

SYNTHÈSE ET UTILISATION DE L'AMIDON CHEZ UN FLAGELLÉ SANS CHLOROPHYLLE INCAPABLE D'UTILISER LES SUCRES

par

ANDRÉ LWOFF, HÉLÈNE IONESCO ET ANTOINETTE GUTMANN

Service de Physiologie microbienne, Institut Pasteur, Paris (France)

On connaît un certain nombre de microorganismes incapables d'utiliser les sucres comme aliment carboné. Ce sont des bactéries comme les *Moraxella* ou des flagellés appartenant à des groupes divers et possédant ou non de la chlorophylle: *Euglena* et *Astasia* (Eugléniens), *Polytoma*, *Chlorogonium* et *Hyalogonium* (Chlamydomonadines). Les flagellés synthétisent tous des réserves glucidiques figurées: paramylon chez les Eugléniens, amidon chez les autres, dont ils sont très abondamment pourvus à certains stades de l'évolution des cultures et qui diminuent ou même disparaissent à d'autres.

Le problème de la synthèse et de l'utilisation des polysaccharides par un micro-organisme incapable d'utiliser les sucres se trouvait posé. Nous avons étudié de ce point de vue le flagellé *Polytomella coeca*. Nos résultats ont été exposés dans une note préliminaire¹. *Polytomella* est un flagellé sans chlorophylle. Il se développe en culture bactériologiquement pure dans des milieux synthétiques avec un sel d'ammonium comme aliment azoté, de l'acide acétique ou de l'éthanol comme aliment carboné énergétique, les sels minéraux habituels et deux facteurs de croissance, le méthyl-4 β -hydroxyéthyl-5 thiazole et la méthyl-2 amino-4 aminométhyl-5 pyrimidine². Il possède la propriété de se multiplier bien entre p_H 3.0 et 8.0³, propriété précieuse qui a déjà été mise à profit pour l'examen d'un certain nombre de problèmes⁴.

Aucun sucre ne peut remplacer l'acide acétique ou l'éthanol pour la nutrition carbonée. En particulier, ni le glucose, ni le maltose, ni le saccharose, ni le tréhalose ne sont utilisables. Des essais pour obtenir des mutants utilisant les sucres ont échoué. Dans des milieux pauvres en aliment carboné, par exemple, éthanol à 1 p. 5000 ou à 1 p. 10000, c'est la teneur en éthanol qui limite la croissance. Dans ces milieux pauvres, les flagellés restent vivants pendant plus de 3 mois. Si un mutant capable d'utiliser un glucide apparaissait dans un milieu pauvre additionné de glucose, il y aurait multiplication abondante. Nous n'avons jamais observé ce phénomène. Il n'est naturellement pas possible d'exclure son existence, mais l'on peut dire que la probabilité de l'apparition d'un mutant utilisant les glucides est faible. Enfin, du glucose ajouté à des cultures en voie de développement en présence d'éthanol ne disparaît pas.

L'incapacité d'utiliser les glucides pour la nutrition est donc absolue. Comment les flagellés synthétisent-ils l'amidon, et comment l'utilisent-ils s'ils sont incapables de métaboliser les glucides. Tel est le problème qui va être examiné.

TECHNIQUE

Le milieu suivant a été utilisé: sulfate d'ammonium 1 g, $\text{SO}_4\text{Mg} + 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0.5 g, acétate de sodium 1 g, éthanol 3 ml, thiamine 0.01 mg, eau bidistillée 1 l, soude pour pH 7.0. Après stérilisation on ajoute du fer sous forme de citrate ferrique, stérilisé à part, pour obtenir une concentration finale de 10 mg/l.

On utilise pour l'alimentation carbonée un mélange d'acétate de sodium et d'éthanol afin que le pH ne s'éloigne pas trop de la neutralité. Le pH augmente en effet notablement lorsque l'aliment carboné est représenté par de l'acétate de sodium — libération d'ions Na^- — et diminue lorsque l'aliment carboné est représenté par de l'éthanol par suite de la libération non compensée des ions SO_4^{--} de l'aliment azoté. Avec le mélange utilisé, il n'y a pas de variation importante du pH, et il n'est pas nécessaire de tamponner le milieu. Seuls des milieux acides peuvent d'ailleurs être tamponnés efficacement sans inconvénient. Les flagellés ne supportent pas une concentration de phosphate M/25 à pH 7.0 alors qu'ils se développent à pH 4.6 dans des milieux renfermant des phosphates à concentration M/3.5.

