenes, glucose pour Cl. Saccharobutyricum) de 0,2%. On agite le mélange et l'on note la vitesse de décoloration à l'air, à 37°. Alors que, pratiquement, les témoins sans substrat restent colorés, voici les temps de décoloration que l'on observe dans des expériences faites avec Cl. Sporogenes:

Colorant E_0' p_H 7	Dilutions			
	1	$1/4$	$1/8$	$1/16$
Bleu de méthylène +0,011 v	Décoloration immédiate	20 min.	Pas de décoloration	Pas de décoloration
Indigo tétrasulfonate -0,046 v		40 min.		
Indigo trisulfonate -0,081 v		50 min.		
Indigo disulfonate -0,125 v		50 min.		
Violet de crésyle -0,167 v		Pas		
Phénosafranine -0,252 v		décoloré		

Les bactéries, on le voit, sont donc, en présence d'air, capables de se défendre contre l'oxygène en dégageant des substances réductrices, celles-ci étant en quantité d'autant plus grande que les bactéries sont plus nombreuses.

Avec le Cl. Saccharobutyricum on obtient des résultats comparables.

II. EXPÉRIENCES FAITES AVEC LA MÉTHODE ÉLECTROMÉTRIQUE.

Les expériences ont été faites uniquement avec *Cl. Saccharobutyricum* cultivé dans le milieu *Weinberg-Prévost* + extrait de pomme de terre, comme il a déjà été dit. La technique adoptée était celle de *Hewitt*¹⁾ qui consiste à envoyer dans le milieu de culture un courant d'un mélange azote + air dont la vitesse est réglée de façon à obtenir un potentiel déterminé. La valeur de ce potentiel est donnée par la méthode électrométrique classique. La croissance des bactéries est suivie par la mesure de l'opacité du milieu au moyen de l'électrophotomètre de *Meunier*. Le volume du liquide de culture était de 35 cm³.

Pour chaque expérience, les lectures étaient faites en double; deux électrodes plongeant dans le milieu de culture. Il n'est, en général, pas possible d'obtenir les mêmes chiffres, les différences dans les résultats donnés par les deux électrodes s'écartant l'un de l'autre d'une dizaine de millivolts. Nous avons pris la moyenne des chiffres donnés par les deux électrodes. Il arrive aussi parfois, avec le milieu employé, que les électrodes de platine, bien qu'elles ne présentent pas de fissure, donnent, soit toutes les deux, soit une seule, des indications manifestement fausses. Elles sont alors empoisonnées. Ceci se passe dans les milieux préparés depuis assez longtemps. Dans ce cas, il suffit d'ajouter au milieu de la poudre de zinc et de faire passer pendant 45 minutes un courant d'air. Après séparation du zinc, on stérilise une première fois; il se forme un précipité que l'on filtre, et on stérilise une seconde fois le milieu qui demeure clair. Les électrodes donnent alors des indications exactes.

L'ensemencement se fait avec des bactéries provenant de cultures de 18 heures. La quantité de semence est de 1 à 3 cm³, ceci afin de diminuer la phase d'induction et avoir une croissance qui dure 7 à 8 heures.

1^o Evolution du potentiel dans l'azote pur.

Les expériences ont été faites, soit dans le milieu tel quel, soit dans le milieu renfermant 0,001% de colorant universel de *Kluyver*²⁾ constitué par un mélange de bleu de Nil, bleu d'alizarine, Phénosafranine, Vert Janus et Rouge neutre (bio-catalyseur).

a) Expériences sans bio-catalyseur. — Le milieu non ensemencé, désaéré par ébullition et par passage d'azote pur pendant $\frac{1}{4}$ d'heure, possède un potentiel mal défini, variant de +0,236 à 0 volt, suivant le temps écoulé après la sortie de l'autoclave et le passage d'azote. Dans nos expériences il était le plus souvent de l'ordre de +0,145 v p_H 6,6.

