

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

II. ACTION DES INHIBITEURS SUR LES DESHYDROGÉNASES
ET LES PHOSPHATASES DE *ESCH. COLI*

par

EUGÈNE AUBEL ET JEKISIEL SZULMAJSTER

Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris (France)

L'action que les inhibiteurs produisent sur la fermentation et la respiration de *Esch. coli*, telle que nous l'avons exposée dans un premier mémoire¹, est une action globale sur les bactéries intactes. Une telle étude est forcément incomplète. Si l'on veut mieux interpréter les résultats obtenus, il faut pousser plus loin l'analyse et, en premier lieu, examiner l'action des inhibiteurs employés sur les systèmes enzymatiques présidant à la dégradation des substrats au cours des phénomènes fermentatifs et respiratoires. C'est l'objet de ce second travail.

I. ACTION SUR LES DESHYDROGÉNASES

Il était nécessaire d'étudier en premier lieu l'action des inhibiteurs sur les deshydrogénases étant donné le rôle important joué par ces enzymes dans les oxydations biologiques*.

Dans *E. coli*, on a pu mettre en évidence un grand nombre de deshydrogénases. Beaucoup se trouvent dans l'extrait bactérien. On a pu ainsi montrer l'existence des deshydrogénases de: l'acide formique, l'alcool éthylique, des trioses-phosphates, de l'acide malique et de l'acide succinique.

Pour étudier l'action des inhibiteurs sur les deshydrogénases, nous avons utilisé la technique classique de THUNBERG dans les mêmes conditions que celles des expériences manométriques¹ (même densité bactérienne, même concentration en substrat et inhibiteur et même p_H). Une seule précaution, cependant, était nécessaire: laver les bactéries trois fois avec du chlorure de sodium à 9% (au lieu d'une fois dans les expériences relatées dans le mémoire précédent) avant de les mettre en suspension dans un tampon de façon à éliminer tout substrat endogène. Les résultats obtenus sont résumés dans les Tableaux I et II.

Il est surprenant de voir que le malonate inhibe non seulement la succino-deshydrogénase mais aussi la pyruvico-deshydrogénase. C'est LIPMANN (1937/39/41)³ qui a montré l'existence de cette deshydrogénase dans le *Lactobacillus delbrueckii*, au cours

* Voir bibliographie détaillée sur les deshydrogénases dans SUMNER².

TABLEAU I

ACTION DU MALONATE, DE L'AZOTURE DE SODIUM ET DU CYANURE DE POTASSIUM SUR QUELQUES DESHYDROGÉNASES DE *E. coli* (M)

Chaque tube de Thunberg contient: dans une branche: 1 ml de substrat (hexoses M/90, corps en C₃ M/30 ou acides en C₄ M/60, conc. finales); 0.5 ml de bleu de méthylène M/2000; dans l'autre branche: 0.5 ml d'une suspension bactérienne dans un tampon phosphate à pH 6.8 et 0.5 ml d'inhibiteur (malonate M/5, azoture de sodium M/800, cyanure de potassium M/250, concentrations finales). Les chiffres expriment le temps (en minutes) de décoloration du bleu de méthylène. Température = 37°.

B = Bactéries

B+S = Bactéries + substrats
∞ = non décoloration

Substrats	Exp. 1			Exp. 2			Exp. 1			Exp. 2			Exp. 1		
	B	B+S	B+S+mal	B	B+S	B+S+mal	B	B+S	B+S+N ₃ Na	B	B+S	B+S+N ₃ Na	B	B+S	B+S+KCN
Glucose	∞	18	8	∞	3	2	∞	11	6	∞	6	6	∞	3	3
Hexose-mono-phosphate (ester Robison)	∞	45	79	∞	40	47	∞	26	30	∞	28	32	∞	52	52
Hexose-di-phosphate	∞	18	13	∞	27	9	∞	35	40	∞	30	36	∞	28	20
Phosphoglycérate	∞	91	95	∞	75	55	∞	76	85	∞	71	73	∞	54	67.5
Pyruvate	∞	35	∞	∞	15	120	∞	20	24	∞	25	26	∞	11	16
Succinate	∞	∞	80	∞	61	∞	∞	110	125	∞	87	100	∞	100	96

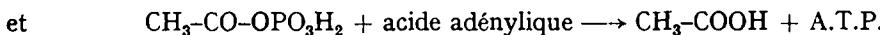
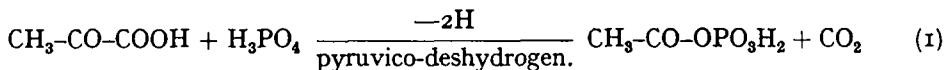
TABLEAU II

