

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

III. RÔLE DU PHOSPHORE DANS LE MÉTABOLISME DE *E.COLI*.  
ACTION DE QUELQUES INHIBITEURS SUR LA PHOSPHORYLATION ET  
LA DÉPHOSPHORYLATION DES OSÉS

par

EUGÈNE AUBEL ET JEKISIEL SZULMAJSTER

*Institut de Biologie Physico-Chimique, Paris (France)*

L'étude du rôle du phosphore dans le métabolisme bactérien découle des travaux effectués sur la phosphorylation des glucides par le muscle<sup>1</sup> et par la levure<sup>2, 3, 4</sup>. Le schéma EMBDEN-MEYERHOF-PARNAS, devenu classique, est actuellement étendu à la fermentation des glucides pour un grand nombre de bactéries. VIRTANEN ET TIKKA<sup>5</sup> ont déjà montré la formation d'esters phosphoriques avec une préparation de *B.casei*. La transformation de l'acide phosphoglycérique en acide pyruvique par *E.coli* a été démontrée par ANTONIANI<sup>6</sup>. TIKKA<sup>7</sup> a trouvé que *E.coli* dégrade l'hexose-diphosphate, l' $\alpha$ -glycérophosphate et l'acide phosphoglycérique en donnant les produits finaux qu'on trouve normalement dans la fermentation du glucose. Il propose d'inclure ces corps comme intermédiaires dans la dégradation des glucides par ces bactéries. Cette hypothèse trouve un appui important dans les travaux de WERKMAN et ses collaborateurs<sup>8</sup>, qui ont, les premiers, isolé l'acide phosphoglycérique au cours de la fermentation du glucose par *Citrobacter freundii*. STONE ET WERKMAN<sup>9</sup> ont isolé cet acide de différentes espèces bactériennes y compris *E.coli* et quelques espèces de bactéries propioniques. Les produits finaux trouvés par WOOD, WIGGERT ET WERKMAN<sup>10</sup> dans les fermentations parallèles de quelques dérivés phosphorylés (hexose-di-phosphate,  $\alpha$ -glycéro-phosphate et acide phosphoglycérique) et non phosphorylés (glucose, glycérol et acide pyruvique) sont identiques. Ils en concluent à la validité du schéma EMBDEN-MEYERHOF pour les bactéries. Des composés intermédiaires phosphorylés, identiques à ceux trouvés dans la fermentation du glucose par la levure, ont été isolés par ENDO<sup>11</sup> à partir d'une préparation acétonique de *E.coli*. FROMAGEOT<sup>12</sup> a apporté la preuve, pour les bactéries propioniques (*Propionibacterium pentosaceum*), d'un mécanisme dans lequel l'acide phosphoglycérique est un intermédiaire dans la fermentation du glucose. O'KANE ET UMBREIT<sup>13</sup> ont montré la formation, à partir du glucose, de composés phosphorylés effectués par *Streptococcus faecalis* à l'état de bactéries non proliférantes.

Dans tous les travaux que nous venons de citer il n'est question que du métabolisme anaérobique des diverses bactéries. Toutefois, il existe aussi de nombreux travaux dans

lesquels sont étudiées les relations entre l'oxydation et la phosphorylation. MANNING<sup>14</sup> a montré que *E. coli communis* décompose les hexoses mono- et di-phosphates aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose en produits finaux de la fermentation normale du glucose. Le rôle du phosphore dans l'oxydation de l'acide pyruvique par *Lactobacillus delbrückii* a été trouvé par LIPMANN<sup>15, 16</sup>. UTTER ET WERKMAN<sup>17</sup> ont étudié la formation d'acétyl-phosphate au cours de cette oxydation par *E. coli* broyé. La mise en évidence d'acétyl-phosphate au cours de l'oxydation de l'acide pyruvique par *Cl. butylicum* a été effectuée par KOEPSELL, JOHNSON ET MEEK<sup>18</sup>. En présence d'un accepteur de phosphore tel que le glucose ou l'acide butyrique, on obtient respectivement, par transphosphorylation, de l'hexose-mono-phosphate ou du butyryl-phosphate. GUNSAKUR ET UMBREIT<sup>19</sup> ont trouvé que l'oxydation du glycérol par *Streptococcus faecalis* met aussi en jeu un mécanisme de phosphorylation. Un mécanisme analogue a été trouvé chez *E. freundii*<sup>20</sup>.

On a montré l'existence d'une oxydation couplée à une phosphorylation non seulement chez les bactéries hétérotrophes, mais aussi chez les autotrophes. En effet, pour VOGLER ET UMBREIT<sup>21</sup>, chez *Thiobacillus thioxidans* la phase oxydative est accompagnée d'une formation de composés phosphorylés riches en énergie, tandis que la phase réductive (fixation d'anhydride carbonique) est liée à une déphosphorylation, grâce à l'intervention des phosphatases.

Enfin, on sait, depuis les travaux de LIPMANN<sup>22</sup>, KALCKAR (1941)<sup>23</sup> et CORI<sup>24, 25</sup>, que certaines liaisons phosphate jouent le rôle d'accumulateur et de transmetteur d'énergie permettant l'utilisation par la cellule de l'énergie d'oxydation. Il est donc normal que la phosphorylation intervienne dans le métabolisme bactérien, comme dans celui des autres tissus.

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE

Nous allons démontrer chez *E. coli* le rôle que le phosphore joue dans la dégradation aérobie et anaérobie des glucides.

Nous avons, à plusieurs reprises, essayé de mettre en évidence la phosphorylation dans les bactéries vivantes de *E. coli*, dans nos conditions expérimentales habituelles, c'est-à-dire, en suspension non proliférante. Ces expériences ont été faites de la manière suivante: nous avons mis les bactéries lavées deux fois avec du chlorure de sodium à 9 % dans un tampon borate en présence de glucose comme substrat, puis ajouté du phosphore inorganique sous forme de tampon, en présence et en absence de fluorure de sodium. On a laissé le tout trois heures à l'étuve à 37°. Les dosages de phosphore effectués sur le liquide surnageant après centrifugation au début et à la fin de l'expérience, n'ont jamais présenté de différences significatives. Nous avons interprété ces résultats négatifs comme provenant de l'action de nombreuses phosphatases hydrolysant les esters phosphoriques éventuellement formés.

Naturellement, pour mener à bien ces expériences, il aurait été préférable d'appliquer la technique de MACFARLANE<sup>25</sup> qui est parvenu à démontrer une phosphorylation par le dosage du phosphore sous ses différentes formes, dans la levure vivante elle-même. Mais nous étions limités par la difficulté d'obtention de grandes masses de bactéries nécessaires aux expériences. Néanmoins, nous avons réussi à démontrer, indirectement il est vrai, l'importance du phosphore dans la respiration de *E. coli* vivant.

