

CONTRIBUTION À L'ÉTUDE  
DE LA FERMENTATION ET DE LA RESPIRATION DE  
*ESCHERICHIA COLI*

I. ACTION DE QUELQUES INHIBITEURS SUR LA RESPIRATION ET LA  
FERMENTATION DE *ESCH. COLI*

par

EUGÈNE AUBEL, ALBERT JEAN ROSENBERG ET JEKISIEL SZULMAJSTER  
*Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris (France)*

De nombreux travaux, dont on trouvera la référence des principaux au cours de ce mémoire, ont déjà été consacrés à la question. Il reste pourtant bien des points obscurs. On ne connaît pas avec précision la nature du système respiratoire de *Esch. coli*, ni même si l'on peut parler avec certitude d'un système respiratoire. On n'en sait guère plus en ce qui concerne les relations entre les systèmes respiratoire et fermentatif, ni même, dans le cas qui nous occupe, si l'on peut faire une distinction réelle entre ces deux systèmes. Bien des points sont encore à élucider en ce qui concerne le mode d'action des inhibiteurs. C'est afin de répondre en partie à ces questions et à quelques autres que nous avons entrepris les expériences dont nous allons rendre compte dans ce mémoire et dans ceux qui suivent.

TECHNIQUES

*Bactéries.* Tout ce travail a été effectué sur une souche de *E. coli* (M), provenant du SERVICE DE PHYSIOLOGIE MICROBIENNE de l'INSTITUT PASTEUR de Paris. Cependant, certaines expériences (expériences manométriques) ont été faites parallèlement sur une deuxième souche de *E. coli* (*Coli communis*) provenant de l'INSTITUT LISTER de Londres.

*Milieu de culture*

Le métabolisme et le système enzymatique d'une bactérie dépendent non seulement de sa composition intrinsèque, mais aussi des conditions dans lesquelles la croissance se produit.

Pour ces raisons, nous avons, au cours de ce travail, toujours cultivé les bactéries dans les mêmes conditions et sur un milieu de même composition :

Glucose	10 g
Peptone bactériologique Byla	10 g
Phosphate bipotassique	2 g
Eau distillée, Q.S.	1000 ml

La souche standard est maintenue sur gélose inclinée. La gélose (3%) est ajoutée au milieu ci-dessus, en remplaçant l'eau distillée par un extrait de viande de bœuf. Les tubes sont scellés et gardés à la glacière.

*L'âge des bactéries* a une très grande importance. Nous avons, en effet, remarqué que les bactéries provenant d'une culture jeune produisent, aux dépens du glucose, plus d'acide acétique et moins d'acide lactique, que les bactéries d'une culture plus âgée.

Toutes nos expériences ont été faites avec des bactéries provenant d'une culture âgée de 16 heures, effectuées à l'air, dans des erlenmeyers à 37°. L'ensemencement était fait avec 2 ml (pour 100 ml de milieu) à partir d'une culture âgée de 6 heures, en milieu liquide de même composition que ci-dessus.

*La suspension bactérienne* utilisée provient, comme nous venons de le dire, d'une culture de 16 heures. Après centrifugation, les bactéries sont lavées une fois avec du chlorure de sodium à 9%, puis remises en suspension dans du chlorure de sodium à 9%. On y fait passer, comme l'a recommandé QUASTEL, pendant une heure, un courant d'air comprimé. Dans certaines expériences avec inhibiteur, celui-ci est ajouté à la suspension juste avant le passage de l'air. On a ainsi un contact préalable des bactéries avec l'inhibiteur, ce qui peut, parfois, réduire les erreurs éventuelles dues à la perméabilité.

On centrifuge ensuite les bactéries et on les met en suspension dans un tampon phosphate M/15 à  $p_H$  6.8. Le poids sec (25 mg environ pour 100 ml de milieu) a été à peu près constant dans chaque expérience.

Nous avons préféré cette technique à celle qui consiste à faire un stock de "resting-bacteria" (pour 8 à 10 jours), que l'on conserve à la glacière. Nous avons en effet remarqué que, dans ce dernier cas, l'activité ( $QO_2$ ) des bactéries diminue de jour en jour et que, par conséquent, les expériences ne sont plus comparables.

#### Concentrations des substrats

Avant de commencer les expériences, il était nécessaire de déterminer les concentrations optima de chaque substrat à utiliser.

Pour déterminer celles-ci, nous avons mis 1 ml de suspension bactérienne, de densité optique constante (environ 2.5 mg de poids sec), en présence des substrats donnés, à des concentrations différentes, le volume total étant de 2.5 ml. La concentration correspondant à la consommation maxima d'oxygène dans un temps déterminé sera considérée comme étant la concentration optima pour les expériences futures. Nous avons ainsi déterminé des concentrations pour trois substrats seulement : hexose (glucose), corps en  $C_3$  (pyruvate), et un acide en  $C_4$  (succinate) ; Fig. 1. Ces courbes montrent que, pour les substrats énoncés, les concentrations finales à utiliser sont respectivement : M/90, M/30 et M/60. Ces concentrations, une fois déterminées, ont été utilisées pour tous les hexoses, corps en  $C_3$  et acides en  $C_4$ .

Nous avons remarqué que certains substrats, surtout les dérivés phosphorylés, ne sont pas du tout ou très peu, attaqués par *E. coli* dans nos conditions expérimentales. Ainsi, l'acide 2-phosphoglycérique ne l'est pas du tout ; son dérivé, l'acide 3-phosphoglycérique l'est seulement en aérobiose. Les échanges gazeux que l'on observe avec les dérivés phosphorylés (dégagement d'anhydride carbonique en anaérobiose ou consommation d'oxygène à l'air) sont faibles en comparaison de ceux que l'on obtient dans les mêmes conditions en présence du glucose ou du pyruvate. Il convient de remarquer que la résistance du phosphoglycérate à la fermentation, et parfois à la respiration (*Coli M.*),

ne signifie pas obligatoirement que cet ester n'est pas un corps intermédiaire dans la dégradation du glucose par *E. coli*. Le rôle complexe qu'il peut jouer dans le métabolisme, ou même simplement les questions de perméabilité, peuvent facilement expliquer, une inertie qui n'est qu'apparente.

Dans ce premier mémoire nous rendrons compte seulement des expériences manométriques effectuées dans l'appareil de WARBURG, suivant la méthode classique.

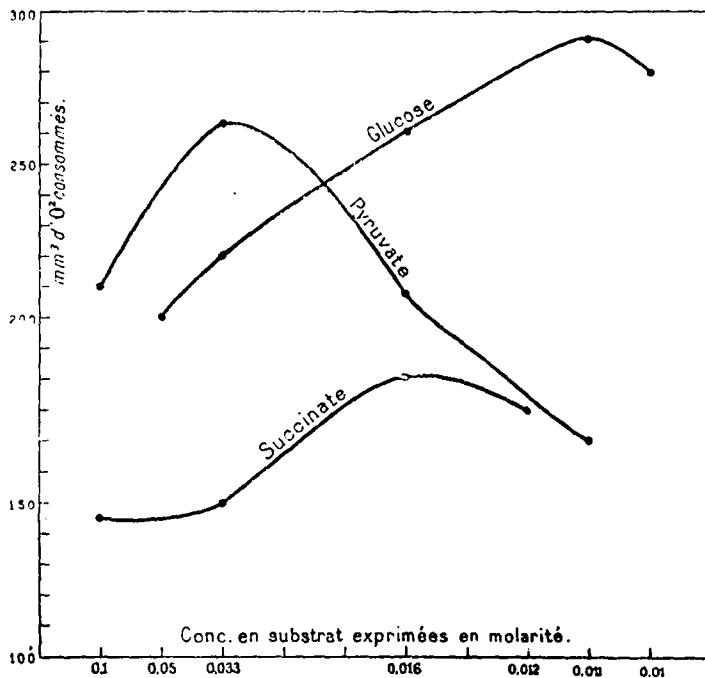


Fig. 1

#### Action du malonate de sodium

L'action du malonate sur les oxydations biologiques a été étudiée pour la première fois par THÜNBERG<sup>1</sup>, puis par QUASTEL<sup>2</sup> et QUASTEL ET WOOLDRIGE<sup>3</sup>, qui ont constaté son action inhibitrice spécifique sur la succino-déshydrogénase du bacille *Coli*. SZENT-GYÖRGYI<sup>4</sup> a montré, grâce à l'inhibition spécifique du malonate, l'importance des acides en C<sub>4</sub> dans les oxydations biologiques.

KREBS ET EGGLESTON<sup>5</sup> ont montré la nature compétitive de cette inhibition. Celle-ci dépend non seulement de la concentration en malonate, mais aussi du rapport malonate-succinate. Ils ont vu également que l'acide fumarique peut annuler cette inhibition.

ROSENBERG<sup>6</sup> a montré que le bore et l'inositol rendent réversible l'action du malonate sur la croissance de *C<sub>1</sub>-saccharobutyricum*. D'après les travaux de DAS<sup>7</sup> et BREUSCH<sup>8</sup>, on sait que l'acide malonique inhibe aussi la déshydrogénération des acides oxaloacétique, lactique et malique.

#### Expériences

Les chiffres du Tableau I montrent l'oxydation du glucose par *E. coli* (M.). L'inhi-

Bibliographie p. 254.

TABLEAU I

ACTION DE *E. coli* SUR LE GLUCOSE, LE PYRUVATE ET LE SUCCINATE EN AÉROBIOSE ET EN PRÉSENCE DE MALONATE DE SODIUM

1 ml de suspension bactérienne (3 mg environ de poids sec) dans tampon phosphate M/15 à pH 6.8; 1 ml de substrat (glucose M/90, pyruvate M/30 ou succinate M/60, conc. finale); 0.5 ml de malonate (concent. finale M/5); 0.2 ml de soude à 10%. Résultats exprimés en millimètres cubes d'oxygène consommé.

Bactéries en contact pendant une heure avec l'inhibiteur, avant l'addition du substrat.

a. *Coli Monod*

Substrat	10 min		20 min		40 min		60 min	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Glucose	53	57	96	112	184	213	270	293
Glucose + malonate	42	43	83	92	164	180	257	265
Inhibition p.cent		23		15.5		13.5		7
Pyruvate	63	66	113	112	209	212	294	300
Pyruvate + malonate	27	35	49	57	91	112	141	167
Inhibition p.cent		52		53		52		48
Succinate	27	23	52	46	107	95	165	180
Succinate + malonate	2	4	5	6	16	17	29	28.5
Inhibition p.cent		87		89		83		83

b. *Coli communis*

Substrat	10 min	20 min	40 min	60 min	90 min	Inhib. moyenne p.cent
Glucose	42	75	140	205	290	55
Glucose + malonate	17	32	66	92	148	
Pyruvate	38	74	131	190	270	50
Pyruvate + malonate	18	35	66	98	147	
Succinate	35	71	153	236	378	96
Succinate + malonate	0	6	7	10	15	

bition dans les dix premières minutes est de l'ordre de 23%, mais diminue à la fin jusqu'à 5-7% et parfois à 0. L'inhibition en présence d'acide pyruvique est de 50% environ. Par contre, en présence d'acide succinique, l'inhibition est très forte et constante (80-90%). Une conclusion importante, confirmant celle de CLIFTON<sup>9</sup> avec d'autres substrats, se dégage déjà de cette expérience: l'oxydation du glucose par *E. coli* (M) ne passe pas par les acides en C<sub>4</sub>. Ajoutons que les résultats ne changent pas, même si l'on met les bactéries en contact avec le malonate pendant une heure avant l'expérience.

