

## MÉTABOLISME DE L'ACIDE GLUTAMIQUE CHEZ *BACILLUS SUBTILIS*

par

J. M. WIAME ET R. STORCK

avec l'assistance technique de W. VAN BERGEN

Laboratoire de Microbiologie du Centre d'Enseignement et de

Recherches des Industries Alimentaires (CERIA) et

Laboratoire de Biochimie des Microorganismes de l'Université de Bruxelles (Belgique)

La découverte des réactions de transamination par BRAUNSTEIN ET KRITZMANN<sup>3</sup> a permis de penser que l'acide glutamique joue un rôle fondamental dans le métabolisme azoté cellulaire. L'importance de l'acide glutamique peut se comprendre également en rapport avec la formation du céto-acide correspondant comme constituant essentiel du cycle tricarboxylique de KREBS<sup>11</sup>. On peut voir dans l'acide glutamique et son précurseur, l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique, la voie principale d'entrée de l'azote dans le métabolisme général.

En étudiant le métabolisme azoté de *Bacillus subtilis*, il a été possible de montrer que l'acide glutamique est un *donneur général d'N*. Ce résultat obtenu *in vivo* a été complété par l'étude des transaminations *in vitro*. Les techniques et résultats sont présentés séparément pour l'étude *in vivo* et *in vitro*.

### A. ETUDE *in vivo* (CROISSANCE)

#### Matériel et techniques

Les milieux de cultures sont à base de glycérol *M*/10 comme aliment énergétique et carboné. Les sels minéraux sont  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  *M*/100,  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$  (1 partie) et  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$  (4 parties) de façon à avoir  $\text{PO}_4$  *M*/100;  $\text{NaCl}$  *M*/100,  $\text{MgSO}_4$  *M*/1000, citrate de fer *M*/25,000. Le  $\text{MgSO}_4$  est ajouté en dernier lieu dans le milieu amené à son volume pour éviter les précipités. Le pH avant stérilisation est de 7.3. A ce milieu (*milieu glycérol*) on ajoute suivant les cas, du citrate de sodium *M*/100 à pH 7.3 (*milieu glycérol, citrate*) ou du glutamate de sodium *M*/100 à pH 7.3 (*milieu glycérol, glutamate*) ou encore les deux substances simultanément (*milieu glycérol, glutamate, citrate*). Ces différents milieux sont éventuellement gélosés. Les amino-acides ont en général été stérilisés à l'autoclave, sauf l'arginine, l'ornithine, la citrulline, la glutamine, le sulfoxyde de méthionine et l'acide carbamyl-glutamique stérilisés par filtration. Les amino-acides sont des produits de Nutritional Biochemical. La norvaline, l'acide  $\alpha$  amino-butyrique, l'ornithine, la citrulline, la glutamine sont des produits Hoffmann La Roche\*. Le sulfoxyde de méthionine et l'acide carbamyl glutamique ont été préparés dans notre laboratoire par P. OCHSNER suivant TOENNIES ET KOLB<sup>32</sup> et MEISTER ET TICE<sup>18</sup>.

Les bactéries sont toutes issues du Bac. subtilis NRRL B 571. Cette bactérie est un Bac. subtilis typique formant des colonies plissées (type *R*) et formant un voile en milieu liquide. A partir de cette bactérie, on a pu obtenir des variants formant des colonies à surface beaucoup plus uniforme (variant *s*) ou encore des variants formant un mucus abondant (variant mucoïde *m*). Les variants *s* et *m* croissent mal en surface, sur milieu liquide, mais donnant une culture homogène en milieu aéré abondamment. Dans ces conditions les cultures se prêtent à une étude quantitative de la crois-

\* Nous remercions cette firme qui nous a fourni gracieusement ces amino-acides.

sance. D'une façon générale, les variants *s* et *m* peuvent être obtenus (probablement par le mécanisme mutation-sélection) par culture de la forme initiale typique *R* en milieu liquide agité.

En plus des variations du type de colonies, des variations touchant la nutrition azotée ont été sélectionnées. Par culture sur un milieu *glycérol citrate*, on sélectionne des variants qui peuvent croître avec l' $\text{NH}_4^+$  comme seule source d'azote; ces variants sont désignés par le signe + (p. ex.  $s^+$ ); par sélection sur milieu *glycérol glutamate* on peut obtenir des bactéries incapables d'utiliser l' $\text{NH}_4^+$  comme seule source d'azote; ces souches sont désignées par le signe (—). On a travaillé avec les deux souches  $m_1^-$  et  $s_1^-$ . La variation (+)  $\rightarrow$  (—) est assez stable; pour éviter les sélections de variants, les souches (+) sont toujours conservées sur un milieu glycérol citrate gélosé et les souches (—)

sur glycérol citrate glutamate. La présence de citrate est nécessaire à l'apparition du caractère mucosité. Les passages *m* (ou *s*)  $\rightarrow$  *r* se produisent aisément en culture sur le milieu solide où elles sont conservées. Pour cette raison, les bactéries sont fréquemment retestées et réisolées. Une culture formant des grumeaux en milieu liquide agité est suspecte d'être composée partiellement de bactéries du type *r*.

