

93

EXTRAIT DES
ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

(Mars 1957. — Tome 92.)

**SUR LA FORMATION D'ENZYMES RESPIRATOIRES
CHEZ UN MUTANT D'*ESCHERICHIA COLI*
STREPTOMYCINO-RÉSISTANT
ET AUXOTROPHE POUR L'HÉMINE**

PAR

Mirko BELJANSKI et Monique BELJANSKI

MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS
Libraires de l'Académie de Médecine
120, Boulevard Saint-Germain
PARIS

SUR LA FORMATION
D'ENZYMES RESPIRATOIRES
CHEZ UN MUTANT
D'*ESCHERICHIA COLI*
STREPTOMYCINO-RÉSISTANT
ET AUXOTROPHE POUR L'HÉMINE

PAR

Mirko BELJANSKI et Monique BELJANSKI

Imprimé avec le périodique « *Annales de l'Institut Pasteur* »
N° d'ordre 2630. — (Extrait Mars 1957. — Tome 92, p. 396.)

**SUR LA FORMATION D'ENZYMES RESPIRATOIRES
CHEZ UN MUTANT D'*ESCHERICHIA COLI*
STREPTOMYCINO-RÉSISTANT
ET AUXOTROPHE POUR L'HÉMINE**

par Mirko BELJANSKI et Monique BELJANSKI (*)

(Institut Pasteur, Service de Biochimie cellulaire) (**)

INTRODUCTION.

Dans le présent mémoire nous décrivons les propriétés d'un mutant d'*Escherichia coli* obtenu par sélection en présence de streptomycine. Ce mutant est caractérisé par la streptomycino-résistance et par l'incapacité de synthétiser l'hémine. Les données réunies par l'étude physiologique et biochimique des bactéries mutantes ont permis d'apporter certaines précisions sur la constitution et la synthèse des enzymes respiratoires chez *Escherichia coli*. Il a été également possible de préparer, à partir des bactéries mutantes, l'apoenzyme de la catalase sous forme d'extraits solubles, permettant la reconstitution *in vitro* de cet enzyme.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Souches. Nous avons utilisé la souche d'*Escherichia coli* « Monod » sensible à la streptomycine et le mutant H₇ streptomycino-résistant que nous avons isolé à partir de la souche sensible par le procédé décrit plus loin.

Milieux de culture. La croissance des bactéries H₇ étant nulle en milieu synthétique, les bactéries normales et mutantes sont cultivées en eau peptonée glucosée [1] liquide ou solide. Le bouillon n'est utilisé que lors de l'étude de la formation des cytochromes chez les bactéries mutantes.

Solutions de streptomycine. Le sulfate de streptomycine (Specia) est utilisé.

(*) Manuscrit reçu le 30 octobre 1956.

(**) Ce travail a bénéficié de subventions du « Jane Coffin Childs Memorial Fund for Medical Research » et de la Fondation Rockefeller de New York.

Solutions de porphyrines. Les solutions de porphyrines (1) sont préparées selon Lwoff [2] et autoclavées à 105° pendant dix minutes. Dans les expériences ne nécessitant pas d'asepsie, des solutions non stériles sont employées. Nous utilisons toujours des solutions de porphyrines fraîchement préparées.

Modes de culture. Les bactéries sont cultivées soit en tubes à essai renfermant 10 ml de milieu, soit en ballons de 250 ml contenant 100 ml de milieu. Les ensemencements sont faits avec un inoculum provenant d'une culture de seize heures à 37°, réalisant une dilution au 1/100. L'agitation des milieux de culture est évitée car l'oxygène a un effet défavorable sur la croissance des bactéries mutantes.

Examen spectroscopique des suspensions bactériennes. Après réduction des cytochromes par l'hyposulfite de sodium, les bandes d'absorption sont examinées au microspectroscope à réversion de Hartridge, soit à la température du laboratoire, soit après immersion dans l'azote liquide (—196°). Epaisseur des préparations : 3 à 8 mm.

EXPÉRIENCES ET RÉSULTATS.

a) *Technique d'isolement de mutants d'Escherichia coli dépourvus d'activité respiratoire.* — Au cours de l'isolement de variants résistant à la streptomycine, nous avons obtenu, par repiquages en série de bactéries sensibles en eau peptonée contenant des doses croissantes de streptomycine, un mutant particulier (H₇) résistant à 100 µg d'antibiotique par millilitre et dépourvu d'activité respiratoire. Poursuivant les repiquages, nous avons finalement obtenu une souche résistant à 2 000 µg d'antibiotique par millilitre [3]. C'est avec cette souche que nous avons fait les expériences décrites dans le présent mémoire. Nous avons par la suite cherché à préciser les conditions expérimentales permettant de sélectionner régulièrement des variants présentant des propriétés analogues à celles des bactéries H₇. Il suffit, en général, de repiquer en série des bactéries sensibles à la streptomycine en présence de doses croissantes de cet antibiotique (4 à 50 µg/ml) et d'hémine (4 µg/ml). Dans ces conditions, trois ou quatre repiquages permettent d'obtenir une culture qui se distingue d'emblée de celles de bactéries normales par sa faible densité optique. Elle est constituée de bactéries mutantes dépourvues d'enzymes respiratoires. Ces conditions de sélection permettent de supposer que le mutant H₇ ne peut être obtenu qu'en plusieurs stades à partir des formes normales. Nous avons, à plusieurs reprises, isolé de tels mutants à partir de différentes souches d'*Escherichia coli*: ML, K12 (C800), B, mais n'avons pu l'obtenir à partir de K12 (112).