TABLEAU I

VARIATIONS DE LA RÉSISTANCE AU PHOSPHATE EN RELATION AVEC LE pH

M/	Après 2 jours					Après 6 jours			Après 4 jours	
	7.4	7.2	7.0	6.6	4.6	7.4	7.2	7.0	6.6	4.6
45	++	++	++	++	++					
25				++	++					
20	o	o	±			++	++	++		
15	o	o	o	±	++	o	o	+		
10			o	o	++			o	+	
4.5					±					
3.5					±					++

++ Culture abondante, plus de 1000 flagellés/ μl

+ 200 à 1000 flagellés/ μl

± 1 à 20 flagellés/ μl

o moins de 1 flagellé/ μl

Les phosphates utilisés sont tous des phosphates *R.A.L.* ou *Merck*, qualité *Sørensen* ou "pour analyse".

L'ensemencement est effectué avec 20 ml d'une culture jeune dans des ballons renfermant 4 litres de milieu aérés par barbotage d'air et maintenus à 24°. Le barbotage doit être ménagé au début afin de ne pas diminuer trop la tension de CO_2 . Dans ces conditions, on obtient en 3 jours des cultures très abondantes. Celles-ci sont centrifugées dans une centrifugeuse SHARPLESS. A grande vitesse, les flagellés éclatent. La pâte blanchâtre est broyée avec du sable fin lavé. Le broyat est mis, suivant les cas, en suspension dans un tampon de phosphate M/100 ou de citrate M/50 de pH 7.0. Une première centrifugation à faible vitesse élimine avec le culot les grains d'amidon et des débris cellulaires. Le liquide trouble qui surnage est centrifugé à 12000 tours dans une centrifugeuse angulaire et le culot remis en suspension dans un tampon.

MISE EN ÉVIDENCE D'UNE PHOSPHORYLASE

Les préparations enzymatiques sont additionnées d'un tampon de phosphate et d'amidon soluble. La concentration en phosphate est donnée dans le Tableau II. La concentration finale en amidon est de 2 à 5 mg/ml. On constitue un témoin sans amidon. Les tubes additionnés de toluène sont placés au bain-marie à 24°. Après traitement par l'acide trichloracétique, le phosphate minéral est dosé par la méthode de FISKE ET SUBBAROW⁵. Le Tableau II montre les résultats de quelques expériences. On voit qu'il y a disparition du phosphate minéral en présence d'amidon.

TABLEAU II
DISPARITION DU PHOSPHORE MINÉRAL EN PRÉSENCE
D'AMIDON

	A	B	C
Enzyme témoin*	47.5	58.5	49.5
Enzyme + amidon	37.5	52.5	39

P minéral en $\mu\text{mol/ml}$.

* La teneur en P minéral dans les préparations témoins est identique au départ et à la fin de l'expérience.

RECHERCHE DU GLUCOSE-1-PHOSPHATE

Nous avons donc cherché à mettre en évidence le glucose-1-phosphate. Il n'est pas possible d'éliminer des préparations brutes le phosphate minéral par le réactif ammoniaco-magnésien car le glucose-1-phosphate est coprécipité.

Nous avons donc utilisé la technique de LE PAGE et UMBREIT, variante comportant la précipitation par l'éthanol, au premier stade, des sels de Ba. Si les opérations sont répétées, la plus grande partie du P minéral est éliminée. Le surnageant, après la dernière centrifugation destinée à éliminer le sulfate de Baryum est amené à p_H 8.2 avec de la potasse et le sel de K de l'acide glucose-1-phosphorique précipité par l'alcool est séché sous vide.

L'hydrolyse par ClH M à 100° (et non M/10 ainsi qu'il a été imprimé par erreur dans notre note préliminaire) libère du phosphate minéral. L'hydrolyse est complète en 7 minutes. Elle libère aussi un sucre réducteur qui a été identifié au glucose par la forme cristalline de son osazone et aussi par l'action spécifique de la glucose-oxydase (notatine). Le dosage a été effectué par la méthode de KEILIN ET HARTREE⁶ à la notatine et par la méthode de SOMOGYI. Le tableau suivant montre que les deux techniques donnent des résultats identiques et que le glucide et le phosphate sont en quantités sensiblement équi-moléculaires.

TABLEAU III
DOSAGE DU GLUCOSE ET DU PHOSPHORE DANS DEUX HYDROLYSATS
($\mu\text{mol/ml}$)

	A	B
Glucose: méthode de SOMOGYI	2.05	13.7
Glucose: méthode de KEILIN ET HARTREE	2.04	
P minéral*	1.86	12.8

* Après soustraction du P minéral trouvé avant hydrolyse: A 0.15; B 1.7 μmol .