Les croissances faites à  $35^\circ$  ont été suivies en cultures aérées par agitation sur un plateau animé d'un mouvement de translation circulaire à une fréquence de 120 à 140 t./min. Pour les cultures d'un volume de 500 ml, on a employé des erlenmeyers de 1 l, et la croissance est suivie en prélevant des échantillons dont on mesure l'opacité. Pour les cultures sur petit volume (10 à 40 ml), on a employé au début des tubes de culture aérés par un courant d'air filtré; ce procédé a cependant été remplacé par la suite par des cultures en fioles spéciales (Fig. 1) construites à partir de fioles cylindro-coniques de 125 ml et comportant un appendice pouvant être introduit dans un opacimètre à cellule cylindrique (COLEMAN); on peut suivre la multiplication par simple renversement de la fiole. On évite ainsi le prélèvement d'échantillons et le passage d'air, source d'infection, d'irrégularité et d'évaporation. Des fioles de culture, en partie semblables, ont été décrites par SHERMAN *et al.*<sup>26</sup>. Ces fioles sont agitées sur l'agitateur habituel. Dans ces conditions, l'oxygène n'est pas un facteur limitant pendant une partie importante de la croissance. Les opacités sont exprimées en densité optique ( $d.o.$ ) =  $\log I_0/I$  pour une épaisseur de 1 cm. Dans le cas de cultures trop denses, une correction est introduite pour tenir compte de la non linéarité de la relation  $d.o.$  mesurée/concentration microbienne. Les croissances sont

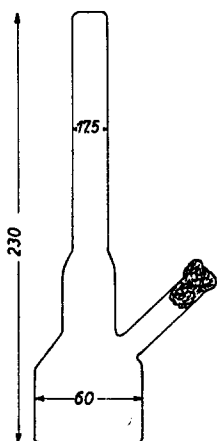


Fig. 1. Fiole pour culture agitée et mesures des opacités.

données en graphique:  $\log d.o./\text{temps}$ .

La phase de latence est déterminée suivant HINSHELWOOD<sup>10</sup> et MONOD<sup>17</sup> par l'intersection du prolongement de la phase exponentielle avec l'horizontale correspondant à l'opacité initiale.

### Résultats expérimentaux

#### Relation entre la croissance totale et la concentration en acide glutamique du milieu de culture

Des essais préliminaires ont montré que le L (+) glutamate n'était oxydé que très lentement par la bactérie et qu'il ne participe vraisemblablement pas au catabolisme de la bactérie. La Fig. 2 représente la croissance bactérienne ( $d.o.$ ) en fonction du temps pour 3 concentrations différentes en glutamate. En prenant comme croissance totale la  $d.o.$  maximum, on peut voir que celle-ci est une fonction parfaitement linéaire de la concentration en acide glutamique (Fig. 3). Celui-ci est le facteur limitant de la croissance dans ces conditions.

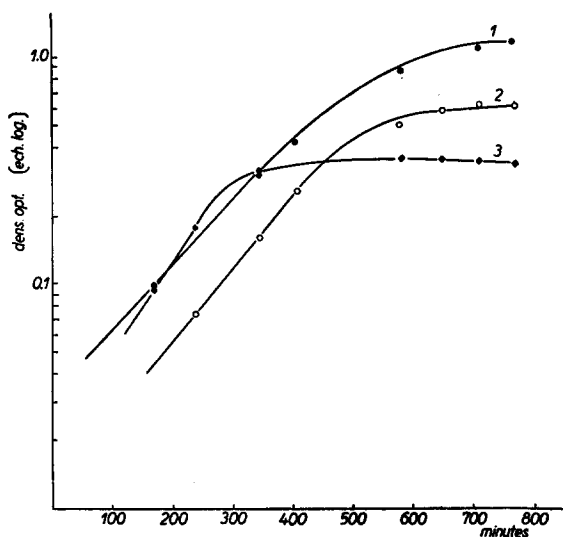


Fig. 2. Croissance de *Bac. subtilis m^-* avec des concentrations en acide glutamique de 1.  $M/150$ ; 2.  $M/300$  et 3.  $M/500$ .

Après avoir atteint la phase stationnaire, les bactéries ont été centrifugées, lavées à l'eau et on a déterminé l'azote total bactérien. La Fig. 4 montre la relation entre l'azote glutamique introduit dans le milieu et l'azote retrouvé dans les bactéries. Pour les doses en acide glutamique allant de  $M/1000$  à  $M/500$ , on retrouve dans les bactéries une quantité d'azote identique à celle introduite sous forme d'acide glutamique. Pour les concentrations supérieures, l'écart est sensible; on ne peut cependant pas le considérer comme supérieur aux erreurs d'expérience, car dans ces cas le début de la phase stationnaire est moins bien définie et il y a vraisemblablement une perte d'N bactérien due à un début de lyse.

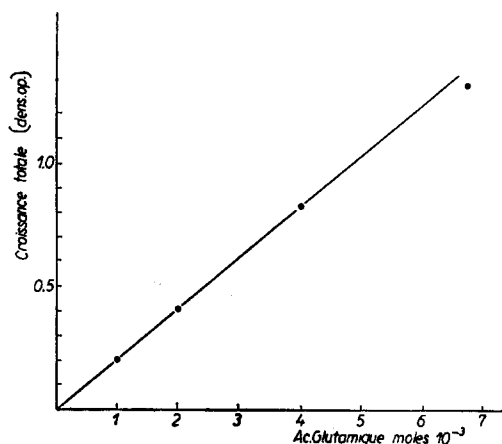


Fig. 3. Relation entre la quantité d'azote glutamique du milieu et la croissance totale exprimée par l'opacité.

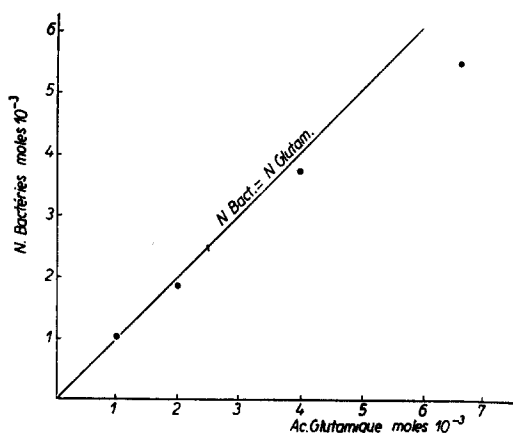


Fig. 4. Relation entre la quantité d'azote glutamique du milieu et la quantité d'azote bactérien retrouvé. La droite correspond à l'égalité de ces deux quantités.

Les milieux utilisés dans les essais précédents contiennent un sel d'ammonium; la suppression de celui-ci ne change pas la vitesse de croissance et la croissance totale (Tableau I).