L'expérience a été faite à l'aide de l'appareil de WARBURG. Les bactéries obtenues, comme d'habitude<sup>26</sup>, sont mises en suspension dans un tampon borate à pH 7. Quelques

cupules contiennent, outre la suspension bactérienne et le glucose, 1 mg de phosphore inorganique (b), un témoin (a) étant fait avec bactéries + substrat seulement. Les courbes de la Fig. I expriment le résultat en  $\mu\text{l}$  d'oxygène consommé en fonction du temps. On voit que dans les premières 30 minutes la courbe (a) (sans phosphate) se confond avec la courbe (b) (avec phosphate): la respiration est égale dans les deux cas, puisque les bactéries utilisent leur phosphate endogène. Mais ensuite la courbe (a) commence à s'infléchir vers le bas: le phosphore endogène s'épuise, tandis que la courbe (b), correspondant à l'utilisation du phosphore ajouté, ne cesse de monter.

Nous pensons que cette expérience, bien que n'étant pas une preuve directe, comme nous venons de le dire, de l'utilisation du phosphore pendant la respiration est tout de même significative en sa faveur.

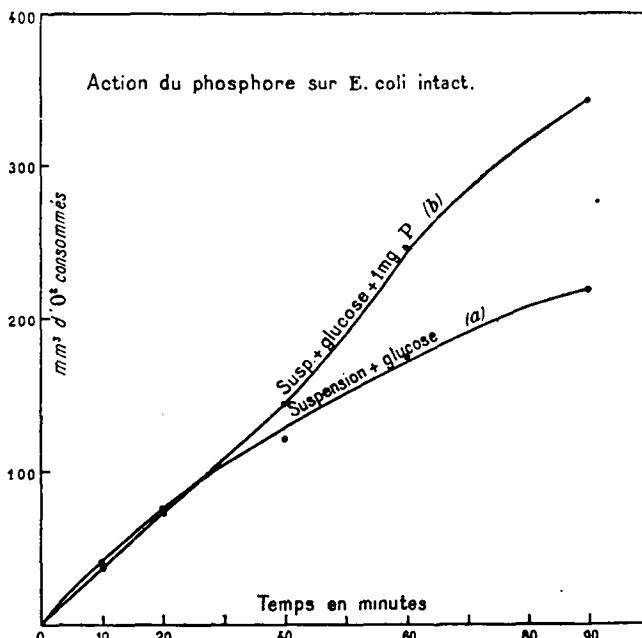


Fig. I

Ne voulant pas nous limiter à ces expériences, nous avons eu recours à une autre technique: le broyage des bactéries. Le broyat a été préparé de la façon suivante: les bactéries provenant d'une culture de 5 litres sont lavées après centrifugation deux fois avec du chlorure de sodium à 9%, puis remises dans 15 ml soit d'eau distillée, soit de tampon phosphate à  $\text{pH}$  6.8, suivant les expériences. Cette suspension est ensuite transvasée dans un flacon rodé s'adaptant à l'appareil de broyage (agitateur ultra-rapide J. W. TOWERS — Londres). On ajoute de la poudre de verre en quantité telle que le niveau du liquide dépasse d'un demi ml celui de la poudre. Le flacon est alors placé dans le broyeur et agité pendant 30 minutes. Après broyage on obtient une suspension épaisse, blanche et mousseuse, à laquelle nous ajoutons 15-17 ml d'eau distillée ou de tampon (ceci pour avoir 15 ml de liquide actif final). On centrifuge une première fois une minute à 3000 tours pour éliminer la poudre de verre. Une seconde centrifugation du liquide surnageant à 13 000 tours à 0° donne un liquide clair utilisé dans les expériences.

On voit (Fig. 3) que dans le liquide après centrifugation il ne reste plus de bactéries intactes.

Avant de décrire nos expériences sur la phosphorylation, nous en donnerons quelques-unes faites avec les bactéries broyées, afin de comparer leur système enzymatique avec celui des bactéries intactes<sup>26</sup>.

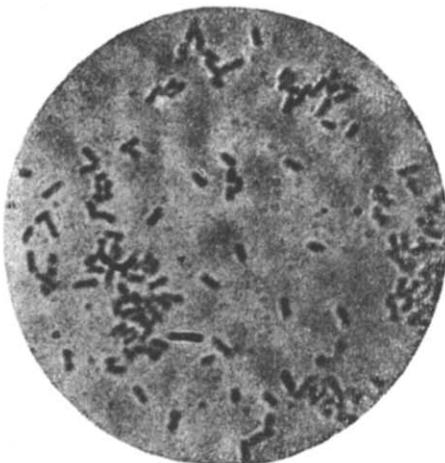


Fig. 2. Suspension avant le broyage

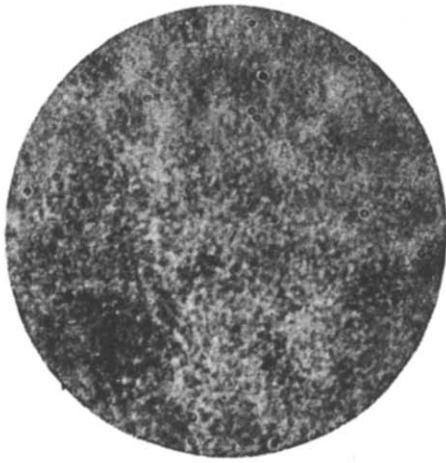


Fig. 3. Liquide après centrifugation à 13 000 tours

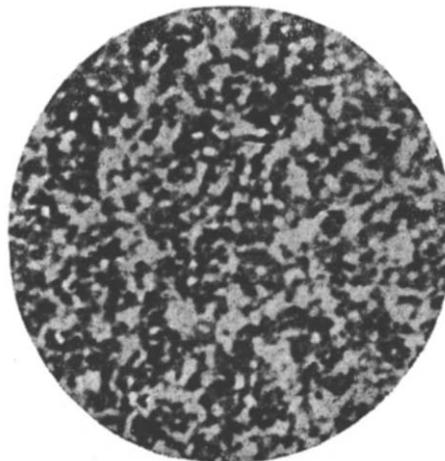


Fig. 4. Culot de débris cellulaires

Dans la première expérience, résumée dans le Tableau I, nous avons voulu voir si la partie liquide du broyat respirait ou, plutôt, consommait de l'oxygène et quel serait l'effet des inhibiteurs (fluorure, azoture et malonate de sodium) dont nous cherchons à localiser l'action.

