

RÉDUCTION DE L'HYDROXYLAMINE LIÉE À L'ACTIVITÉ DE L'HYDROGÉNASE DE *DESULFOVIBRIO DESULFURICANS*

I. ACTIVITÉ DES CELLULES ET DES EXTRAITS

JACQUES C. SENEZ ET FRANCIS PICHINOTY

Centre National de la Recherche Scientifique, C.R.S.I.M., Marseille (France)

L'hydroxylamine est considérée comme un des intermédiaires de la réduction du nitrate en ammoniacque^{1, 2, 3} et son métabolisme présente, de ce fait, un grand intérêt pour le métabolisme de l'azote inorganique en général:

Les premières études sur la réduction de l'hydroxylamine par des suspensions bactériennes non-proliférantes sont celles d'AUBEL⁴ et de WOODS⁵, qui ont montré que cette réaction est effectuée par *Clostridium welchii* et par *Escherichia coli*, aux dépens soit d'un donateur organique d'hydrogène, soit de l'hydrogène moléculaire activé par l'hydrogénase de ces microorganismes.

Etudiant une souche d'*E. coli* dont STICKLAND⁶ avait déjà observé que, sous atmosphère d'hydrogène, elle ne réduit pas le nitrate au delà du stade nitrite, LASCELLES ET STILL⁷ ont constaté que ces bactéries deviennent capables de réduire le nitrite et l'hydroxylamine en ammoniacque lorsqu'on leur ajoute un transporteur artificiel d'hydrogène. D'autre part, l'indépendance relative des différentes étapes enzymatiques parcourues par l'azote minéral pendant sa réduction en ammoniacque a été soulignée par les observations de LEMOIGNE, DE SOMER ET CROSON⁸ sur une souche de *Bacillus megatherium* qui, en anaérobiose et en présence de glucose, réduit le nitrite et l'hydroxylamine, mais est inactive à l'égard du nitrate.

Au cours de ces dernières années, la nature des systèmes enzymatiques qui réduisent l'hydroxylamine a fait l'objet de plusieurs travaux importants. TANIGUCHI *et al.*⁹ ont extrait des cellules de *Bacillus pumilis* une hydroxylamine-réductase spécifique, couplée avec la formico-déshydrogénase. Peu après, KLAUSMEIER ET BARD¹⁰ ont extrait de *Bacillus subtilis* un enzyme qui réduit l'hydroxylamine aux dépens des pyridine-nucléotides. Ayant observé que leurs préparations réduisent le coenzyme I (DPN) en présence d'ammoniacque, ces auteurs pensaient avoir démontré la réversibilité de la réaction et avaient, de ce fait, décrit leur enzyme sous le nom d'"ammonium-déshydrogénase". Mais ROUSSOS *et al.*¹¹ ont récemment montré que cette réoxydation du nucléotide par l'ammoniacque est, en réalité, un artefact non-enzymatique et que l'enzyme de *B. subtilis* fonctionne seulement comme hydroxylamine-réductase. Une autre hydroxylamine-réductase a récemment été purifiée à partir des cellules de *Neurospora crassa* par ZUCKER ET NASON¹², qui ont étudié cet enzyme d'une façon détaillée et ont établi sa nature flavo-protéique.

D'autre part, plusieurs auteurs ont publié des observations tendant à établir un lien fonctionnel entre les cytochromes bactériens et la réduction de l'azote minéral.

C'est ainsi que SATO ET EGAMI¹³, VERNON¹⁴, et VERHOEVEN ET TAKEDA¹⁵ ont mis en évidence chez *E. coli*, *Micrococcus denitrificans* et différents *Pseudomonas* des cytochromes *b*, *b*₁ et *c*, qui sont réoxydés par le nitrate, par le nitrite ou par l'hydroxylamine.