TABLEAU I

Temps. min.	Croissance (densité optique)	
	Ac. glut. $M/500$ sans $NH_4^+$	Ac. glut. $M/500$ ( $NH_4$ ) $_2$ SO $_4$ $M/50$
0	0.13	0.13
70	0.24	0.23
120	0.33	0.31
180	0.51	0.52
270	0.67	0.66

Ces résultats montrent que l'acide glutamique est la seule source importante d'azote de la bactérie et qu'il est utilisé intégralement.

#### Remplacement de l'acide glutamique par les autres amino-acides

En plus de l'acide glutamique, la *B. subtilis*  $m_1^-$ , peut encore croître sur les acides.

Bibliographie p. 278/279.

aminés suivants: L-arginine, acide L-aspartique, L-proline et L-ornithine. L'hydroxyproline donne une croissance très lente. Les amino-acides suivants ne peuvent pas remplacer l'acide glutamique: DL-alanine, L-cystéine, L-histidine, DL-isoleucine, L-lysine, DL-méthionine, L-tryptophane, L-tyrosine, DL-valine, DL-norvaline, glycine, DL-serine, DL-threonine, DL-phénylalanine, ac. D-aspartique, DL-norleucine. Ces différents amino-acides ont toujours été testés à la concentration  $M/100$ ; l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique ne peut pas remplacer l'acide glutamique. La glutamine donne une croissance régulière, mais beaucoup plus lente; elle est vraisemblablement transformée en acide glutamique avant d'être utilisée. La citrulline et l'acide carbamylglutamique (filtrés) ne donnent pas de croissance.

En suivant la croissance totale sur les différents amino-acides remplaçant l'acide glutamique, on a constaté que

le remplacement est strictement stoechiométrique. La Fig. 5 montre la croissance d'une bactérie  $m^-$  ayant cru sur acide glutamique, lavée et ensemencée ensuite sur des milieux à concentration diverses en acide glutamique et en arginine. Les croissances sur arginine débutent plus tard que celles faites sur acide glutamique; cependant à molarité égale, on a des croissances totales égales, malgré la teneur différente en azote de ces différents amino-acides. La même observation vaut pour le remplacement de l'acide glutamique par la proline et l'acide aspartique (Fig. 6).

#### *Les adaptations simultanées dans le cas des différents amino-acides*

Les données précédentes montrent que la bactérie  $m_1^-$  est incapable d'utiliser l'ion

$\text{NH}_4^+$  comme source d'azote alors que les variants du type(+) croissent normalement avec l'ammonium comme seule source d'azote. Il est nécessaire de fournir à la bactérie de l'azote, sous forme d'acido-acides. Ces différents amino-acides jouent un rôle semblable; ils sont la source générale d'N de la bactérie. On peut donc penser qu'ils empruntent une voie métabolique en partie commune. Sauf l'acide aspartique, les autres amino-acides donneurs d'azote sont des acides à chaîne carbonée en  $\text{C}_5$  dont la parenté est bien connue.

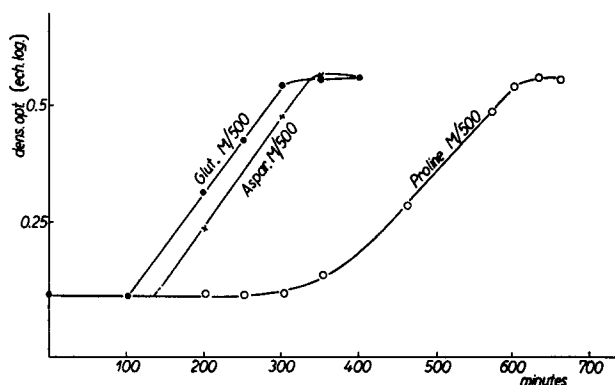


Fig. 6. Croissance comparée sur acide glutamique, acide aspartique et proline.

L'interconversion de ces amino-acides est admise et il est intéressant de savoir quel

est celui de ces amino-acides qui effectivement est le donneur d'azote. Nous avons résolu ce problème par la méthode des adaptations simultanées de STANIER<sup>27</sup> appliquée à la croissance (WIAME<sup>37</sup>).

Les bactéries après avoir cru sur un acide aminé déterminé sont replacées dans différents milieux contenant un des amino-acides permettant la croissance. Les courbes de croissance ayant été publiées dans une note précédente<sup>37</sup>, nous limiterons ici l'expression des résultats au Tableau II. Dans ce tableau, un signe + signifie une phase de latence de la croissance nettement plus longue que celle d'un témoin (croissance de la bactérie sur un amino-acides identique à celui qui a servi à obtenir l'inoculum).

TABLEAU II

Inoculum ayant cru sur	Prolongation de phase de latence de croissance sur			
	Ac. Glut.	Proline	Ornithine	Arginine
Acide glutamique	—	+	+	+
Proline	—	—	non testé	+
Arginine	—	—	—	—

On peut donc voir par ces résultats que l'utilisation de l'acide glutamique ne prépare pas à l'utilisation de la proline, de l'ornithine ou de l'arginine. Au contraire, la croissance sur arginine prépare à la fois à l'utilisation de la proline, de l'ornithine et de l'acide glutamique. On peut en déduire que la bactérie utilise l'arginine ou l'ornithine ou la proline en les transformant en acide glutamique. Ceci explique que dans ces conditions l'arginine et l'ornithine, quoique possédant plus d'un atome d'N, ne peuvent effectivement en fournir qu'un à la bactérie.

Dans le cas de l'acide aspartique, la méthode des adaptations simultanée ne donne pas une réponse claire: les acides aspartique et glutamique peuvent se remplacer mutuellement sans un accroissement de la phase de latence nettement supérieur à l'erreur expérimentale.

