
MICROBIOLOGIE. — *Isolement de mutants d'Escherichia coli streptomycino-résistants dépourvus d'enzymes respiratoires. Action de l'hémine sur la formation de ces enzymes chez le mutant H₇. Note de M. MIRKO BELJANSKI, présentée par M. Jacques Tréfouël.*

Dans certaines conditions de sélection, on obtient des mutants streptomycino-résistants ne manifestant pas d'activité respiratoire. Quelques propriétés de l'un de ces mutants (H₇) sont décrites. L'hémine permet la formation des enzymes dont le mutant H₇ est dépourvu.

Au cours de l'isolement de variants résistants à la streptomycine, à partir d'une souche bactérienne sensible (*E. coli* « Monod »), nous avons obtenu un mutant particulier (H₇) se distinguant de la souche originale par sa résistance à la streptomycine et par l'inactivité du système respiratoire. Nous avons alors cherché à préciser des conditions permettant de sélectionner régulièrement de tels mutants à partir de la souche normale. En repiquant en série les bactéries sensibles, en eau peptonée glucosée contenant 2 à 4 µg d'hémine/ml et des doses croissantes de streptomycine (initiale 4 µg et finale 100 à 1000 µg/ml), nous avons pu isoler à quatre reprises successives des souches mutantes du même type que la souche H₇. Nous avons obtenu un mutant analogue dans les mêmes conditions, à partir d'une souche d'*E. coli* K-12. Sur gélose, le mutant H₇ donne, en 24 heures, de très petites colonies à peine visibles dont la taille n'augmente que très faiblement par la suite.

Les tests fermentaires classiques effectués avec la souche normale et avec le mutant H₇ ont donné les mêmes résultats. La fermentation du dulcitol, positive avec la forme normale, n'est positive avec le mutant que si la croissance a lieu en présence d'hémine. Les bactéries H₇ et normales (milieu d'eau peptonée gélosé renfermant 4 µg d'hémine par ml) sont sensibles au phage T₆ et résistantes aux phages T₁, T₂, T₃, T₄, T₅, T₇. Ajoutons qu'après 40 repiquages en absence de streptomycine et d'hémine, le mutant H₇ a conservé tous ces caractères distinctifs.

La croissance des bactéries H₇ en eau peptonée glucosée est notablement accélérée par l'addition d'hémine (2 µg/ml), et la culture atteint un maximum plus élevé. L'hémine est, au contraire, sans effet sur la croissance des bactéries normales. Testée en présence de glucose, la respiration des bactéries H₇,

cultivées en l'absence d'hémine, est pratiquement nulle ($QO_2 = 3$), celle des bactéries normales est beaucoup plus élevée ($QO_2 = 150$); celle des bactéries H_7 cultivées en présence d'hémine est relativement active ($QO_2 = 35$ à 40).

Ces observations nous ont incité à étudier la déshydrogénation de quelques substrats et l'activité catalasique chez les bactéries H_7 cultivées en eau peptonée glucosée additionnée ou non d'hémine.

Les tableaux I et II résument les résultats d'une série d'expériences qui furent répétées à plusieurs reprises sans variations notables. Parmi les substrats utilisés nous avons choisi pour le tableau I ceux pour lesquels aucune activité déshydrogénasique ne se manifestait chez le mutant H_7 cultivé en l'absence d'hémine.

TABLEAU I.

Temps (min) de décoloration du bleu de méthylène [substrat M/5, 1 ml; B. M. M./500 0,5 ml; tamp. phos. M/15 pH 7,2, 2 ml; bactéries 0,5 ml (p. sec, 2 mg) 37°].

Substrats.	Bactéries normales.	Bactéries H_7 cultivées	
		—	en présence d'hémine.
Témoins.....	1 000	> 1 440	1 200
Succinate.....	60	> 1 440	70
β -alanine.....	100	> 1 440	100
Acétate.....	120	> 1 440	100
<i>L</i> -aspartate.....	120	> 1 440	260
Formiate.....	10	> 1 440	240
H_2 (pression atmosphérique).....	20	> 1 440	40

TABLEAU II.