(1) L'hémine provient de la maison Hoffmann La Roche et les autres porphyrines nous ont été aimablement envoyées par le D^r Granick que nous remercions très vivement.

b) *Propriétés morphologiques et tests fermentaires.* — Les bactéries H₇, après coloration de Gram, présentent au microscope le même aspect que les formes normales. Sur milieu gélosé, en présence comme en absence d'hémine ou de streptomycine, les bactéries mutantes donnent, en vingt-quatre heures, de très petites colonies dont la taille n'augmente que très faiblement par la suite. Les bactéries normales et mutantes présentent des différences de pigmentation très sensibles. Le culot des formes normales est jaunâtre, celui des formes mutantes est blanc.

Les tests fermentaires classiques, effectués avec les bactéries normales et mutantes, ont donné les mêmes résultats : xylose⁺, arabinose⁺, glucose⁺, lactose⁺, maltose⁺, saccharose⁺, indol⁺, glycérol⁻, citrate-Na⁻, acétylméthylcarbinol⁻, ac. β-phénylpropionique⁻.

La fermentation du dulcitol, positive avec les bactéries normales, n'est positive avec les bactéries mutantes que si la croissance a lieu en présence d'hémine. Avec les bactéries H₇, les virages sont plus tardifs qu'avec les bactéries normales.

La sensibilité aux phages des bactéries normales et mutantes cultivées sur eau peptonée gélosée renfermant 4 µg d'hémine par millilitre a été déterminée. Les bactéries H₇, comme les bactéries normales, sont sensibles au phage T₆ et résistantes aux phages T₁, T₂, T₃, T₄, T₅, T₇. Ajoutons qu'après quarante repiquages successifs en eau peptonée glucosée, en l'absence d'hémine et de streptomycine, les bactéries H₇ conservent tous leurs caractères distinctifs.

c) *Croissance ; action de l'hémine et de ses précurseurs.* — Nous avons suivi la croissance des bactéries normales et mutantes par mesure de la densité optique en milieu agité, en aérobiose et en anaérobiose : 20 ml de milieu de culture sont introduits dans des ballons de 250 ml et ensemencés avec un inoculum réalisant une dilution au 1/100. *En aérobiose*, les bactéries H₇ ont une croissance presque nulle qui n'est que faiblement accélérée lorsque les cultures sont additionnées d'hémine. *En anaérobiose* (le vide est effectué avec une trompe à eau et les ballons sont scellés), le maximum de croissance atteinte par les bactéries H₇ est d'environ 30 p. 100 inférieur à celui des bactéries normales. Cette différence n'est pas très marquée, mais elle est constante et se trouve supprimée lorsque les cultures sont additionnées de 4 µg d'hémine par millilitre. La streptomycine inhibe l'action stimulante de l'hémine sur la croissance des bactéries H₇. L'hémine est sans action sur la croissance des bactéries normales (tableau I).

Nous avons cherché parmi les précurseurs de l'hémine [4] ceux qui pourraient stimuler la croissance des bactéries mutantes. Les

TABLEAU I. — Action de l'hémine et de la streptomycine sur la croissance des bactéries normales et des bactéries H₇.

Bactéries	Azote (µg/ml) des cultures bactériennes après 16 heures à 32°C Milieu agité en anaérobiose
Bactéries normales	65
Bactéries normales + 4 µg d'hémine/ml	65
Bactéries H ₇	46
Bactéries H ₇ + 4 µg d'hémine/ml	65
Bactéries H ₇ + 100 µg de streptomycine/ml	45
Bactéries H ₇ + 4 µg d'hémine/ml + 100 µg de streptomycine/ml	46

précurseurs suivants, seuls ou associés, ont été essayés à différentes concentrations : glycine, succinate, acétate, α -cétoglutarate, ac. δ -amino-lévilinique, porphobilinogène, uroporphyrine, coproporphyrine, hématorporphyrine, protoporphyrine. *Seule la protoporphyrine stimule, aussi fortement que l'hémine, la croissance des bactéries mutantes.* Les autres substances se sont montrées sans action.

d) *Examen spectroscopique des bandes de cytochromes.* — Ces observations montrant que la différence entre les bactéries normales et mutantes tient à la synthèse des porphyrines, nous avons examiné le spectre des cytochromes des formes normales et mutantes. Les bactéries normales présentent, au microspectroscope à réversion de Hartridge, deux bandes d'adsorption, l'une forte à 560 m μ (cyt. b₁) et la deuxième très faible à 530 m μ . C'est le système typique de cytochromes d'*Escherichia coli* décrit par plusieurs auteurs [5, 6, 7]. Au contraire, chez les bactéries mutantes, aucune bande d'adsorption n'a pu être décelée, même après immersion des préparations dans l'azote liquide. Les bactéries H₇, cultivées en eau peptonée agitée, non agitée ou gélosée, renfermant 4 µg d'hémine ou plus par millilitre, n'ont en aucun cas présenté de bandes d'absorption des cytochromes. Par contre, cultivées en bouillon agité ou gélosé additionné de 4 µg d'hémine par millilitre, les bactéries mutantes présentent une faible bande d'absorption à 560 m μ . Cette bande n'est pas décelable si la croissance a lieu en bouillon non agité ou en l'absence d'hémine.

e) *Recherche des porphyrines.* — L'absence de bandes visibles de cytochromes chez les bactéries H₇, et l'action stimulante de l'hémine sur leur croissance, nous ont amenés à rechercher la présence éventuelle de porphyrines intracellulaires.