#### *Inhibition par des amino-acides analogues*

La présence d'un amino-acide autre que l'acide glutamique n'influence généralement

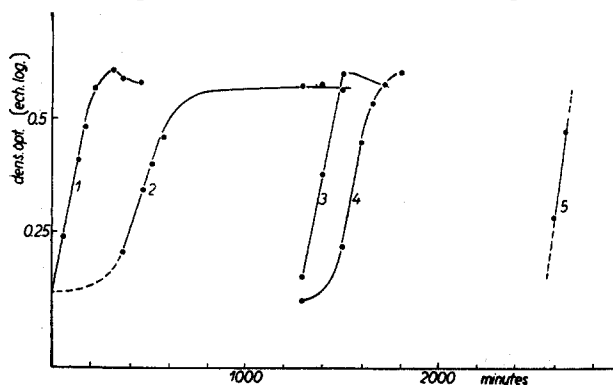


Fig. 7. Inhibition de la croissance pour la DL-norvaline, acide glutamique M/500 (1) additionné de DL-norvaline M/2000 (2) M/1000 (3) M/500 (4) M/250 (5)

Bibliographie p. 278/279.

pas, ou peu, la durée de la phase de latence de la culture. Cependant de légères inhibitions ont été obtenues avec l'isoleucine et la leucine. Nous l'avons attribué à la chaîne en C<sub>5</sub> de ces amino-acides qui entrerait en compétition avec l'acide glutamique.

Dans ce cas il était logique de penser que l'analogue en C<sub>5</sub> le plus proche de l'acide glutamique, la *norvaline* ( $\alpha$ -amino *n*-valérique) produirait une inhibition plus accentuée. Ce résultat a été vérifié. L'analogue monocarboxylé de l'acide aspartique, l'acide  $\alpha$ -amino-butérique, a égale-

ment une activité inhibitrice; elle est cependant moins prononcée. Nous donnons à la Fig. 7 les résultats des croissances obtenues en présence de diverses concentrations en norvaline. En présence d'acide glutamique  $M/500$ , la DL-norvaline est déjà inhibitrice à la concentration  $M/2000$ . D'une façon générale, après une période de latence plus ou moins longue, la croissance en présence de norvaline se fait à une vitesse normale.

Le sulfoxyde de la méthionine à des concentrations relativement fortes ( $M/100$ ,  $M/50$ ) n'a qu'une action inhibitrice faible. En présence de DL-norvaline  $M/1000$  et de concentration en acide glutamique respectivement  $M/1000$ ,  $M/500$ ,  $M/250$ ,  $M/100$ , les temps de latence ont été de 1300, 1000, 200 et 200 minutes (témoin 90 m) montrant ainsi l'effet compensateur de l'acide glutamique sur l'inhibition due à la norvaline.

La norvaline et l'acide  $\alpha$ -amino-butyrique prolongent également la phase de latence de souches n'exigeant pas d'acides-amino pour leur croissance (souche  $s^+$ ) (Tableau III).

TABLEAU III

Inhibiteur	Phase de latence en minutes
Néant	140
DL- $\alpha$ -amino-butyrique $M/500$	240
DL- $\alpha$ -amino-butyrique $M/250$	260
DL-norvaline $M/1000$	990
DL-norvaline $M/500$	1350
DL-norvaline $M/250$	2800

## ETUDE DES TRANSAMINATIONS

*Technique expérimentale*

Une bactérie  $s^-$  a été employée pour ces essais\*; elle est cultivée sur le milieu *glycérol glutamate* en ballon de 6 l contenant 3 l de milieu. L'aération est obtenue dans le même agitateur que celui employé pour les cultures de petit volume. Les bactéries sont récoltées au moyen d'une centrifuge Sharpless, alors que la croissance est encore active (dens. opt. 1 cm = 0.4). Les bactéries sont lavées deux fois à l'eau et finalement lyophilisées. On obtient dans ces conditions environ 100 mg de bactéries sèches par litre de culture.

Les transaminations ont été testées par incubation des divers amino-acides ( $M/20$ ) et d'acide  $\alpha$ -céto-glutarique ( $M/20$ ), en présence de 20 mg de bactéries et 120  $\mu$ g de pyridoxalphosphate\*\*, le tout contenu dans 1 ml de tampon phosphate  $M/25$  à pH 8.3. Le mélange est incubé à 35°. L'acide glutamique formé a été détecté par chromatographie unidimensionnelle sur papier à partir de tâches de 7  $\mu$ L des mélanges à analyser (solvant = phénol — eau). L'expression quantitative des résultats fut obtenue par le dosage de l'acide glutamique au moyen de la décarboxylase glutamique du *Clostridium Welchii* SR 12 suivant GALE<sup>8,9</sup>. Le Clostridium est obtenu par culture sur glucose 2 %; glutamate 1 %; Cooked meat medium (Difco) 0.5 %; Yeast extract (Difco) 0.5 %, pendant 15 heures à 37°. Le Clostridium est recueilli par centrifugation et lyophilisé. La poudre tenue à -10° se conserve au moins 12 mois. Pour le dosage, la poudre sèche est suspendue dans du tampon acétique-acétate  $M/5$  pH 4.5 à raison de 6 mg bactéries/ml de tampon; 2 ml de cette suspension sont utilisés pour chaque dosage. Le dégagement de CO<sub>2</sub> est mesuré par la méthode manométrique de WARBURG. Dans le cas où le mélange contient de l'acide aspartique, l'addition de cétaulon (MEISTER *et al.*<sup>15</sup>) réduit fortement la décarboxylation de l'acide aspartique qui pourrait fausser les résultats de dosage de l'acide glutamique.

Le *Bacillus subtilis*  $s^-$  lyophilisé contient un peu d'alanine libre visible sur les chromatogrammes. Cette alanine transamine et donne avec l' $\alpha$ -céto-glutarate une certaine quantité d'acide glutamique, qui doit être retranchée des valeurs obtenues dans chaque transamination.

Le témoin des transaminations est donc formé par la bactérie, l'acide céto-glutarique et le

\* La souche  $m_1^-$  ayant été perdue nous avons employé la souche  $s^-$ .