Le composé isolé à partir des préparations présente donc les propriétés suivantes: sels de Ba soluble à p_H 8.2 et précipité par 4 vol. d'alcool. Pas de précipitation par le réactif ammoniaco-magnésien (après purification). Hydrolyse complète en 7 minutes à 100° par ClH M. Présence de glucose et de phosphate en quantités équi-moléculaires. Il s'agit donc bien de glucose-1-phosphate.

En présence de glucose-1-phosphate (préparé avec la phosphorylase de la pomme de terre suivant la technique de HANES) et de dextrine comme amorce, les préparations

enzymatiques libèrent du phosphate minéral. Les préparations n'ayant pu être débarrassées des traces d'amylase, la synthèse d'amidon n'a pu être mise en évidence. Notons aussi qu'il n'apparaît pas de sucres réducteurs au cours de la libération du P minéral. Il nous paraît fort vraisemblable que l'action de la phosphorylase de *Polytomella* comme celle des phosphorylases classiques étudiées par W. KIESSLING⁷, C. S. HANES⁸ et par C. F. CORI, G. SCHMIDT ET G. T. CORI⁹ est réversible.

ESSAI DE PURIFICATION DE L'ENZYME

a) La préparation est traitée par le sulfate d'ammonium au tiers de saturation. Le surnageant reste actif. Par contre, l'activité passe dans le culot après précipitation par le sulfate d'ammonium à demi-saturation.

b) Si la préparation est centrifugée dans une centrifugeuse angulaire de SERVALL à 12000 tours par minute pendant 10 minutes, la fraction active est dans le culot. L'enzyme est lié à des granules qui sont visibles au microscope, mais que nous n'avons pas identifiés.

Cette centrifugation élimine la plus grande partie d'une amylase que nous n'avons cependant pas pu, même après centrifugations répétées, éliminer des granules contenant la phosphorylase. D'autres essais de purification n'ont pas été tentés.

REMARQUES SUR L'AMYLASE

Les préparations d'amylase dans un tampon citrate M/20 ne donnent pas de sucre réducteur en 2 h aux dépens de l'amidon, mais uniquement des dextrines. Par contre, les préparations maintenues 24 h sous toluène en l'absence de phosphate minéral montrent une légère activité réductrice. Le sucre, qui est vraisemblablement du maltose, n'a pas été identifié. On sait que le maltose n'est pas utilisé par *Polytomella coeca*. Si donc la, ou les amylases intervenaient seules dans l'utilisation de l'amidon, leur action aboutirait à un glucide qui serait perdu pour les flagellés en culture bactériologiquement pure. Il est fort probable que l'amylase, ou des amylases, interviennent dans les premiers stades de l'utilisation des grains d'amidon, et que les dextrines produites au début de l'attaque sont phosphorylées et donnent du glucose-1-phosphate avant que le stade glucide réducteur ne soit atteint.

DISCUSSION

On connaît jusqu'ici deux voies de biosynthèse de l'amidon : par la phosphorylase classique (C. HANES, C. ET G. CORI) et par l'amyloamylase (J. MONOD ET A. M. TORRIANI¹⁰). Ces deux enzymes représentent d'ailleurs conformément aux idées exprimées par DOUDOROFF, BARKER ET HASSID¹¹ et par A. M. TORRIANI ET J. MONOD¹² des transglucosidases.

Le défaut de l'utilisation du maltose et des autres disaccharides permet d'exclure l'hypothèse d'une synthèse de l'amidon chez *Polytomella* par une amyloamylase ou par un enzyme du même type. L'existence d'une phosphorylase suffit à rendre compte de la synthèse du polysaccharide.

Admettons que cette phosphorylase soit responsable de la synthèse de l'amidon chez le flagellé. Deux questions restent posées.

1. *Pourquoi les flagellés sont-ils incapables d'utiliser les glucides et, en particulier, le glucose?* Si les flagellés possédaient une hexokinase et une phosphoglucomutase, ils seraient bien entendu capables de synthétiser le glucose-1-phosphate. L'absence de ces deux enzymes, ou d'un seul d'entre eux, suffit à expliquer le défaut d'utilisation du glucose. Nous avons en tous cas constaté que l'hexose-diphosphate mis en présence de préparations enzymatiques du flagellé n'est pas attaqué.