Ensemencé avec 2 cm³ de bactéries prises pendant la phase logarithmique de croissance, on observe immédiatement une baisse brusque de potentiel qui descend jusqu'à +0,016 et même -0,034 v p_H 6,6, puis au bout d'une dizaine de minutes le potentiel remonte, pour redescendre brusquement, 2 ou 3 heures après, pendant la phase d'induction avant que la phase logarithmique de la croissance commence, et 4 à 5 heures après, on obtient la valeur minimum qui peut atteindre E_h = -0,274 v p_H 5. Il faut noter que le p_H évolue au cours de la croissance. Le bouillon est à p_H 6,8, au moment de l'ensemencement le p_H tombe à 6,5, puis descend et se stabilise à la fin à p_H 5. On constate, au cours de la baisse de potentiel, un point d'inflexion vers E_h = -0,050 v. Malheureusement, nous n'avons pas la valeur du p_H à ce point, mais il doit être de l'ordre de 6,2.

La figure 1 donne deux exemples de l'évolution du potentiel dans l'azote pur en fonction du temps et du développement des bactéries.

b) Expériences avec bio-catalyseur. — Le potentiel obtenu est plus stable, il atteint une valeur plus basse que ci-dessus, mais du même ordre de grandeur. En outre, si l'on ajoute le biocatalyseur au moment où le potentiel est de l'ordre de -0,100 v, on observe une remontée du potentiel à une valeur voisine de -0,050 v.

1) *Hewitt*, *Biochem. J.* **24**, 512 (1930).

2) *Kluyver*, *Enzymol.* **1**, 1 (1936).

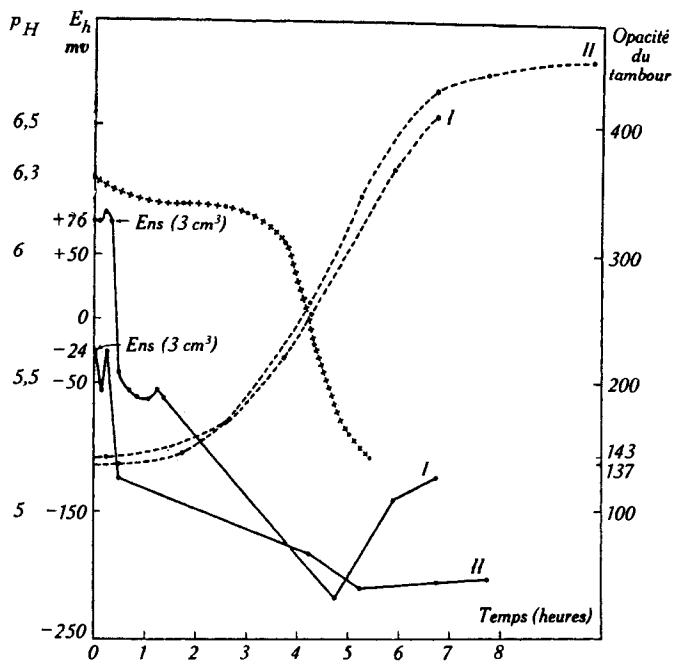
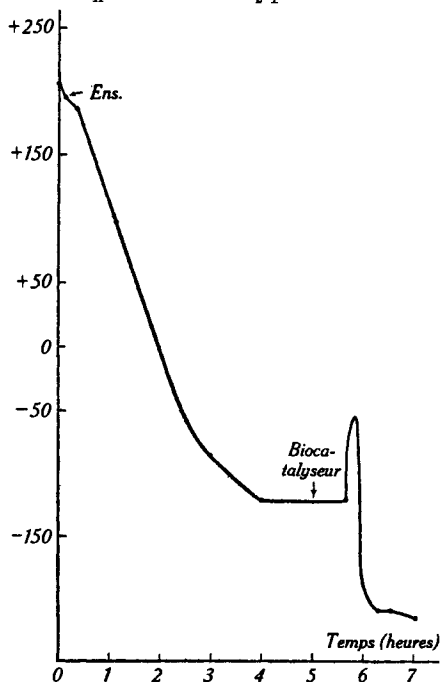


Fig. 1.