Le présent travail est consacré à la réduction de l'hydroxylamine par les bactéries sulfato-réductrices (*Desulfovibrio desulfuricans*), organismes dont on a déjà indiqué brièvement, dans une note antérieure¹⁶, qu'ils réduisent NH₂OH en utilisant, comme source d'énergie et comme donateur d'électrons, l'hydrogène moléculaire.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches bactériennes et techniques de culture

Au cours de cette étude, on a employé cinq souches pures de *Desulfovibrio desulfuricans*, dont trois non-halophiles: GAZ 54, Essex (NCIB 8390) et ATCC 7757, et deux halophiles: Canet 41 (NCIB 8393) et El Agheila Z (NCIB 8380). Ces différentes souches ont été conservées depuis leur isolement et ont été cultivées dans le milieu suivant, où la source minérale d'azote est le chlorure d'ammonium:

CNH₄: 2.0 g; SO₄Mg, 7 H₂O: 2.0 g; SO₄Na₂: 10.0 g; PO₄HK₂: 1.0 g; lactate de soude: 20.0 g; extrait de levure (Difco): 5.0 g; Cl₂Ca, 2 H₂O: 0.05 g; ClNa (pour les souches halophiles): 20.0 g; eau distillée: 1 litre; pH: 7.0.

Les cultures destinées à la préparation des extraits ont été réalisées en ensemençant massivement, avec 1 litre d'une culture sous vide âgée de 36 à 48 h, 10 l de milieu fraîchement stérilisé. Les sulfures contenus dans l'inoculum suffisent à rendre le milieu fortement réducteur et assurent l'anaérobiose, sans autre précaution que de fermer le récipient avec un bouchon en caoutchouc.

Les bactéries ont systématiquement été récoltées par centrifugation (Sharples) après 48 h de développement à 32°, et lavées à deux reprises avec de l'eau distillée ou, dans le cas des souches halophiles, avec une solution de ClNa à 2%.

Préparation des extraits

On a d'abord employé l'extraction des cellules par les ultra-sons, dans des conditions semblables à celles que MILLET¹⁷ a utilisées pour extraire la sulfite-réductase du même organisme: 50 ml de suspension bactérienne, contenant 1 à 2 g de cellules (poids sec), sont traités par les ultra-sons (420 kc, 45 min) sous atmosphère d'hydrogène, en présence de SO₄Na₂ (0.5%), dans un dispositif¹⁸ muni d'une circulation d'eau, de façon à éviter qu'au cours du traitement la température ne s'élève au-dessus de 20°.

Par la suite, on a également employé l'autolyse en milieu aqueux, pendant 3 h, des cellules préalablement desséchées sous vide, l'extraction aqueuse des poudres acétoniques, le traitement par le toluène (2%) à 32° pendant 12 h¹⁹ et enfin le broyage des cellules par la poudre de quartz à 0°, dans les conditions indiquées par McILWAIN²⁰.

Les extraits sont séparés des débris cellulaires par centrifugation (26,000 g; + 4°; 15 min) et, sauf dans les cas qui seront précisés ultérieurement, employés sans purification. Leur conservation à -15°C pendant plus d'un mois ne s'accompagne d'aucune perte d'activité.

Mesure de l'activité

L'activité des suspensions non-proliférantes et des extraits a été mesurée par la méthode manométrique de Warburg, dans les conditions générales suivantes: phase gazeuse: H₂ purifié par passage sur de la tournure de cuivre chauffée au rouge; *t*: 37°; tampon phosphatique M/15: 1 cm³; volume total de la phase liquide: 3.0 cm³. Pour des raisons qui seront exposées plus loin, l'activité des extraits est systématiquement mesurée en présence de 20 μM de chlorhydrate de cystéine neutralisé.

Les taux d'activité sont exprimés en mm³ d'H₂ consommés (-Q_{H₂}) par heure et par mg (poids sec) de bactéries ou, dans le cas des extraits, par mg d'azote protéique total.

Techniques analytiques

Les densités bactériennes des suspensions ont été déterminées à l'aide du photocolorimètre de Blet et exprimées en mg de bactéries (poids sec) par cm³. L'hydroxylamine a été dosée par la technique d'ENDRES ET KAUFMANN²¹ et l'ammoniaque par la méthode de CONWAY²². La teneur des extraits en azote protéique a été déterminée par micro-Kjeldahl.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

I. *Activité des suspensions bactériennes*

Lorsqu'elles ont été cultivées en milieu où la seule source minérale d'azote est le chlorure d'ammonium, les cellules des cinq souches de *D. desulfuricans* étudiées réduisent l'hydroxylamine en ammoniacque aux dépens de l'hydrogène moléculaire, par un processus lié à l'activité hydrogénasique. Ces cellules réduisent également le nitrite, mais sont entièrement inactives à l'égard du nitrate. Cependant, on a constaté que si les cultures sont effectuées dans un milieu contenant 0.05 % de NO_3K , certaines souches acquièrent une nitrate-réductase adaptative dont l'étude fera l'objet d'une publication ultérieure.