Dans une expérience parallèle nous avons obtenu, avec le *Coli communis*, une *Bibliographie p. 254.*

inhibition de 50% de l'oxydation du glucose (Tableau 1b). L'inhibition en présence d'autres substrats reste sensiblement la même qu'avec *Coli* (M.).

L'inhibition de l'oxydation de l'acide pyruvique, qui est de l'ordre de 50%, sera expliquée dans un mémoire ultérieur.

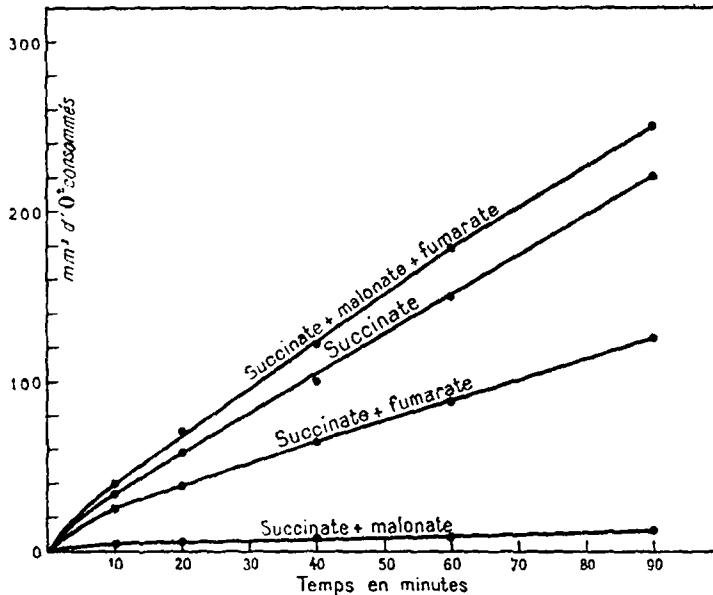


Fig. 2. Réversibilité de l'inhibition due au malonate

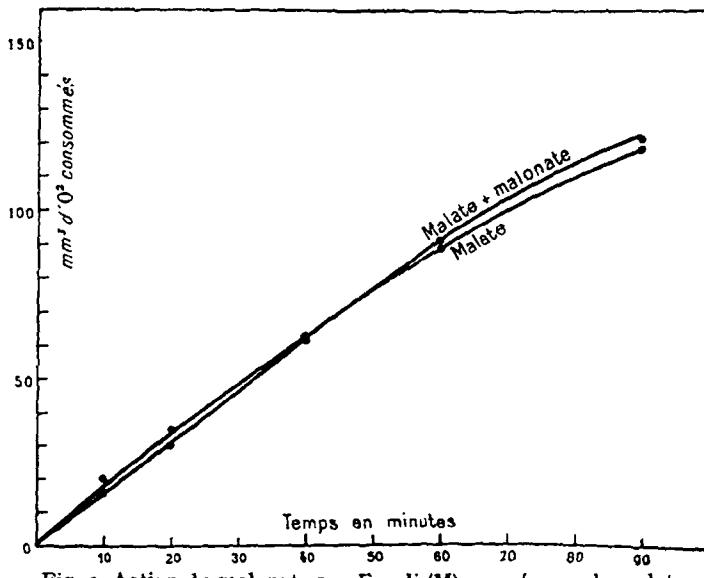


Fig. 3. Action du malonate sur *E. coli* (M) en présence de malate

La réversibilité de l'inhibition par le malonate a été vérifiée par l'action du fumarate. La Fig. 2 résume nos résultats. L'oxydation de l'acide malique n'est pas inhibée par le malonate, comme l'avait déjà montré QUASTEL<sup>3</sup> (Fig. 3).

Bibliographie p. 254.

Le Tableau II montre, à l'aide des deux souches de *E. coli*, l'action du malonate sur les dérivés phosphorylés (en aérobiose).

Quand on étudie comparativement l'action du malonate sur l'oxydation du glucose et sur celle de ses dérivés phosphorylés, on constate une grande différence sur laquelle nous reviendrons dans d'autres mémoires.

Le Tableau III résume l'action du malonate sur *E. coli* en anaérobiose. Certaines de ces expériences ont été faites comparativement à l'air et en anaérobiose, avec la même suspension bactérienne et les mêmes substrats. On observe une inhibition générale, qui est particulièrement élevée dans le cas du glucose et de l'hexose diphosphate.

Notons cependant que deux années plus tard nous n'avons pu retrouver, en présence de glucose, le même résultat, l'inhibition étant devenue beaucoup plus faible. Pourtant, chaque expérience avait été répétée au moins six à sept fois avant de conclure à la validité des résultats. Il s'agit ici, sans doute, d'un phénomène de mutation très répandu chez les bactéries et, en particulier, chez *E. coli*. Un cas analogue (changement saisonnier du pouvoir oxydatif vis-à-vis d'un substrat) a été déjà observé par BARRON ET JACOBS<sup>10</sup> sur un streptocoque.

#### Résumé de l'action du malonate dans les expériences manométriques

Le malonate, considéré généralement comme un fort inhibiteur de la succinodéshydrogénase, est très actif, en effet, sur cet enzyme dans les deux souches de *E. coli*. Mais, tandis qu'il est sans effet sur l'oxydation aérobiose du glucose chez *E. coli* (M.), il inhibe à 50% cette inhibition chez *E. coli communis*. Entre ces deux souches de *E. coli*, il faut souligner cette différence, à laquelle d'autres viendront s'ajouter (voir également Tableau II).

D'autre part, la dégradation aérobiose et anaérobiose des hexoses et des corps en C<sub>8</sub> est fortement inhibée par le malonate.

TABLEAU II

ACTION DE *E. coli* SUR LES HEXOSES PHOSPHATES ET SUR LE PHOSPHOGLYCÉRATE EN AÉROBIOSE ET EN PRÉSENCE DE MALONATE DE SODIUM

1 ml de suspension bactérienne dans le tampon phosphate pH 6.8 (M/15); 1 ml de substrat (hexose M/90 ou triose M/30, concen. finale); 0.5 ml de malonate, conc. finale M/5; 0.2 ml de soude à 10%. Les résultats sont exprimés en QO<sub>2</sub>.

C.M. = *Coli Monod*

C.C. = *Coli communis*

Substrat	QO <sub>2</sub>		Inhibit. p.cent	
	C.M.	C.C.	C.M.	C.C.
Hexose-monophosphate	85			
Hexose-monophosphate + malonate	16		81	
Hexose-diphosphate	90		63	
Hexose-diphosphate + malonate	8		18	
3-phosphoglycérate	24		22	
3-phosphoglycérate + malonate	6		10.5	
			75	
			52	

TABLEAU III

ACTION DE *E. coli* SUR LE GLUCOSE, L'HEXOSE-PHOSPHATE ET LE PYRUVATE  
EN ANAÉROBIOSE ET EN PRÉSENCE DE MALONATE

1 ml de suspension bactérienne dans le tampon phosphate à pH 6.8; 1 ml de substrat (hexoses à M/90 ou acide pyruvique à M/30, concentrations finales); 0.5 ml de malonate M/5, conc. finale.

Substrat	Inhibit. p.cent			
	Q CO <sub>2</sub>	Q H <sub>2</sub>	Q CO <sub>2</sub>	Q H <sub>2</sub>
Glucose	180	153	100	100
Glucose + malonate	0	0		
Hexose-monophosphate		H <sub>2</sub> { 28		
Hexose-monophosphate + malonate		8.5		H <sub>2</sub> { 70
Hexose-diphosphate		CO <sub>2</sub> { 53		
Hexose-diphosphate + malonate		2.6		CO <sub>2</sub> { 94.5
Pyruvate	180	158	79	60
Pyruvate + malonate	37	64		

#### Action du fluorure de sodium

La première remarque sur l'action du fluorure dans la fermentation a été faite par EFFRON<sup>11</sup>. L'effet inhibiteur du fluorure sur la glycolyse du sang a été étudiée par MACLEOD<sup>12</sup> et par EVANS<sup>13</sup>. EMBDEN<sup>14, 15</sup> et ses collaborateurs ont montré que la dégradation de l'hexose diphosphate dans le muscle est inhibée par le fluorure. D'autre part, KAY<sup>16</sup> a vu que le fluorure inhibe les synthèses des esters phosphoriques. LIPMANN<sup>17</sup> étudiant la levure et le muscle, conclut que l'inhibition par le fluorure est due à la formation d'un complexe avec le fer, analogue à celui de la fluorométhémoglobin. DICKENS ET SIMOR<sup>18</sup> ont étudié l'action de fluorure de sodium sur la glycolyse anaérobiose de différents tissus de mammifères (normaux et cancéreux). Ces auteurs ont montré que l'inhibition est réversible: elle empêche la glycolyse sans détruire le pouvoir glycolytique.

RUNNSTRÖM, GURNEY ET SPERBER<sup>19</sup> ont montré qu'une molécule d'enzyme peut se combiner avec plusieurs atomes de fluor, que l'affinité de l'enzyme pour le fluorure varie, comme dans le cas du cyanure, avec les différents tissus et que les concentrations de fluorure qui inhibent la glycolyse n'affectent pas la respiration. Pour inhiber cette dernière, il faut des concentrations extrêmement fortes. MASSART ET DUFAIT<sup>20</sup> ont vu que les métaux lourds tels que Mg<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>, Co<sup>++</sup>, Ni<sup>++</sup>, Fe<sup>++</sup>, peuvent réactiver les estérasées et les phosphatases inhibées par le fluorure. Pour ces auteurs, c'est une preuve que cette inhibition est due à la formation d'un complexe avec un métallo-protéide dont le métal peut être bi ou trivalent. MEYERHOF ET LOHMAN<sup>21</sup> ont montré que l'enzyme le plus sensible au fluorure est l'énoïlase et MEYERHOF ET KIESLING<sup>22</sup> ont remarqué que la sensibilité de l'énoïlase dans le muscle est d'autant plus faible que l'extrait est dialysé plus longtemps et que la concentration en phosphore minéral du milieu est plus petite. WARBURG ET CHRISTIAN<sup>23</sup> ont recherché l'action du fluorure sur une énoïlase-Mg cristallisée très pure. Ils ont constaté qu'en présence de fluorure, il y a formation d'un complexe Mg-fluorophosphate.