Soulignons d'abord que la consommation d'oxygène en présence de glucose est relativement faible (120  $\mu$ l). Le dosage montre en effet qu'il y a 14.4  $\mu$ M de glucose disparu, ce qui correspond environ à  $1/3$  de molécule d'oxygène consommé par molécule

*Bibliographie p. 513/514.*

TABLEAU I

ACTION DU LIQUIDE DU BROYAT DE *E. coli* SUR LE SUCCINATE ET LE GLUCOSE EN PRÉSENCE DE FLUORURE, AZOTURE ET MALONATE DE SODIUM (AÉROBIOSE)

Chaque cupule de l'appareil de WARBURG contient:

1 ml de liquide du broyat dans tampon phosphate à pH 6.8 + 0.5 ml de substrat dans le logement latéral (glucose à conc. finale M/90 ou succinate à M/60) + 0.5 ml d'une solution d'inhibiteur (fluorure de sodium M/33, azoture de sodium M/800, malonate de sodium M/5, concentration finale) ou 0.5 ml d'eau (témoin).

Le substrat est ajouté au liquide du broyat après 10 minutes d'équilibre dans le thermostat à 37°C. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{l}$  d'oxygène consommé.

	10'	20'	30'	50'	70'	90'	% d'inhibition
Liquide du broyat	8	11	13	15	18	19	
Liquide du broyat + succinate	2.5	4	4	4	6	6	
Liquide du broyat + glucose	19	27	39	65	85	120	
Liquide du broyat + glucose + fluorure de sodium	9	10	15	20	29	42.5	65
Liquide du broyat + glucose + azoture de sodium	18	30	40	67	87	129	(exaltation)
Liquide du broyat + glucose + malonate de sodium	14	20	30	47	65	90	25

de glucose disparu. (3-4 fois plus faible que dans les bactéries intactes). Il est frappant que le fluorure inhibe à 65% cette oxydation, contrairement à ce que l'on observe avec les bactéries intactes<sup>26</sup>. Ce fait significatif sera discuté dans un prochain mémoire.

Par contre, le malonate n'a qu'une action faible (inhibition légèrement plus grande que dans les bactéries intactes). Quant à l'azoture de sodium, il provoque toujours une exaltation. Notons encore que le liquide du broyat est inactif vis-à-vis du succinate, lequel inhibe même la consommation d'oxygène endogène.

Le Tableau II montre que l'anhydride carbonique dégagé est très faible par rapport à l'oxygène consommé, le QR, après 60 minutes, est égal à 0.18.

TABLEAU II

Chaque cupule de l'appareil de WARBURG contient:

1 ml de liquide du broyat dans le tampon phosphate M/15 à pH 6.8; 1 ml d'une solution de glucose (concent. finale M/90); 0.2 ml de soude à 10% ou 0.2 ml d'eau dans le réservoir central.

Le QR est calculé par la "méthode directe".

Temps en min	$\mu\text{l}$ d' $\text{O}_2$ consommé	$\mu\text{l}$ de $\text{CO}_2$ dégagé	QR
10	22	7.5	0.34
20	50	10	0.2
40	86	13	0.15
60	110	20	0.18

Par contre, en ajoutant 0.5 ml d'une préparation de carboxylase de levure on observe un dégagement de gaz carbonique. Cela montre que le blocage du gaz carbonique

était dû sans doute à la destruction de la pyruvico-deshydrogénase dans le liquide du broyat seule responsable, dans le cas de *E. coli*, du dégagement d'anhydride carbonique. Dans ce cas on doit trouver une accumulation d'acide pyruvique ou d'acide lactique au cours de l'oxydation du glucose. Pour le montrer, nous avons fait l'expérience suivante: le liquide du broyat (préparé comme dans les expériences précédentes) est remis en suspension dans 25 ml de tampon phosphate à  $p_{\text{H}}$  6.8. On y ajoute 25 ml d'une solution de glucose à 0.5% (volume total 50 ml). 15 ml sont prélevés immédiatement, déprotéinés avec  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5 N, et complétés à 20 ml. Sur le liquide surnageant après centrifugation, sont effectués les dosages initiaux. Les 35 ml restants sont mis à l'étuve à 37° pour quatre heures, puis traités comme précédemment. Sur le liquide surnageant on fait les dosages finaux<sup>27</sup>. Les résultats sont donnés dans le Tableau III.

TABLEAU III  
ACTION DU LIQUIDE DU BROYAT DE *E. coli* SUR LE GLUCOSE (AÉROBIOSE)  
(Calcul en mg de carbone)

Glucose disparu	Produits formés.		
	Acide lactique	Acide pyruvique	Acide acétique
43.5	20.2	14.7	0
p.cent par rapport au glucose disparu	46.5	33.8	0

On voit, en effet, qu'environ 80% du glucose disparu sont accumulés sous forme d'acides lactique et pyruvique. Rappelons que la consommation d'oxygène observée dans la première expérience de ce mémoire correspond exactement à la quantité d'acide pyruvique trouvée ici.

Nous avons cherché à savoir pourquoi le succinate n'est pas du tout oxydé par le liquide du broyat. Est-ce dû à la destruction de la succino-deshydrogénase? L'expérience (Tableau IV) faite dans les tubes de THÜNBERG indique, en effet, que cet enzyme n'existe plus dans le liquide du broyat.

TABLEAU IV

Chaque tube de THÜNBERG contient: dans une branche: 1 ml de substrat (hexoses à M/90 ou succinate à M/60 en conc. finale); 0.5 ml de bleu de méthylène M/2000; dans l'autre branche: 1 ml de liquide du broyat.

Le vide étant fait, on mélange le contenu des deux branches après 10 minutes d'équilibre. Les chiffres expriment le temps, (en minutes) de décoloration du bleu de méthylène.

	Exp. 1	Exp. 2
Liquide du broyat	25	29
Liquide du broyat + glucose	6	6
Liquide du broyat + hexose-diphosphate	1	instantanément
Liquide du broyat + succinate	$\infty$	$\infty$

De plus, le liquide du broyat seul décolore assez vite le bleu de méthylène (à cause des substances réductrices présentes), tandis qu'avec le succinate, il n'y a aucune

décoloration. Par contre, la glucose-deshydrogénase et l'hexose-diphosphate-deshydrogénase sont très actives.