On prépare une poudre acétonique par la technique habituelle : 1,7 g de poudre est additionné de 20 ml d'eau et d'un même volume d'HCl concentré. L'hydrolyse est pratiquée pendant trente minutes à reflux au bain-marie bouillant. L'extraction des porphyrines éthéro-solubles [8] est réalisée à l'aide d'une solution d'HCl normal (quatre fois 2 ml ; volume complété à 10 ml). Pour rechercher la présence éventuelle d'uroporphyrine insoluble dans l'éther, nous avons utilisé la méthode de Rimington [9].

Les spectres d'absorption en U. V. des extraits chlorhydriques montrent que les bactéries normales renferment des porphyrines

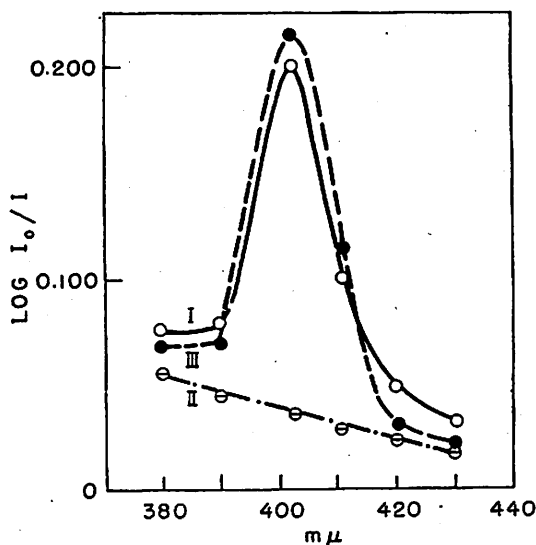


FIG. 1. — Extrait chlorhydrique contenant des porphyrines intracellulaires. I. Bactéries normales. II. Bactéries H., III. Solution témoin d'hématoporphyrine.

avec leur maximum caractéristique à 403 mμ, tandis que les bactéries mutantes en sont dépourvues (fig. 1). La spectroscopie de fluorescence, permettant de déceler de 0,01 à 1 μg de porphyrines par millilitre [10], a confirmé ces résultats. Nous avons calculé la quantité de porphyrines d'après le graphique de Pappenheimer [11] établi pour l'hématoporphyrine (valeur lue D_{403}). Les bactéries normales contiendraient $2,5 \times 10^{-6}$ de porphyrines environ. Les bactéries mutantes n'en contiennent pas et n'en excrètent pas.

Le dosage du fer total a été réalisé selon Paulais [12], soit sur les suspensions bactériennes, soit sur la poudre acétonique des bactéries normales et mutantes. Le taux en fer des bactéries nor-

males était de 51×10^{-5} , tandis que celui des bactéries mutantes était de 27×10^{-5} .

f) *Métabolisme respiratoire.* — Nous avons comparé la respiration des bactéries normales et H₇ en présence de divers substrats carbonés : les bactéries d'une culture de seize heures, lavées à l'eau distillée à froid (4°) sont rapidement utilisées. La respiration a été mesurée durant quatre-vingt-dix minutes à l'aide de l'appareil de Warburg. Contenu d'une cupule : 0,5 ml de tampon phosphate M/30, pH 7,2 (pH 6,0 pour formiate et lactate) ; 0,5 ml de suspension bactérienne (poids sec, 2,5 mg) ; 0,2 ml de KOH à 30 p. 100 et 0,2 ml de substrat M/5. Volume total, 2 ml. Température, 37° C.

Les principaux résultats sont exprimés dans le tableau II.

TABLEAU II. — **Activité respiratoire des bactéries normales et des bactéries H₇ en présence de divers substrats.**

Substrats	QO ₂ (μlxh ⁻¹ xmg ⁻¹)	
	Bactéries normales	Bactéries mutantes
Témoins	5	0
Glucose	150	0
Lactate	140	0
Pyruvate	122	0
Formiate	150	0
Succinate	125	0
l-glutamate	80	0
β-alanine	85	0

L'examen de ce tableau montre que les bactéries mutantes cultivées sans hémine ne présentent pas de respiration mesurable en présence comme en l'absence de substrats carbonés. En revanche, mesurée en présence de glucose, la respiration de ces mêmes bactéries H₇ cultivées en milieu héminé devient relativement importante (QO₂ = 35) bien qu'encore inférieure à celle des bactéries normales (QO₂ = 150). La respiration des bactéries normales n'est pas modifiée, qu'elles aient ou non poussé en présence d'hémine.

g) *Déshydrogénation de divers substrats.* — Nous avons comparé l'activité déshydrogénasique des bactéries normales et mutantes à l'égard de divers substrats. Contenu d'un tube de Thunberg : 2 ml de tampon phosphate M/30 pH 7,2 (pH 6,0 pour formiate et lactate) ; 0,5 ml de suspension bactérienne (poids sec,

2,5 mg) ; 1 ml de substrat M/5 ; 0,5 ml de bleu de méthylène M/500. Le vide est réalisé avec une trompe à eau. On introduit de l'azote commercial dans les tubes et on refait le vide. Les tubes sont portés à 37° C et après équilibre de dix minutes on mélange et on détermine le temps nécessaire pour obtenir une décoloration de 90 p. 100 du bleu de méthylène. Les résultats sont exprimés dans le tableau III.

TABLEAU III. — Activité de divers systèmes déshydrogénants chez les bactéries normales et chez les bactéries H₇ après croissance en l'absence ou en présence d'hémine (atmosphère d'air).