En présence de NH_2OH , les $-\text{QH}_2$ des différentes souches (Tableau I) sont sensiblement égaux à ceux qu'on relève pour le sulfate. Ils sont, par contre, très inférieurs à ceux de l'activité hydrogénasique mesurée dans des systèmes où l'accepteur d'hydrogène est un indicateur coloré d'oxydo-réduction. C'est ainsi que, pour la souche GAZ 54, les $-\text{QH}_2$ moyens en présence de NH_2OH , SO_4Na_2 , bleu de méthylène et benzyl-viologène ont respectivement les valeurs suivantes: 95, 100, 5,950 et 6,000.

TABLEAU I
ACTIVITÉ DES BACTÉRIES ENTIÈRES ET DES EXTRAITS

	$-\text{QH}_2$
<i>Bactéries entières</i>	
Souche GAZ 54 (non-halophile)	95
Essex (non-halophile)	193
ATCC 7757 (non-halophile)	145
Canet 41 (halophile)	200
El Agheila Z (halophile)	29
<i>Extraits de la souche GAZ 54</i>	
Ultra-sons	188
Toluène	170
Autolyse des bactéries séchées	110
Extraction de poudre acétonique	61
Broyage par la poudre de quartz	0

Conditions expérimentales: bactéries cultivées sur milieu au chlorure d'ammonium; NH_2OH : 5 μM par manomètre; phase gazeuse: H_2 ; température: 37°C; tampon phosphate, pH 7.0; activités exprimées en mm^3 d' H_2 consommés ($-\text{QH}_2$) par heure et par mg de bactéries (poids sec) ou, dans le cas des extraits, par mg d'azote protéique.

La souche El Agheila Z se distingue des autres par sa faible activité hydrogénasique ($-\text{QH}_2 = 200$). Elle est corrélativement très peu active à l'égard de l'hydroxylamine ($-\text{QH}_2 = 29$).

L'activité des cellules de la souche GAZ 54 présente une particularité intéressante. Sur les courbes manométriques représentant la consommation de l'hydrogène en fonction du temps (Fig. 1), on constate que la vitesse de la réaction diminue progressivement au fur et à mesure que l'hydroxylamine est réduite, alors que la vitesse, avec les cellules des autres souches, comme par exemple Canet 41, demeure constante jusqu'à l'épuisement complet du substrat. Ce comportement, qui est particulier à l'hydroxylamine et ne s'observe pas avec le nitrite, n'est pas dû à une

inhibition par le substrat ou par les produits du métabolisme. Il est, par contre, lié à l'intégrité de la structure cellulaire. En effet, dans le cas des extraits provenant de la même souche, la vitesse de consommation de l'hydrogène en présence de NH_2OH demeure constante jusqu'à l'épuisement complet du substrat.

L'analyse des courbes de la Fig. 1 montre que la réduction de l'hydroxylamine par les bactéries entières est une réaction du premier ordre, dont la vitesse est proportionnelle à la concentration effective du substrat. A partir de deux systèmes, où la concentration initiale de NH_2OH était respectivement 2 et $3 \cdot 10^{-3} M$, la constante de cette réaction (k_1) a été calculée pour chaque point expérimental, par la relation :

$$k_1 = \frac{2,3 \log_{10} a/(a-x)}{t},$$

dans laquelle (t) est le temps en minutes, (a) la concentration initiale, du substrat et ($a-x$) la concentration restante au moment de la mesure. Les valeurs numériques

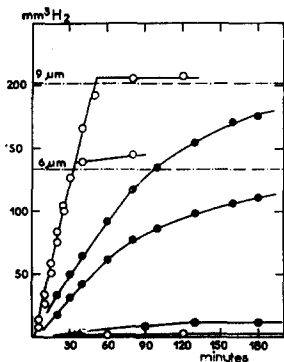


Fig. 1. Consommation de l'hydrogène par les cellules de la souche GAZ 54 (—●—●—) et de la souche Canet 41 (—○—○—). Conditions expérimentales: température: 37° , pH 7.4 (tampon phosphate M/15), bactéries: 1.05 mg (poids sec) par manomètre. Les mesures ont été faites pour chacune des souches avec deux systèmes différents, contenant l'un $9 \mu M$ et l'autre $6 \mu M$ de NH_2OH par manomètre. Les deux courbes inférieures sont celles de systèmes témoins, ne contenant pas d'hydroxylamine.