Quant à la succino-deshydrogénase, nous avons pensé qu'étant donné la puissance du broyage et la grande vitesse de centrifugation (13 000 tours) elle devait rester dans le culot de débris cellulaires, car cet enzyme est lié aux granules cytoplasmiques. Nous avons donc mis les débris cellulaires seuls avec le tampon d'une part et d'autre part les débris cellulaires avec le surnageant après centrifugation. Mais dans ces deux cas nous n'avons aucune action sur le succinate. Nous nous trouvons donc ici en présence d'un phénomène qui a déjà retenu l'attention d'un grand nombre de chercheurs. YODUKIN<sup>28</sup> avait déjà observé que la diminution de l'activité d'un enzyme dans le broyat de *E. coli* ne peut pas être corrigée par addition d'un excès de cet enzyme. Cette baisse d'activité est donc due simplement à la destruction du lien entre enzyme et structure cellulaire. Il est certain que la cellule vivante ne peut plus être considérée comme un simple "sac rempli d'enzymes"<sup>29</sup>. Au contraire, les différents enzymes sont liés d'une certaine manière avec la structure cellulaire et existent sous une forme morphologique bien définie. Certaines réactions par exemple, qui se produisent à la surface de la membrane, disparaissent complètement dans le broyat.

Nous avons aussi examiné si le liquide du broyat fermente le glucose ou l'hexose-diphosphate de magnésium. Dans les deux cas nous n'avons observé aucun dégagement de gaz carbonique dans l'appareil de WARBURG.

En résumé, on peut dire que la partie liquide du broyat se caractérise par l'absence de succino-deshydrogénase et de pyruvico-deshydrogénase. La destruction de cette dernière provoque un arrêt du dégagement d'anhydride carbonique en aérobiose et en anaérobiose. Par contre, il décompose aérobiquement le glucose en acides lactique et pyruvique.

Avec ce liquide nous avons étudié, d'une part, la phosphorylation et la déphosphorylation et, d'autre part, l'action du fluorure, du malonate et de l'azoture de sodium sur ces deux phénomènes.

#### *Mise en évidence d'une phosphorylation dans la partie liquide du broyat de *E. coli**

Les bactéries sont obtenues comme dans les expériences précédentes mais le broyage est fait dans l'eau distillée. La partie liquide est ensuite récupérée avec 15 ml d'eau distillée. L'expérience est faite dans l'appareil de WARBURG, à l'air.

On met dans chaque cupule: 1 ml de liquide du broyat, 0.5 ml de tampon phosphate à pH 6.8, correspondant successivement à 3.23, 6.45, 12.9, 32.3, 64.5  $\mu$ M de phosphore minéral (le témoin contient 0.5 ml d'eau) + 0.5 ml d'une solution de glucose à 1% (dans le logement latéral) + 0.2 ml d'une solution de soude à 10% dans le logement central. Le glucose est ajouté au liquide du broyat après 10 minutes d'équilibre au thermostat à 37°. Après 90 min d'expérience, on ajoute à chaque cupule un ml d'une solution d'acide perchlorique à 10%. On transvase en filtrant le contenu de chaque cupule dans une fiole jaugée de 10 ml en prenant la précaution de rincer la cupule plusieurs fois à l'eau distillée, puis on complète à 10 ml. Sur ces solutions, on dose le glucose selon HAGEDORN ET JENSEN<sup>30</sup> et le phosphore selon MACHEBOEUF ET DELSAL<sup>31</sup>. Les dosages initiaux sont faits dans les mêmes conditions. Les résultats sont donnés dans le Tableau V.

On y voit que la disparition du glucose est parallèle à celle du phosphore; les rapports glucose-phosphore sont particulièrement significatifs: au début de l'expérience le rapport est égal à 1.0, ce qui correspond à un hexose-monophosphate; après 90 min il devient égal à 0.53 et se rapproche de celui d'un corps en C<sub>3</sub> phosphorylé. Entre ces deux extrêmes on trouve des rapports qui varient de 0.78 à 0.81, ce qui correspond sans doute à un mélange de ces deux composés phosphorylés, en proportions variables.

TABLEAU V

P minéral ajouté (en $\mu\text{M}$ )	Glucose disparu en plus* (en $\mu\text{M}$ )	P minéral disparu (en $\mu\text{M}$ )	Glucose disparu Phosphore disparu	ml d' $\text{O}_2$ consommé
0	0	0	0	0
3.23	1.22	1.2	1.01	3
6.45	3.1	4.0	0.78	9
12.9	5.4	7.0	0.77	18
32.3	12.1	14.9	0.81	65
64.5	7.0	13.2	0.53	155

\* Glucose disparu en plus = glucose total disparu — glucose disparu sans addition du P.

Grâce à ces expériences on connaît d'une manière assez précise la marche de la phosphorylation avec ses stades intermédiaires dans le liquide du broyat de *E.coli*. Nous avons donc ici un exemple probant d'une oxydation liée à une phosphorylation. D'autre part, la consommation d'oxygène est égale à 155 ml pour 7  $\mu\text{M}$  de glucose disparu, ce qui correspond à la dégradation aérobie d'une molécule du glucose en acide pyruvique. Ceci vérifie encore les expériences précédentes.

#### Action de quelques inhibiteurs sur la phosphorylation et la déphosphorylation

Après avoir démontré l'existence d'une phosphorylation, nous avons étudié l'action du fluorure, du malonate et de l'azoture de sodium sur ce phénomène.

Ces expériences ont été faites aussi à l'aide de l'appareil de WARBURG, les conditions étant les mêmes que dans l'expérience précédente, mais en ajoutant uniformément 1 mg de P minéral sous forme de tampon. Les manomètres avec leurs cupules sont disposés par couples (un essai témoin et un avec inhibiteur) et l'on fait des prélèvements à intervalles donnés. Le transvasement et les dosages sont faits comme précédemment. Les courbes de la Fig. 5 expriment la disparition du phosphore minéral en fonction du temps, en présence et en absence de fluorure. Cette courbe montre que le fluorure n'empêche pas la phosphorylation du glucose, il y a simplement un retard qui s'annule d'ailleurs après 180 min. La quantité du glucose disparu dans les deux cas est la même. Rappelons-nous cependant que, dans le Tableau I, nous avons observé que le fluorure inhibe à 65% l'oxydation du glucose, or, nous venons de voir qu'il n'agit pas sur la phosphorylation. D'autre part, la réaction qualitative de l'acide pyruvique (au nitroprussiate) est positive en absence de fluorure et négative en sa présence, et ceci avec glucose ou hexose-diphosphate comme substrat. Il semble évident que le fluorure ne doit agir que sur la déphosphorylation.