+++++ Evolution du p_H . ----- Courbe de croissance.
 — Evolution du E_h en mv dans N_2 pur ensemencé 3 cm³ bactéries.

Fig. 2. Evolution du E_h dans un milieu + Biocatalyseur en fonction du temps.

2° Essais de stabilisation du potentiel à des niveaux différents.

Les expériences ont été faites en envoyant, aussitôt après l'ensemencement (2 cm^3 dans 35 cm^3 de milieu), un mélange en proportions variables d'azote et d'oxygène. Un mélange à 7% d'oxygène donne un potentiel se stabilisant à $E_h = +0,219 \text{ v p}_H 6,8$. Il n'y a pas de croissance. Avec 3,5% d'oxygène, on a une stabilisation à $E_h = +0,156 \text{ v p}_H 6,8$. Il n'y a pas de croissance. Avec 1,4% d'oxygène, on a une stabilisation à $E_h = +0,116 \text{ v p}_H 6,8$, et on observe la croissance des bactéries. Dès que cette croissance est commencée, le potentiel s'abaisse et atteint rapidement $E_h = -0,224 \text{ v p}_H 5,2$. A ce moment, les bactéries supportent un taux d'oxygène plus élevé (Figure 3).

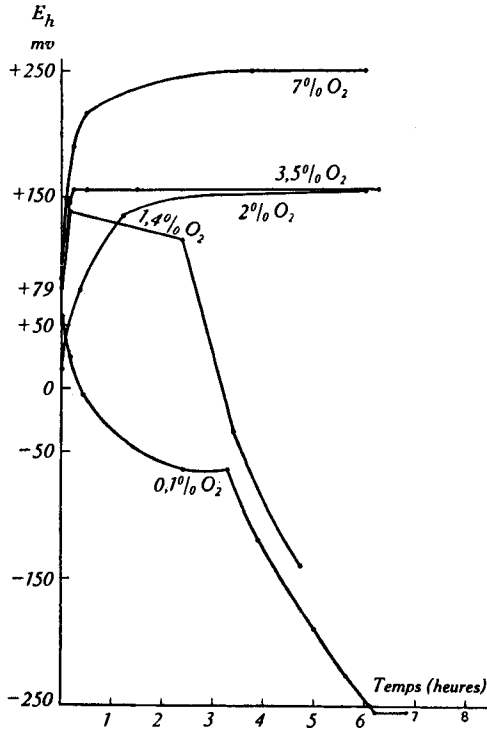


Fig. 3.

Evolution du E_h après ensemencement avec différentes quantités d' O_2 dans N_2 pur.

3° Potentiel d'arrêt en fonction de la quantité de bactéries.

Les expériences ont été conduites de la façon suivante: onensemence 35 cm^3 du milieu avec 2 cm^3 de culture, puis on fait passer l'azote pur. On suit alors la croissance à l'électrophotomètre, puis, à différents stades de la croissance, durant la phase logarithmique, on envoie un mélange air + azote, dont on règle l'arrivée de façon à bloquer le développement. On mesure alors le potentiel correspondant à cet arrêt de la croissance. La détermination de ce potentiel est assez délicate. Il est en effet impossible de saisir de façon précise le moment exact où cesse la croissance. Le mieux est de déterminer la valeur du potentiel pour lequel la croissance est très ralentie, et la valeur du potentiel pour lequel il n'y a nettement plus de croissance, et de prendre la moyenne entre ces deux valeurs (ce sont ces deux valeurs qui sont réunies par une droite horizontale dans la courbe de la figure 4), les déterminations se faisant à 5 minutes d'intervalle. Il est possible ainsi

de déterminer la courbe représentant le potentiel d'arrêt en fonction de la quantité de bactéries. On voit qu'il est d'autant plus élevé que la quantité de bactéries est plus grande (figure 4, courbe N° 1), les variations étant de $E_h = +0,130$ v à p_H 6,3 à $E_h = +0,180$ a p_H 6,2.