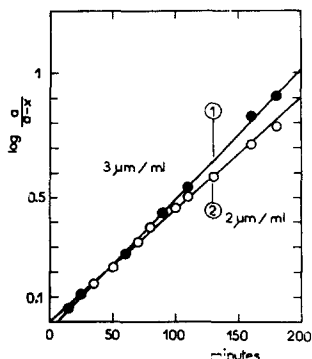


Fig. 2. Détermination graphique de la constante k_1 . Suspension de la souche GAZ 54 (1.05 mg de bactéries, poids sec, par manomètre). Concentrations initiales en hydroxylamine: (1) $9 \mu M$ par manomètre ($3.3 \cdot 10^{-3} M$), (2) $6 \mu M$ par manomètre ($2 \cdot 10^{-3} M$).

de ($a-x$) sont obtenues à partir des variations manométriques, en tenant compte du fait que la réduction d'une molécule de NH_2OH correspond à la consommation d'une molécule d'hydrogène. Les données expérimentales concordent de façon satisfaisante avec l'équation théorique (Fig. 2) et la valeur de k_1 ainsi déterminée est: $9.6 \cdot 10^{-3} (\pm 1.7)$. On verra plus loin (§ 5) que cette constante de k_1 est valable dans une large gamme de concentrations, entre $5 \cdot 10^{-4} M$ et $6 \cdot 10^{-2} M$.

En rapportant l'activité au poids total des bactéries contenues dans les systèmes manométriques, et en considérant, suivant les numérations effectuées, qu'un milligramme de bactéries (poids sec) contient $4.46 \cdot 10^8$ cellules, la constante k_1 permet de calculer que, lorsque la concentration de l'hydroxylamine est $1.0 M$, la vitesse de sa réduction est de $10.7 \cdot 10^{-7}$ molécule-gramme par cellule et par heure.

La première hypothèse à envisager pour expliquer la cinétique particulière de la réduction de NH_2OH par les bactéries entières de la souche GAZ 54, est une faible

TABLEAU II
CONSTANTES DE PERMÉABILITÉ (P) DES CELLULES DE LA SOUCHE GAZ 54 ET D'AUTRES
TYPES DE CELLULES

Cellules	(P)		
	Urée	Glycérol	Hydroxylamine
<i>D. desulfuricans</i> * (GAZ 54)	—	—	$3.44 \cdot 10^{-17}$
Erythrocyte (Boeuf) **	$2.1 \cdot 10^{-17}$	$0.017 \cdot 10^{-17}$	—
<i>Beggiatoa mirabilis</i> **	$15.8 \cdot 10^{-17}$	$10.6 \cdot 10^{-17}$	—
<i>Bacterium paracoli</i> **	$0.83 \cdot 10^{-17}$	$0.55 \cdot 10^{-17}$	—

"Constantes de perméabilité" exprimées en molécules-gramme de substrat pénétrant dans la cellule par heure et par μ^2 de surface cellulaire lorsque le gradient de concentration du substrat entre l'extérieur et l'intérieur de la cellule est 1.0 M .

* Dimensions moyennes des cellules (mensurations optiques): longueur 2.5 μ , largeur 0.4 μ , surface 3.14 μ^2 .

** Données relevées dans l'ouvrage de DAVSON ET DANIELLI²³.

perméabilité de la paroi cellulaire à l'égard de l'hydroxylamine. Cette interprétation peut paraître d'autant plus séduisante que, si on exprime la vitesse dans les unités employées pour définir la "constante de perméabilité" (P), c'est-à-dire en molécules-gramme par heure et par μ^2 de surface cellulaire, on trouve une valeur (Tableau II) très voisine de celles déjà rapportées dans la littérature²³ pour diverses cellules peu perméables à l'égard de substances ayant un encombrement moléculaire et des propriétés chimiques comparables à ceux de l'hydroxylamine.