Enfin, BOREI<sup>24</sup> a montré que l'inhibition par le fluorure se fait de deux façons différentes: dans la fermentation il agit sur l'énolase et dans la respiration le fluorure doit attaquer, dans la chaîne d'oxydations, un transporteur dont le potentiel serait voisin de celui des cytochromes c et b. RUNNSTRÖM<sup>25</sup>, <sup>26</sup> et ses collaborateurs ont montré que certains substrats tels que le glucose, peuvent former avec l'enzyme sensible au fluorure des composés ("protected units") qui protègent la respiration contre le fluorure. Plus il y a de substrat, plus il y a d'unités protectrices formées, et plus faible sera l'inhibition.

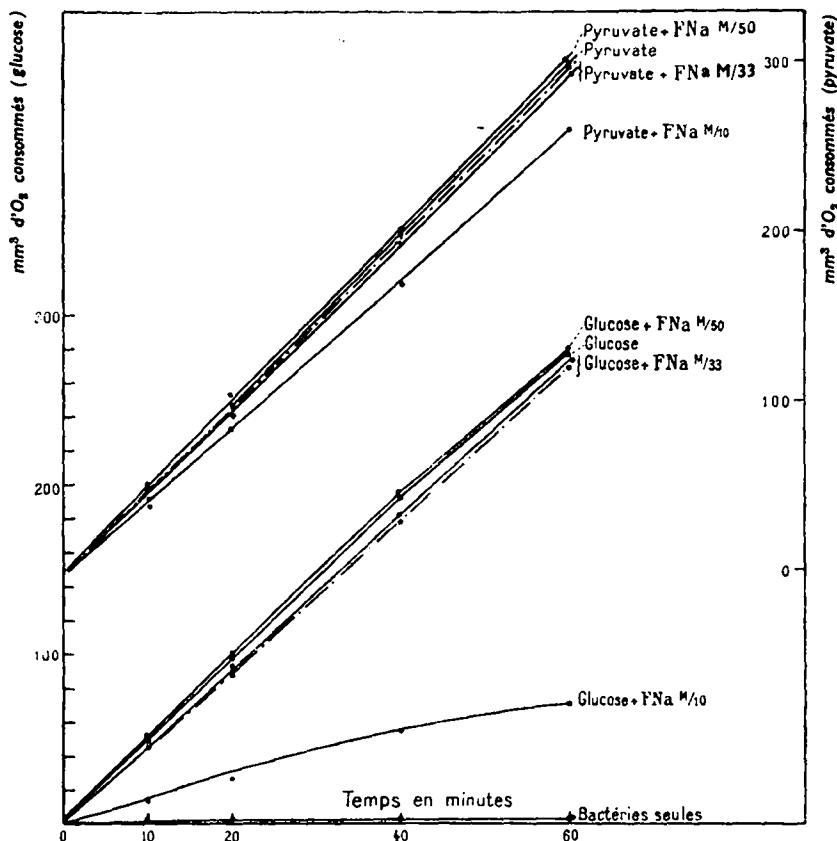


Fig. 4. Action du FNa sur *E. coli* (M. et C.) en présence de glucose et de pyruvate (aérobiose)

Pour compléter cet aperçu sur l'action du fluorure, il convient d'ajouter que CHAIX ET FROMAGEOT<sup>28</sup> ont trouvé une autre réaction sensible au fluorure. Il s'agit de l'inhibition totale du métabolisme anaérobiose de l'acide lactique en présence des bactéries propioniques.

#### Expériences en aérobiose

Nos premières expériences manométriques avec le fluorure de sodium ont été faites sans prendre de précautions spéciales, l'inhibiteur étant ajouté en même temps que le substrat.

Les courbes de la Fig. 4 montrent l'action du fluorure de sodium à différentes

concentrations chez *E. coli* (M.) en présence de glucose ou de pyruvate. On y voit que cet inhibiteur, aux concentrations M/50 et M/33, n'a pas d'effet sur la respiration de *E. coli* en présence des substrats ci-dessus. Seule la concentration M/10 inhibe à 75% l'oxydation du glucose, et à 15% celle du pyruvate. Considérant la concentration M/10 très forte pour un inhibiteur auquel certains enzymes sont particulièrement sensibles, nous avons essayé la concentration M/33. Les courbes en trait pointillé montrent qu'à cette concentration, le fluorure n'a pas plus d'effet sur le *Coli communis* que sur le *Coli Monod*.

Devant ces résultats il était normal d'étudier immédiatement l'action du fluorure de sodium en présence des intermédiaires phosphorylés.

Le Tableau IV montre qu'en présence des dérivés phosphorylés, on obtient une inhibition relativement forte (75% avec C.M.) avec l'hexose monophosphate et plus faible (50% environ) avec l'acide phosphoglycérique. Mais avec l'hexose diphosphate de magnésium l'inhibition tombe à 6%. Avec le *Coli communis*, l'inhibition est de 30% avec l'hexose monophosphate et nulle avec l'hexose diphosphate.

D'autre part, nous avons vu, comme le montre le Tableau V, qu'en présence des acides en C<sub>4</sub> l'inhibition par le fluorure est presque complète avec les deux souches de *Coli*.

Constatant une différence entre l'action du fluorure sur l'oxydation du glucose ou de l'hexose diphosphate d'une part, et celle des autres dérivés phosphorylés d'autre part, nous avons pensé que la perméabilité devait jouer un rôle. En effet, on sait depuis longtemps que les sucres phosphorylés pénètrent mal dans la cellule. Pour vérifier ceci, nous avons soumis la suspension de bactéries à l'action d'un broyeur de POTTER ET ELVEHJEM<sup>27</sup>, dont l'efficacité de broyage, surtout pour les bactéries, était très faible. En effet, à l'examen microscopique, une grande partie des bactéries restait encore intacte. Cependant, ce traitement a certainement modifié leur perméabilité, comme le montre le Tableau VI. Ces chiffres ont été obtenus avec la même suspension bactérienne dont une moitié était soumise au traitement, l'autre restant intacte et servant comme témoin. A noter que le QO<sub>2</sub> est plus faible avec les bactéries traitées qu'avec les bactéries intactes. Il est possible que le traitement abîme certains enzymes. Cette expérience, en tous cas, montre que l'inhibition est plus forte (surtout avec l'hexose diphosphate) avec les bactéries traitées qu'avec les bactéries intactes. Cependant, l'action du fluorure sur le glucose reste toujours la même: aucune inhibition. Nous reviendrons sur ces questions de perméabilité et d'extrait bactérien dans un autre mémoire.

Ajoutons que nous sommes assurés dès le début que, dans nos conditions expérimentales, le bacille *Coli* possède une énolase active. Pour cela, nous avons fait l'expérience suivante: on ensemence largement deux litres de milieu (avec une culture âgée de six heures) qu'on laisse 20 heures à l'étuve à 37°. On centrifuge et on lave deux fois avec du chlorure de sodium à 9%. On divise ensuite la suspension en deux parties égales, puis on centrifuge. A une partie on ajoute 20 ml d'eau distillée stérile, à la deuxième, 20 ml d'une solution de phosphoglycérate de sodium à 1%. On ajoute partout 2 ml de toluène. Les deux flacons sont mis à l'étuve à 37° pour 20 heures. Après ce temps, la réaction qualitative de l'acide pyruvique (au nitroprussiat suivant la méthode de HOPKINS) est positive avec le flacon contenant le phosphoglycérate, alors que le témoin reste négatif. Le dosage de l'acide pyruvique a montré qu'il correspond à un rendement de 31% par rapport à la valeur théorique.

Cette expérience montre l'existence d'une énolase active dans le *Coli*.

TABLEAU IV

ACTION DE *E. coli* SUR LES HEXOSES PHOSPHATES ET SUR LE PHOSPHOGLYCÉRATE  
EN AÉROBIOSE ET EN PRÉSENCE DE FLUORURE DE SODIUM

1 ml de suspension bactérienne dans tampon phosphate M/15 à pH 6.8; 1 ml de substrat (hexoses-phosphates à M/90 ou phosphoglycérate à M/30, concentrations finales); 0.5 ml de fluorure de sodium (concentration finale M/33); 0.2 ml de soude à 10%.

Les résultats sont exprimés en millimètres cubes d'oxygène consommé.

C.M. = *Coli Monod*C.C. = *Coli communis*

Substrat	10 min		20 min		40 min		60 min		90 min		inhibition p.cent	
	C.C.	C.M.	C.C.	C.M.								
Hexose-monophosphate	14	19	28	32	56.5	59	85	108	138	185	31	75
Hexose-monophosphate + fluorure de sodium	11	4	17.5	10	37	15	58	26	106	45		
Hexose-diphosphate	22	7.5	48	22.5	103	51	168	96	277	202.5	0	6
Hexose-diphosphate + fluorure de sodium	25	9	51	22.5	109	49	183	89	299	190		
3-phosphoglycérate		22		45		71		130				50
3-phosphoglycérate + fluorure de sodium		11.5		24		32		61				

TABLEAU V

ACTION DE *E. coli* SUR LES ACIDES EN C<sub>4</sub> EN AÉROBIOSE ET EN PRÉSENCE DE FLUORURE DE SODIUM

1 ml de suspension bactérienne dans tampon phosphate pH 6.8; 1 ml de substrat à concentration finale M/60; 0.5 ml de fluorure de sodium M/33 (conc. finale); 0.2 ml de soude à 10%.

Substrat	10 min		20 min		40 min		60 min		90 min		inhibition p.cent	
	C.C.	C.M.	C.C.	C.M.								
Succinate	25	21	50	46	114	83	177	133	308		95	91
Succinate + fluorure de sodium	1.5	3	4.5	4	6	7	12	10	12			
Malate	25		52		93		143				88	
Malate + fluorure de sodium	2.5		7		12		16					
Fumarate	16.5		34		73		105		157		70	
Fumarate + fluorure de sodium	6.5		13		21		25		27			

Bibliographie p. 254.

TABLEAU VI

ACTION DE *E. coli* (INTACT ET TRAITÉ) SUR LE GLUCOSE ET LES HEXOSES PHOSPHATES  
EN AÉROBIOSE ET EN PRÉSENCE DE FLUORURE DE SODIUM

1 ml de suspension bactérienne dans tampon phosphate à pH 6.8;  
1 ml de substrat, concentration finale M/90; 0.5 ml de fluorure de sodium, concentration finale M/33;  
0.2 ml de soude à 10%.