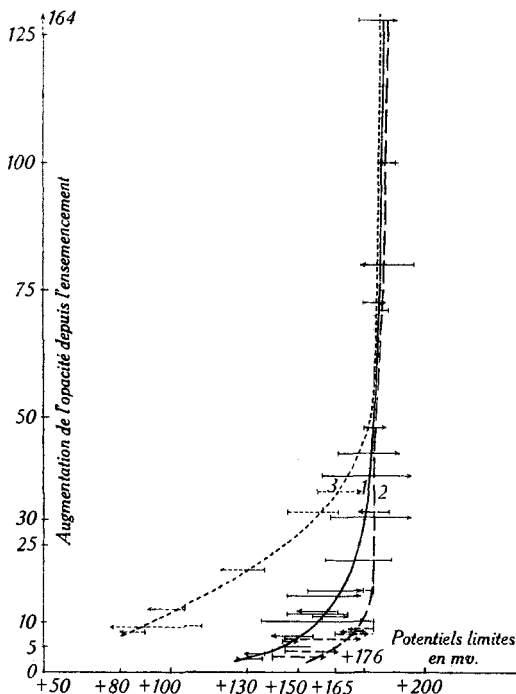


Fig. 4.

- | | | | |
|-------|----|---|------------------------|
| — | 1) | Potentiels limites des Bactéries normales | en fonction du nombre. |
| - - - | 2) | » » » » + 5 cm ³ d'extrait | » » » » |
| · · · | 3) | » » » » centrifugées | » » » » |

4° Influence des produits sécrétés par les bactéries sur la valeur du potentiel d'arrêt.

Nous avons remarqué qu'au moment de l'ensemencement, il y avait une baisse de potentiel d'autant plus grande que les bactéries étaient plus jeunes. La question se posait de savoir si les substances réductrices apportées avec la semence ne seraient pas responsables de cette baisse brusque, et d'ailleurs temporaire. Dans les premières expériences destinées à résoudre cette question, nous centrifugions les cultures, ou les filtrions sur bougie *Chamberlan*, sans autre précaution. Dans ces conditions, le liquide privé de cellules n'avait aucun effet sur le potentiel. Nous avons alors centrifugé les bactéries dans un milieu privé d'oxygène, c'est-à-dire simplement dans le tube où elles ont poussé, puis ouvert avec précaution ce tube et prélevé le liquide immédiatement. 5 cm³ d'extrait faisaient alors passer brusquement le potentiel de $E_h = +0,100$ v p_H 6,4 à $E_h = -0,074$ v p_H 6,4. Cet extrait est très sensible à l'action de l'oxygène: le simple fait de l'agiter à l'air, avant de l'ajouter au milieu, l'oxyde, et on ne constate plus aucune baisse de potentiel. On ne peut l'obtenir que dans des cultures jeunes, de 4 ou 5 heures, et le plus actif se rencontre dans les cultures arrivées à la dernière partie de la phase logarithmique, juste avant la phase d'accélération négative.

L'influence de l'extrait sur le potentiel est nette. Si l'on ajoute, au moment où dans les expériences du paragraphe 3 on envoie le mélange gazeux destiné à arrêter la croissance, 5 cm³ d'extrait, on s'aperçoit que les bactéries peuvent se développer pour un même nombre de bactéries et un même p_H à un potentiel plus élevé que dans les expériences où l'on n'ajoute pas d'extrait. La courbe N° 2 de la figure 4, qui traduit les résultats expérimentaux, montre que cette influence de l'extrait est d'autant plus considérable que la quantité de bactéries est moins élevée, et qu'il n'a plus d'action si le nombre de bactéries est suffisant, vraisemblablement parce que ces bactéries, en poussant, ont elles-mêmes formé dans le milieu de culture une quantité suffisante de la ou des substances actives.