ACTION DU FLUORURE DE SODIUM ET DE L'ACIDE MONOIODOACÉTIQUE SUR QUELQUES DESHYDROGÉNASES DE *E. coli* (M)

Mêmes conditions que dans le Tableau I. AIA = acide monoiodoacétique M/1000, fluorure de sodium M/33 (concentrations finales)

Substrats	Exp. 1			Exp. 2			Exp. 1			Exp. 2		
	B	B+S	B+S+FNa	B	B+S	B+S+FNa	B	B+S	B+S+AIA	B	B+S	B+S+AIA
Glucose	∞	8	8	∞	4	2	∞	2	2	∞	7	10
Hexose-mono-phosphate (Ester de Robison)	∞	20	60	∞	18	63	∞	14	5	∞	20	22
Hexose-diphosphate	∞	40	30	∞	30	27	∞	21	18	∞	30	20
Phosphoglycérate	∞	76	∞	∞	61	∞	∞	76	150	∞	85	193
Pyruvate	∞	15	22	∞	9	7	∞	3	9	∞	12	10
Succinate							∞	20	∞	∞	10	∞
Fumarate							∞	15	11			
Malate							∞	10	9			

de l'oxydation de l'acide pyruvique, cette oxydation étant couplée avec la phosphorylation de l'acide adénylique suivant la réaction:



Les 2 H provenant de cette oxydation sont acceptés par la flavine-adénine-dinucléotide. Le dinucléotide réduit est réoxydé par l'oxygène moléculaire en aérobiose, le bleu de méthylène pouvant remplacer l'oxygène en anaérobiose. STILL (1941)⁴ a trouvé un système analogue dans l'extrait de *E.coli* qui a besoin de phosphore inorganique, de cocarboxylase, de magnésium et d'un dinucléotide flavine-adénine pour oxyder l'acide pyruvique.

Nous venons de démontrer que le malonate inhibe presque complètement ce système. Une conséquence de cette action dérive du fait que la réaction (1) produit un dégagement d'anhydride carbonique. Si, au cours de sa dégradation, le glucose passe par le stade acide pyruvique, en présence du malonate, on ne doit pas observer de production d'anhydride carbonique. L'expérience suivante (Tableau III) montre qu'après 60 minutes le malonate bloque complètement l'anhydride carbonique au cours de l'oxydation du glucose par *E. coli*.

TABLEAU III

ACTION DE *E.coli* SUR LE GLUCOSE EN PRÉSENCE DE MALONATE DE SODIUM EN AÉROBIOSE

Expérience faite dans l'appareil de WARBURG. Chaque cupule contient: 1 ml de suspension bactérienne (3 mg poids sec) dans tampon phosphate M/15 à pH 6.8; 0.5 ml de malonate (concentration finale M/5) ou 0.5 ml d'eau (dans le témoin); 0.2 ml de soude à 10% ou 0.2 ml d'eau.

Q.R. calculé (pour chaque 20 minutes) par la "méthode directe". Température: 37°.

Temps	mm ³ d'O ₂ consommé		mm ³ de CO ₂ dégagé		Q. R.	
	Témoin	Malonate	Témoin	Malonate	Témoin	Malonate
10	49	55	29	27	0.59	0.49
20	110	119	69	64	0.63	0.54
40	226	236	129	103	0.52	0.33
60	325	342	194	124	0.65	0.198
80	425	448	269	124	0.75	0

Cette nouvelle propriété du malonate explique l'inhibition de l'oxydation de l'acide pyruvique étudiée dans le mémoire précédent¹. Il est vrai que cette inhibition n'est que de 50% environ, ce qui conduit à admettre qu'une partie de l'acide pyruvique pourrait peut-être s'oxyder par une autre voie.

Quant aux autres inhibiteurs, les tableaux ci-dessous nous montrent leurs effets. Le fluorure empêche fortement l'action de la deshydrogénase de l'acide phosphoglycérique. Il provoque aussi un léger retard dans la décoloration du bleu de méthylène, en présence de l'hexose-monophosphate (ester de ROBISON). Par contre, en présence de l'hexose-diphosphate, la décoloration est exaltée.

L'acide monoiodoacétique, par son action sur les groupements -SH, inhibe non seulement la deshydrogénase de l'acide succinique, ce que l'on connaît depuis longtemps,

mais aussi celle de l'acide phosphoglycérique, ce qui s'explique sûrement de la même façon.

L'azoture de sodium produit un léger retard dans la décoloration du bleu de méthylène en présence de l'acide succinique, de l'hexose-diphosphate et du phosphoglycérate.

Le cyanure n'inhibe que très peu la deshydrogénase de l'acide phosphoglycérique et reste sans action sur les autres deshydrogénases.