Substrats	Bactéries normales	Bactéries H ₇	Bactéries H ₇ cultivées en présence d'hémine
Témoins	0	0	-
"a" { glucose	336	268	-
{ lactate	80	74	-
{ pyruvate	85	110	-
"b" { formiate	300	0	8
{ succinate	28	0	20
{ β-alanine	14	0	14

Les activités déshydrogénasiques sont exprimées en Q_{BM} (μl de H₂ transféré par heure et par milligramme de protéines).

On voit que les bactéries mutantes, cultivées en l'absence d'hémine, manifestent une activité déshydrogénasique comparable à celle des bactéries normales pour les substrats du groupe « a » et aucune activité pour ceux du groupe « b ». Les substrats du groupe « b » ne sont déshydrogénés par les bactéries mutantes que si celles-ci sont cultivées sur milieu renfermant de l'hémine (4 μg/ml). Notons que les bactéries mutantes cultivées en présence d'hémine retrouvent une forte activité succino-déshydrogénasique, tandis que l'activité formico-déshydrogénasique n'est que partiellement restaurée.

L'addition de Fe⁺⁺ et de Fe⁺⁺⁺ au milieu de culture ne contenant pas d'hémine ne fait pas apparaître d'activité déshydrogénasique chez les bactéries mutantes pour les substrats du groupe « b ».

ETUDE DE L'HYDROGÉNASE. — L'action de l'hémine sur la déshydrogénation de divers substrats par les bactéries H₇ nous a incités à étudier, en particulier, le rôle de l'hémine dans la synthèse et l'activité de l'hydrogénase. En effet, l'action de l'hémine dans ce système enzymatique n'a pu être mise en évi-

dence, bien que de nombreux travaux aient été consacrés à cette étude [14, 15, 16, 17].

Les bactéries normales et mutantes sont cultivées en eau peptonée glucosée soit en présence d'air sans agitation, soit en anaérobiose (azote, vide). Les cultures, arrêtées à la vingtième heure, sont centrifugées et les culots bactériens sont lavés à froid au tampon « Tris » pH 7,05 [18]. Nous utilisons soit des suspensions de bactéries intactes soit des lysats bactériens en tampon « Tris » (Raytheon à 5°, 9 K. C., quinze minutes). L'activité hydrogénasique a été suivie dans l'appareil de Warburg. Contenu d'une cupule : 1 ml de suspension ou de lysat bactérien renfermant de 30 à 80 µg d'azote ; 0,5 ml de bleu de méthylène neutralisé (8 µM) ; 0,2 ml de pyrogallol alcalin. Volume total, 2 ml. Après barbotage dans le pyrogallol alcalin, l'hydrogène passe pendant dix minutes dans les cupules agitées à 37°. On laisse cinq minutes sous pression atmosphérique d'hydrogène, on mélange le bleu de méthylène à l'enzyme, puis on suit l'utilisation de l'hydrogène pendant la phase linéaire.

Nos résultats sont exprimés en $Q_{H_2}^N$ (µl de H_2 transféré par milligramme d'N et par heure), déterminé à la vingtième minute après addition du bleu de méthylène.

Les résultats obtenus avec les bactéries normales et mutantes, cultivées en milieu non agité sous atmosphère d'air, sont résumés dans le tableau IV.

TABLEAU IV. — Effets de la présence d'hémine ou de catalase sur l'activité de l'hydrogénase de bactéries cultivées en aérobie et en anaérobiose.

Bactéries	µl H_2 transférés par mg N aminé et par h			
	Bactéries cultivées en présence d'air		Bactéries cultivées en anaérobiose	
	intactes	lysats	intactes	lysats
Normales	4.375	5.677	5.460	--
Mutantes	0	0	3.400	2.906
Mutantes cultivées en présence de 4 µg d'hémine/ml	2.198	2.653	4.100	4.403
Mutantes cultivées avec de la catalase exogène (20 µg/ml)	2.695	2.580	--	--

Les bactéries normales manifestent une forte activité hydrogénasique, tandis que les bactéries H_7 en sont totalement dépourvues. Mais ces mêmes bactéries H_7 , cultivées en présence d'hémine exogène, manifestent de l'activité hydrogénasique. Ce résultat sug-

gérât à première vue que l'hémine était nécessaire à la synthèse de l'enzyme. Or, les bactéries H_7 cultivées en l'absence d'hémine, mais en présence de catalase commerciale (20 $\mu\text{g/ml}$), présentent une forte activité hydrogénasique. Cette catalase exogène n'est pas utilisée comme source d'hémine par le mutant H_7 , car après plusieurs lavages, ces bactéries ne manifestent plus aucune activité catalasique, mais présentent toujours une activité hydrogénasique importante. Donc la synthèse de l'hydrogénase chez les bactéries H_7 cultivées en présence d'hémine exogène n'est pas due à l'hémine comme constituant de l'hydrogénase, mais selon toute vraisemblance à l'action protectrice de la catalase qui, comme nous l'avons déjà montré, est synthétisée par les bactéries H_7 cultivées en présence d'hémine [13]. Si cette conclusion est exacte, des bactéries H_7 cultivées à l'abri total de l'air devraient présenter de l'activité hydrogénasique. En effet, cultivées en anaérobiose, ces bactéries manifestent une forte activité hydrogénasique et la présence d'hémine durant la croissance n'exerce alors qu'un effet très faible sur cette activité (tableau IV). L'ensemble des résultats montre donc que l'hémine n'est pas nécessaire pour la synthèse de l'hydrogénase chez les bactéries mutantes H_7 d'*E. coli*.