Substrat	QO <sub>2</sub>		Inhibition p.cent	
	bact. intactes	bact. traitées	bact. intactes	bact. traitées
Glucose	87	70	0	0
Glucose + fluorure de sodium	93	73		
Hexose monophosphate	36	32	64	87.5
Hexose monophosphate + fluorure de sodium	13	4		
Hexose diphosphate	62	25	0	60
Hexose diphosphate + fluorure de sodium	62	10		

TABLEAU VII

ACTION DE *E. coli* SUR LE GLUCOSE, LE PYRUVATE ET SUR LES HEXOSES PHOSPHATES  
EN ANAÉROBIOSE ET EN PRÉSENCE DE FLUORURE DE SODIUM

1 ml de suspension bactérienne dans tampon phosphate à pH 6.8;  
1 ml de substrat (hexose M/90 ou corps en C<sub>4</sub> à M/30, concentrations finales);  
0.5 ml de fluorure de sodium M/33, concentration finale. Chiffres exprimés en millimètres cubes de CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub> dégagé/gramme de poids sec de bactéries/heure.

Substrat	Q <sup>N</sup> CO <sub>2</sub>	Q <sup>N</sup> H <sub>2</sub>	Inhibition p.cent	
			Q <sup>N</sup> CO <sub>2</sub>	Q <sup>N</sup> H <sub>2</sub>
Glucose	180	155		
Glucose + fluorure de sodium	0	1	100	
Pyruvate	212	211	50	0
Pyruvate + fluorure de sodium	105	220		(exaltation 50%)
Hexose-monophosphate	H <sub>2</sub>	72		
Hexose-monophosphate + fluorure de sodium	+ Q <sup>N</sup> CO <sub>2</sub>	1	H <sub>2</sub>	99
Hexose-diphosphate	Q <sup>N</sup> CO <sub>2</sub>	120	Q <sup>N</sup> CO <sub>2</sub>	
Hexose-diphosphate + fluorure de sodium	23		81	

#### Action du fluorure en anaérobiose

Puisque le fluorure est surtout un inhibiteur de la glycolyse, il était nécessaire d'étudier son action sur *E. coli* en présence des substrats déjà étudiés, en anaérobiose. Ceci nous permettra de comparer l'effet de cet inhibiteur sur le métabolisme aérobiose et anaérobiose du glucose. Les résultats donnés dans le Tableau VII montrent que le

$Q^N CO_2 + H_2$  est complètement inhibé en présence de glucose et de l'hexose monophosphate de sodium. En présence de l'hexose diphosphate de magnésium, l'inhibition est encore de 81%, mais avec le pyruvate elle n'est que de 50%. L'inhibition seulement partielle de ce dernier substrat est compréhensible, puisque l'action du fluorure porte sur un stade précédent la formation d'acide pyruvique.

#### *Résumé des expériences manométriques avec le fluorure*

On peut brièvement résumer ces expériences en disant que le fluorure inhibe plus ou moins intensément l'oxydation aérobie et anaérobie par *E. coli* de tous les substrats essayés, sauf le glucose. Si nous n'avions fait que des expériences manométriques, nous aurions pu conclure que l'oxydation aérobie du glucose est différente de la fermentations, autrement dit, que la respiration ne nécessite pas une phosphorylation préalable. Mais, de nombreuses expériences nous ont montré que le phénomène est plus complexe qu'il ne semble à première vue. On le verra dans un autre mémoire.

#### *Action de l'acide monoiodoacétique*

Nous avons essayé un autre inhibiteur de la glycolyse: l'acide monoiodoacétique. LUNDSGAARD<sup>28</sup>, en 1929, a montré le premier que l'acide monoiodoacétique inhibe la glycolyse anaérobie de la levure et l'on sait que, dans la glycolyse l'acide monoiodoacétique inhibe la déshydrogénase de l'aldéhyde 1,3-diphosphoglycérique, découverte et isolée par WARBURG ET CHRISTIAN<sup>29</sup> en 1939.

RAPKINE (1938)<sup>30</sup> a montré que cette action de l'acide monoiodoacétique est due à la présence, dans l'enzyme, de groupements SH-oxydables. On sait maintenant que beaucoup d'autres déshydrogénases sont inactivées par l'acide monoiodoacétique.

#### *Expériences*

Nous avons comparé, comme pour les autres inhibiteurs, l'action de l'acide monoiodoacétique sur la respiration et la fermentation de *E. coli* en présence de différents substrats. Ces expériences (Tableau VIII) montrent que ce poison inhibe totalement la fermentation de *E. coli* et ceci pour tous les substrats essayés. Par contre, en aérobiose, son action varie sensiblement selon la nature du substrat. La plus forte inhibition est obtenue avec le succinate. L'action de l'acide monoiodoacétique s'exerce, sans aucun doute, sur le groupement -SH de la succino-déshydrogénase.

En présence de glucose, d'hexoses phosphates, de phosphoglycérate et de fumarate, l'inhibition est encore assez forte (75-87%), mais elle tombe à 60% avec le pyruvate et le malate. Nous ne sommes pas en mesure de donner une explication nette de ces différences dans l'inhibition.

#### *Effet du cyanure*

L'action inhibitrice de l'acide cyanhydrique et de ses sels sur la respiration des animaux supérieurs est connue depuis fort longtemps\*: on sait que l'action du cyanure se porte sur la cytochrome-oxydase, coupant ainsi toute la chaîne d'oxydations cellulaires. On sait aussi que la respiration d'un grand nombre de cellules n'est que partiellement inhibée par le cyanure (BATELLI ET STERN<sup>31</sup>, DIXON<sup>32</sup>), ce qui montre qu'il y a au moins deux systèmes respiratoires: l'un sensible, l'autre insensible au cyanure. Ce dernier doit dépendre d'un autre enzyme médiateur capable de réduire l'oxygène moléculaire d'une manière indépendante.

\* Voir bibliographie détaillée sur la question dans le mémoire de COMMONER<sup>33</sup>.

TABLEAU VIII

ACTION DE *E. coli* SUR DIFFÉRENTS SUBSTRATS EN AÉROBIOSE ET ANAÉROBIOSE  
ET EN PRÉSENCE D'ACIDE MONOIODOACÉTIQUE

1 ml de substrat (hexoses à M/90, corps en C<sub>3</sub> à M/30 ou acides en C<sub>4</sub> à M/60, concentrations finales); 1 ml de suspension bactérienne (3 mg poids sec) dans tampon phosphate M/15 à pH 6.8; 0.5 ml d'acide monoiodoacétique (AIA) (M/1000 conc.finale); 0.2 ml de soude à 10% (dans les expériences à l'air) ou 0.2 ml H<sub>2</sub>O (en anaérobiose).

Substrat	QO <sub>2</sub>	Inhibition p.cent	Q <sup>N</sup> CO <sub>2</sub> + H <sub>2</sub>	Inhibition p.cent
Glucose Glucose + AIA	106 14	87	153 1.6	100
Hexose monophosphate Hexose monophosphate + AIA	31 6	81	47.6 0	100
Hexose diphosphate Hexose diphosphate + AIA	46 11	76	39.3 0	100
Phosphoglycérate Phosphoglycérate + AIA	52 9	83	103 0	100
Pyruvate Pyruvate + AIA	62 24	61		
Succinate Succinate + AIA	52 5	90.5		
Fumarate Fumarate + AIA	17 3	82		
Malate Malate + AIA	16 6.5	60		

COOK ET HALDANE<sup>33</sup> ont vu que la sensibilité des bactéries au cyanure varie avec la nature du substrat. Ainsi le cyanure à 0.01 M inhibe l'oxydation du formiate à 98%, et celle du lactate à 65% seulement. TAMIYA ET KUBO<sup>34</sup> ont montré le même phénomène sur l'Acetobacter avec l'alcool éthylique et le glucose comme substrats. COMMONER<sup>35</sup> pense que cette différence dans la sensibilité au cyanure, en présence de divers substrats, est fonction de l'activité relative des déshydrogénases spécifiques correspondantes et, par là, se trouve en relation avec le QO<sub>2</sub>. Les déshydrogénases à grande activité (qui produisent un QO<sub>2</sub> élevé) nécessitent un degré d'activité plus grand de l'oxydase, rendant ainsi le système entier plus sensible au cyanure. La déshydrogénase de l'acide pyruvique, par exemple, n'a pas la même activité quand elle agit sur l'acide pyruvique formé au cours de la dégradation du glucose—où d'autres déshydrogénases agissent déjà avant elle—que lorsqu'elle entre en jeu par l'addition d'acide pyruvique. Il y a, en somme, une autocatalyse par réaction en chaîne de différents enzymes. Ceci nous permettra, dans la suite de ce travail, de comprendre et d'interpréter divers résultats.

*Expériences*

Les expériences résumées dans le Tableau IX montrent que le cyanure inhibe fortement la respiration du bacille *Coli* (M.) en présence de glucose et faiblement en présence de pyruvate. D'autre part, on voit (expériences a) et b) du même tableau) que l'inhibition en fonction du temps diminue, puis reste constante après les premières dix minutes en présence de glucose, tandis qu'en présence de pyruvate elle diminue continuellement; elle passe: en a), de 40 à 22 % et en b) de 33 à 18 %. Les résultats ne changent presque pas pour le glucose, en faisant varier les concentrations en cyanure. Remarquons

TABLEAU IX

ACTION DE *E. coli* (M) SUR LE GLUCOSE ET LE PYRUVATE EN AÉROBIOSE ET EN PRÉSENCE DE CYANURE À DIFFÉRENTES CONCENTRATIONS

a. 1 ml suspension (3 mg poids sec environ); 1 ml glucose (conc. finale M/90) ou 1 ml pyruvate (conc. finale M/30); 0.5 ml KCN (conc. finale M/150); 0.2 ml HOK+HCN (mélange de KREBS). L'inhibiteur et le substrat sont mis en même temps. Les chiffres sont donnés en mm<sup>3</sup> d'oxygène consommé.

Substrat	20 min		40 min		60 min	
Glucose	128	131	215	229	267	291
Glucose + KCN	17	20	30	33	35	41
Inhibition p.cent	87	85	86	86	87	86
Pyruvate	81	87	156	159	215	240
Pyruvate + KCN	49	55	113	109	164	188
Inhibition p.cent	40	37	28	31	24	22

b. Même expérience que a), mais bactéries et inhibiteur sont mis en contact une heure avant l'addition du substrat.

Substrat	10 min	20 min	40 min	60 min
Glucose	90	163	238	290
Glucose + KCN	11	31	44	55
Inhibition p.cent	88	81	81.5	81
Pyruvate	55	101	181	256
Pyruvate + KCN	37	77	143	210
Inhibition p.cent	33	24	21	18

c. Même expérience que a), mais avec KCN M/250.