Cette étude sur les deshydrogénases nous a apporté un certain nombre de faits nouveaux, mais les différences entre l'action du malonate, du fluorure et de l'azoture de sodium sur l'oxydation du glucose, d'une part, et sur celle des autres substrats d'autre part, qu'on a signalées dans le mémoire précédent¹, restent toujours inexpliquées.

Ceci nous a conduit à rechercher l'action des inhibiteurs sur les phosphatases.

2. ACTION DES INHIBITEURS SUR LES PHOSPHATASES⁵

On désigne en général sous le nom de phosphatases, tout enzyme dont l'activité libère l'acide orthophosphorique (PO_4H_3) à partir des mono et diesters, ou des phospho-amides, des acides pyrophosphorique et métaphosphorique.

Chaque type de liaison est hydrolysé par un ou plusieurs enzymes spécifiques, aussi existe-t-il des phosphomono-estérases, des phospho-di-estérases, des phospho-amidases, des pyrophosphatases et des métaphosphatases.

Les phosphoestérases (mono et di) et les pyrophosphatases sont de beaucoup les plus importantes et les plus répandues dans la nature. Les monoestérases des tissus animaux ou végétaux hydrolysent dans les tumeurs et les tissus de nombreux esters phosphoriques, entre autres: les acides hexoses-phosphoriques, phosphoglycérique, phosphopyruvique — termes intermédiaires du métabolisme des glucides — et les nucléotides participant au métabolisme des acides nucléiques ou à diverses fonctions cellulaires.

La première remarque sur l'existence d'une phosphatase date de 1907, quand SUZUKI, YOSHIMURA ET TAKAISHI⁶ ont trouvé un enzyme dans le son de riz qui libère l'acide phosphorique de la phytine. En 1908, MCCOLLUM ET HART⁷ ont montré un enzyme semblable dans le tissu animal. GROSSER ET HUSLER (1912)⁸ ont mis en évidence une phosphatase dans les os, les reins et le pancréas.

ROBISON⁹ a trouvé une phosphatase qui agit sur l'hexose-mono-phosphate et qui, en présence de sels de calcium solubles forme un précipité de phosphate tricalcique. Ce phénomène a conduit ROBISON ET SOAMES (1924)¹⁰ à formuler une théorie de l'ossification par l'action des phosphatases. C'est à partir de cette époque que les recherches sur les phosphatases ont pris une extension importante. Actuellement on en connaît un grand nombre qui catalysent de multiples réactions en rapport avec le métabolisme des hydrates de carbone, des nucléotides, des phospholipides.

FOLLEY ET KAY (1935)¹¹ ont classé les phosphatases suivant leur pH optimum d'action, leur spécificité vis-à-vis des isomères α et β de l'acide glycéro-phosphorique et leur sensibilité à l'activation par les ions Mg^{++} . Mais toute classification ne saurait être qu'incomplète et provisoire, tant que l'isolement des enzymes purs n'a pas été réalisé et leurs propriétés bien définies.

Il existe très peu de travaux sur les phosphatases dans les bactéries. HEARD ET *Bibliographie p. 267.*

WYNNE¹² ont montré (1933) l'existence d'une hexose-di-phosphatase dans une culture de *Cl. acétobutylicum*. PETT ET WYNNE¹³, qui ont étudié les propriétés de cette phosphatase, arrivent à la conclusion qu'elle diffère non seulement de l'hexose-di-phosphatase isolée des mammifères et des plantes, mais aussi de celle d'une autre espèce bactérienne (*B. propionique Jensenii* VAN NIEL). Ces auteurs ont montré que Mg^{++} n'active pas cette phosphatase comme c'est le cas pour les phosphatases animales et végétales, et que le fluorure de sodium est sans action inhibitrice. BOIVIN ET MESROBEANU (1933)¹⁴ ont mis en évidence un système phosphatasique dans l'autolysat d'*E.coli* qui libère le phosphore soluble (p_H 6) et le phosphore acido-insoluble (p_H 10). SUTRA¹⁵, en 1946, a trouvé une phosphatase dans le *Cl. saccharoaceticum* dont le maximum d'activité est à p_H 6 avec les glycéro-phosphates α et β . Le pouvoir hydrolytique ce microorganisme vis-à-vis de l'hexose-di-phosphate est très faible.

Nous avons mis en évidence dans le *E.coli* (M) à l'état de bactéries non proliférantes, l'existence d'un système phosphatasique capable d'hydrolyser les hexoses mono et di phosphates. Puis nous avons étudié l'action des inhibiteurs sur ces enzymes et plus particulièrement sur l'hexose-di-phosphatase. Cette dernière est, en général, peu connue. Certains auteurs (HOMMERBERG¹⁶, WALDSCHMIDT-LEITZ¹⁷) ont même refusé d'accorder une spécificité à cette phosphatase. Cependant, GOMORI (1943)^{17a} a trouvé dans le foie une hexose-di-phosphatase spécifique. Il a montré qu'elle est activée par le cyanure et inhibée par le fluorure de sodium.