Notons que l'addition d'hémine exogène au lysat des bactéries H_7 cultivées sans hémine en présence d'air ne permet pas d'obtenir d'activité hydrogénasique.

L'aération des suspensions bactériennes ou des lysats en présence de cyanure de potassium (10^{-3} à 10^{-2} M, incubation trente minutes en présence d'air) inhibe fortement l'activité hydrogénasique des bactéries normales, mais se montre sans action sur celle des bactéries H_7 cultivées soit en présence de catalase exogène, soit à l'abri total de l'air.

Le monoiodo-acétate (10^{-3} à 10^{-2} M) n'a aucune action inhibitrice sur l'activité hydrogénasique des bactéries normales ni sur celle des bactéries mutantes H_7 .

Précisons que les expériences réalisées avec des lysats des bactéries normales et mutantes ont donné les mêmes résultats que ceux obtenus avec les suspensions des bactéries intactes.

ETUDE DE LA CATALASE *in vivo* ET *in vitro*. — L'absence de cytochromes chez les bactéries mutantes et l'action stimulante de l'hémine sur leur croissance montrent clairement que ces bactéries sont incapables de synthétiser l'hémine. Ces observations suggéraient que le mutant H_7 était également dépourvu d'activité catalasique. Le tableau V montre que les bactéries normales présentent une forte activité catalasique alors que les bactéries-mutantes en sont totalement dépourvues. Les bactéries H_7 cultivées en présence d'hémine présentent une activité

TABLEAU V. — Activité catalasique des bactéries normales et des bactéries H₇ cultivées en présence d'hémine.

Bactéries	Activité catalasique exprimée en QO_2 ($\mu\text{l d'O}_2$ libéré $\times h^{-1} \times mg^{-1}$)
Bactéries normales	10.620
Bactéries H ₇	60
Bactéries H ₇ cultivées en présence de	
4 μg d'hémine/ml	1.500
20 μg d'hémine/ml	5.300
40 μg d'hémine/ml	6.250
Hémine (40 μg)	70

catalasique forte, bien qu'encore inférieure à celle manifestée par les bactéries normales.

L'activité catalasique a été déterminée à l'aide de l'appareil de Warburg. Contenu d'une cupule : 0,2 ml de KOH à 30 p. 100 ; 0,5 ml de tampon phosphate M/30 pH 6,8 ; 0,5 ml de suspension bactérienne (poids sec de 0,3 à 2 mg) ; 0,3 ml d'une solution de H₂O₂ à 2 volumes. Volume total, 2 ml ; température, 15°.

Il était particulièrement intéressant, dans ces conditions, de déterminer si les bactéries H₇ cultivées en l'absence d'hémine synthétisent l'apoenzyme de la catalase. La figure 2 montre qu'effectivement les bactéries mutantes synthétisent l'apoenzyme et que celui-ci peut en être extrait ; en outre, la reconstitution *in vitro* de la catalase, à partir de l'hémine et de l'apoenzyme, est possible.

La reconstitution *in vitro* de la catalase a été réalisée de la façon suivante : une suspension de bactéries H₇ en eau distillée (4 mg/ml) est soumise à l'action des sons (Raytheon) pendant quinze minutes. Le lysat est centrifugé à 60 000 g (Spinco) pendant trente minutes. 0,5 ml du surnageant (poids sec, 1,7 mg) est additionné de 0,5 ml de tampon phosphate M/30 pH 6,8 et de 0,5 ml d'une solution d'hémine. Incubation, une heure à 15°. L'activité catalasique est alors mesurée après addition d'H₂O₂.

Les résultats sont exprimés par la figure 2.

On voit que l'activité catalasique (O₂ libéré) est proportionnelle à la quantité d'hémine jusqu'à la concentration de 0,2 μg . Si, à ce point de saturation, on ajoute une nouvelle quantité de lysat frais, on n'obtient pas d'accroissement de l'activité catalasique, ce qui indique qu'à ce point il ne reste plus d'hémine libre.

La catalase reconstituée libre, à 15°, $9,0 \times 10^6$ μl d' O_2 par heure et par μM d'hémine, à partir de l'eau oxygénée. La catalase pure, provenant des tissus animaux, en libère $8,4 \times 10^8$ à 0° [49]. Cette différence pourrait être due à la fixation d'une partie de l'hémine par des protéines autres que l'apoenzyme de la catalase. D'autre part, la catalase n'ayant pas été isolée à l'état pur à partir d'*E. coli*, nous ne connaissons pas son activité spécifique.

Si, avant l'addition d'hémine, on ajoute à l'apoenzyme de l'eau

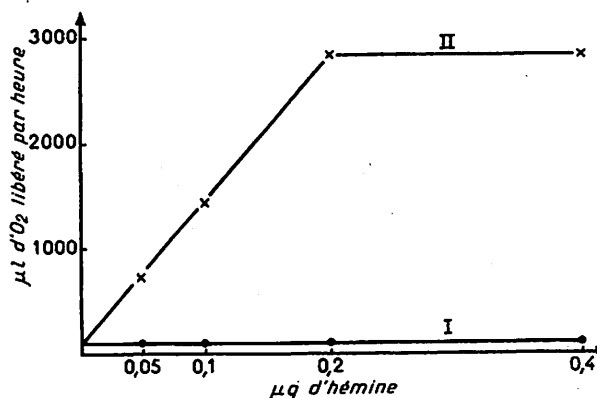


FIG. 2. — Reconstitution *in vitro* de la catalase.
I. Hémine seule. II. Hémine additionnée d'extrait du mutant H_7 .

oxygénée, la réactivation n'a pas lieu. L'apoenzyme semble être ainsi irréversiblement inactivé.