Substrat	10 min	20 min	40 min	60 min
Glucose	88	140	234	301
Glucose + KCN	10	23	36	45
Inhibition p.cent	89	84	85	85
Pyruvate	56	99	198	283
Pyruvate + KCN	56	101	188	278
Inhibition p.cent	0	0	5	2

que le fait que l'acide pyruvique n'est pas inhibé par le cyanure est probablement dû à la formation d'une cyanhydrine non-toxique, comme l'avaient déjà signalé GREEN ET WILLIAMSON (1936)<sup>36</sup>. D'autre part, il est possible que le cyanure, en inhibant la catalase, permette l'accumulation d'eau oxygénée en présence de glucose, tandis que celle-ci se décompose en présence d'acide pyruvique (SEVAG ET SHELBURN, 1942<sup>37</sup>), ce qui supprime l'inhibition.

Nous avons répété les mêmes expériences avec une autre souche de *E. coli* (*Coli communis*): Tableau X. On voit qu'avec cette souche de *E. coli*, l'inhibition en présence de ces deux substrats est plus forte et qu'elle tend plutôt à augmenter avec la durée de l'expériences. Ceci est le contraire de ce que l'on observe avec le *Coli Monod*.

TABLEAU X  
ACTION DE *Coli communis* SUR LE GLUCOSE ET LE PYRUVATE EN AÉROBIOSE ET  
EN PRÉSENCE DE CYANURE À M/250

Substrat	10 min	20 min	40 min	60 min	90 min
Glucose	61	105	204	280	386
Glucose + KCN	6	7	17	20	28
Inhibition p.cent	90	93.5	92	93	93
Pyruvate	23	44	87	131	196
Pyruvate + KCN	15	23	42	57	87
Inhibition p.cent	35	48	52	56.5	56

TABLEAU XI  
ACTION DE *E. coli* (C ET M) SUR LES ACIDES EN C<sub>4</sub> EN PRÉSENCE DE CYANURE  
DE SODIUM ET EN AÉROBIOSE

1 ml de suspension bactérienne (3 mg poids sec environ); 1 ml de substrat (conc. finale M/60); 0.5 ml cyanure (conc. finale M/250); 0.2 ml mélange de KREBS (HOK + HCN). Chiffres donnés en mm<sup>3</sup> d'oxygène consommé.

C.M. = *Coli Monod*

C.C. = *Coli communis*

Substrat	10 min		20 min		40 min		60 min		90 min	
	C.M.	C.C.								
Succinate	44	26	81	52	166	105	266	150		222
Succinate + KCN	11	4	15	9	31	11	53	15		21
Inhibition p.cent	75	85	81.5	83	81	89.5	80	90		90.5
Malate	0	23	0	50	0	95	0	144		
Malate + KCN	0	4	0	9	0	16	0	23		
Inhibition p.cent	83			82		83		84		
Fumarate	6	15	11	24	18	42	25	60	30	83
Fumarate + KCN	4	4	5	4	6	11	9	13	12	15
Inhibition p.cent	33	73	55	83.5	67	74	64	78	60	82

Le Tableau XI montre l'action du cyanure sur les deux souches de *E. coli* en présence d'acides en C<sub>4</sub>. Ces expériences montrent que la respiration en présence des acides en C<sub>4</sub> est fortement inhibée par le cyanure (80-90%). On voit en outre que le malate n'est pas du tout métabolisé par la souche de *Coli Monod* et que le fumarate l'est très faiblement, tandis que ces deux substrats sont mieux attaqués par le *Coli communis*. D'ailleurs, l'acide fumrique n'est utilisé qu'en se transformant en acide malique suivant la réaction:



Il suffit donc que ce dernier ne soit pas attaqué pour qu'on ne puisse observer aucune action sur le fumarate.

Les chiffres du Tableau XII montrent que le cyanure inhibe considérablement l'oxydation des dérivés phosphorylés: hexoses phosphates à 74%, phosphoglycérate à 68%. Ici aussi on remarque que l'inhibition augmente avec le temps. En comparant les différents QO<sub>2</sub> avec et sans cyanure, on peut affirmer que l'hypothèse de COMMONER (l'inhibition augmente avec le QO<sub>2</sub>) n'est pas toujours exacte. Cette inhibition varie plutôt avec la nature du substrat.

TABLEAU XII

**ACTION DE *E. coli* (M.) SUR LES HEXOSES MONO- ET DIPHOSPHATE ET SUR L'ACIDE PHOSPHOGLYCÉRIQUE EN PRÉSENCE DE CYANURE ET EN AÉROBIOSE**

1 ml de suspension bactérienne (3 mg poids sec); 1 ml de substrat pour le triose phosphate, M/30 et pour les hexoses phosphates, M/90, concentrations finales); 0.5 ml de cyanure à M/250 (conc. finale); 0.2 ml (HOK + HCN).

Les chiffres sont donnés en millimètres cubes d'oxygène consommé.

Substrat	10 min	20 min	40 min	60 min	90 min
Hexose-monophosphate	25	54	127	212	313
Hexose-monophosphate + cyanure	12	20	37	57	81
Inhibition p.cent	52	63	71	73	74
Hexose-diphosphate Mg	17	27	66	117	
Hexose-diphosphate Mg + cyanure	10	12	20	32	
Inhibition p.cent	41	55.5	70	73	
Ac. 3-phosphoglycérique*	15.5	31	79	135	159
Ac. 3-phosphoglycérique* + cyanure	7	12.5	25	45	50.5
Inhibition p.cent	55	60	68	67	68

\* L'acide 2-glycérophosphorique n'est pas attaqué par le *Coli Monod* et l'est faiblement par le *Coli communis*, QR = 22.

Nous avons refait les expériences précédentes, dans les mêmes conditions, mais en anaérobiose. Le Tableau XIII en donne les résultats: l'inhibition est totale avec les hexoses et de 70% avec l'acide pyruvique.

TABLEAU XIII  
ACTION DE *E. coli* (M.) SUR DIFFÉRENTS SUBSTRATS EN  
PRÉSENCE DE CYANURE ET EN ANAÉROBIOSE

1 ml de suspension bactérienne (3 mg poids sec environ) dans tampon phosphate M/15 à pH 6.8; 1 ml de substrat (glucose, hexoses mono- et diphosphate à conc. finale M/90, pyruvate à M/30); 0.5 ml de cyanure à M/250 conc. finale.

Les chiffres sont donnés en  $Q_{CO_2}^N + H_2$  (= nombre de millimètres cubes de  $CO_2 + H_2$  dégagés/heure/1 mg poids sec.)

Substrat	$Q_{CO_2}^N + H_2$	Inhibition p.cent
Glucose	243	98.5
	210	
Glucose + cyanure	4	
	2	
Hexose-monophosphate de Na	40.3	100
	38	
Hexose-monophosphate + KCN	0	
	0	
Hexose-diphosphate de Mg	22	100
	27	
Hexose-diphosphate + KCN	0	
	0	
Acide pyruvique	120	
	151	
Acide pyruvique + cyanure	36	68.5
	50	

#### RÉSUMÉ ET DISCUSSION DES EXPÉRIENCES SUR L'ACTION DU CYANURE

Les expériences avec le cyanure montrent que:

1. En aérobiose, avec le *Coli Monod*, l'inhibition en présence de glucose est de l'ordre de 85-87%; elle tombe à 74% en présence des hexoses phosphates, tandis qu'en présence de pyruvate elle n'est plus que de 18-20% avec le cyanure M/150 et devient nulle avec le cyanure M/250. Avec les acides en C<sub>4</sub>, l'inhibition est de 80% pour le succinate et de 64% pour le fumarate.

Dans les mêmes conditions que ci-dessus on a, avec le *Coli communis*, une inhibition plus forte en présence des différents substrats essayés (glucose: 93%; pyruvate: 56%; succinate: 90%; malate: 84%; fumarate 78%).

2. En anaérobiose, avec le *Coli Monod*, on a une inhibition de 100% avec les hexoses, et de 70% environ avec le pyruvate.

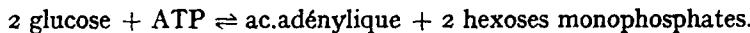
Le fait qu'en aérobiose l'inhibition n'est pas complète en présence des hexoses, pourrait s'expliquer par l'existence d'un système non sensible au cyanure. Il reste maintenant à savoir sur quel enzyme agit le cyanure au cours de l'oxydation de ces différents substrats par *E. coli*. WARBURG ET KEILIN en ont localisé l'action sur le système cytochrome-cytochrome-oxydase, or, celui-ci n'existe pas dans le *Coli*, dans

le sens classique. On pourrait, à priori, attribuer l'effet du cyanure à l'inhibition de la catalase et à la formation de l'eau oxygénée. Ceci expliquerait, comme nous l'avons déjà dit, l'inhibition partielle en présence d'acide pyruvique. WIELAND<sup>38</sup> a, en effet, montré que l'eau oxygénée est un produit de l'oxydation biologique à l'air, et BROH-KAHN ET MIRSKY<sup>39</sup> ont mis en évidence chez *E. coli* l'eau oxygénée en présence de cyanure. Mais SEVAG ET SHELBURNE (1942)<sup>37</sup> ont pu montrer chez le pneumocoque type I, dépourvu de catalase, un système respiratoire sensible au cyanure, qui diffère du système cytochrome habituel et qu'ils rapprochent de celui que KEILIN ET HARPLEY (1941)<sup>40</sup> ont déterminé chez *E. coli*.

L'inhibition par le cyanure, que nous avons vue dans nos expériences *en anaérobiose*, est encore moins claire. Ceci est vrai non seulement pour *E. coli*, mais aussi pour la levure. WARBURG a pensé (1925)<sup>41</sup> que l'inhibition de la fermentation de la levure par le cyanure serait due, comme dans la respiration, à la formation d'un complexe avec un métal lourd. MASSART ET DUFAIT (1942)<sup>20</sup>, sous l'impulsion de SZENT-GYÖRGYI, ont essayé de localiser l'action du cyanure dans la fermentation. Dans ce but, ils ont fait agir le cyanure sur différents substrats de la fermentation alcoolique du glucose, jusqu'au stade de l'acide phospho-pyruvique. Ainsi, ils ont pu déterminer que c'est sur la réaction :



que s'exerce l'action du cyanure en empêchant le réestérification du glucose (ou de l'hexose monophosphate).



Cette réaction doit donc être catalysée par un métal lourd. D'après MASSART ET DUFAIT<sup>20</sup>, la réaction (I) serait catalysée par Zn, Mn et Fe<sup>++</sup> (non pas Fe<sup>+++</sup>).

Le fait que la fermentation de l'acide phosphopyruvique et la réestérification du glucose sont inhibées par le cyanure et l'hydrogène sulfureux, montre l'importance des métallo-protéines, non seulement dans la respiration, mais aussi dans la fermentation. Il est possible que dans le *Coli*, l'inhibition par le cyanure soit due à un même mécanisme, *en anaérobiose* ou *en aérobiose*.