Cet extrait active la croissance des bactéries et peut diminuer la durée de la phase stationnaire et de la phase d'induction.

5° *Potentiel d'arrêt obtenu avec les bactéries séparées du milieu ou elles ont poussé.*

Le culot de centrifugation d'une culture dans le vide est mis en suspension dans un milieu de culture stérile, désaéré, en volume égal à celui de la culture primitive. 2 cm³ de la suspension de bactéries ainsi obtenue servent à ensemercer 35 cm³ du milieu d'expérience. On n'observe jamais, au moment de l'ensemencement, la baisse de potentiel décrite précédemment qui doit donc être attribuée, uniquement, aux substances formées par les bactéries en croissance. D'autre part, le départ de la croissance dans le milieu est retardé. En outre, lorsque l'on détermine le potentiel d'arrêt comme précédemment, on constate qu'il est, pour une même quantité de bactéries et un même p_H , décalé vers des potentiels moins élevés (courbe N° 3, figure 4).

DISCUSSION

Tout d'abord une remarque s'impose, sur laquelle *Broh-Kahn* et *Mirsky*¹ ont insisté: le fait, signalé par *Michaelis*, que l'introduction d'une électrode de platine brillant dans un milieu de culture, en présence d'oxygène, introduit des conditions nouvelles qui aboutissent à une élévation du potentiel. Par suite, on peut se poser la question de savoir quelle est la valeur du potentiel en l'absence d'électrode.

Quant à l'introduction de colorants, en présence d'oxygène, elle peut également amener des perturbations. Ces colorants, en effet, constituent des transporteurs d'hydrogène, ils catalysent les déshydrogénations et favorisent la fixation de l'hydrogène sur l'oxygène. On détermine alors, par le procédé des colorants, un potentiel d'arrêt différent de celui qui existe sans colorant.

D'autre part, il faut aussi considérer que ce que l'on mesure est un potentiel extérieur à la cellule bactérienne, et jusqu'ici nous n'avons aucune indication en ce qui concerne le potentiel à l'intérieur même de ces cellules.

Dans plusieurs travaux, des essais ont été tentés pour tamponner, en milieu anaérobie, à un potentiel déterminé, des milieux. En particulier dans le travail de *Plotz* et *Gélosio*²) sur le bacille tétanique, on employait le bleu de crésyle $E_0' = +0,032$ v à p_H 7, et l'on observait une croissance, d'où la conclusion que le bacille poussait à $E_0' = +0,032$ v p_H 7, le colorant ayant été mis en quantité telle qu'il n'était pas décoloré. Dans les expériences de *Knaysi* et *Dutky*³) on ajoutait de l'hexacyanoferrate(III) de potassium

¹) *Broh-Kahn* et *Mirsky*, *J. Bact.* **35**, 455 (1938).

²) *Plotz* et *Gélosio*. *Ann. Inst. Pasteur* **45**, 613 (1930).

³) *Knaysi* et *Dutky*, *J. Bact.* **31**, 137 (1936).