A la suite de ces observations, nous nous sommes demandé si l'apoenzyme de la catalase des bactéries H_7 cultivées sans hémine manifesterait une affinité pour des porphyrines autres que l'hémine, porphyrines ne contenant pas de fer. L'extrait du mutant H_7 , mis en présence soit de protoporphyrine, de méso-porphyrine, de deutéroporphyrine ou d'hématoporphyrine (conditions identiques à celles de la reconstitution *in vitro* de la catalase), ne manifeste pas d'activité catalasique. Après traitement de l'apoenzyme par ces porphyrines, la reconstitution de la catalase par l'hémine (incubation trente minutes à 15°) n'est plus possible, ce qui montre que ces porphyrines donnent des combinaisons pratiquement irréversibles avec l'apoenzyme de la catalase. Par contre, l'uroporphyrine et la coproporphyrine ne manifestent pas une telle affinité pour l'apoenzyme (tableau VI).

TABLEAU VI. — Action de diverses porphyrines sur la reconstitution *in vitro* de la catalase.

	QO ₂
Extrait du mutant H ₇ + mésoporphyrine (0,2 µg)	62
" " " + deutéroporphyrine "	60
" " " + hématoporphyrine "	61
" " " + uroporphyrine "	1.900
" " " + coproporphyrine "	1.850
" " " + protoporphyrine (0,2 µg) + hémine (0,2; 0,4; 0,8 µg)....	68
" " " + Hémine (0,2 µg) + protoporphyrine (0,2; 0,4; 0,8 µg)....	1.875
" " " (témoin).....	62
Hémine (0,8 µg).....	66

INFLUENCE DE LA STREPTOMYCINE SUR LA FORMATION DE LA CATALASE. — Comme les bactéries H₇ ont été isolées par sélection en présence de streptomycine, il était indiqué de rechercher quel pouvait être le rapport entre la streptomycine et l'utilisation de l'hémine exogène par ces bactéries. Le tableau I montre que le maximum de croissance des bactéries H₇, en milieu renfermant de la streptomycine et de l'hémine, est inférieur à celui d'une culture ayant lieu en présence d'hémine, mais sans streptomycine. En l'absence d'hémine, la streptomycine se montre sans action. Ces résultats suggèrent assez clairement que cet antibiotique intervient dans l'utilisation de l'hémine exogène.

Au lieu de déterminer l'effet de la streptomycine sur la croissance en présence d'hémine, on peut également démontrer, à l'aide des bactéries H₇ intactes, l'effet de cet antibiotique sur la reconstitution de la catalase. La streptomycine n'inhibe pas la synthèse de l'apoenzyme de la catalase chez les bactéries mutantes cultivées en présence de cet antibiotique, mais inhibe *in vivo* la combinaison hémine-apoenzyme. Les expériences suivantes ont été réalisées : 0,5 ml de suspension de bactéries H₇ (poids sec, 2 mg) est additionné de 0,5 ml de tampon phosphate M/30 pH 6,8, de 0,2 ml d'une solution d'hémine (10 µg/ml) et de 0,3 ml de streptomycine (différentes concentrations, voir fig. 3). Incubation une heure à 15°. On ajoute 0,3 ml de H₂O₂ à 2 volumes et on détermine l'activité catalasique.

En effet, si à une suspension des bactéries H₇ cultivées sans hémine, on ajoute d'abord de l'hémine puis de la streptomycine, on constate que l'antibiotique n'a pas d'action sur la formation de la catalase. Par contre, lorsque la streptomycine est ajoutée

en même temps que l'hémine, on observe une forte inhibition de la reconstitution de la catalase. Enfin, ajoutée avant l'hémine, la streptomycine inhibe totalement la formation de la catalase (fig. 3).

Ces expériences montrent donc que la streptomycine inhibe l'utilisation *in vivo* de l'hémine exogène.

En revanche, la streptomycine se montre dépourvue de toute action sur la reconstitution *in vitro* de la catalase à partir de l'hémine et de l'apoenzyme. Ajoutons que chez les bactéries nor-

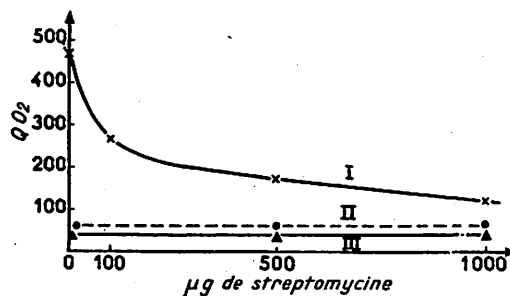


FIG. 3. — Action de la streptomycine sur la formation *in vivo* de la catalase.
I. Bactéries H₇ additionnées simultanément d'hémine et de streptomycine.
II. Bactéries H₇ + streptomycine d'abord + hémine ensuite. III. Témoin, bactéries H₇.

males, intactes ou lysées, la streptomycine n'a aucune action sur l'activité de la catalase.

CONCLUSIONS ET DISCUSSION.

Le mutant H₇ que nous avons isolé dans certaines conditions de sélection, en présence de streptomycine, est un organisme anaérobie qui diffère très nettement par ses propriétés physiologiques et biochimiques d'autres mutants streptomycino-résistants. L'étude comparée des bactéries normales et mutantes montre que les bactéries H₇ sont incapables de synthétiser les porphyrines ; par contre, elles peuvent transformer la protoporphyrine en hémine. Les bactéries H₇ ne synthétisent pas de quantité appréciable de noyau porphyrinique, ce qui permet de supposer que le bloc génétique, dans la synthèse de l'hémine, est situé avant la synthèse des précurseurs porphyriniques de la protoporphyrine.