EXPÉRIENCES

Bactéries: les bactéries sont obtenues par centrifugation d'une culture (1 litre) de 18 heures sur milieu habituel¹. Le culot est lavé deux fois avec du chlorure de sodium à 9% et mis en suspension dans 40 ml de chlorure de sodium à 9% (dans l'expérience 1, Tableau IV) ou dans un tampon borate (dans les expériences suivantes).

Mise en évidence de l'hexose-diphosphatase et de son p_H optimum

Pour l'étude de la variation du taux de l'hydrolyse de l'hexose-di-phosphate de Mg entre p_H 5 et 9, la suspension bactérienne est répartie dans une série de tubes de centrifugeuse (de 30 ml). Chaque tube contient 10 ml de solution tampon (acétate ou borate) au p_H voulu et 1 ml d'une solution d'hexose-di-phosphate de Mg à 1% environ (voir Tableau IV).

Une prise ayant été faite pour le dosage du P minéral initial, les tubes, avec leur contenu, sont ensuite mis pour 3 heures à l'étuve à 37°. On fait alors une prise identique pour le dosage du P minéral final. On déprotéinise ensuite avec l'acide perchlorique (conc. finale 5%) et l'on centrifuge. On dose le P minéral par la méthode MACHEBOEUF-DELSAL¹⁸ sur une prise adéquate du surnageant. Toutes les opérations, jusqu' au stade de la déprotéinisation, sont faites aseptiquement. Le dosage de l'activité phosphatasique repose sur la détermination, dans des conditions standardisées, des quantités d'acide phosphorique libéré par les bactéries, agissant sur un substrat spécifique.

La suspension bactérienne renferme toujours des quantités non négligeables d'acide phosphorique. Il est donc nécessaire, dans chaque série d'expériences, de faire un témoin (Bss). Il faut également effectuer ce dosage dans le cas des hexoses mono- et di-phosphates; car il est pratiquement impossible d'éliminer par purification les dernières traces de phosphore minéral qu'ils contiennent.

TABLEAU IV
HEXOSE-DIPHOSPHATASE ET SON PH OPTIMUM

Les chiffres donnent les quantités (en γ) de P minéral hydrolysé pour 5 ml initiaux de chaque essai, contenant au départ 0.371 mg de P organique sous forme d'hexose-di-phosphate de Mg.

Bss = bactéries sans substrat

PH	Pm init.	Pm fin.	Pm fin.— Pm init.	Pm hydrolysé	p.cent d'hydrolyse
5	47	121	74	64	17.25
5.6	47	124	77	67	18.05
7	47	110	63	53	14.24
8	47	122	75	65	17.50
Bss(T)	47	104	57	47	12.67
7	8	18	10		

Le Tableau IV montre que *E. coli* contient une hexose-di-phosphatase dont l'activité présente deux maxima: l'un à p_H 5.6 et l'autre à p_H 8. Il montre aussi que le taux d'hydrolyse trouvé à ces p_H est du même ordre que celui trouvé par HEARD ET WYNNE¹² et par SUTRA¹³. Cependant, c'est à p_H 7 que nous avons étudié la déphosphorylation, pour rester dans les conditions habituelles de nos expériences. L'écart est d'ailleurs minime.

D'autre part, il était important de savoir si, dans nos conditions expérimentales, cette phosphatase *peut passer hors de la cellule pour hydrolyser l'hexose-diphosphate*. Il était en effet difficile d'admettre que dans les expériences manométriques¹, les dérivés phosphorylés puissent pénétrer dans les bactéries. D'ailleurs, le temps de latence observé fréquemment dans le départ de la respiration ou de la fermentation, en présence des esters phosphoriques, l'indique suffisamment.

Pour obtenir le passage des phosphatases dans le milieu extérieur, nous avons laissé les bactéries en suspension trois heures à 37° avant d'ajouter le substrat. Dans ces conditions il y a début d'autolyse et vraisemblablement modification de l'état de la membrane bactérienne. Les expériences ont été réalisées de la façon suivante:

Nous préparons trois séries de trois tubes de centrifugeuse stérils: A, B, C. Dans la série A, nous utilisons directement une partie de la suspension bactérienne dans le tampon borate à p_H 7. Le reste est mis à l'étuve à 37° pour trois heures, puis centrifugé. Le culot bactérien, repris dans une même quantité de tampon, constitue la suspension de la série B. Quant au liquide surnageant, il servira dans la série C à la place de la suspension.

On a étudié l'action des inhibiteurs dans chaque série. Pour chacune d'elles nous avons fait les essais décrits dans le Tableau V.