L'expérience représentée par les courbes de la Fig. 6 a été faite comme la précédente, en remplaçant le glucose par l'hexose-diphosphate de magnésium. Dans les 60 premières minutes on n'observe aucune action apparente du fluorure, mais ensuite il se produit une diminution progressive de l'hydrolyse par rapport au témoin; sur la même figure on voit qu'il y a aussi une inhibition de la consommation d'oxygène en présence de fluorure; on peut donc affirmer que le fluorure, en inhibant, dans le broyat, l'oxydation du glucose ou celle de l'hexose-diphosphate, agit soit sur un système phosphatasique,

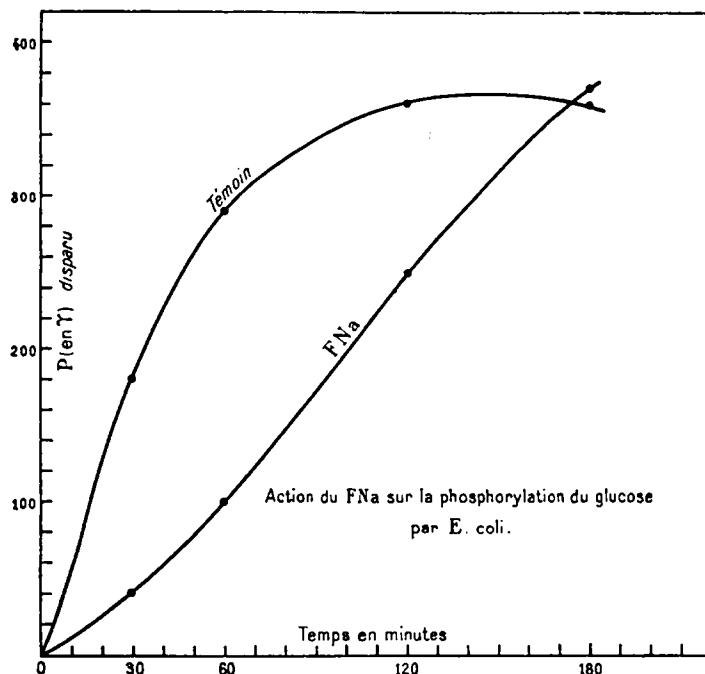


Fig. 5

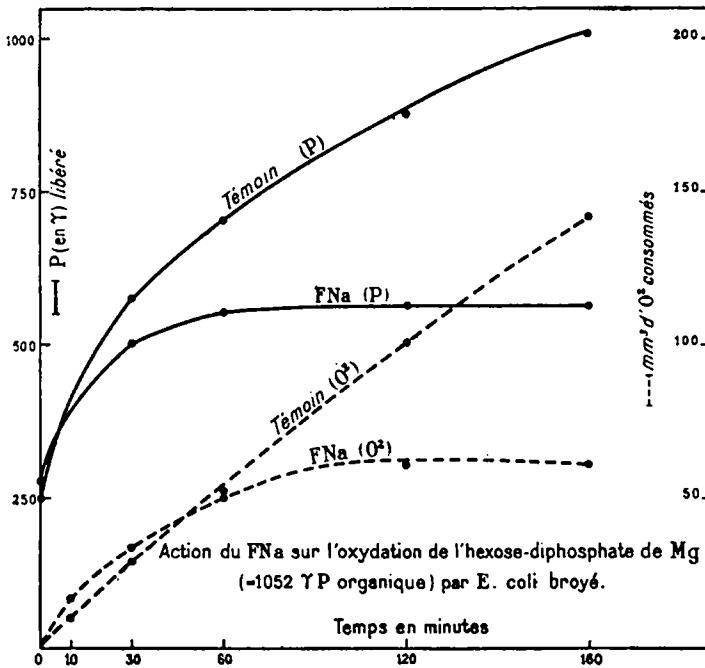


Fig. 6

soit sur la phospho-glycérate-deshydrogénase<sup>32</sup>, soit sur les deux à la fois. A l'aide de ces expériences nous expliquerons à la fin de ce mémoire les difficultés soulevées par l'action du fluorure lors des expériences manométriques rapportées dans le premier mémoire<sup>26</sup>.

TABLEAU VI  
ACTION DE L'AZOTURE DE SODIUM SUR LA PHOSPHORYLATION DU GLUCOSE  
PAR LE LIQUIDE DU BROYAT DE *E. coli*

P min. ajouté en $\mu\text{M}$	Glucose disparu en plus en $\mu\text{M}$		P min. disparu en $\mu\text{M}$		Glucose disparu Phosphore disparu		$\text{O}_2$ consommé en $\text{mm}^3$	
	Témoin		$\text{N}_3\text{Na}$		Témoin		$\text{N}_3\text{Na}$	
12.9	2.93	4.45	4.06	5.22	0.72	0.85	81	85
32.2	10.0	10.08	13.9	13.7	0.72	0.79	143	156

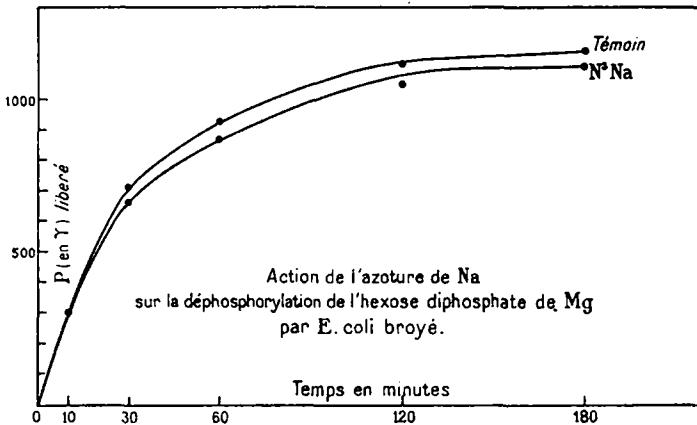


Fig. 7

Les expériences avec l'azoture de sodium ont été faites dans les mêmes conditions que précédemment, mais avec une concentration finale en azoture de M/800. Le Tableau VI indique que l'inhibition produite par l'azoture de sodium sur la phosphorylation est négligeable. Les rapports *glucose disparu/phosphore disparu* restent sensiblement les mêmes avec ou sans inhibiteur. Quant à la consommation d'oxygène, elle est toujours exaltée en présence d'azoture. Ce dernier n'a aucune action non plus sur la déphosphorylation (Fig. 7). Remarquons que le taux d'hydrolyse de l'hexose-diphosphate dans cette expérience est extrêmement élevé: 87% dans le témoin et 84% en présence de l'azoture de sodium.

Si l'on compare ces taux d'hydrolyse à ceux que nous avons obtenus avec les bactéries intactes<sup>32</sup>, il ressort nettement que la membrane cellulaire constitue un obstacle sérieux aux possibilités d'hydrolyse des esters examinés.

Le troisième inhibiteur dont nous avons étudié l'effet sur la phosphorylation, est le malonate de sodium. Nous connaissons déjà sa forte action inhibitrice sur les phosphatasées<sup>32</sup>. Le Tableau VII résume son action sur la phosphorylation aérobie du glucose dans le liquide du broyat. Avec une concentration en malonate M/5 et M/10 il n'y a pas

TABLEAU VII

ACTION DU MALONATE DE SODIUM SUR LA PHOSPHORYLATION DU GLUCOSE  
PAR LE LIQUIDE DU BROYAT DE *E. coli*

Malonate de sodium à concentration finale M/5.