#### Action de l'azoture de sodium

C'est KEILIN<sup>42</sup> qui, le premier, a constaté l'inhibition de la respiration par l'azoture de sodium, due à la combinaison de ce corps avec la cytochrome-oxydase. En 1935, KEILIN ET HARTREE<sup>43</sup> ont vu que l'azoture de sodium inhibe aussi la catalase. Ces mêmes auteurs ont souligné que l'inhibition de la respiration de la levure par l'azoture de sodium dépend du pH du milieu. A un pH acide, son action est comparable à celle du cyanure, c'est-à-dire qu'elle provoque une inhibition complète, tandis qu'à pH 7.5, il n'y a aucune inhibition.

CLIFTON, (1936/37)<sup>44, 45</sup> et CLIFTON ET LOGAN, (1939, 1946)<sup>9</sup>, étudiant les phénomènes d'assimilation chez les microorganismes hétérotrophes en présence de divers substrats, ont constaté que l'azoture de sodium et le dinitrophénol empêchent cette assimilation en provoquant une oxydation complète des substrats. WINZLER (1940)<sup>46</sup> confirme ces résultats sur la levure. Ce même auteur a constaté depuis (1944)<sup>47</sup> que l'azoture de sodium peut inhiber aussi l'assimilation anaérobiose du glucose par la levure, sans interférer avec la fermentation. PICKETT ET CLIFTON (1946)<sup>48</sup> ont trouvé que l'azoture de sodium et

le dinitrophénol bloquent les synthèses à partir du glucose dans la levure. SPIEGELMAN et ses collaborateurs<sup>49, 50, 51</sup> dans toute une série de travaux, ont montré ces dernières années que l'azoture de sodium, à concentration  $2 \cdot 10^{-2} M$  empêche, non seulement les synthèses des glucides, mais aussi la formation d'enzymes adaptatifs dans la levure. L'azoture de sodium, suivant ces auteurs, empêcherait l'utilisation de l'énergie produite au cours du métabolisme anaérobiose des hydrates de carbone nécessaire pour la formation des enzymes adaptatifs. MEYERHOF<sup>52</sup>, en 1945, a trouvé que l'apyrase de la levure est complètement inhibée par l'azoture de sodium. SPIEGELMAN, KAMEN ET SUSSEMAN (1948)<sup>51</sup> ont récemment montré que le mécanisme d'action de l'azoture de sodium serait en rapport avec le mécanisme de la régénération et de l'utilisation de l'énergie pour les synthèses des différents constituants cellulaires. Ils pensent que l'inhibition de l'activité synthétique résulterait de l'interférence de l'azoture de sodium dans la formation des composés phosphorylés "riches en énergie" que LIPMANN avait mis en évidence. Ces mêmes auteurs ont même essayé de localiser l'action de l'azoture de sodium dans le cycle glycolytique de phosphorylation, soit sur la triose-phosphate-déshydrogénase, soit sur le produit d'hydrolyse du triose. ROSENBERG<sup>52a</sup> a trouvé que la dégradation phosphorylante de la glucosamine par les suspensions de *E. coli* lavé est inhibée par l'azoture de sodium.

Au cours de ce travail et des suivants, nous serons amenés à étudier l'action de l'azoture de sodium sous différents aspects: son influence sur la respiration, la fermentation, la phosphorylation et les synthèses chez *E. coli*.

Dans ce mémoire nous donnerons seulement les résultats de l'action de l'azoture de sodium, obtenus dans les expériences manométriques, en aérobiose et anaérobiose.

#### *Action de l'azoture de sodium sur la respiration*

Le Tableau XIV résume quelques expériences faites avec différentes concentrations d'azoture de sodium et à différents  $p_H$ . On voit que l'azoture de sodium à concentration finale M/1600 et M/800 exalte l'oxydation du glucose et du pyruvate quel que soit le  $p_H$  du milieu (compris entre 5.2 et 7.2). Pour éviter les causes d'erreur qui seraient dues à la faible pénétration de l'inhibiteur ou à l'action protectrice éventuelle du glucose, nous avons mis les bactéries en contact prolongé avec l'inhibiteur avant l'addition du substrat. L'expérience est faite de la façon suivante: la suspension bactérienne, préparée comme d'habitude, est divisée en deux parties égales avant passage du courant d'air (la densité des bactéries était déterminée par opacimétrie) et à une partie on ajoute de l'azoture de sodium (concentration finale M/800). Après passage du courant d'air pendant une heure, les deux suspensions sont centrifugées et remises en suspension dans le tampon phosphate à  $p_H$  6.8. On désigne par *Bn* les bactéries non traitées par l'azoture de sodium et par *Ba* les bactéries traitées.

Le Tableau XV montre que, même avec les bactéries traitées préalablement par l'azoture de sodium, il n'y a pas d'inhibition; au contraire, on observe toujours une exaltation de la respiration avec les deux souches de *Coli*.

Pour montrer qu'en présence d'azoture de sodium l'augmentation de la consommation de l'oxygène est due à la combustion complète du substrat, il était nécessaire de regarder le QR avec ou sans azoture de sodium (Tableau XVI). Cette expérience montre en effet que le QR, en présence d'azoture de sodium, devient égal à l'unité après 90 minutes, tandis que celui du témoin (glucose seul) reste toujours inférieur.

Le Tableau XVII montre l'action de l'azoture de sodium sur le *E. coli* en présence

TABLEAU XIV

ACTION DE *E. coli* (M.) SUR LE GLUCOSE ET LE PYRUVATE EN PRÉSENCE D'AZOTURE DE SODIUM ET À DIFFÉRENTS PH

1 ml de suspension bactérienne dans tampon phosphate M/15 (3 mg poids sec); 1 ml de substrat (glucose M/90, pyruvate M/30, conc. finale); 0.5 ml d'azoture de sodium; 0.2 ml de soude à 10%. Les résultats sont exprimés en  $QO_2$ .

a. *Coli Monod*

Substrat	PH 7.2	PH 6.8	PH 5.2
Glucose	93.6	99	36.3
Glucose + azoture de sodium (M/1600 / M/800)	112 120	130 127	48.2 46.6
Pyruvate	50	52	52
Pyruvate + azoture de sodium (M/1600 / M/800)	61 71	72 67.6	61 60.3

b. Les mêmes résultats sont obtenus avec *Coli Communis*.

Expérience faite à PH 6.8 et avec l'azoture de sodium M/1600

Substrat	$QO_2$	Exaltation p.cent
Glucose Glucose + azoture de sodium	95 121	27
Pyruvate Pyruvate + azoture de sodium	54 67	24

TABLEAU XV

ACTION DE *E. coli*, PRÉALABLEMENT TRAITÉ PAR L'AZOTURE DE SODIUM, SUR LE GLUCOSE EN AÉROBIOSE

1 ml de suspension bactérienne dans tampon phosphate M/15, PH 6.8;

1 ml de substrat M/90 (conc. finale); 0.5 ml d'azoture de sodium (M/800 conc. finale); 0.2 ml de soude à 10%.

SOUCHE	$QO_2$ BN		$QO_2$ BA	
	Glucose	Glucose + $N_3Na$	Glucose	Glucose + $N_3Na$
<i>Coli Monod</i>	87.6	112	99.6	133
<i>Coli communis</i>	45	75	52	76

TABLEAU XVI

1 ml de suspension bactérienne dans tampon phosphate PH 6.8;

1 ml de glucose M/90, conc. finale; 0.5 ml d'azoture de sodium (M/800 conc. finale). Résultats exprimés en QR.

Substrat	10 min	20 min	40 min	60 min	90 min	120 min
Glucose	0.6	0.62	0.65	0.76	0.85	0.85
Glucose + azoture de sodium M/800	0.73	0.75	0.85	0.98	1.00	1.00

des acides en C<sub>4</sub>. Si l'on compare ces résultats à ceux obtenus avec le glucose et l'acide pyruvique, il paraît difficile d'admettre que la chaîne respiratoire de ces derniers corps emprunte la voie des acides succinique-fumarique. Après les résultats obtenus avec le malonate, ceux de l'azoture de sodium donnent une preuve de plus en faveur de cette conception.

Avec les substrats phosphorylés, nous avons trouvé les résultats résumés dans le Tableau XVIII.

Il est important de souligner de grandes différences dans l'action de l'azoture de sodium sur l'oxydation aérobie des différents substrats. Cet inhibiteur augmente la

TABLEAU XVII  
ACTION DE *E. coli* SUR LES ACIDES EN C<sub>4</sub> EN PRÉSENCE  
D'AZOTURE DE SODIUM ET EN AÉROBIOSE

1 ml de suspension bactérienne dans tampon phosphate M/15, pH 6.8;  
1 ml de substrat M/60 (conc. finale); 0.5 ml d'azoture de sodium (M/800 conc. finale); 0.2 ml de soude à 10%.  
Résultats exprimés en QO<sub>2</sub>

Substrat	QO <sub>2</sub>		Inhib. p.cent	
	C.M.	C.C.	C.M.	C.C.
Succinate	57	48.5	78	71
Succinate + azoture de sodium	12.5	14		
Malate		33		
Malate + azoture de sodium		10		70
Fumarate		37.5		
Fumarate + azoture de sodium		9.5		75

TABLEAU XVIII  
ACTION DE *E. coli* SUR LES HEXOSES MONO- ET DI-PHOSPHATE ET PHOSPHOGLYCÉRATE  
EN PRÉSENCE D'AZOTURE DE SODIUM ET EN AÉROBIOSE

1 ml de suspension bactérienne (3 mg poids sec env.) dans tampon phosphate M/15 pH 6.8; 1 ml de substrat à conc. finale indiquée dans le tableau; 0.5 ml d'azoture de sodium M/1600 (conc. finale); 0.2 ml de soude à 10%. Résultats exprimés en QO<sub>2</sub>.

Substrat	QO <sub>2</sub>		Inhib. p.cent	
	C.M.	C.C.	C.M.	C.C.
Hexosemonophosphate de Na M/90	73	66	6	7.5
Hexosemonophosphate de Na M/90 + azoture de sodium	68.5	61		
Hexosediphosphate de Mg M/90	48	60.5		
Hexosediphosphate de Mg M/90 + azoture de sodium	9.5	14.5	80	76
3-phosphoglycérate de Na	59	43		
3-phosphoglycérate de Na + azoture de sodium	24	21	59	51

consommation de l'oxygène par *E. coli* en présence du glucose et du pyruvate. Il est presque sans action en présence de l'hexose-monophosphate, mais inhibe fortement l'oxydation de l'hexose-diphosphate, de l'acide phosphoglycérique et, comme nous l'avons déjà montré, celle des acides en C<sub>4</sub>. Il serait difficile pour le moment, de donner une interprétation juste de ces résultats, sans une étude plus profonde et plus détaillée de ces phénomènes, que l'on fera ultérieurement.