\*\* Nous remercions vivement le Dr K. FOLKERS de la Firme Merck (Rahway, New Jersey) qui nous a gracieusement fourni ce produit.

pyridoxalphosphate. Dans ces conditions, il se forme de 1.9 à 2.2  $\mu M$  d'acide glutamique provenant de la transamination de la faible quantité d'alanine présente dans la bactérie  $s^-$  (Tableau IV, N° 4). Cette valeur, décomptée de la quantité d'acide glutamique formée en présence des divers amino-acides donneurs d' $NH_2$ , donne l'expression de l'intensité de la transamination. Un second contrôle a été fait pour chaque amino-acide donneur, il est constitué par l'acide glutamique, le pyridoxalphosphate et il ne contient pas d'acide  $\alpha$ -céto-glutarique; ce contrôle élimine les conversions éventuelles de l'acide glutamique considéré en acide glutamique par une autre voie que la transamination. Disons dès maintenant que ce type de transformation n'a pas été observé avec certitude.

### Résultats expérimentaux

Les résultats sont donnés au Tableau IV.

Dans la colonne 3 sont indiqués les résultats nets des transaminations.

TABLEAU IV

Composition du mélange étudié		Acide glutamique dans 1 ml de mélange		
<i>Bactérie 20 mg dans tampon phosphate M/25 pH 8.3 + pyridoxalphosphate 120 <math>\mu g</math>, additionné de: (sauf indication les temps d'incubation sont de 120 min)</i>		<i>en <math>\mu l</math> <math>CO_2</math> dégagé</i>	<i>Total en <math>\mu M</math></i>	<i>Formé par transamination (obtenu en retranchant de l'ac. glutamique total, l'ac. glutamique de l'essai No. 4)</i>
		(1)	(2)	(3)
1	au temps de 0	30.8	1.3	
2	120	23.4	1.0	
3	$\alpha$ -céto-glutarique 0	21.2	0.9	
4	$\alpha$ -céto-glutarique 120	51.0	2.2	
5	glycine	28.2	1.2	
6	glycine + $\alpha$ -céto-glutarique	4.6	2.0	0
7	DL- $\alpha$ -alanine	32.6	1.4	
8	DL- $\alpha$ -alanine + $\alpha$ -céto-glutarique	98.2	4.3	2.1
9	DL- $\beta$ -alanine	24.8	1.1	
10	DL- $\beta$ -alanine + $\alpha$ -céto-glutarique	40.2	1.7	0
11	DL- $\alpha$ -amino butyrique	26.	1.1	
12	DL- $\alpha$ -amino butyrique + $\alpha$ -céto-glutarique	197.0	8.7	6.5
13	DL- $\gamma$ -amino butyrique	26.0	1.1	
14	DL- $\gamma$ -amino butyrique + $\alpha$ -céto-glutarique	49.0	2.1	0
15	DL-valine	26.8	1.1	
16	DL-valine + $\alpha$ -céto-glutarique	324.0	14.4	12.2
17	DL-norvaline	29.2	1.3	
18	DL-norvaline + $\alpha$ -céto-glutarique	273.	12.1	9.9
19	L-leucine	26.8	1.1	
20	L-leucine + $\alpha$ -céto-glutarique	325.6	14.5	12.3
21	D-leucine	26.4	1.1	
22	D-leucine + $\alpha$ -céto-glutarique	42.8	1.9	0
23	DL-isoleucine	21	0.9	
24	DL-isoleucine + $\alpha$ -céto-glutarique	327.6	14.6	12.4
25	DL-norleucine	24.5	1.0	
26	DL-norleucine + $\alpha$ -céto-glutarique	303	13.5	11.3
27	D-aspartate + céta-vlon	26.	1.1	
28	D-aspartate + $\alpha$ -céto-glutarique + céta-vlon	28.5	1.2	
29	L-aspartate + céta-vlon	41.	1.7	
30	L-aspartate + $\alpha$ -céto-glutarique + céta-vlon	700.	31.2	29.0
31	L-arginine	25	1.7	
32	L-arginine + $\alpha$ -céto-glutarique	47.2	2.1	0
33	L-ornithine	25.	1.1	
34	L-ornithine + $\alpha$ -céto-glutarique	19.7	0.9	0
35	L-citrulline	41.	1.7	
36	L-citrulline + $\alpha$ -céto-glutarique	43.3	1.9	0
37	L-lysine	24.7	1.1	
38	L-lysine + $\alpha$ -céto-glutarique	41.6	1.7	0
39	L-proline	24.9	1.1	0
40	L-proline + $\alpha$ -céto-glutarique	56.3	2.4	0

TABLEAU IV (continuation)

Composition du mélange étudié		Acide glutamique dans 1 ml de mélange		
Bactérie 20 mg dans tampon phosphate M/25 pH 8.3 + pyridoxalphosphate 120 µg, additionné de: (sauf indication les temps d'incubation sont de 120 min)		en µl CO <sub>2</sub> dégagé	Total en µM	Formé par transamination (obtenu en retranchant de l'ac. glutamique total, l'ac. glutamique de l'essai No. 4)
		(1)	(2)	(3)
41	L-histidine	22.	0.9	
42	L-histidine + α-cétoglutarique	164.	7.3	7.1
43	DL-thréonine	2.52	0.1	
44	DL-thréonine + α-cétoglutarique	21.6	0.9	0
45	DL-serine	25.7	1.1	
46	DL-serine + α-cétoglutarique	40.9	1.7	0
47	L-cystéine	6.9	0.3	
48	L-cystéine + α-cétoglutarique	12.5	0.5	0
49	L-cystéine	19.2	0.9	
50	L-cystéine + α-cétoglutarique	11.8	0.5	0
51	DL-méthionine	24.2	1.0	
52	DL-méthionine + α-cétoglutarique	241.3	10.7	8.5
53	L-phénylalanine	23.8	1.0	
54	L-phénylalanine + α-cétoglutarique	210.8	9.4	7.2
55	DL-tryptophane	25.4	1.1	
56	DL-tryptophane + α-cétoglutarique	84.3	3.7	1.5
57	L-tyrosine	24.7	1.0	
58	L-tyrosine + α-cétoglutarique	90.7	4.0	1.8

Les résultats de la détermination quantitative de l'acide glutamique par décarboxylation sont en accord avec les résultats de la chromatographie. Tous les amino-acides donnant une transamination positive donnent une tache très nette sur les chromatogrammes.