aux concentrations de 0,0025 M, 0,001 M et 0,005 M, on ensemençait avec 0 cm³, 1 de culture 20 cm³ de milieu, et l'on faisait le vide. On avait donc un potentiel de +0,380 v p_H 7 et la croissance avait lieu. Mais dans ce cas, l'hexacyanoferrate(III) était réduit dès le début de la croissance, et le potentiel descendait rapidement à des valeurs négatives. Mais ce que les auteurs ont observé, et qui concerne le milieu extérieur, est-il valable pour la bactérie elle-même, et peut-il être comparé avec ce que l'on observe pour l'oxygène? L'oxygène, en effet, doit avoir la possibilité de pénétrer à l'intérieur des bactéries, le bleu de crésyle et l'hexacyanoferrate(III) ont-ils la même propriété? On sait déjà, d'après Guillermond¹⁾, que pour la levure le bleu de crésyle se comporte ainsi: pour les p_H supérieurs à 5,4—5,6, le colorant s'accumule dans les vacuoles, pour les p_H inférieurs à 5,4—5,6, il n'y a presque pas de colorant absorbé. Or, nous avons constaté, dans nos expériences avec une culture de 24 heures de *Cl. Saccharobutyricum*, que lors de l'ensemencement en masse (5 cm³ pour 30 cm³), le p_H du milieu prenait une valeur de 5,5 environ, pour s'abaisser, dès la croissance, à 5,2. Il est donc peu probable qu'une quantité importante de bleu de crésyle ait pénétré dans les bactéries. Nous avons essayé de pousser plus loin nos recherches dans ce sens. On ensemençait des tubes contenant 1%, 1,6%, 2% de bleu de crésyle, ces concentrations fortes étant nécessaires pour que les tubes ne soient pas décolorés, et l'on ensemençait 5 cm³ du milieu coloré avec 0 cm³, 5 de *Cl. Saccharobutyricum* très actif. 24 heures après, les bactéries ayant poussé, les tubes à 1,6% et 2% ne sont pas décolorés. On centrifuge alors, et on lave les bactéries avec une solution neutre de NaCl à 90/00. Malheureusement, pendant la croissance, le colorant précipite et agglutine les microbes. Il faut donc ensuite filtrer à travers un papier filtre pour séparer les bactéries non fixées sur les parcelles de colorant. Elles sont peu nombreuses, mais incolores après lavage. Il semblerait donc que tout au plus le colorant se fixe à l'extérieur des clostridies et ne pénètre pas à l'intérieur de celles-ci. Les mêmes expériences ont été faites avec l'hexacyanoferrate(III). Ici, l'hexacyanoferrate(III) a été, dans les tubes où les cultures furent positives, réduit en hexacyanoferrate(II). Les bactéries, centrifugées et lavées, n'ont pas donné la réaction du bleu de prusse, alors que les substances organiques inertes du bouillon étaient nettement colorées en bleu. L'hexacyanoferrate(II) n'a donc pas pénétré dans les cellules. Il est donc raisonnable de penser que l'on ne peut tirer aucune conclusion des mesures effectuées soit à l'aide d'électrodes, soit à l'aide des colorants, en ce qui concerne le potentiel d'oxydo-réduction à l'intérieur des cellules et des variations qu'il peut subir.

Ces réserves faites, il reste, d'une part, que si on envoie, immédiatement après l'ensemencement, un courant d'oxygène, le potentiel limite supérieur permettant la croissance des bactéries est de E_h = +0,116 v à p_H 6,8 environ, valeur analogue à celle trouvée déjà par d'autres auteurs (*Fildes*²⁾, *Knight et Fildes*³⁾, *Kliger et Guggenheim*⁴⁾, *Vennesland et Hanke*⁵⁾, *Hanke et Katz*⁶⁾). Cette valeur se retrouve dans nos expériences en milieu solide renfermant le 1-naphtol-2-sulfonate-indo-2,6-dichlorophénol, où nous avons eu une colonie à E₀' = +0,123 v à p_H 7; d'autre part, qu'un point d'inflexion se rencontre à -0,050 v, et qui est de l'ordre du potentiel d'arrêt signalé autrefois par *Aubel et Aubertin*⁷⁾ -0,060 v p_H 7. Il s'agissait alors d'expériences faites en milieu solide, en présence de colorants, dans des tubes ne renfermant que 4 ou 5 colonies, alors que les expériences faites dans le présent mémoire et qui donnent une valeur limite de +0,123 v p_H 7 renfermaient un très grand nombre de colonies, non confluentes pourtant. Cette différence dans la quantité de colonies explique la contradiction apparente des valeurs du potentiel d'arrêt, nous

1) *Guillermond*, Ann. Ferm. **5**, 449 (1939).

2) *Fildes*, Brit. J. Path. Bact. **10**, 151 (1929).

3) *Knight et Fildes*, Biochem. J. **24**, 1496 (1930).

4) *Kliger et Guggenheim*, J. Bact. **35**, 141 (1938).