Nous avons refait les mêmes expériences *en anaérobiose*. Elles sont résumées dans le Tableau XIX. On voit qu'en anaérobiose l'azoture bloque presque complètement le  $Q_{CO_2}^N + CO_2$ . Dans le cas de l'acide pyruvique l'inhibition s'exerce surtout sur le dégagement de l'hydrogène et faiblement sur celui de l'anhydride carbonique.

A titre de contrôle, nous avons essayé l'action de l'azoture de sodium sur la levure de boulangerie (Tableau XX). Ici nous retrouvons l'inhibition de la respiration classique, ainsi qu'une inhibition partielle de la fermentation.

TABLEAU XIX  
ACTION DE *E. coli* SUR DIFFÉRENTS SUBSTRATS EN PRÉSENCE  
D'AZOTURE DE SODIUM ET EN ANAÉROBIOSE

1 ml de suspension bactérienne dans tampon phosphate M/15 pH 6.8; 1 ml de substrat à conc. indiquée dans les expériences précédentes; 0.5 ml d'azoture de sodium à concentration finale M/1600. Résultats exprimés en  $Q_{CO_2}^N$  et  $Q_{H_2}^N$ .

Substrat	$Q_{CO_2}^N$	$Q_{H_2}^N$	Inhibition p.cent	
			$Q_{CO_2}^N$	$Q_{H_2}^N$
Glucose	110	100		
Glucose + azoture de sodium	13	0	88	100
Hexose-monophosphate		69		
Hexose-monophosphate + azoture de sodium		5		93
Hexose-diphosphate		22.3		
Hexose-diphosphate + azoture de sodium		0		100
Acide pyruvique	105.5	74		
Acide pyruvique + azoture de sodium	92	8	13	89

TABLEAU XX

10 mg de levure de boulangerie dans 1 ml de tampon phosphate pH 5.2; 1 ml de glucose à 0.5%; 0.5 ml d'azoture de sodium (M/1600 conc. finale) T = 25°.

Substrat	$QO_2$	$Q_{CO_2}^N + H_2$
Glucose	132.4	217
Glucose + azoture de sodium	0	129
Inhibition p.cent	100	40.5

*Comparaison entre l'action de l'azoture de sodium et du cyanure*

En 1937, KEILIN<sup>52</sup> a montré que l'action du cyanure sur la respiration est la même que celle de l'azoture de sodium. D'autres auteurs, parmi lesquels BRACHET (1934)<sup>53</sup>, PHILIPS (1940)<sup>54</sup> et BARNES (1944)<sup>55</sup>, travaillant sur différents organismes, ont également trouvé un parallélisme entre les effets de ces deux inhibiteurs. MOOG ET SPIEGELMAN (1942)<sup>56</sup>, étudiant les rapports entre régénération et respiration, ont montré, par contre, une différence spécifique entre ces deux inhibiteurs: l'azoture de sodium inhibe la régénération à une concentration qui n'affecte pas sensiblement la respiration. Le cyanure au contraire agit sur les deux phénomènes à la fois. STANNARD (1939)<sup>57</sup> et KORR (1941)<sup>58</sup> ont vu que le cyanure inhibe la respiration du muscle au repos comme au travail, tandis que l'azoture de sodium l'inhibe au travail seulement. Ils en concluent qu'il y a différentes voies de respiration dans le muscle, suivant son état de repos ou de travail. BALL (1942)<sup>59</sup> a suggéré que l'"Atmungsferment-azoture" et l'"Atmungsferment-cyanure" ont des potentiels d'oxydoréduction différents, qui peuvent leur conférer un pouvoir catalytique variable. WINZLER (1943)<sup>60</sup>, étudiant la cinétique de l'inhibition de la respiration par la levure, arrive à la conclusion suivante: le cyanure peut agir sur la respiration au moins par trois voies distinctes, tandis que l'azoture de sodium l'inhibe seulement par une seule voie, en se combinant avec l'"Atmungsferment" oxydé.

Dans les expériences que nous venons d'exposer, on voit une différence très nette dans l'action des deux inhibiteurs. Si l'on admet, avec WINZLER, que l'azoture de sodium n'agit sur la respiration que par la seule combinaison avec la cytochrome-oxydase, il est normal que la respiration de *E. coli*, qui ne possède pas cet enzyme, ne soit pas inhibée. Mais dans ce cas il est difficile de comprendre l'inhibition de la respiration en présence des autres substrats (dérivés phosphorylés et acides en C<sub>4</sub>). Il faut donc admettre que l'azoture de sodium agit sur un système différent de celui qui existe dans la respiration classique. Il est évident aussi que le cyanure, dans nos expériences, n'agit pas comme l'azoture de sodium et, d'autre part, agit différemment de son action habituelle dans la respiration.

Il était intéressant de voir ce qui se passerait en faisant agir les deux inhibiteurs ensemble. On constate (Tableau XXI) que l'inhibition en présence de cyanure + azoture

TABLEAU XXI  
ACTION DE *E. coli* SUR LE GLUCOSE EN PRÉSENCE DE L'AZOTURE  
DE SODIUM ET DU CYANURE EN AÉROBIOSE

1 ml de suspension bactérienne (3 mg poids sec) dans tampon phosphate M/15 pH 6.8; 1 ml glucose à M/90 conc. finale; 0.5 ml de cyanure M/250, conc. finale; 0.5 ml d'azoture de sodium M/800; 0.2 ml de soude à 10%.

Le cyanure est ajouté en même temps que le substrat et l'azoture après équilibre de 10 minutes. Résultats donnés en millimètres cubes d'oxygène consommé.

Substrat	10 min	20 min	40 min	60 min	Inhibition p.cent
Glucose	62	115	214	287	
Glucose + cyanure	7.5	14	25	38	
Glucose + azoture de sodium	98	164	300	365	87
Glucose + azoture de sodium + cyanure }	15	26	48	78	73

est de 73% environ, alors qu'elle est de 87% avec le cyanure seul. Il est évident que l'azoture de sodium agit sur la partie non sensible au cyanure (ici 13%), en augmentant sa consommation d'oxygène comme il le fait normalement, d'où une diminution de l'inhibition globale. Cette expérience montre que l'action de ces deux inhibiteurs s'exerce sur des enzymes différents.

#### DISCUSSION DES EXPÉRIENCES MANOMÉTRIQUES EN AÉROBIOSE ET ANAÉROBIOSE

Les Tableaux XXII et XXIIa résument les résultats obtenus par des mesures manométriques, avec une suspension non proliférante de *E. coli* (*Monod et communis*), en aérobiose et anaérobiose.

Si on confronte les résultats obtenus en aérobiose, on voit immédiatement la différence de comportement de *E. coli* vis-à-vis du malonate, du fluorure et de l'azoture de

TABLEAU XXII  
ACTION DE *E. coli* SUR DIFFÉRENTS SUBSTRATS EN PRÉSENCE  
DE DIVERS INHIBITEURS ET EN AÉROBIOSE

C.M. = *Coli Monod*

C.C. = *Coli communis*

↗ = exaltation

AIA = acide monoiododiacétique

Les chiffres expriment le pourcentage d'inhibition.

Substrats	Malonate		Azoture		Cyanure		Fluorure		AIA	
	C.M.	C.C.	C.M.	C.C.	C.M.	C.C.	C.M.	C.C.	C.M.	C.C.
Glucose M/90	0-15	50	↗ <sup>25</sup> 30	↗ <sup>25</sup> 30	85	87	0	0	87	
Hexose-monophosphate de Na M/90	81		6	7	70 75		85	87	84	
Hexose-diphosphate de Mg M/90	90	74	75 80		75		60		76	
Phosphoglycérate de Na M/30	75	52	50 60		70		50		83	
Pyruvate de Na M/30	50 55	50	↗ <sub>20</sub>	↗ <sub>25</sub>	0	55			60	
Succinate de Na M/60	80 85	96	79 80	70	80	90	91	95	96	
Fumarate de Na M/60	0			75		70 80		82		82
Malate de Na M/60	0			70		80 85		90		60

TABLEAU XXIIa

## ANAÉROBIOSE

Les chiffres expriment le pourcentage d'inhibition.

SUBSTRATS	Malonate		Azoture		Cyanure		Fluorure		AIA	
	CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>								
Glucose M/90	100	100	85 90	100	98		100		100	
Hexose monophosphate de Na M/90		70		93		100		99		100
Hexose diphosphate de Mg M/90		95		100		100		81		100
Pyruvate de Na M/30	79	60	12	90	70		50	0		100

Phosphoglycérate de Na M/30, succinate de Na M/60, fumarate de Na M/60 et malate de Na M/60 ne sont pas attaqués.

sodium en présence de glucose, d'une part, et des autres substrats, d'autre part. Tandis que ces trois inhibiteurs n'ont aucune action sur la respiration en présence de glucose, ils inhibent considérablement l'oxydation des dérivés phosphorylés et des acides en C<sub>4</sub>. Ces mêmes inhibiteurs bloquent complètement la dégradation anaérobiose de tous les substrats essayés. Or, le fluorure, et depuis peu l'azoture de sodium, sont considérés comme des inhibiteurs intervenant dans la phosphorylation. Si l'on se limitait à ces résultats, on pourrait facilement conclure que l'oxydation aérobie du glucose par *E. coli* met en jeu un système qui ne passe pas par des intermédiaires phosphorylés, tandis que l'oxydation anaérobiose suivrait la voie classique de la fermentation. L'inhibition de l'oxydation du glucose par le cyanure pourrait facilement s'expliquer, comme nous l'avons déjà dit, par l'inhibition de la catalase, produisant alors une accumulation d'eau oxygénée toxique. L'inhibition par l'acide monoiodoacétique s'expliquerait par blocage des groupement -SH des enzymes intervenant en aérobiose. Dans ce cas, on pourrait supposer une différence entre respiration et fermentation dès le premier stade de dégradation du glucose.

Il est clair que, pour résoudre ce problème, il devenait nécessaire d'entreprendre des études systématiques. C'est pourquoi, dans les mémoires suivants, nous exposerons l'étude de l'action de ces inhibiteurs sur différents enzymes et sur les produits du métabolisme intermédiaire, en faisant, chaque fois que cela sera possible, des analyses chimiques. Il était évident aussi que le problème de la phosphorylation devait être résolu par des expériences propres démontrant d'abord l'existence d'une phosphorylation dans nos conditions expérimentales et ensuite en abordant l'étude de l'action des inhibiteurs sur la phosphorylation. Nous verrons que certains de ces problèmes ne pourront trouver une solution avec les bactéries intactes, mais nécessiteront une suppression de la membrane cellulaire, car en fait, toutes les difficultés que l'on rencontre dans une telle étude se ramènent presque à un seul problème: celui de la perméabilité.