Les amino-acides transaminant avec certitude sont, par ordre d'intensité de la transamination: l'acide aspartique, l'isoleucine, la leucine, la norleucine, la valine, la norvaline, l'acide α-amino-butyrique, la méthionine, la phénylalanine, l'histidine, l'alanine, la tyrosine et le tryptophane.

Les amino-acides de la série d (N° 22, 28) ou les amino-acides dont le groupe — NH<sub>2</sub> n'est pas en α (N° 10, 14) ne transaminent pas.

Il est intéressant de constater que la norvaline et l'acide α-amino-butyrique dont la présence dans les cellules est contestée, transaminent très bien. SRUMPF<sup>31</sup> a trouvé récemment une transamination de la norvaline dans des graines en germination.

Comme il a déjà été signalé, la norvaline inhibe la croissance. En raison de la possibilité d'action de la norvaline, comme antagoniste de l'acide glutamique, au niveau des transaminations, nous avons testé son action sur la transaminase aspartique → glutamique.

La formation d'acide glutamique a été déterminée dans les 3 systèmes décrits ci-après:

20 mg <i>Bacillus subtilis</i> lyophilisé + 30 µg pyridoxalphosphate	{	1. α-cétoglutarate M/10 + L-aspartate M/10 donne 9.4 µM acide glutamique
		2. cétoglutarate M/10 + DL-norvaline M/10 donne 16 µM acide glutamique
		3. cétoglutarate M/5 + L-asp. M/10 + DL-norvaline M/10 donne 27 µM acide glutamique



On peut donc voir que la norvaline n'inhibe pas la transamination de l'aspartate. Les deux transaminations sont additives et vraisemblablement causées par deux transaminases indépendantes. L'étude des interrélations des différentes transaminations est actuellement à l'étude.

#### DISCUSSION DES RÉSULTATS

La perte de la possibilité d'utiliser l'ammonium comme seule source d'azote peut s'observer chez un *Bacillus subtilis* en réalisant des cultures sélectives, sur un milieu contenant du glutamate. Les bactéries mutantes obtenues ( $m^-$ ) non seulement exigent alors de l'azote aminé, mais elles ont perdu la possibilité d'utiliser, même partiellement, l'ion  $\text{NH}_4^+$ . Ceci montre que l'exigence ne résulte pas de l'impossibilité pour la bactérie de synthétiser un des amino-acides en tant qu'unité de construction des protéines, mais qu'elle correspond à la perte du mécanisme général d'incorporation de l' $\text{NH}_4^+$ . Un cas partiellement semblable a été signalé récemment par FINCHAM<sup>6,7</sup> chez *Neurospora*, où une utilisation partielle de l' $\text{NH}_4^+$  est cependant encore possible. La souche  $m^-$  peut croître sur un des amino-acides suivants: acide glutamique, proline, ornithine, arginine et acide aspartique. La parenté des quatre premiers amino-acides est bien connue et leur interrelation a été observée depuis longtemps dans les tissus animaux. (NEBER<sup>19</sup>; KREBS *et al.*<sup>11,12,13</sup>; ROLOFF *et al.*<sup>23</sup>; STETTEN *et al.*<sup>28,29,30</sup>; WEIL-MALHERBE ET KREBS<sup>36</sup>; WIAME<sup>37</sup>).

Des résultats décrits dans ce travail, il résulte que la chaîne métabolique: Arginine  $\rightarrow$  ornithine  $\rightarrow$  proline  $\rightarrow$  acide glutamique est fonctionnelle et que chaque enzyme de cette chaîne est adaptatif. Il est établi par ce fait que la proline est un intermédiaire direct de la chaîne. La proline avait été considérée comme le résultat d'une chaîne latérale (BONNER<sup>2</sup>) lors de l'étude du remplacement de l'arginine par la proline chez un *Penicillium*. Il faut remarquer que, dans ce cas, la chaîne étudiée était: ac. glutamique  $\rightarrow$  arginine, et que les deux voies ne sont pas nécessairement le résultat de la stricte inversion des réactions. De plus récemment SRB, FINCHAM ET BONNER<sup>25</sup> ont signalé que, dans de nouveaux essais, la réponse à l'acide glutamique a donné des résultats irréguliers; il est donc possible que la chaîne de réactions observée chez *Neurospora* se limite à proline  $\rightarrow$  arginine.

Le remplacement stoechiométrique de l'acide glutamique par les amino-acides précités montre que pour l'arginine un seul azote sur quatre, et pour l'ornithine un azote sur deux sont utilisés. Ceci se comprend aisément étant donné que ces amino-acides sont utilisés via l'acide glutamique.

Il résulte de ces observations que l'acide glutamique occupe une position centrale comme source d'azote pour cette bactérie. Cette opinion a déjà été exprimée par plusieurs auteurs. ROINE<sup>22</sup> avait observé que l'acide glutamique, l'acide aspartique et l'alanine sont les amino-acides les plus abondants de la fraction amino-acides solubles de la levure, tout particulièrement lorsqu'une levure épuisée en azote est remise en présence d'ion  $\text{NH}_4^+$ . L'accumulation de ces amino-acides précède l'incorporation de l'azote dans les protéines.

D'autre part, MORISSON ET HINSHELWOOD<sup>18</sup> ont clairement montré que la phase de latence de *E. coli* est réduite au minimum par ajout d'acide glutamique. BILLEN ET LICHSTEIN<sup>1</sup> ont également montré que *E. coli* (cellules non proliférantes) synthétise l'hydrogénelyase et l'hydrogénase avec une vitesse plus grande en présence d'acide glutamique qu'avec d'autres substances testées.

La sensibilité du *Bac. subtilis* à la norvaline, et l'effet compensateur de l'acide glutamique s'expliquent par l'analogie de structure de ces substances. La norvaline agit également sur les souches capables d'utiliser l' $\text{NH}_4^+$ , VACIRCA<sup>33</sup>, PORTER ET MEYERS<sup>20</sup> avaient déjà signalé l'effet inhibiteur de la norvaline chez d'autres micro-organismes sans l'interpréter.