Les Tableaux V et Va résument nos résultats en aérobiose et anaérobiose. On voit ici que l'activité phosphatasique est relativement forte; on a, dans la série A, 28%, dans la série B, 19% et dans la série C on a encore 16% d'hydrolyse. Ce dernier résultat montre que la phosphatase diffuse à travers la membrane cellulaire et hydrolyse l'hexose-diphosphate avant qu'il ne pénètre dans les bactéries. L'inhibition de la phosphatase

TABLEAU V

ACTION DU MALONATE SUR L'HEXOSEDIPHOSPHATASE DE *E. coli* EN AÉROBIOSE

1. (B+s) = 5 ml de susp. bactérienne + 1 ml de solution d'hexosediphosphate de magnésium à 1% environ; on complète à 16 ml avec tampon borate pH 7.

2. (B+s+mal) = 5 ml susp. bactérienne + 1 ml hexose-diph. + 1 ml malonate (conc. finale M/5): on complète à 16 ml avec tampon borate pH 7.

3. (B) = 5 ml susp. bactérienne; on complète à 16 ml avec tampon borate à pH 7.

Les chiffres expriment les quantités de P minéral (en γ) hydrolysé pour 10 ml de liquide initial. P organique initial (sous forme d'hexose diph.) pour 10 ml = 806 γ

Série A

No. d'essai	Pm init.	Pm fin.	Pm fin.— Pm init.	Pm hydr.	p.cent d'hydr.	inhibition p.cent
1. (B+s)	212	484	272	224	27.8	
2. (B+s+mal)	204	360	156	108	13.4	
3. (B)	72	120	48			51.8

Série B

1. (B+s)	228	416	188	156	19.3	
2. (B+s+mal)	228	300	72	40	4.96	
3. (B)	72	104	32			74

Série C

1. (B+s)	224	364	140	132	16.4	
2. (B+s+mal)	216	232	16	8	0.99	
3. (B)	56	64				93.4

TABLEAU Va

ACTION DU MALONATE SUR L'HEXOSE-DIPHOSPHATASE DE *E. coli* EN ANAÉROBIOSE

Contenu identique au Tableau V. P organique initial (sous forme d'hexose-diphosphate) pour 10 ml = 506 γ

Série A

No. d'essai	Pm init.	Pm fin.	Pm fin.— Pm init.	Pm hydr.	p.cent d'hydr.	Inhibition p.cent
1. (B+s)	220	388	168	108	21.3	
2. (B+s+mal)	232	276	44	0	0	
3. (B)	108	168	60			100

Série B

1. (B+s)	188	268	80	60	11.8	
2. (B+s+mal)	188	248	60	40	7.9	
3. (B)	100	120	20			33

Série C

1. (B+s)	200	280	80	76	15	
2. (B+s+mal)	208	206	2	0	0	
3. (B)	92	96	4			100

par le malonate à M/5 est presque totale dans l'autolysat et assez forte dans les bactéries, aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose. Nous reviendrons un peu plus tard sur la signification de ce fait.

Les Tableaux V et VI résument les résultats obtenus avec le fluorure, l'azoture de sodium, le cyanure et l'acide monoiodoacétique.

En ce qui concerne le fluorure et l'azoture de sodium il est difficile de tirer une conclusion quant à leur action sur l'hexose-diphosphatase. Les chiffres donnés dans le Tableau V indiquent que leur action vis-à-vis de cette phosphatase n'est pas constante; nous avons observé plusieurs fois tantôt une inhibition et tantôt une exaltation, aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose. Il est vrai que pour le fluorure l'inhibition est plus fréquente que l'exaltation. En revanche, l'inhibition par le cyanure est constante et de l'ordre de 45% (série A et C).

Remarquons que cette phosphatase est certainement différente de celle que GOMORI^{17a} a mis en évidence dans le foie animal et qui est activée par le cyanure. L'inhibition par l'acide monoiodoacétique est faible: 15% avec les bactéries intactes et 28% avec l'autolysat.

TABLEAU VI

ACTION DE L'AZOTURE ET DU FLUORURE DE SODIUM SUR L'HEXOSE-DIPHOSPHATASE DE *E. coli*

Mêmes conditions que dans le Tableau V

Azoture de sodium M/800 } concentrations finales
Fluorure de sodium M/33 }

P organique initial (sous forme d'hexose-diph.) pour 10 ml = 742 γ.