L'addition d'hémine pendant la culture des bactéries H₇ permet de faire réapparaître l'activité respiratoire ainsi que les activités

déshydrogénasiques, absentes chez les bactéries mutantes. L'étude comparative des bactéries H₇ et normales peut donc permettre de préciser quels sont, chez *Escherichia coli*, les systèmes enzymatiques dont la synthèse et l'activité dépendent directement ou indirectement de la présence de noyaux hémiques. Notons en particulier le cas de l'hydrogénase et celui de la succino-déshydrogénase.

Plusieurs auteurs ont constaté que l'aération des suspensions bactériennes en présence de cyanure de potassium inhibe fortement l'activité hydrogénasique de ces bactéries [14, 20, 21]. La combinaison cyanure de potassium-hématine ne se faisant que si le fer se trouve à l'état ferrique [14, 17], certains de ces auteurs ont pensé que l'hydrogénase pouvait être un enzyme à groupement prosthétique hémique. Or, l'étude du mutant H₇ nous montre que le rôle de l'hémine dans la formation de l'hydrogénase est indirect et que cet enzyme peut se former, dans certaines conditions, en l'absence totale d'hémine. Notons que d'après Shug et ses coll. l'hydrogénase de *Clostridium pasteurianum* serait une molybdo-flavoprotéine [22].

L'hypothèse des auteurs [23, 24] qui identifient la succino-déshydrogénase au cytochrome b₁ ne semble pas être confirmée par l'étude des bactéries H₇. En effet, dans certaines conditions, la présence d'hémine ou de catalase dans le milieu de culture permet aux bactéries mutantes de retrouver une forte activité succino-déshydrogénasique, sans pour autant présenter de bande visible du cytochrome b₁.

Nous avons constaté que la perte totale du cytochrome chez les bactéries H₇ était accompagnée de la perte de respiration en présence de divers substrats carbonés. Chez les levures [25, 26, 27], ainsi que chez un mutant de *Staphylococcus aureus* [28], ce parallélisme entre la richesse des cellules en cytochromes et la respiration a été déjà observé. Par contre, chez d'autres souches bactériennes, Waring et Werkman [29], ainsi que Schaeffer [6] ont observé une disparition des cytochromes sans que la respiration soit diminuée.

L'un des résultats les plus notables de notre étude est la constatation que le mutant H₇ forme l'apoenzyme de la catalase et que celle-ci peut être reconstituée *in vitro* par addition d'hémine à des extraits solubles de bactéries H₇. Ceci revient par conséquent à une résolution physiologique de la catalase, résolution qui, par les méthodes chimiques [30, 31, 32], avait jusqu'ici échoué, alors qu'elle avait été réalisée pour la peroxydase par Theorell et Maehly [33]. L'obtention de l'apoenzyme de la catalase sous forme réactivable permet d'étudier certaines de ses propriétés spécifiques telles que son affinité pour les porphyrines et de démontrer en particulier que l'apoenzyme forme des combi-

naisons stables non seulement avec l'hémine, mais également avec la protoporphyrine, l'hématoporphyrine, la mésoporphyrine et la deutéroporphyrine. En revanche, l'apoenzyme ne se combine pas avec l'uroporphyrine et avec la coproporphyrine.

Par sa sensibilité à l'hémine et à la protoporphyrine, le mutant H₇ d'*E. coli* présente des similitudes avec certaines souches d'*Hemophilus* [34, 35]. Mais le problème essentiel que pose l'isolement de ce mutant, est celui de l'action de la streptomycine dans la synthèse et l'utilisation du noyau porphyrinique. Il est très remarquable que, chez un organisme aussi différent d'*E. coli* que *Staphylococcus aureus*, Jensen et Thofern [28] aient isolé un mutant streptomycino-résistant présentant, comme le mutant H₇, une déficience en hémine. L'organisme étudié par ces auteurs ne respire pas, ne présente pas de bandes de cytochromes ni d'activité catalasique. L'hémine rétablit la croissance normale et permet la synthèse *in vivo* des trois enzymes étudiés. Ce mutant est incapable, contrairement au mutant H₇, de transformer la protoporphyrine en hémine.

Certaines observations avec le mutant H₇ suggèrent l'hypothèse d'une interférence de la streptomycine dans l'utilisation de l'hémine. L'inhibition par la streptomycine de la reconstitution *in vivo* de la catalase paraît, à cet égard, très significative. Le fait que la streptomycine n'a pas d'action *in vitro* permet, dans une certaine mesure, de délimiter cette action sans toutefois suggérer d'hypothèse précise.

RÉSUMÉ.

Certaines conditions de sélection nous permettent d'isoler régulièrement des variants d'*Escherichia coli* streptomycino-résistants, qui se distinguent des bactéries normales, non seulement par leur résistance à l'antibiotique, mais également par leur activité respiratoire nulle. Cultivés dans les conditions normales, ces organismes sont notamment dépourvus d'activité succino-déshydrogénasique et d'activité catalasique. Cultivées en présence d'hémine ou de protoporphyrine, ces bactéries présentent cependant une activité succino-déshydrogénasique considérablement accrue et une activité catalasique presque normale. On peut donc attribuer le manque d'activité respiratoire de ces bactéries à leur incapacité de synthétiser le noyau hémique. Cultivées en l'absence d'hémine, les bactéries mutantes synthétisent l'apoenzyme de la catalase ainsi que le démontre le fait que l'addition d'hémine *in vitro* à des extraits de ces bactéries fait réapparaître l'activité catalasique. La streptomycine n'a pas d'action sur la synthèse de l'apoenzyme de la catalase ni sur la reconstitution *in vitro* de

cet enzyme, mais semble bloquer l'utilisation de l'hémine exogène par les bactéries mutantes intactes.