Toutefois, un examen plus approfondi du phénomène montre que cette hypothèse ne peut être retenue. Dans le second mémoire de cette série, il sera démontré que le bromure de cétyle tri-ammonium (CeTAB) a la propriété de rendre la paroi cellulaire des bactéries sulfato-réductrices perméable aux grosses molécules du cytochrome c_3 (p.m. 13,000). Or, les suspensions de la souche GAZ 54 traitées par ce détergent continuent à réduire l'hydroxylamine suivant une cinétique comparable à celle des cellules non-traitées. Les courbes manométriques conservent une forme fortement incurvée et la valeur numérique de (P) passe seulement de 3.44 à $10.1 \cdot 10^{-17}$.

D'autre part, la perméabilité de la paroi cellulaire à l'égard de l'hydroxylamine et du produit de son métabolisme, c'est-à-dire l'ion ammonium, a été mesurée directement par la méthode des culots bactériens denses de MITCHELL ET MOYLE²⁴. Les résultats de ces expériences (Tableau III) montrent que, à la différence de ce que LITTLEWOOD ET POSTGATE²⁵ ont observé pour le sulfate et pour le chlorure de sodium, avec la même espèce bactérienne et la même technique, les cellules de GAZ 54 sont librement perméables à NH_2OH et à NH_4^+ .

Dans les culots denses de *D. desulfuricans*, LITTLEWOOD ET POSTGATE²⁵ ont établi que 35% environ du volume total sont occupés par des espaces intra-cellulaires inaccessibles aux substances dissoutes, même lorsque la barrière osmotique a été rompue. On doit, par conséquent, considérer que, dans la limite des erreurs auxquelles expose la technique employée, les résultats rapportés dans le Tableau III correspondent non seulement à une libre pénétration de l'hydroxylamine et de l'ion ammonium dans la cellule, mais encore à une légère concentration endo-cellulaire de ces substances, par un mécanisme non déterminé.

Mesurant la perméabilité des cellules de *Valonia* à l'égard d' H_2S , OSTERHOUT²⁶

TABLEAU III
 PERMÉABILITÉ DES CELLULES DE GAZ 54 À L'ÉGARD DE L'HYDROXYLAMINE
 ET DE L'ION AMMONIUM

Substrat	Concentration dans le surnageant ($\mu\text{M}/\text{ml}$)		Dilution du surnageant (%)	Volume théorique du culot bactérien pénétré par le substrat (%)
	initiale	finale		
NH_2OH	250	109	56.5	113
	125	59	53	106
CINH_4	30	13.6	45.3	90.6
	0	4.5		

Conditions expérimentales. Bactéries récoltées en phase exponentielle de croissance, lavées, remises en suspension dans du tampon phosphate $M/15$ à pH 6.3 et centrifugées à 18,000 t/min, $+ 4^\circ$, jusqu'à ce que le culot ait un volume constant. Volume du culot estimé d'après le poids sec de bactéries et la relation²⁵: $V/\text{poids sec} = 5$. Le culot est remis en suspension homogène dans la solution du substrat en tampon phosphate (pH 6.3) et les bactéries sont, après 10 min de contact à $+ 4^\circ$, à nouveau centrifugées. La concentration du substrat est déterminée analytiquement dans la solution initiale de NH_2OH ou de CINH_4 et dans le surnageant final.

a constaté que la vitesse de la pénétration croît avec la concentration, en tendant asymptotiquement vers une limite. Ce fait a été interprété par l'auteur comme exprimant la saturation d'un transporteur chimique avec lequel l' H_2S devrait se combiner pour franchir la paroi cellulaire. D'autre part, RICKENBERG *et al.*²⁷ ont récemment démontré que, chez *E. coli*, la pénétration endo-cellulaire des galactosides est assurée par des transporteurs actifs qui tendent à être saturés par les concentrations élevées en substrat. Aucun système transporteur semblable ne paraît exister dans les cellules de GAZ 54, dont l'activité croît linéairement pour des concentrations en hydroxylamine allant de $10^{-3} M$ à $5 \cdot 10^{-2} M$, sans tendre vers une limite.

En définitive, la cinétique observée avec les cellules de la souche GAZ 54 est celle d'une simple diffusion physique de l'hydroxylamine à travers une barrière qui ralentit son accès aux systèmes enzymatiques responsables de sa réduction. Les faits observés ne permettent pas de formuler une hypothèse sur la nature de cette barrière ni sur la raison pour laquelle une seule souche de *D. desulfuricans* sur cinq présente cette particularité. Ils permettent néanmoins de préciser que le siège de l'obstacle n'est pas la paroi cellulaire, mais une structure située à l'intérieur même de la cellule.