Série A

No. d'essai	Pm init.	Pm fin.	Pm fin.— Pm init	Pm hydr.	p.cent d'hydr.	Inhibition p.cent
1. (B+s)	192	396	204	100	13.47	
2. (B+s+azoture de sodium)	192	392	200	96	12.93	4
3. (B+s+fluorure de sodium)	192	368	176	72	9.7	28
4. (B)	64	168	104			

Série B

1. (B+s)	188	376	188	160	21.56	
2. (B+s+azoture de sodium)	188	320	132	104	14.01	35
3. (B+s+fluorure de sodium)	188	320	132	104	14.01	35
4. (B)	56	84	28			

Série C

1. (B+s)	164	252	88	88	11.85	
2. (B+s+azoture de sodium)	176	253	77	77	10.30	13
3. (B+s+fluorure de sodium)	180	280	100	100	13.50	14 (exaltation)
4. (B)	40	40	0			

TABLEAU VII

ACTION DU CYANURE ET DE L'ACIDE MONOIODOACÉTIQUE SUR L'HEXOSE-DI-PHOSPHATASE DE *E.coli*

Mêmes conditions que dans le Tableau V

Cyanure de potassium M/250

AIA = Acide monoiodoacétique M/1000

P organique initial (sous forme d'hexose-diph. de Mg) pour 10 ml = 694 γ

Série A

No. d'essai	Pm init.	Pm fin.	Pm fin.— Pm init.	Pm hydr.	p.cent d'hydr.	Inhibition p.cent
1. (B + s)	240	560	320	264	38.0	
2. (B + s + KCN)	244	452	208	152	21.9	42.42
3. (B + s + AIA)	236	516	280	224	32.27	15.15
4. (B)	88	144	56			

Série C

1. (B + s)	204	300	96	84	12.1	
2. (B + s + KCN)	220	276	56	44	6.34	47.6
3. (B + s + AIA)	196	268	72	60	8.64	28.56
4. (B)	72	84	12			

Hexosemonophosphatase

Nous avons également mis en évidence, dans les bactéries intactes, une phosphatase qui hydrolyse l'ester phosphorique de ROBISON. Nous n'avons employé que l'azoture de sodium comme inhibiteur. Le Tableau VIII montre que le degré d'hydrolyse est plus faible (12 % environ), mais ceci est peut-être dû à la quantité plus faible de bactéries utilisées. On constate en outre que l'azoture de sodium est sans action sur cet enzyme.

TABLEAU VIII

ACTION DE L'AZOTURE DE SODIUM SUR L'HEXOSE-MONO-PHOSPHATASE DE *E.coli*

1. (B + s) = 1 ml susp. bactérienne + 1 ml d'une solution d'hexose-monophosphate de sodium (Ester de ROBISON) contenant 807 γ de P organique; on complète à 10 ml avec tampon borate à pH 7.

2. (B + s + azoture de sodium) = 1 ml susp. bactérienne + 1 ml solution d'hexose-monophosph.

de sodium + 1 ml solution d'azoture de sodium (conc. finale M/800); on complète à 10 ml avec une

solution de tampon borate à pH 7.

3. (B) = 1 ml susp. bactérienne; on complète à 10 ml avec tampon à pH 7.

4. (B + azoture de sodium) = 1 ml susp. bactérienne + 1 ml solution d'azoture de sodium (conc.

finale M/800); on complète à 10 ml avec tampon borate pH 7.

Les chiffres expriment le P minéral en γ hydrolysé pour 10 ml.

No. d'essai	Pm init.	Pm fin.	Pm fin.— Pm init.	Pm hydr.	p.cent d'hydr.	Inhibition p.cent
1. (B + s)	44	150	106	102	12.6	
2. (B + s + azoture de sodium)	48	152	104	101	12.5	0
3. (B)	12	16	4			
4. (B + azoture de sodium)	13	16	3			

Adénylpyrophosphatase

Etant donné l'importance de l'acide adenyl-pyrophosphorique dans le métabolisme glucidique, il est intéressant de voir si *E. coli* possède une phosphatase capable d'hydrolyser cet acide. Nous nous proposons d'étudier l'action des inhibiteurs sur cet enzyme. Pour réaliser cette expérience nous avons utilisé comme substrat l'ATP préparé à partir du muscle de lapin¹⁹. Le Tableau IX donne le schéma et le résultat de l'expérience. Malgré le résultat négatif on ne peut conclure à l'inexistence d'une adényl-pyrophosphatase (apyrase) dans *E. coli*. En effet, il est possible que cette dernière n'agisse pas sur l'ATP du muscle, alors que'elle peut le faire avec l'ATP propre de *E. coli*. D'ailleurs, MEYERHOF (1945)²⁰ a montré l'existence de différentes apyrases (entre autres celle de la levure et celle de la pomme de terre). Ceci nous a amené à préparer l'ATP extrait de *E. coli*. Mais si nous sommes arrivés à mettre en évidence l'ATP dans *E. coli* (déjà isolé par LE PAGE ET UMBREIT (1943)²¹, nous n'avons pu, avec les moyens dont nous disposons, isoler une quantité suffisante pour faire quelques expériences.