Une chose certaine ressort dès maintenant de ces expériences manométriques: l'oxydation du glucose par *E. coli* se fait en dehors de toute participation de la succino-

déshydrogénase, donc sans passage par les acides en C<sub>4</sub>. Ceci est encore confirmé par l'action de l'azoture de sodium qui, comme le malonate, inhibe fortement l'oxydation aérobie des acides en C<sub>4</sub>, sans influencer celle du glucose.

Nous pouvons, d'après ces résultats, affirmer aussi que l'oxydation du glucose et du pyruvate par *E. coli* ne passe pas par le système tricarboxylique de KREBS. Le malonate, le fluorure et l'azoture de sodium ont nettement différencié le succinate du glucose et du pyruvate. D'ailleurs, le citrate, comme substrat, n'est jamais métabolisé par aucune des deux souches de *E. coli* que nous avons utilisées.

### RÉSUMÉ

1. Le malonate, le fluorure et l'azoture de sodium n'inhibent pas la respiration de *E. coli* à l'état non-proliférant en présence de glucose ou de pyruvate. Ils inhibent, au contraire, la respiration en présence des hexoses-phosphates, du phosphoglycérate et des acides en C<sub>4</sub>.
2. Le cyanure inhibe la respiration, en présence de glucose, des hexoses-phosphates, du phosphoglycérate, des acides en C<sub>4</sub>, mais n'inhibe pas en présence d'acide pyruvique. L'inhibition par le cyanure est due vraisemblablement à son action sur la catalase.
3. L'acide monoiodoacétique inhibe la respiration de tous les substrats examinés.
4. La fermentation en présence de glucose, hexoses-phosphates et pyruvate est inhibée par le malonate, l'azoture, le fluorure, le cyanure et l'acide monoiodoacétique.
5. Les phosphoglycérates et les acides en C<sub>4</sub> ne fermentent pas dans nos conditions expérimentales.
6. La respiration de *E. coli* ne s'effectue pas suivant le cycle de SZENT-GYÖRGYI ou celui de KREBS. D'ailleurs, l'acide citrique n'est pas métabolisé.

### SUMMARY

1. Sodium malonate, fluoride, and azide do not inhibit the respiration of non-proliferating *E. coli* in the presence of glucose or pyruvate. On the other hand, they inhibit respiration in the presence of hexose phosphates, phosphoglycerate and C<sub>4</sub>-acids.
2. Cyanide inhibits respiration in the presence of glucose, hexose phosphates, phosphoglycerate and C<sub>4</sub>-acids, but not in the presence of pyruvic acid. The inhibition by cyanide is apparently due to its action on catalase.
3. Monoiodoacetic acid inhibits the respiration in all substrates examined.
4. Fermentation in the presence of glucose, hexose phosphates, and pyruvate is inhibited by malonate, azide, fluoride, cyanide and monoiodoacetic acid.
5. Phosphoglycerates and C<sub>4</sub>-acids are not fermented under the experimental conditions used.
6. The respiration of *E. coli* is not carried out according to the cycle of SZENT-GYÖRGYI or that of KREBS. Besides, citric acid is not metabolized.

### ZUSAMMENFASSUNG

1. Natrium-Malonat, -Fluorid und -Azid hemmen in Gegenwart von Glucose oder von Pyruvat die Atmung von nicht im Vermehrungszustand befindlichem *E. coli* nicht. Sie hemmen diese Atmung je doch in Gegenwart von Hexosephosphaten, Phosphoglycerat und von Säuren der C<sub>4</sub>-Reihe.
2. Cyanid hemmt die Atmung in Gegenwart von Glucose, Hexosephosphaten, Phosphoglycerat und der C<sub>4</sub>-Säuren, jedoch nicht in Gegenwart von Pyruvat. Die Hemmung durch Cyanid ist wahrscheinlich auf dessen Wirkung auf die Katalase zurückzuführen.
3. Monojodessigsäure hemmt die Atmung bei allen untersuchten Substraten.
4. Die Gärung in Gegenwart von Glucose, Hexosephosphaten und Pyruvat wird durch Malonat, Fluorid, Azid, Cyanid und Monojodessigsäure gehemmt.
5. Phosphoglycerate und C<sub>4</sub>-Säuren werden unter unseren Versuchsbedingungen nicht vergoren.
6. Die Atmung von *E. coli* spielt sich weder nach dem Zyklus von SZENT-GYÖRGYI noch nach demjenigen von KREBS ab. Citronensäure wird übrigens nicht umgesetzt.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 T. THUNBERG, *Skand. Arch. Physiol.*, 22 (1909) 430.
- 2 J. H. QUASTEL, *Biochem. J.*, 20 (1926) 166.
- 3 J. H. QUASTEL ET W. R. WOOLDRIDGE, *Biochem. J.*, 22 (1928) 689.
- 4 A. SZENT-GYÖRGYI, *Z. physiol. Chem.*, 249 (1937) 211.
- 5 H. A. KREBS ET L. V. EGGLESTON, *Biochem. J.*, 34 (1940) 1386.
- 6 A. J. ROSENBERG, *Compt. rend.*, 222 (1946) 310.
- 7 N. B. DAS, *Biochem. J.*, 31 (1937) 1116.
- 8 F. L. BREUSCH, *Enzymologia*, 10 (1941) 165.
- 9 C. E. CLIFTON ET W. A. LOGAN, *J. Bact.*, 37 (1939) 523; *Advances in Enzymol.*, 6 (1946) 269.
- 10 E. S. G. BARRON ET H. JACOBS, *J. Bact.*, 36 (1938) 433.
- 11 J. EFFRONT, *Bull. soc. chim. France*, 4 (1890) 337.
- 12 MACLEOD, *J. Biol. Chem.*, 15 (1913) 497.
- 13 EVANS, *J. Physiol.*, 56 (1922) 146.
- 14 EMBDEN, *Z. physiol. Chem.*, 56 (1924) 146.
- 15 EMBDEN, DEUTICKE ET KRAFT, *Klin. Wochschr.*, 12 (1933) 213.
- 16 KAY, *Biochem. J.*, 22 (1928) 855.
- 17 F. LIPMANN, *Biochem. Z.*, 196 (1928) 3.
- 18 F. DICKENS ET F. SIMOR, *Biochem. J.*, 23 (1929) 937.
- 19 J. RUNNSTRÖM, R. GURNEY ET E. SPERBER, *Enzymologia*, 10 (1941) 1.
- 20 L. MASSART ET A. DUFAIT, *Z. physiol. Chem.*, 272 (1942) 157.
- 21 O. MEYERHOF ET K. LOHMANN, *Biochem. Z.*, 271 (1934) 89; *Biochem. Z.*, 273 (1934) 413.
- 22 O. MEYERHOF ET KISSLING W., *Biochem. Z.*, 276 (1935) 239; *Biochem. Z.*, 279 (1935) 40.
- 23 O. WARBURG ET W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.*, 311 (1942) 385.
- 24 H. BOREI, *Biochem. Z.*, 312 (1942) 160.
- 25 J. RUNNSTRÖM ET E. SPERBER, *Biochem. Z.*, 298 (1938) 340.
- 26 P. CHAIX ET CL. FROMAGEOT, *Enzymologia*, 7 (1939) 353.
- 27 V. R. POTTER ET C. A. ELVEJHEM, *J. Biol. Chem.*, 114 (1936) 495.
- 28 E. LUNDSGAARD, *Biochem. Z.*, 217 (1929) 162; *Biochem. Z.*, 220 (1930) 8; *Biochem. Z.*, 250 (1932) 67.
- 29 O. WARBURG ET W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.*, 303 (1939) 40.
- 30 L. RAPKINE, *Biochem. Z.*, 32 (1938) 1729.
- 31 F. BATELLI ET L. STERN, *J. physiol. et path. gén.*, 9 (1907) 228.
- 32 M. D. DIXON, *Biol. Revs.*, 4 (1929) 352.
- 33 J. B. S. COOK ET HALDANE, *Biochem. J.*, 25 (1931) 534; *Biochem. J.*, 25 (1931) 888.
- 34 TAMIYA ET KUBO, *Acta Phytochim.*, 10 (1938) 317.
- 35 B. COMMONER, *Biol. Revs.*, 15 (1940) 168.
- 36 D. E. GREEN ET S. WILLIAMSON, *Biochem. J.*, 31 (1936) 617.
- 37 M. S. SEVAG ET G. H. SHELURN, *J. Gen. Physiol.*, 26 (1942) 1.
- 38 H. WIELAND, *Ergeb. Physiol.*, 20 (1922) 477.
- 39 R. H. BROH-KAHN ET I. A. MIRSKY, *J. Bact.*, 35 (1938) 455.
- 40 D. KEILIN ET C. H. HARPLEY, *Biochem. J.*, 35 (1941) 688.
- 41 O. WARBURG, *Biochem. Z.*, 160 (1925) 309.
- 42 D. KEILIN, *Proc. Roy. Soc.*, 121 (1937) 165.
- 43 D. KEILIN ET E. F. HARTREE, *Proc. Roy. Soc., B* 119 (1935) 114.
- 44 C. E. CLIFTON, *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, 34 (1936) 291.
- 45 C. E. CLIFTON, *Enzymologia*, 4 (1937) 246.
- 46 R. J. WINZLER, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 15 (1940) 343.
- 47 R. J. WINZLER, *Science*, 99 (1944) 327.
- 48 M. J. PICKETT ET C. E. CLIFTON, *Proc. Exptl Biol. Med.*, 46 (1946) 443.
- 49 S. SPIEGELMAN, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 30 (1947) 315.
- 50 S. SPIEGELMAN ET M. J. REINER, *J. Gen. Physiol.*, 31 (1947) 175.
- 51 S. SPIEGELMAN, M. D. KAMEN ET M. SUSSMAN, *Arch. Biochem.*, 18 (1948) 409.
- 52 O. MEYERHOF, *J. Biol. Chem.*, 157 (1945) 105.
- 52a A. J. ROSENBERG, *Compt. rend.*, 226 (1948) 1751.
- 53 J. BRACHET, *Arch. de biol.*, 45 (1934) 611.
- 54 PHILIPS, *Biol. Bull.*, 78 (1940) 256.
- 55 BARNES, *J. Exptl Zool.*, 95 (1944) 399.
- 56 F. MOOG ET S. SPIEGELMAN, *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, 49 (1942) 392.
- 57 J. N. STANNARD, *Am. J. Physiol.*, 126 (1939) 196.
- 58 I. M. KORR, *Am. J. Physiol.*, 133 (1941) 167.
- 59 E. G. BALL, *Symposium on Respiratory Enzymes*, Wisconsin 1942.
- 60 R. J. WINZLER, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 21 (1943) 229.

Reçu le 7 juin 1949