2. Activité des extraits de la souche GAZ 54

On observe en général que la consommation de l'hydrogène par les extraits ne débute pas aussitôt que le diverticule contenant NH_2OH a été renversé, mais seulement après un temps de latence plus ou moins prolongé (Fig. 3). Cette période de latence est supprimée par l'addition de cystéine (10 à 20 μM par manomètre). La cystéine, qui n'est pas dégradée et ne modifie pas la vitesse de la réaction, agit, comme on l'a déjà signalé dans une publication antérieure¹⁹, en abaissant le potentiel d'oxydo-réduction et en désoxygénant l'hydrogénase qui est réversiblement inhibée par l'air.

L'extraction par les ultra-sons, par le toluène et par autolyse des bactéries séchées donnent des résultats comparables (Tableau I), et c'est la dernière de ces trois techniques qui, du fait de sa simplicité, a par la suite été systématiquement employée pour la préparation des extraits. Il est intéressant de noter que le broyage des bactéries

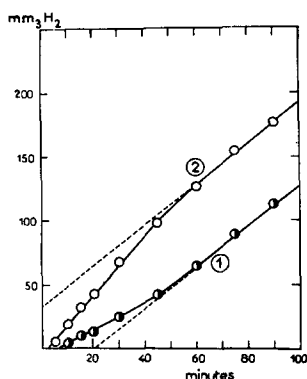


Fig. 3. Consommation de l'hydrogène, en présence de NH_2OH $3.3 \cdot 10^{-3} M$, par un extrait de la souche GAZ 54. Courbe (1): système contenant l'extrait brut, sans cystéine; courbe (2): système identique, additionné de cystéine ($20 \mu M$).

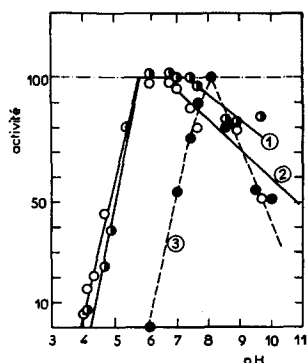


Fig. 4. Activité des extraits en fonction du pH. Expériences réalisées à 37° , en tampons acétate-véronal. (1) extrait brut contenant du cytochrome c_2 , en présence de NH_2OH ($10 \mu M$); (2) extrait purifié et réactivé par le benzyl-viologène ($50 \mu g/\text{manomètre}$), en présence de NH_2OH ($10 \mu M$); (3) activité hydrogénasique mesurée en l'absence de NH_2OH , dans des systèmes où l'accepteur d'hydrogène est constitué par $20 \mu M$ de benzyl-viologène.

par la poudre de quartz procure des préparations douées d'activité hydrogénasique en présence de benzyl-viologène, mais ne réduisant pas l'hydroxylamine.

3. Bilans métaboliques

L'analyse des systèmes manométriques en fin de réaction (Tableau IV) montre que l'hydroxylamine est stoechiométriquement réduite en ammoniacque par les extraits et les cellules, suivant l'équation:

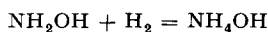


TABLEAU IV

BILANS MÉTABOLIQUES

(Expériences réalisées avec des suspensions de la souche GAZ 54)

$\mu M \text{ NH}_2\text{OH}$		$\mu M \text{ HN}_3$ produites		$\mu M \text{ H}_2$ consommées	
initial	restant	théorique	observé	théorique	observé
5.0	0.03	4.97	4.80	4.97	5.1
10.0	0.26	9.74	9.00	9.74	10.1
10.0*	0.03	9.97	9.60	9.97	9.3

* Expérience effectuée en tampon TRIS.

4. Influence du pH

La réduction de l'hydroxylamine aux dépends de l'hydrogène moléculaire par les cellules de *Cl. welchii* (WOODS⁵) et d'*E. coli* (LASCELLES ET STILL⁷) présente un optimum dans une zone de pH nettement alcaline, entre pH 8.5 et 9.0. ZUCKER ET NASON¹² ont également trouvé, pour l'hydroxylamine-réductase de *N. crassa*, un optimum compris entre pH 7.5 et 8.5.