La caractère général de donneur d'azote de l'acide glutamique chez *Bac. subtilis* est en accord avec les nombreuses transaminations que nous avons pu mettre en évidence chez cet organisme. Nous confirmons ainsi le rôle général des transaminations prévu par Braunstein et démontré définitivement par VIRTANEN ET LAINE<sup>34,35</sup>, RAUTANEN<sup>21</sup>, ROINE<sup>22</sup>, FELDMAN ET GUNSALUS<sup>5</sup>; CAMMARATA ET COHEN<sup>4</sup> et ROWSELL<sup>24</sup>.

Parmi les amino-acides qui ne transaminent pas, il faut noter qu'il y a précisément ceux qui peuvent se transformer en acide glutamique (proline, arginine, ornithine).

L'ensemble des résultats sur la transamination montre que cette réaction joue un rôle très général dans l'ensemble du métabolisme azoté et permet de croire que les céto-acides homologues de l'isoleucine, la leucine, la norleucine, la valine, la méthionine, la phénylalanine, l'histidine, l'hydroxyproline, l' $\alpha$ -alanine, la tyrosine et le tryptophane sont les accepteurs du groupe  $-\text{NH}_2$  de l'acide glutamique.

La possibilité de passer (probablement par mutation et sélection) de souches assimilant l' $\text{NH}_4^+$  (souche +) à des souches ayant perdu entièrement cette possibilité (souche —) permet de prévoir avec une forte probabilité que l'entrée de l' $\text{NH}_4^+$  dans le métabolisme azoté se fait par une voie unique. On peut penser à l'amination réductive de l' $\alpha$ -cétoglutarate. Récemment, FINCHAM<sup>6,7</sup> a pu montrer que les souches de *Neurospora* n'ayant pas la possibilité d'assimiler l' $\text{NH}_4^+$  sont dépourvues de L-glutamique deshydrogénase, alors que cet enzyme est présent dans les souches pouvant assimiler l' $\text{NH}_4^+$ .

Nous avons signalé que des amino-acides comme la leucine et l'alanine ne peuvent pas remplacer l'acide glutamique comme donneur d'N; cependant, il est démontré que ces amino-acides transaminent en donnant de l'acide glutamique. Cette contradiction entre les résultats *in vivo* et *in vitro* pose un problème intéressant qui est actuellement à l'étude.

Ce travail a été subventionné par l'Institut pour la Recherche Scientifique dans l'Industrie et l'Agriculture (I.R.S.I.A.), le Centre de Brasserie et Malterie (C.B.M.) et l'Institut Belge de l'Alimentation et la Nutrition (I.B.A.N.). Nous remercions vivement ces institutions pour l'intérêt qu'elles ont pris à ce travail.

## RÉSUMÉ

Le métabolisme azoté de différents variants d'un *Bac. subtilis* a été étudié.

Certaines souches (+) peuvent utiliser l' $\text{NH}_4^+$  comme source unique d'azote. Cette possibilité peut être perdue (souche —) et dans ce cas ( $m^-$ ,  $s^-$ ), la bactérie ne peut croître qu'en présence de l'un des amino-acides suivants: ac. glutamique, proline, ornithine, arginine et ac. aspartique.

La transformation d'une souche (+) en souche (—) entraîne la perte totale de l'utilisation de l' $\text{NH}_4^+$ . Les amino-acides cités ci-dessus constituent alors la seule source d'azote utilisable.

Il est démontré que l'arginine, l'ornithine et la proline sont des donneurs d'azote après leur transformation préalable en ac. glutamique, qui est le donneur général d'azote. Cette fonction est confirmée par la mise en évidence de transaminations entre l'ac. glutamique et les amino-acides suivants: ac. aspartique, isoleucine, leucine, norleucine, valine, norvaline, acide  $\alpha$ -amino-butyrique, méthionine, phénylalanine, histidine,  $\alpha$ -alanine, tyrosine et tryptophane.

On démontre que la proline est un constituant de la chaîne de réaction allant de l'arginine à l'acide glutamique.

La norvaline et à un degré moindre, l'acide  $\alpha$ -amino-butyrique sont des inhibiteurs de la croissance de *Bac. subtilis*. Cette inhibition est attribuée à la similitude de ces substances avec l'acide glutamique et l'acide aspartique.

### SUMMARY

The nitrogen metabolism of variants of *B. subtilis* has been studied.  $\text{NH}_4^+$  may be the only source of nitrogen for (+) strains.

This ability to utilise  $\text{NH}_4$  may be lost (Strains —) and in this case ( $m^-$ ,  $s^-$ ) the bacteria only grow when one of the following amino acid is present in the medium: L-glutamic acid, L-proline, L-ornithine, L-arginine and L-aspartic acid.

The transformation of a strain (+) in a strain (—) results in the complete loss of ability to use  $\text{NH}_4^+$ . The above-cited amino acids being the unique source of nitrogen.

Arginine, ornithine, and proline are donors of nitrogen after their previous transformation into glutamic acid, which is the general nitrogen donor. This function is confirmed by the demonstration of a transamination reaction between glutamic acid and the following amino acids: aspartic acid, isoleucine, leucine, norleucine, valine, norvaline,  $\alpha$ -amino-butyric acid, methionine, phenylalanine, histidine,  $\alpha$ -alanine, tyrosine and tryptophane.

It is demonstrated that proline is an intermediate when arginine is transformed to glutamic acid.

Norvaline and, to a lesser degree,  $\alpha$ -amino-butyric acid, are growth inhibitors of *B. subtilis*. This inhibition is explained by the similarity between these substances and glutamic and aspartic acid, respectively.

### ZUSAMMENFASSUNG

Der Stickstoffmetabolismus verschiedener Varianten eines *B. subtilis* wurde untersucht.

Gewisse Stämme (+ Stämme) können  $\text{NH}_4^+$  als einzige Stickstoffquelle gebrauchen. Diese Fähigkeit kann verloren gehen (— Stamm) und in diesem Falle ( $m^-$ ,  $s^-$ ) kann die Bakterie nur in Gegenwart einer der folgenden Aminosäuren wachsen: Glutaminsäure, Prolin, Ornithin, Arginin und Asparaginsäure.