SUMMARY

ON THE FORMATION OF RESPIRATORY ENZYMES
IN A STREPTOMYCIN-RESISTANT
AND HAEMIN-REQUIRING MUTANT OF *Escherichia coli*.

Certain specific conditions of selection allow the isolation of streptomycin-resistant mutants of *Escherichia coli* which are characterized by their extremely low respiratory activity. When cultivated under the usual conditions, these organisms are devoid of catalase and succinic-dehydrogenase activity. When haematin or protoporphyrin are added to the growth medium, the succinic dehydrogenase activity is considerably increased while catalatic activity is restored to normal. The low respiratory activity of these organisms should therefore be attributed to their inability to synthesize haem compounds.

However, even in the absence of exogenous haem, the mutant organisms are able to synthesize the apoenzyme moiety of catalase, as evidenced by the fact that addition of haemin to extracts of such bacteria results in virtually complete reconstitution of catalatic activity. The presence of streptomycin does not inhibit the synthesis of the apoenzyme moiety of catalase nor the *in vitro* union of the apoenzyme with haemin. Streptomycin however would seem to block the utilisation of exogenous haemin by intact bacteria.

*
**

Nous remercions vivement le D^r J. Monod pour tout l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail, ainsi que le D^r P. Slonimski.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BELJANSKI (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, 85, 463.
- [2] LWOFF (M.). *Recherches sur le pouvoir de synthèse des flagellés trypanosomides*. Monographie de l'Institut Pasteur, Masson et C^o, Paris, 1940.
- [3] BELJANSKI (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1955, 240, 374.
- [4] SHERIN (D.). *III^e Congr. intern. Biochim.*, Bruxelles, Rés. Commun., 1955, 170.
- [5] FUJITA (A.) et KODAMA (T.). *Biochem. Z.*, 1934, 273, 186.
- [6] SCHAEFFER (P.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1952, 9, 261.
- [7] GALE (E. F.). *Biochem. J.*, 1939, 33, 1025.
- [8] SCHAEFFER (P.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1952, 9, 362.

- [9] RIMINGTON (C.) *Onderstepoort J.*, 1936, 7, 567.
- [10] LEMBERG (R.) et LEGGE (J. W.). *Hematin Compounds and Bile Pigments*. Interscience Publishers, Inc., New York, 1949.
- [11] PAPPENHEIMER (A. M.). *J. biol. Chem.*, 1947, 167, 251.
- [12] PAULAIS (R.). *Thèse Sciences*, Paris, 1939.
- [13] BELJANSKI (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1955, 241, 1351.
- [14] HOBBERMAN (H. D.) et RITTENBERG (D.). *J. biol. Chem.*, 1943, 147, 211.
- [15] JOELIE (W. K.). *Aust. J. exp. Biol.*, 1950, 27, 321.
- [16] GEST (H.). *Bact. Rev.*, 1954, 18, 43.
- [17] HYNDMAN (L. A.) et coll. *J. Bact.*, 1953, 65, 522.
- [18] GOMORI (G.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1946, 62, 33.
- [19] SUMNER (J. B.) et SOMERS (G. F.). *Chemistry and Methods of Enzymes*. Academic Press, Inc., New York, 1947, 208.
- [20] BACK (K. J. C.) et coll. *Austral. J. Sci.*, 1946, 9, 25.
- [21] GREEN (M.) et WILSON (P. W.). *J. Bact.*, 1953, 65, 511.
- [22] SHUG (A. L.), WILSON (P. W.), GREEN (D. E.) et MAHLER (H. R.). *J. Am. Chem. Soc.*, 1954, 76, 3355.
- [23] BACH (S. J.), DIXON (M.) et ZERFAS (L. G.). *Biochem. J.*, 1946, 40, 229.
- [24] PAPPENHEIMER (A. M.) et HENDEE (E. D.). *J. biol. Chem.*, 1947, 171, 701.
- [25] EPHRUSSI (B.) et SLONIMSKI (P. P.). *Biochim. Biophys. Acta*, 1950, 6, 256.
- [26] YCAS (M.) et STARR (T. J.). *J. Bact.*, 1953, 65, 83.
- [27] SLONIMSKI (P. P.). *Formation d'enzymes respiratoires chez les levures*. Actualités biochimiques, Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1953.
- [28] JENSEN (J.) et THOFERN (E.). *Z. Naturforsch.*, 1953, 8 b, 600.
- [29] WARING (W. S.) et WERKMAN (C. H.). *Arch. Biochem.*, 1944, 4, 75.
- [30] AGNER (K.). *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, 1935, 235, 11.
- [31] TAUBER (H.) et KLEINER (I. S.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1939, 33, 391.
- [32] SUMNER (J. B.) et DOUNCE (A. L.). *J. biol. Chem.*, 1939, 127, 439.
- [33] THEORELL (H.) et MAEHLY (A. C.). *Acta Chem. Scand.*, 1950, 4, 422.
- [34] LWOFF (A.) et LWOFF (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1937, 59, 130.
- [35] GRANICK (S.) et GILDER (H.). *J. gen. Physiol.*, 1947, 30, 1.