Avec les extraits et les cellules entières de *D. desulfuricans* (souche GAZ 54), l'activité (Fig. 4) est nulle à pH 4.0 et atteint son maximum vers pH 6.0. Elle se

maintient à sa valeur maxima jusqu'à pH 8.5, puis s'abaisse de façon très progressive et, à pH 10, elle représente encore 50% de l'activité relevée dans la zone de pH optimum. Ce comportement en fonction du pH est identique lorsqu'on opère avec un extrait dépourvu de cytochrome c_3 et réactivé, c'est-à-dire dans des conditions où, comme le précisera le second mémoire de cette série, le transport de l'hydrogène est assuré artificiellement par une quantité catalytique de benzyl-viologène.

Si on compare l'influence du pH sur la réduction de l'hydroxylamine et sur l'activité hydrogénasique, mesurée dans des systèmes ne contenant pas d' NH_2OH et où l'accepteur est constitué par une quantité relativement importante (20 μM) de benzyl-viologène, on constate que l'activité hydrogénasique est nulle pour les pH inférieurs à 6.0 (Fig. 4) et atteint son maximum à pH 8.0 seulement.

Le fait que les extraits réduisent NH_2OH aux dépens de l'hydrogène moléculaire dans une zone de pH où l'hydrogénase paraît être inactive est, à première vue, paradoxal. Il s'explique cependant par les conditions employées pour mesurer l'activité hydrogénasique. L'accepteur servant à ces mesures, c'est-à-dire le benzyl-viologène, a la particularité d'avoir un potentiel d'oxydo-réduction invariable²⁸ ($E'_0 = -0.359\text{ V}$). Par contre, le potentiel de la réaction catalysée par l'hydrogénase ($\text{H}_2 \rightleftharpoons 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$) varie avec le pH, suivant la relation $\Delta E'_0/\Delta\text{pH} = -0.060\text{ V}$, et son E'_0 , qui est de -0.420 V à pH 7.0, n'est plus que de -0.360 V à pH 6.0. En conséquence, lorsque le pH est suffisamment bas, on conçoit que les deux potentiels finissent par se rejoindre, ce qui a pour effet de rendre impossible la réduction du benzyl-viologène. Pour mesurer l'activité NH_2OH -réductase, on emploie des systèmes dont le potentiel d'oxydo-réduction est élevé par la présence de l'hydroxylamine et où la concentration du benzyl-viologène est très inférieure à celle qui est nécessaire pour mesurer l'activité hydrogénasique. Ces conditions différentes peuvent avoir pour conséquence que, dans le second cas, le chevauchement entre les potentiels de l'hydrogénase et du benzyl-viologène se produise plus près de la neutralité et détermine ainsi une inactivation apparente de l'enzyme à pH < 6.0. En l'absence de données précises sur les potentiels réels des systèmes, cette explication demeure cependant hypothétique. Une autre différence entre les deux types de mesures est que, pour mesurer manométriquement l'activité hydrogénasique, on doit employer des quantités d'extrait 50 fois plus faibles environ que pour déterminer l'activité NH_2OH -réductase. Cette plus grande dilution peut également modifier le comportement de l'enzyme à l'égard du pH.

5. Inhibition par le substrat

LEMOIGNE, DE SOMER ET CROSON⁹ ont observé que la réduction de l'hydroxylamine par les cellules de *B. megatherium*, dans des conditions où le donateur d'hydrogène est le glucose, est inhibée par NH_2OH lorsque sa concentration dépasse un certain seuil. Le même fait s'observe avec les suspensions et les extraits de *D. desulfuricans* pour la réduction de l'hydroxylamine à partir de l'hydrogène moléculaire.

Sur les courbes représentant l'activité des cellules de GAZ 54 en fonction de la concentration en NH_2OH (Fig. 5), on constate, après une première phase ascendante, due au phénomène de diffusion intra-cellulaire déjà décrit, une brusque inhibition débutant à concentration 0.07 M et atteignant 100 % à concentration 0.1 M . Par contre, avec les extraits de la même souche (Fig. 5), l'inhibition commence dès la concentration 0.02 M et elle est plus progressive. Cette différence conduit à con-

sidérer que la concentration inhibitrice pour les cellules est celle qui est nécessaire dans le milieu extérieur pour que la concentration endo-cellulaire de l'hydroxylamine atteigne, au niveau des sites enzymatiques, le seuil d'inhibition relevé pour les extraits.