5) *Vennesland et Hanke*, J. Bact. **39**, 139 (1940).

6) *Hanke et Katz*, Arch. Bioch. **2**, 185 (1943).

7) *Aubel et Aubertin*, C. r. Soc. Biol. **97**, 1729 (1927).

le verrons plus loin, et nous retiendrons que, aussi bien par la méthode électrométrique que par la méthode des colorants, on met, dans le milieu où croissent les bactéries, en évidence l'existence d'un système à $E_h = -0,050$ v à $-0,060$ v. Ce système, si le p_H , comme cela est possible, est de l'ordre de 6—6,5, serait à rapprocher de celui que *Wurmser* et *Filitti*¹⁾ ont signalé dans le suc de *Lebedew* et qui, dans ce dernier cas, est la protéoflavine.

Revenons maintenant à la valeur $E_h = +0,116$ v à $+0,123$ v p_H 7 environ. Elle a été établie, nous l'avons vu, en envoyant l'oxygène dans le milieu, dès l'ensemencement (ou, ce qui revient au même, en ensemençant en milieu solide, en présence d'un colorant et d'oxygène diffusant dans la gélose). C'est une valeur obtenue avec des bactéries qui, aussi bien dans nos expériences que dans celles des autres auteurs, sont dans la phase non proliférante, apportant avec elles des substances réductrices sécrétées dans le milieu où elles ont poussé. Il faut vraisemblablement d'ailleurs une quantité minimum de cellules qui n'a pas été déterminée pour avoir, dans les conditions expérimentales, une culture positive. A ce sujet, nous avons quelques expériences indicatives dans ce sens. Nous avons essayé, dans une série d'expériences, de garder un potentiel fixe en faisant varier la quantité d'oxygène envoyé dans le milieu dès l'ensemencement. Si l'on ensemence avec 1 cm³ de culture dans 35 cm³ de milieu, il n'y a aucune croissance à $E_h = +0,136$ v p_H 6,4, si l'on ensemence avec 2 cm³, on a, au contraire, une bonne croissance. Mais il faudrait, pour avoir une certitude absolue, faire des expériences d'une durée de plus de 24 heures en surveillant constamment le potentiel, ce que nous n'avons pas fait. Nous nous sommes arrêtés à une durée de 12 heures. En tous cas, le phénomène observé est bien dans le sens voulu, et l'on peut penser que le potentiel d'arrêt est fonction du volume de culture inoculé; nous disons volume de culture car, outre les bactéries, nous introduisons les substances réductrices sécrétées par celles-ci.

Déjà donc nous apparaît le fait que les valeurs trouvées sont contingentes, qu'elles dépendent de la vitesse d'arrivée de l'oxygène et de la quantité du complexe bactéries + substances sécrétées.

Ceci se confirme dans les expériences exposées en 3^o, 4^o et 5^o du chapitre II, et que les courbes 1, 2, 3, figure 4, résument. On y constate que le potentiel d'arrêt est d'autant plus élevé que la quantité de bactéries est plus grande, que les bactéries auxquelles on a ajouté du liquide de culture privé de bactéries et renfermant les produits de sécrétion de ces bactéries supportent un potentiel plus élevé que les bactéries sans extrait, et que, réciproquement, les bactéries privées des substances sécrétées ont un potentiel d'arrêt décalé vers les potentiels plus bas. En outre, les expériences sur les milieux solides en présence des colorants nous ont montré qu'une décoloration de la zone proche de l'air précède le développement des bactéries qui arrivent ainsi à pousser très près de la surface.

Il reste que, quelle que soit la quantité de bactéries et d'extrait ajoutés, il est impossible d'obtenir des cultures quand le potentiel dépasse $E_h = +0,180$ v p_H 6,2. Ce chiffre est à rapprocher de celui de *Kanel*²⁾, qui a trouvé que dans un milieu anaérobie la croissance ne commence précisément qu'à partir de $E_h = +0,180$ v. C'est précisément celui pour lequel, dans les expériences d'*Engelhardt* sur l'effet *Pasteur*, la fermentation est bloquée 100%.

