

CHIMIE BIOLOGIQUE. — *Reconstitution in vitro de la catalase.*

Note de M. MIRKO BELJANSKI, présentée par M. Jacques Tréfouël.

On peut obtenir l'apoenzyme de la catalase sous forme d'extraits solubles à partir du mutant H₇ d'*Escherichia coli*, auxotrophe pour l'hémine, dépourvu d'activité catalasique. L'addition d'hémine à l'apoenzyme permet la reconstitution *in vitro* de la catalase active.

Plusieurs auteurs ont, par les méthodes chimiques, séparé les deux parties constitutives de la catalase, l'hémine et l'apoenzyme; mais la reconstitution *in vitro* de l'enzyme à partir de ces deux fractions n'a pu être réalisée. Toutefois, Agner a obtenu une très faible activité catalasique en ajoutant de l'hémine à l'apoenzyme dialysé ⁽¹⁾, mais H. Tauber et Kleiner ⁽²⁾ ainsi que B. Summer et A. L. Dounce ⁽³⁾ n'ont pu obtenir ce résultat. Par contre, la reconstitution *in vitro* de la peroxydase a été réalisée par H. Theorell et A. C. Maehly ⁽⁴⁾.

Le mutant H₇ d'*Escherichia coli* que nous avons isolé ⁽⁵⁾ permet d'effectuer une résolution « physiologique » de la catalase. Ce mutant dont les propriétés physiologiques et biochimiques sont décrites ailleurs ⁽⁶⁾, ne synthétise pas d'hémine. En revanche, les bactéries H₇, cultivées sans hémine, synthétisent l'apoenzyme de la catalase qui peut être extrait et réactivé *in vitro* par l'hémine, comme le montre l'expérience suivante :

Les cultures des bactéries H₇ en eau peptonée glucosée sans hémine, sont centrifugées, les bactéries lavées à l'eau distillée sont mises en suspension (4 mg/ml) et exposées à l'action des sons (Raytheon) pendant 15 mn. Le lysat est ensuite centrifugé à 60 000 g pendant 30 mn. Le surnageant (0,5 ml) est additionné de tampon phosphate M/30, pH 6,8 (0,5 ml) et de différentes concentrations d'hémine (0,5 ml). Après 1 h d'incubation à 15° on ajoute de l'eau oxygénée à 2 vol (0,3 ml). Le volume est complété à 2 ml et l'activité catalasique mesurée dans l'appareil de Warburg (T = 15°).

(1) K. AGNER, *Z. phys. Chem.*, 235, 1935, II.

(2) *Proc. Soc. exp. Biol.*, 33, 1939, p. 391.

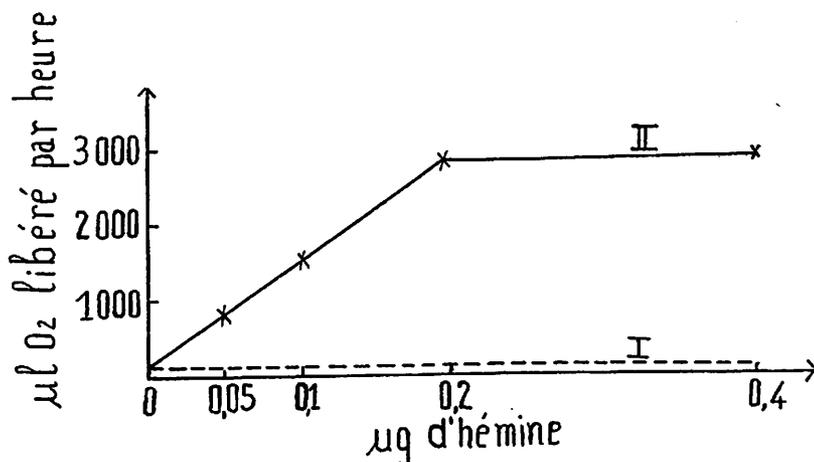
(3) *J. Biol. Chem.*, 127, 1939, p. 439.

(4) *Acta chem. scand.*, 4, 1950, p. 422.

(5) M. BELJANSKI, *Comptes rendus*, 240, 1955, p. 374.

(6) M. BELJANSKI et M. BELJANSKI, *Bioch. et Bioph. Acta* (sous presse).

La figure montre que l'activité est linéairement proportionnelle à la quantité d'hémine jusqu'à la concentration de 0,2 μg . Si à ce point de saturation une nouvelle quantité d'extrait est ajoutée, on n'observe pas d'accroissement de l'activité catalasique. Ceci indique qu'à ce point toute l'hémine avait été utilisée.



Reconstitution *in vitro* de la catalase.

I. Hémine seule. II. Hémine additionné d'extrait du mutant H₇.

Lorsque l'eau oxygénée est ajoutée avant l'hémine, la réactivation n'a pas lieu, ce qui semble indiquer qu'en l'absence d'hémine, l'apoenzyme est inactivé irréversiblement.

La catalase pure provenant des tissus animaux libère à 0°, en présence d'eau oxygénée, $8,4 \cdot 10^8$ μl d'O₂ par heure et par μM d'hémine. La catalase reconstituée *in vitro* à partir de l'apoenzyme du mutant H₇ et d'hémine libère à 15° : $9,0 \cdot 10^6$ μl d'O₂ par μM d'hémine. Cette différence pourrait être due au moins en partie à la fixation d'une fraction de l'hémine par des protéines autres que l'apoenzyme de la catalase. Quoi qu'il en soit, la catalase d'*Escherichia coli* n'ayant pas été isolée à l'état pur, nous ne connaissons pas son activité spécifique.

Enfin les résultats consignés dans le tableau suivant indiquent que l'apoenzyme se combine avec certaines porphyrines ne contenant pas de fer. Il cesse alors d'être réactivable par l'hémine. Le fait que le résultat dépend de l'ordre dans lequel sont ajoutés respectivement la porphyrine inhibitrice et l'hémine, montre que cette combinaison est pratiquement irréversible. L'uroporphyrine et la coproporphyrine n'inactivent pas l'apoenzyme, ce qui signifie qu'elles ne forment pas de combinaison de ce type, mais ne signifie pas nécessairement qu'elles soient dépourvues de toute affinité pour l'apoenzyme.

Action de diverses porphyrines sur la reconstitution in vitro de la catalase.

	QO ₂ .
Extrait du mutant H ₇ + protoporphyrine (0,2 µg) + hémine (0,2 µg).....	64
» » + mésoporphyrine » » »	62
» » + deutéroporphyrine » » »	60
» » + hématoporphyrine » » »	61
» » + uroporphyrine » » »	1 900
» » + coproporphyrine » » »	1 850
» » (témoin).....	62
Hémine (témoin).....	65

(Extrait des *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*,
t. 241, p. 1351-1353, séance du 7 novembre 1955.)