Temps en min	Glucose disparu en plus en $\mu\text{M}$		P minéral disparu en $\mu\text{M}$		Glucose disparu	
	Témoin	Malonate	Témoin	Malonate	Phosphore disparu	Malonate
0	0	0	0	0	0	0
30	8.3	0	6.45	0	1.29	0
60	11.1	0	10.6	0	1.05	0
120	14.4	0	12.9	0	1.11	0

Malonate de sodium à concentration finale M/30.

30	—	—	—	—	—	—
60	11.5	1.34	9.5	2.58	1.21	0.52
120	12.7	1.51	10.2	4.95	1.24	0.34

de consommation de glucose ni de phosphore. Sans doute ces concentrations sont beaucoup trop fortes et empoisonnent tout le système enzymatique\*. Nous avons donc été amenés à travailler avec la concentration finale M/30. Le Tableau VII montre qu'à cette concentration on obtient, au contraire, une exaltation de la phosphorylation. Le rapport *glucose disparu/phosphore disparu*, en présence de malonate est égal, après 120 min, à 0.36, chiffre qui fait penser à un triose-diphosphate. Dans le témoin ce rapport est toujours à peu près celui d'un hexose-monophosphate.

Quant à la déphosphorylation, les courbes de la Fig. 8 montrent que le malonate à M/30 est sans action sur l'hydrolyse de l'hexose-di-phosphate (même résultat en présence de l'ester de ROBISON).

D'après ces résultats nous pouvons affirmer qu'aucun des trois inhibiteurs étudiés n'empêche la phosphorylation. Lorsqu'on compare les rapports *glucose disparu/phosphore disparu* dans les témoins (Tableaux V, VI, VII), en absence de tout inhibiteur, on a la certitude que le liquide du broyat, dans nos conditions expérimentales, possède un système enzymatique capable de synthétiser oxydativement certains dérivés phosphorylés. Naturellement, dans nos expériences il est impossible de savoir exactement quel est ou quels sont ces composés. On peut, tout au plus, supposer qu'il s'agit de corps en C<sub>6</sub> ou en C<sub>3</sub> phosphorylés. Nous avons pensé que seul l'isolement d'un de ces corps à partir de *E. coli* pourrait définitivement résoudre de problème. C'est ainsi que nous fûmes amenés à l'extraction et à la caractérisation des deux hexoses-mono-phosphates 1 et 6. Au cours de cette extraction nous avons isolé également l'acide adenyl-pyro-phosphorique.

\* Nous avons pourtant vu, dans le Tableau I, que le malonate à concentration M/5 n'inhibe que faiblement l'oxydation du glucose. Mais, lors de cette expérience, le broyage a été effectué dans un tampon phosphate qui peut avoir une action protectrice contre le malonate, tandis que dans toutes les expériences sur la phosphorylation, le broyage a été fait dans l'eau distillée.

Bibliographie p. 513/514.

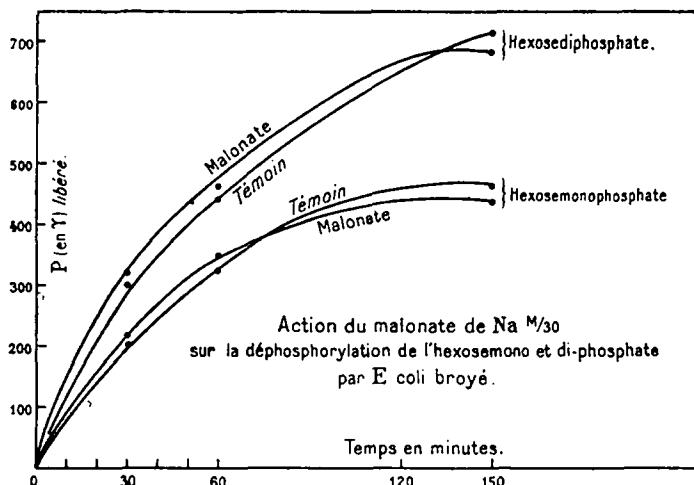


Fig. 8

#### Fractionnement et isolement de corps phosphorylés à partir de l'extrait de *E. coli*

La technique utilisée est celle de LE PAGE ET UMBREIT (1943)<sup>38</sup>. Elle est basée sur l'extraction trichloracétique et sur la séparation de trois fractions définies dans l'extrait; Chaque fraction est ensuite analysée individuellement.

La suspension provenant d'une culture de 10 l de milieu (2.5 g environ de bactéries en poids sec) est lavée une fois avec du chlorure de sodium à 90%. Le culot est remis en suspension dans 15 ml de chlorure de sodium, puis traité 5 minutes avec 1 ml d'une solution de potasse à 50%. On neutralise par l'acide trichloracétique à 100% et on ajoute 2.5 ml de ce même acide pour avoir la concentration finale de 10% et on laisse 12 heures à la glacière. On répète cette extraction cinq fois. Les extraits réunis contiennent: P.minéral = 9.6 mg

P.organique = 22.7 mg

A l'extrait sont ensuite ajoutés 2.5 ml d'acétate de baryum à 25% et le pH est ramené à 8.4 par la soude à 40%. On laisse une heure à 0° et on centrifuge.

<b>Précipité (1)</b>	<b>Liquide surnageant (1')</b> Au liquide surnageant on ajoute de l'acide sulfurique jusqu'à précipitation complète du sulfate de baryum. On centrifuge et lave le précipité qu'on élimine ensuite. Au liquide surnageant, auquel on a réuni les eaux de lavage, on ajoute 2.5 ml d'acétate de baryum à 25%. Le pH est ramené à 8.4 par la soude à 40%. On laisse à 0° une heure et on centrifuge.
	<b>Précipité (2)</b> Les précipités (1) et (2) constituent la <i>Fraction barytique insoluble I</i> . On dissout le précipité dans peu d'eau additionnée de quelques gouttes d'une solution d'acide nitrique normal. On rejette l'insoluble. Le liquide surnageant est ramené à 50 ml.
<b>Précipité (3)</b> <b>Fraction II — soluble dans l'eau, insoluble dans l'alcool.</b> Le précipité est dissous dans peu d'eau et reprécipité par 5 volumes d'alcool éthylique à 96°. On répète l'opération plusieurs fois, en se servant la première fois de quelques gouttes d'une solution d'acide nitrique normal.	<b>Liquide surnageant (2')</b> Au liquide surnageant on ajoute 5 volumes d'alcool éthylique à 96°. On laisse à la glacière trois heures et on centrifuge.
	<b>Liquide surnageant III — Fraction barytique soluble dans l'eau et dans l'alcool.</b>

*I. Fraction barytique insoluble (50 ml).*

Cette fraction contient:

*Phosphore:* 2.9 mg correspondant au phosphore organique.

dont 1.33 mg hydrolysés en 7 min (P.7') dans l'acide chlorhydrique normal. à 100°.