2. *Comment les flagellés synthétisent-ils le glucose-1-phosphate?* Cette question est actuellement à l'étude. L'hypothèse la plus simple est celle d'une synthèse par condensation aldolique sous l'influence d'un enzyme, d'acide dioxyacétone-phosphorique et de D-aldéhyde-glycérique. L'existence de cette réaction chez les levures a été démontrée par les recherches d'OTTO MEYERHOF¹³.

Quoi qu'il en soit, le flagellé *Polytomella coeca*, comme beaucoup de flagellés avec ou sans chlorophylle, synthétise de l'amidon et est incapable d'utiliser les glucides. Le glucose n'apparaît donc pas comme un métabolite intermédiaire obligé entre les aliments carbonés minéraux ou organiques et les polysaccharides. Des organismes peuvent synthétiser l'amidon et l'utiliser sans que le glucose apparaisse dans ce cycle autrement que sous forme phosphorylée.

RÉSUMÉ

1. Le flagellé *Polytomella coeca* synthétise et utilise l'amidon. Ce flagellé est incapable d'utiliser les glucides pour son alimentation carbonée.

2. Le flagellé possède une phosphorylase: du glucose-1-phosphate a été isolé à partir de préparations enzymatiques additionnées d'amidon soluble et de phosphate minéral.

3. Le problème de la synthèse du glucose-1-phosphate n'a pas été résolu.

4. Des organismes peuvent synthétiser l'amidon et l'utiliser sans que le glucose apparaisse dans ce cycle autrement qu'en sous forme phosphorylée.

SUMMARY

1. The flagellate *Polytomella coeca* synthesizes and utilizes starch. This flagellate is unable to utilize the sugars for its carbon-nutrition.

2. The flagellate contains a phosphorylase. Glucose-1-phosphate has been isolated from enzyme preparations to which soluble starch and mineral phosphate were added.

3. The problem of the synthesis of glucose-1-phosphate has not been solved.

4. Organisms exist, which can synthesize and utilize starch, glucose appearing in the cycle only in phosphorylated form.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Der Flagellat *Polytomella coeca* baut Stärke auf und verwendet sie. Dieser Flagellat ist unfähig, die Zucker für seine Kohlenstoff-Nahrung zu verwenden.

2. Der Flagellat enthält eine Phosphorylase: Glucose-1-phosphat wurde aus Enzym-Präparaten isoliert, zu denen lösliche Stärke und mineralisches Phosphat zugegeben worden waren.

3. Das Problem der Synthese des Glucose-1-phosphats ist noch ungelöst.

4. Es gibt Organismen, welche Stärke aufbauen und abbauen können, ohne dass Glucose in diesem Zyklus erscheint, ausser in phosphorylierter Form.

BIBLIOGRAPHIE

¹ A. LWOFF, H. IONESCO ET A. GUTMANN, *Compt. rend.*, 228 (1949) 342-344.

² A. LWOFF ET H. DUSI, *Compt. rend.*, 205 (1937) 630; *Compt. rend. soc. biol.*, 127 (1938) 1408.

³ A. LWOFF, *Ann. inst. Pasteur*, 66 (1941) 407.

- ⁴ A. LWOFF, F. NITTI, MME J. TREFOUËL ET V. HAMON, *Ann. inst. Pasteur*, 67 (1941) 9.
- ⁵ C. H. FISKE ET Y. SUBBAROW, *J. Biol. Chem.*, 81 (1929) 629.
- ⁶ D. KELLIN ET E. F. HARTREE, *Biochem. J.*, 42 (1948) 230.
- ⁷ W. KIESSLING, *Naturwissenschaften*, 27 (1939) 129.
- ⁸ C. S. HANES, *Proc. Roy. Soc., B*, 128 (1939-1940) 421-450.
- ⁹ C. F. CORI, G. SCHMIDT ET G. T. CORI, *Science*, 89 (1939) 464.
- ¹⁰ J. MONOD ET A. M. TORRIANI, *Compt. rend. acad. sci.*, 227 (1948) 240-242.
- ¹¹ M. DOUDOROFF, H. A. BARKER ET W. Z. HASSID, *J. Biol. Chem.*, 168 (1947) 725-746.
- ¹² A. M. TORRIANI ET J. MONOD, *Compt. rend. acad. sci.*, 228 (1949).
- ¹³ O. MEYERHOF, *Bull. soc. chim. biol.*, 20 (1938) 1033-1042.

Reçu le 9 mars 1949