Catalase [(mm³ d'O₂ libéré pendant 5 min à 30°); KOH, 0,2 ml; tamp. phos. pH 7,2 0,5, ml; bactéries 0,5 ml (p. sec, 2 mg); H₂O₂ à 1 vol. 0,25 ml; volume total, 2 ml].

	Suspensions	
	non chauffées.	chauffées (1 min à 100°).
Bactéries normales cultivées sans hémine.....	185	4
Mutant H_7 cultivé sans hémine.....	4	5
» cultivé avec hémine.....	85	5
» + 20 μ g d'hémine (contact 1 h).....	66	6
» (broyat) + 20 μ g d'hémine (contact 1 min).....	135	4

L'examen de ces tableaux montre que les bactéries normales déshydrogènent les substrats utilisés; les bactéries H_7 ne les déshydrogènent que si la croissance a eu lieu en présence d'hémine. Les essais faits (tableau II) après chauffage et après addition d'hémine aux suspensions et au broyat de bactéries H_7 cultivées sans hémine, montrent clairement que l'apoenzyme de la catalase est synthétisé au cours de la croissance.

Examinées à l'aide d'un microspectroscope à réversion, les bactéries normales présentent des bandes d'absorption de cytochromes à 530 et à 560 m μ (cyt. b_1); ces bandes ne sont pas visibles chez les bactéries H₇ cultivées en eau peptonée glucosée additionnée d'hémine (milieu agité ou gélosé). Par contre, cultivées en bouillon héminé agité ou gélosé, ces bactéries présentent une faible bande à 560 m μ .

De cet ensemble d'observations, nous pensons pouvoir conclure que le mutant H₇ diffère du type normal par la perte du pouvoir de synthétiser l'hémine. Ce mutant, par sa sensibilité à l'hémine, présente des similitudes avec certaines souches d'*Hémophilus* ⁽¹⁾ ainsi qu'avec un mutant de *Staphylococcus aureus* streptomycino-résistant ⁽²⁾. Outre l'intérêt que pourra présenter éventuellement la recherche de précurseurs de l'hémine, utilisables par ces bactéries, l'étude de ce mutant doit permettre de déterminer quels sont, chez *E. coli*, les systèmes enzymatiques dont la synthèse et l'activité sont liées directement ou indirectement à la présence du groupement héminique.

Notons que la réapparition de la succino-déshydrogénase chez les bactéries H₇ cultivées en eau peptonée glucosée additionnée d'hémine, contraste avec la non réapparition dans les mêmes conditions, de la bande du cytochrome b_1 . Ceci semble contredire l'identification proposée par certains auteurs entre ces deux éléments du système respiratoire ⁽³⁾ ⁽⁴⁾. Au contraire, l'étude de l'action très marquée de l'hémine sur la formation de l'hydrogénase pourrait apporter une confirmation expérimentale à l'hypothèse ⁽⁵⁾ ⁽⁶⁾ que cet enzyme possède un groupement héminique.

⁽¹⁾ A. et M. LWOFF, *Ann. Inst. Past.*, 59, 1937, p. 130.

⁽²⁾ J. JENSEN et E. THOPERN, *Zeit. f. Naturfor Bd. 8b, Heft 10*, 1953, p. 600.

⁽³⁾ S. J. BACH et coll., *Bioch. J.*, 40, 1946, p. 229.

⁽⁴⁾ A. M. PAPPENHEIMER et E. D. HENDEE, *J. biol. Chem.*, 171, 1947, p. 701.

⁽⁵⁾ H. D. HOBERMAN et D. RITTENBERG, *J. biol. Chem.*, 147, 1943, p. 211.

⁽⁶⁾ L. A. HYNDMAN et coll., *J. Bact.*, 65, 1953, p. 522.

(Extrait des *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*,
t. 240, p. 374-377, séance du 17 janvier 1955.)

GAUTHIER-VILLARS,

ÉDITEUR-IMPRIMEUR-LIBRAIRE DES COMPTES RENDUS DES SÉANCES DE L'ACADÉMIE DES SCIENCES
147467-55 Paris. — Quai des Grands-Augustins, 55.