TABLEAU IX
ACTION DE *E. coli* SUR L'ATP DU MUSCLE DE LAPIN

1. (B+s) = 1 ml susp. bactérienne + 1 ml solution d'A.T.P. (= 100 γ P 7'); on complète à 10 ml avec tampon borate pH 7.
 2. (B+s+azoture de sodium) = 1 ml susp. bactérienne + 1 ml solution d'ATP + 1 ml solution d'azoture de sodium (conc. finale M, 800); on complète à 10 ml avec tampon borate à pH 7.
 3. (B) = 1 ml susp. bactérienne; on complète à 10 ml avec tampon borate pH 7.
- Les chiffres expriment le P minéral (en γ) hydrolysé pour 10 ml.

No. d'essai	Pm init.	Pm fin.	Pm fin.— Pm init.	Pm hydr.	Pcent d'hydrolyse
1. (B+s)	50	49	0	0	0
2. (B+s+azoture de sodium)	50	51	1	0	0
3. (B)	12	16	4		

CONCLUSION

Dans ce mémoire nous avons étudié l'action des inhibiteurs sur les deshydrogénases et les phosphatases de *E. coli*. En ce qui concerne les deshydrogénases, nous avons mis en évidence l'action de quelques inhibiteurs sur certains de ces enzymes. Ainsi, nous avons trouvé une nouvelle action de l'acide malonique, inhibant la pyruvico-deshydrogénase. Ceci explique l'inhibition partielle de l'oxydation de l'acide pyruvique et l'arrêt du dégagement de l'anhydride carbonique à partir du glucose, observés en présence de cet inhibiteur. En outre, le fluorure inhibe totalement la deshydrogénase de l'acide 3-phospho-glycérique et plus faiblement celle de l'ester de ROBISON. L'intervention du fluorure dans ce système deshydrogénasique pourrait expliquer en partie l'action inhibitrice observée sur l'oxydation de dérivés phosphorylés¹.

L'acide monoiodoacétique inhibe aussi la deshydrogénase de l'acide 3-phospho-glycérique. Par contre, le cyanure et l'azoture de sodium sont presque sans action sur les deshydrogénases.

D'autre part, nous avons mis en évidence l'existence, dans *E. coli*, de phosphatases

capables d'hydrolyser les hexoses mono- et di-phosphates. Ces enzymes peuvent passer dans le milieu extérieur au cours de l'expérience, vraisemblablement par une modification de la membrane cellulaire.

L'hexose-diphosphatase se montre sensible au malonate (inhibition 100%) à concentration M/5. On peut admettre que les hexoses-phosphates ne pénètrent pas ou pénètrent très peu dans les cellules bactériennes. Pour pénétrer et ensuite être oxydés, ils doivent être déphosphorylés; or, le malonate à concentration M/5, empêchant cette déphosphorylation, produit l'arrêt de la consommation d'oxygène, observé dans les expériences manométriques¹.

Il est pourtant difficile d'admettre une spécificité d'action du malonate vis-à-vis de l'hexose-di-phosphatase. Dans ce cas la difficulté subsiste toujours quant à l'action du malonate, du fluorure et de l'azoture de sodium sur l'oxydation du glucose d'une part et sur celle des hexoses-phosphates d'autre part (voir mémoire¹).

L'explication de ce phénomène ne pouvait être donnée que par une étude de la phosphorylation, ce qui fera l'objet du prochain mémoire.

RÉSUMÉ

1. La spécificité d'action des inhibiteurs dans nos conditions expérimentales n'est pas rigoureuse. Le malonate inhibe non seulement la succino-deshydrogénase mais aussi la pyruvico-deshydrogénase. De même, le fluorure, connu comme inhibiteur de l'énolase, inhibe fortement la deshydrogénase de l'acide 3-phosphoglycérique, plus faiblement celle de l'ester de ROBISON et complètement celle des acides en C₄.

L'acide monoiodoacétique inhibe également la deshydrogénase de l'acide 3 phosphoglycérique. Par contre, l'azoture et le cyanure sont presque sans action sur les deshydrogénases.

2. Quant aux phosphatases, il en existe dans *E.coli* capables d'hydrolyser l'hexosemono- et diphosphate. Ces enzymes peuvent passer dans le milieu extérieur vraisemblablement par modification de la membrane cellulaire.

3. Les dérivés phosphorylés pénètrent peu ou pas du tout dans la cellule bactérienne vivante. Pour y pénétrer et ensuite être oxydés ils doivent subir la déphosphorylation.