1.95 mg hydrolysés en 12 min (P.12') dans l'acide chlorhydrique normal. à 100°.

2.00 mg hydrolysés en 180 min (P.180') dans l'acide chlorhydrique normal. à 100°.

D'après ces chiffres d'hydrolyse on a dans cette fraction 2 mg de phosphore correspondant à l'ATP, c'est-à-dire 40 γ/ml.

*Azote:* (Dosage par sub-micro KJELDAHL)<sup>34</sup>

2.35 mg d'azote organique, c'est-à-dire 47 γ/ml.

Si cet azote est entièrement dû à l'ATP on a  $N/P = 47/40 = 1.18$  (rapport théorique: 1.12).

*II. Fraction barytique soluble dans l'eau, insoluble dans l'alcool (170 mg sous forme de poudre impure).*

Cette fraction contient:

*Phosphore:* 5.65 % de phosphore organique

dont 5.12 % hydrolysés en 7 min dans l'acide chlorhydrique N à 100°

et 0.53 % non hydrolysables en 180 min dans les mêmes conditions.

*Pouvoir réducteur en glucose:* 2.32%.

D'après cette analyse on peut admettre que le phosphore hydrolysé en 7 min (ici 5.12%) correspond au glucose-1-phosphate, dont tout le phosphore est hydrolysé en 7 min.

D'autre part, on sait que 10.5 % du phosphore du glucose-6-phosphate sont hydrolysés en 180 min. Donc,  $0.53 + 0.05 = 0.58\%$ : ce phosphore et le pouvoir réducteur ne peuvent provenir que du glucose-6-phosphate.

D'ailleurs, le rapport  $G/P = (2.32/0.58) (31/180) = 0.7$ ; correspond à un ester phosphorylé ayant un pouvoir réducteur de 70%.

*III. Fraction barytique soluble dans l'eau et dans l'alcool:* n'a pas été analysée.

Ainsi, comme le montrent ces dosages, *E.coli* est effectivement capable de synthétiser les hexoses-mono-phosphates et l'ATP à partir du glucose et du phosphore inorganique. Cette expérience confirme donc les résultats exposés au cours de ce travail.

## CONCLUSIONS

Dans ce mémoire, nous avons étudié la phosphorylation et la déphosphorylation. Nous avons d'abord démontré indirectement, sur les bactéries intactes, que le phosphore joue un rôle dans leur métabolisme. Pour avoir une démonstration plus directe de la phosphorylation, nous avons eu recours à l'emploi des bactéries broyées. Après avoir étudié les principales propriétés de la partie liquide du broyat, nous avons constaté que celui-ci est bien capable d'oxyder le glucose, mais jusqu'au stade de l'acide pyruvique seulement. Malgré l'absence de certains enzymes (succino-deshydrogénase, pyruvico-deshydrogénase, etc.) le système responsable de la phosphorylation semble rester intact.

Nous avons pu démontrer, par l'examen des rapports *glucose disparu/phosphore disparu*, la formation de composés caractéristiques d'un hexose-mono-phosphate ou d'un corps en  $C_3$  phosphorylé. Ces expériences ont reçu confirmation dans l'isolement des produits phosphorylés à partir des bactéries intactes.

La phosphorylation chez *E.coli* a déjà été démontrée au cours d'expériences de fermentation du glucose par plusieurs chercheurs MANNING<sup>14</sup>, ENDO<sup>11</sup>, TIKKA<sup>7</sup>, WERKMAN<sup>8</sup> et ses collaborateurs. Nous avons, pour notre part, démontré une phosphorylation couplée à l'oxydation aérobie du glucose dans les bactéries intactes et dans le broyat de *E.coli*. Pour éviter les reproches qu'on fait souvent aux expériences effectuées à l'aide de bactéries broyées, nous avons cherché, autant que possible, à apporter des expériences parallèles sur les bactéries intactes.

Ainsi, nous avons pu dissiper les doutes soulevés par l'action du fluorure, du malonate et de l'azoture de sodium, dans les expériences manométriques<sup>28</sup>, quant à la phosphorylation du glucose au cours de la respiration. A la question posée par la différence d'action de ces inhibiteurs sur l'oxydation du glucose d'une part et sur les hexoses-phosphates d'autre part, nous sommes en mesure maintenant de répondre partiellement.

En ce qui concerne le malonate, nous venons de voir qu'à la concentration M/30, non seulement il n'empêche pas la phosphorylation, mais au contraire qu'il l'exalte. A cette concentration il est aussi sans action sur la déphosphorylation.

Dans ces conditions il est normal que l'oxydation du glucose ne soit pas inhibée par le malonate; car, le fait d'avoir, dans le milieu extérieur, une concentration en malonate M/5 n'implique pas que celle-ci soit le même à l'intérieur de la cellule intacte, où elle doit être plus faible. D'autre part, en ce qui concerne les phosphatases qui passent dans le milieu extérieur et se trouvent en présence de malonate à la concentration M/5, il est normal qu'elles soient inhibées.

Ainsi s'explique parfaitement la différence entre l'action du malonate sur l'oxydation du glucose d'une part et des hexoses-phosphates d'autre part<sup>28</sup>; car le glucose peut être phosphorylé à l'intérieur de la cellule, tandis que les hexoses-phosphates ne pouvant pas pénétrer en tant que tels, ne sont pas hydrolysés dans le milieu extérieur en présence de malonate.

Quant à l'azoture de sodium, nous sommes toujours incapables d'expliquer pourquoi il inhibe l'oxydation de l'hexose-diphosphate et non celle du glucose puisqu'il n'agit ni sur la phosphorylation ni sur la déphosphorylation. Il est certain que son action sur *E. coli* est différente de celle observée par SPIEGELMAN<sup>35</sup> et ses collaborateurs sur la levure.

Le troisième inhibiteur étudié ici est le fluorure de sodium. Nous avons vu qu'il agit sur un système phosphatasique intervenant dans la dégradation de l'hexose-diphosphate. Ceci permet de comprendre son action inhibitrice sur l'oxydation des composés phosphorylés observés dans les expériences manométriques avec les bactéries intactes<sup>28</sup>. D'autre part, nous avons vu dans ce mémoire que dans le liquide du broyat il inhibe fortement l'oxydation du glucose. Pourquoi donc reste-t-il sans action sur l'oxydation du glucose dans les bactéries intactes?