L'ensemble de tous ces résultats nous semble s'expliquer ainsi: quand on envoie de l'oxygène dans un milieu où se trouvent des bactéries anaérobies, celles-ci créent autour d'elles une zone de défense formée par l' H_2 et les substances réductrices qu'elles libèrent. Si la quantité d'oxygène est relativement faible, d'une part l'oxygène est neutralisé, d'autre part il reste suffisamment d'hydrogène et de métabolites nécessaires aux synthèses, et la croissance se produit. Si la quantité d'oxygène est trop forte, la zone de défense est forcée,

¹⁾ *Wurmser* et *S. Filitti-Wurmser*, *Enzymol.* **4**, 137 (1937).

²⁾ *Kanel*, *Microb.* **6**, 254 (1937). Tirage 2.

tout l'hydrogène et les métabolites nécessaires aux synthèses sont oxydés, et les synthèses ne se produisant plus, la croissance devient impossible. En outre, cet oxygène pénétrant à l'intérieur des cellules inhibe certaines réactions du type de celle étudiée par *Engelhard et Sakov*¹⁾, détruit partiellement ou totalement certains enzymes, entre autres les déshydrogénases, et crée un potentiel incompatible avec les synthèses. Cette dernière considération: l'impossibilité où sont les anaérobies de lutter contre l'élévation du potentiel, lorsque l'oxygène a pénétré à l'intérieur de la cellule, a déjà d'ailleurs été admise par *Wurmser*²⁾, à la suite de considérations théoriques dans un travail sur l'électroactivité dans la chimie des cellules.

En dernière analyse, le niveau d'oxydo-réduction au moment de l'arrêt est donc déterminé par la compétition entre l'oxygène et les produits du métabolisme bactérien.

RÉSUMÉ.

1° Cl. *Saccharobutyricum* et Cl. *Sporogenes* cultivés en présence de colorants indicateurs de potentiel d'oxydo-réduction, en milieu solide où l'oxygène diffuse, peuvent croître à un potentiel de l'ordre de $E_0' = + 0,123$ v à p_H 7.

2° Aussi bien dans les milieux solides que dans les milieux liquides, ils se défendent contre l'oxygène en dégageant des substances réductrices, en quantité d'autant plus grande que les bactéries sont plus nombreuses.

3° L'étude de l'évolution du potentiel par la méthode électrométrique, dans l'azote pur, montre que l'on peut obtenir une valeur minimum de $E_h = - 0,274$ v à p_H 5, avec, au cours de la baisse de potentiel, un point d'inflexion aux environs de $E_h = - 0,050$ v p_H 6,2.

4° Des essais de stabilisation du potentiel à des niveaux différents obtenus en envoyant des proportions variées d'un mélange azote + oxygène ont montré qu'avec 1,4 % d'oxygène on a une stabilisation à $E_h = + 0,116$ v p_H 6,8 et croissance des bactéries.

5° La détermination du potentiel d'arrêt en fonction de la quantité de bactéries montre que ce potentiel est d'autant plus élevé que la quantité de bactéries est plus grande.

6° Si l'on ajoute du milieu de culture dans lequel les bactéries sont à la dernière partie de la phase logarithmique de croissance, et que l'on a privé de bactéries par centrifugation à l'abri de l'air, le potentiel d'arrêt est plus élevé que dans les expériences témoin.

7° Si l'on sépare les bactéries du milieu où elles ont poussé, le potentiel d'arrêt est inférieur à celui obtenu dans les expériences témoin.

8° La signification de ces résultats est discutée.

Paris, Institut de Biologie physico-chimique.

1) *Engelhard et Sakov*, *Biochemia* **8**, 35 (1943).

2) *Wurmser*, L'électroactivité dans la chimie des cellules, *Hermann*, éditeur, Paris 1935, p. 76.