Die Verwandlung eines (+) in einen (—) Stamm bringt den vollständigen Verlust der Fähigkeit,  $\text{NH}_4^+$  zu verwerten mit sich. Die obengenannten Aminosäuren stellen dann die einzige verwendbare Stickstoffquelle dar.

Es wird bewiesen, dass Arginin, Ornithin und Prolin nach Umwandlung in Glutaminsäure, welche die allgemeine Stickstoffquelle ist, Stickstoff abgeben. Eine Bestätigung hierfür bilden die aufgezeigten Umaminierungen zwischen Glutaminsäure einerseits und Asparaginsäure, Isoleucin, Leucin, Norleucin, Valin, Norvalin,  $\alpha$ -Aminobuttersäure, Methionin, Phenylalanin, Histidin,  $\alpha$ -Alanin, Tyrosin und Tryptophan andererseits.

Es wird bewiesen, dass Prolin ein Glied der Reaktionskette ist, welche vom Arginin zur Glutaminsäure führt.

Norvalin und, in geringerem Masse,  $\alpha$ -Aminobuttersäure hemmen das Wachstum von *B. subtilis*. Diese Hemmung wird auf die Ähnlichkeit der genannten Verbindungen mit Glutamin- und Asparaginsäure zurückgeführt.

### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> D. BILLEN ET H. C. LICHSTEIN, *J. Bact.*, 61 (1951) 515.
- <sup>2</sup> D. BONNER, *Cold Spring Harbor Symposia Quant Biol.*, 11 (1946) 14.
- <sup>3</sup> A. E. BRAUNSTEIN ET KRITZMANN, *Enzymologia*, 2 (1937) 129, 138.
- <sup>4</sup> P. S. CAMMARATA ET P. P. COHEN, *J. Biol. Chem.*, 187 (1950) 439.
- <sup>5</sup> L. I. FELDMAN ET I. C. GUNSALES, *J. Biol. Chem.*, 187 (1950) 821.
- <sup>6</sup> J. R. S. FINCHAM, *J. Biol. Chem.*, 182 (1950) 61.
- <sup>7</sup> J. R. S. FINCHAM, *J. Gen. Microbiol.*, 5 (1951) 793.
- <sup>8</sup> E. F. GALE, *Biochem. J.*, 39 (1945) 46.
- <sup>9</sup> E. F. GALE, *Biochem. J.*, 41 (1947) VII.
- <sup>10</sup> C. H. HINSHELWOOD, *Chemical Kinetics of the Bacterial Cell*, Oxford, 1946.
- <sup>11</sup> H. A. KREBS ET W. A. JOHNSON, *Enzymologia*, 4 (1937) 148.
- <sup>12</sup> H. A. KREBS ET K. HENSELHEIT, *Z. Phys. Chem.*, 210 (1932) 33.

- <sup>13</sup> H. A. KREBS, L. V. EGGLESTON ET R. HEMS, *Biochem. J.*, 43 (1948) 406.
- <sup>14</sup> A. J. P. MARTIN ET R. L. M. SINGE, *Advances in Protein Chem.*, 2 (1945) 5.
- <sup>15</sup> A. MEISTER, H. A. SOBER ET J. V. TICE, *J. Biol. Chem.*, 189 (1951) 577.
- <sup>16</sup> A. MEISTER ET S. V. TICE, *J. Biol. Chem.*, 187 (1950) 173.
- <sup>17</sup> J. MONOD, *Ann. Rev. Microbiol.*, (1949) 371.
- <sup>18</sup> G. A. MORRISON ET C. H. HINSHELWOOD, *J. Chem. Soc.*, (1949) 372.
- <sup>19</sup> M. NEBER, *Z. physiol. Chem.*, 240 (1936) 70.
- <sup>20</sup> J. R. PORTER ET F. P. MEYERS, *J. Bact.*, 47 (1944) 435.
- <sup>21</sup> N. RAUTANEN, *J. Biol. Chem.*, 163 (1946) 687.
- <sup>22</sup> P. ROINE, *Ann. Acad. Sci. Fennicae*, série A, No. 26.
- <sup>23</sup> M. ROLOFF, S. RATNER ET R. SCHOENHEIMER, *J. Biol. Chem.*, 136 (1940) 561.
- <sup>24</sup> E. V. ROWSELL, *Nature*, 168 (1951) 104.
- <sup>25</sup> A. M. SRB, J. R. S. FINCHAM ET D. BONNER, *Am. J. Botany*, 37 (1950) 533.
- <sup>26</sup> F. G. SHERMAN ET B. M. GRANT, *J. Lab. Clin. Med.*, 37 (1951) 325.
- <sup>27</sup> R. STANIER, *J. Bact.*, 54 (1947) 339.
- <sup>28</sup> M. STETTEN ET R. SCHOENHEIMER, *J. Biol. Chem.*, 153 (1944) 113.
- <sup>29</sup> M. STETTEN, *J. Biol. Chem.*, 181 (1949) 31.
- <sup>30</sup> M. STETTEN, *J. Biol. Chem.*, 189 (1951) 499.
- <sup>31</sup> P. K. STUMPF, *Federation Proc.*, 10 (1951) 256.
- <sup>32</sup> G. TOENNIES ET J. KOLB, *J. Biol. Chem.*, 128 (1939) 399.
- <sup>33</sup> F. VACIRCA, *Boll. ist. sieroterap. milan.*, 24 (1945) 143.
- <sup>34</sup> A. I. VIRTANEN ET J. LAINE, *Nature*, 141 (1938) 748.
- <sup>35</sup> A. I. VIRTANEN ET J. LAINE, *Biochem. Z.*, 308 (1941) 213.
- <sup>36</sup> H. WEIL-MALHERBE ET H. KREBS, *Biochem. J.*, 29 (1935) 2077.
- <sup>37</sup> J. M. WIAME, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 478.

Reçu le 15 Mai 1952