Cette différence dans l'action du fluorure, observée dans le liquide du broyat et dans les bactéries intactes, doit être due à la perméabilité. C'est pourquoi nous étudierons quelques problèmes particuliers de la perméabilité en rapport avec le métabolisme de *E.coli* dans un prochain travail.

## RÉSUMÉ

1. En se servant soit de bactéries intactes, soit de bactéries broyées, dont on a séparé le culot de centrifugation, on peut démontrer que la respiration comme la fermentation de *Escherichia coli* est accompagnée d'une phosphorylation. Ceci est confirmé par l'isolement de certains dérivés phosphorylés.

2. L'étude de l'action de certains inhibiteurs (fluorure, malonate et azoture de sodium) sur la phosphorylation et déphosphorylation des oses a été faite. La signification des résultats obtenus a été donnée dans la conclusion du mémoire.

## SUMMARY

1. Using either intact micro-organisms or crushed micro-organisms, and separating the debris by centrifuging, it can be shown that respiration as well as fermentation by *Escherichia coli* is accompanied by a phosphorylation. This has been confirmed by the isolation of certain phosphorylated derivatives.

2. The action of certain inhibitors (sodium fluoride, malonate and azide) on phosphorylation and dephosphorylation has been studied. The significance of the results obtained is discussed in the conclusion of this paper.

## ZUSAMMENFASSUNG

1. Mit Hilfe ganzer oder gemahlener Mikroorganismen (nach Entfernung der Zellreste durch Zentrifugieren) konnte bewiesen werden, dass sowohl die Atmung wie die Gärung von *Escherichia coli* von einer Phosphorylierung begleitet sind. Dies wurde durch die Isolierung gewisser phosphorylierter Derivate bestätigt.

2. Die Wirkung einiger Hemmstoffe (Natriumfluorid, -malonat und -azid) auf die Phosphorylierung und Dephosphorylierung der Zucker wurde untersucht. Die Bedeutung der Ergebnisse wurde in der Schlussfolgerung dieser Mitteilung erörtert.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> EMBDEN, DEUTICKE ET KRAFT, *Klin. Wochschr.*, 12 (1933) 213.
- <sup>2</sup> O. MEYERHOF ET W. KIESSELING, *Biochem. Z.*, 264 (1933) 40; *Biochem. Z.*, 267 (1933) 313.
- <sup>3</sup> O. MEYERHOF ET W. KIESSELING, *Biochem. Z.*, 276 (1935) 239; *Biochem. Z.*, 279 (1935) 40; *Biochem. Z.*, 283 (1935) 83.
- <sup>4</sup> J. K. PARNAS, P. OSTERN ET T. MANN, *Biochem. Z.*, 272 (1934) 64.
- <sup>5</sup> A. I. VIRTANEN ET J. TIKKA, *Biochem. Z.*, 228 (1930) 407.
- <sup>6</sup> C. ANTONIANI, *Biochem. Z.*, 267 (1933) 376.
- <sup>7</sup> J. TIKKA, *Biochem. Z.*, 279 (1935) 264.
- <sup>8</sup> C. H. WERKMAN, E. A. ZOELLNER, H. GILMAN ET H. REYNOLDS, *J. Bact.*, 31 (1936) 5.
- <sup>9</sup> R. W. STONE ET C. H. WERKMAN, *Biochem. J.*, 31 (1937) 1516.
- <sup>10</sup> H. G. WOOD, W. P. WIGGERT ET C. H. WERKMAN, *Enzymologia*, 2 (1938) 373.
- <sup>11</sup> S. ENDO, *Biochem. Z.*, 296 (1938) 56.
- <sup>12</sup> CL. FROMAGEOT ET R. SAFAVI, *Enzymologia*, 6 (1939) 57.
- <sup>13</sup> D. J. O'KANE ET W. W. UMBREIT, *J. Biol. Chem.*, 142 (1942) 25.
- <sup>14</sup> R. J. MANNING, *Biochem. J.*, 21 (1927) 349.
- <sup>15</sup> F. LIPMANN, *Enzymologia*, 4 (1937) 65.
- <sup>16</sup> F. LIPMANN, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, 7 (1939) 248.
- <sup>17</sup> M. F. UTTER ET C. H. WERKMAN, *Arch. Biochem.*, 5 (1944) 413.
- <sup>18</sup> H. J. KOEPEL, M. J. JOHNSON ET J. S. MEEK, *J. Biol. Chem.*, 154 (1944) 535.
- <sup>19</sup> I. C. GUNSALUS ET W. W. UMBREIT, *J. Bact.*, 49 (1945) 347.
- <sup>20</sup> M. N. MICKELSON ET F. E. SHIEDEMAN, *Arch. Biochem.*, 13 (1947) 438.
- <sup>21</sup> K. G. VOGLER ET W. W. UMBREIT, *J. Gen. Physiol.*, 26 (1942) 157.
- <sup>22</sup> F. LIPMANN, *Advances in Enzymol.*, 1 (1941) 99.
- <sup>23</sup> H. M. KALCKAR, *Chem. Revs.*, 28 (1941) 71; *J. Biol. Chem.*, 143 (1942) 299.
- <sup>24</sup> C. F. CORI, *Symposium on Respiratory Enzymes*, Wisconsin 1942.
- <sup>25</sup> M. G. MACFARLANE, *Biochem. J.*, 30 (1936) 1369.

- <sup>26</sup> E. AUBEL, A. J. ROSENBERG ET J. SZULMAJSTER, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 228.  
<sup>27</sup> E. AUBEL, M. GRUNBERG-MANAGO ET J. SZULMAJSTER, *Biochim. Biophys. Acta*, 3 (1949) 442.  
<sup>28</sup> J. YODKIN, *Biochem. J.*, 31 (1937) 865.  
<sup>29</sup> E. S. G. BARRON, *Advances in Enzymol.*, 3 (1943) 150.  
<sup>30</sup> H. C. HAGEDORN ET B. H. JENSEN, *Biochem. Z.*, 135 (1923) 46.  
<sup>31</sup> M. MACHEBEUF ET J. DELSAL, *Bull. soc. chim. biol.*, 25 (1943) 116.  
<sup>32</sup> E. AUBEL ET J. SZULMAJSTER, *Biochim. Biophys. Acta*, 5 (1950) 255.  
<sup>33</sup> G. A. LE PAGE ET W. W. UMBREIT, *J. Biol. Chem.*, 147 (1943) 263; *J. Biol. Chem.*, 148 (1943) 255.  
<sup>34</sup> A. E. SOBEL, A. M. MAYER ET S. GOTTFRIED, *J. Biol. Chem.*, 156 (1944) 355.  
<sup>35</sup> S. SPIEGELMAN, M. O. KAMEN ET M. SUSSMAN, *Arch. Biochem.*, 18 (1948) 409.

Reçu le 22 juin, 1949