4. L'action des quelques inhibiteurs sur les phosphatases de *E.coli* a été étudiée.

SUMMARY

1. The specificity of action of the inhibitors under our experimental conditions is not absolute. The malonate inhibits not only succinate dehydrogenase, but also pyruvate dehydrogenase. Similarly, fluorine, known as an inhibitor of enolase, inhibits strongly the dehydrogenase of 3-phosphoglyceric acid, less strongly that of the ROBISON ester and completely that of C₄-acids.

Moniodoacetic acid also inhibits the dehydrogenase of 3-phosphoglyceric acid. In contrast, azide and cyanide are almost without action on the dehydrogenases.

2. Regarding phosphatases, there is one in *E.coli* capable of hydrolyzing hexose mono- and diphosphates. These enzymes are able to pass into the exterior surroundings, apparently by modification of the cellular membrane.

3. The phosphorylated derivatives penetrate little or not at all into the living bacterial cell. To penetrate and subsequently to be oxidized, they must undergo dephosphorylation.

4. The action of some inhibitors on the phosphatases of *E.coli* has been studied.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Wirkung der Hemmstoffe ist unter unseren Versuchsbedingungen nicht streng spezifisch. Malonat hemmt nicht nur die Bernsteinsäure-Dehydrogenase sondern auch die Brenztraubensäure-Dehydrogenase. Das Fluorid, bekanntlich ein Hemmstoff der Enolase, hemmt die Dehydrogenase der 3-Phosphoglyzerinsäure stark, schwächer die des ROBISON-Esters und vollkommen die der C₄-Säuren.

Die Monojodessigsäure hemmt gleichfalls die Dehydrogenase der 3-Phosphoglyzerinsäure. Dagegen sind Azid und Cyanid beinahe ohne Wirkung auf die Dehydrogenasen.

Bibliographie p. 267.

2. *E. coli* enthält Phosphatasen, die Hexose-mono- und -diphosphat hydrolysieren können. Diese Enzyme können, wahrscheinlich durch Veränderung der Zellwand, in das umgebende Medium gelangen.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 E. AUBEL, A. J. ROSENBERG, J. SZULMAJSTER, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 228.
- 2 J. B. SUMNER ET G. F. SOMERS, *Chemistry and Methods of Enzymes*, Acad. Press, New York 1943.
- 3 F. LIPMANN, *Enzymologia*, 4 (1937) 65.
- 4 F. LIPMANN, *Cold Spring Harbor Symposia, Quant. Biol.*, 7 (1939) 248.
- 5 F. LIPMANN, *Advances in Enzymol.*, 1 (1941) 99.
- 6 J. L. STILL, *Biochem. J.*, 35 (1941) 380.
- 7 J. ROCHE ET J. COURTOIS, *Exposés Ann. Bioch. Méd.*, IVe Série (1944) 219.
- 8 U. SUZUKI, K. YOSHIMURA ET M. TAKAISHI, *Tokyo Imp. Univ. J. Coll. Agr.*, 7 (1907) 503.
- 9 E. V. MACCOLLUM ET E. B. HART, *J. Biol. Chem.*, 4 (1908) 497.
- 10 P. GROSSE ET J. HUSLER, *Biochem. Z.*, 39 (1912) 1.
- 11 R. ROBISON, *Biochem. J.*, 17 (1923) 286.
- 12 R. ROBISON ET K. M. SOAMES, *Biochem. J.*, 18 (1924) 740.
- 13 S. J. FOLLEY ET H. D. KAY, *Biochem. J.*, 29 (1935) 1837.
- 14 R. H. D. HWARD ET R. M. WYNNE, *Biochem. J.*, 27 (1933) 1655.
- 15 L. B. PETT ET R. M. WYNNE, *Biochem. J.*, 27 (1933) 1660.
- 16 A. BOIVIN ET L. MESROBEANU, *Compt. rend. soc. biol.*, 112 (1933) 611.
- 17 R. SUTRA, *Bull. soc. chim. biol.*, 28 (1946) 741.
- 18 C. HOMMERBERG, *Z. physiol. Chem.*, 185 (1929) 123.
- 19 E. WALDSCHMIDT-LEITZ, *Z. physiol. Chem.*, 236 (1935) 168.
- 20 G. GOMORI, *J. Biol. chem.*, 148 (1943) 199.
- 21 M. MACHEBOEUF ET J. DELSAI, *Bull. soc. chim. biol.*, 25 (1943) 116.
- 22 R. AGID, *Bull. soc. chim. biol.*, 29 (1947) 572.
- 23 O. MEYERHOF, *J. Biol. Chem.*, 157 (1945) 105.
- 24 G. A. LE PAGE ET W. W. UMBREIT, *J. Biol. Chem.*, 147 (1943) 263; 148 (1943) 255.

Received le 20 juin 1949