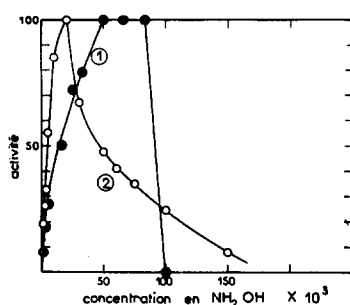


Fig. 5. Inhibition par le substrat. (1) suspension bactérienne de la souche GAZ 54, (2) extrait de la même souche, activé par l'addition d'une quantité catalytique de benzyl-viologène (50 μg per manomètre).

6. Inhibition par le nitrite de l'hydrogénase et de la réduction de l'hydroxylamine

L'activité hydrogénasique et la réduction de NH_2OH sont très fortement inhibées par le nitrite (Tableau V). Cette inhibition débute pour des concentrations en NO_2K très faibles, de l'ordre de $5 \cdot 10^{-5} M$, et elle est proportionnelle au logarithme de la concentration en inhibiteur. Elle est sensiblement parallèle pour les deux activités et ne dépend pas du rapport de concentrations $\text{NH}_2\text{OH}/\text{NO}_2\text{K}$, mais de la concentration absolue en nitrite. Elle n'est donc pas compétitive. Il s'agit, d'autre part, d'une inhibition réversible. En effet, si on met l'extrait en contact avec le nitrite et si on n'introduit NH_2OH dans le système que lorsque le nitrite a été complètement réduit en ammoniacque, on ne constate aucun ralentissement du taux de réduction de NH_2OH par rapport aux systèmes témoins n'ayant pas contenu de nitrite.

TABLEAU V
INHIBITION PAR LE NITRITE DE L'ACTIVITÉ HYDROGÉNASIQUE ET
DE LA RÉDUCTION DE L'HYDROXYLAMINE

	hydrogénase*		réduction de l'hydroxylamine**	
	Q_{H_2}	inhibition (%)	Q_{H_2}	inhibition (%)
Extrait GAZ 54:				
sans addition	480	—	181	—
+ NO_2K $3,3 \cdot 10^{-4} M$	280	41.7	87	51.9
Extrait Canet 41:				
sans addition	145	—	92	—
+ NO_2K $3,3 \cdot 10^{-4} M$	40	72.5	23	75.0

Nota: Activités ($-Q_{H_2}$) exprimées en mm^3 d' H_2 consommés par manomètre dans des systèmes contenant: * $10 \mu M$ de benzyl-viologène; ** $20 \mu M$ de NH_2OH + $0.2 \mu M$ de benzyl-viologène.

7. Autres inhibiteurs

Le barbotage d'air dans les suspensions bactériennes pendant trois heures ne modifie pas l'activité à l'égard de NH_2OH , alors que le même traitement supprime totalement leur activité à l'égard du sulfate¹⁹. Cette résistance des cellules à l'oxydation par l'air contraste avec la sensibilité des extraits et rend inutile l'addition de

cystéine ou d'un autre agent réducteur lorsque les mesures d'activité sont faites avec des cellules entières.

L'action de divers inhibiteurs chimiques a été étudiée avec des suspensions bactériennes à pH 7.4 (tampon phosphatique) ou à pH 7.5 (tampon TRIS), en prenant soin de mettre les inhibiteurs en contact avec les cellules pendant une heure avant l'addition du substrat. Les résultats obtenus concordent dans leur ensemble avec ceux des auteurs qui ont étudié la réduction de l'hydroxylamine par d'autres microorganismes^{5,7,8,9,29}. L'activité n'est pas inhibée par des concentrations 10^{-2} M des composés suivants: fluorure, arséniate et iodacétate de soude, semi-carbazide, hydrazide iso-nicotinique, *ortho*- et *para*-nitrophénols. L'arsénite, l'hydrazine, le phényl-uréthane et l'azothhydrate de soude (N_3Na) n'inhibent qu'à concentrations très élevées (Tableau VI) et, pour le dernier de ces composés, du même ordre que la concentration nécessaire³⁰ pour inhiber le cytochrome *c*.

TABLEAU VI
INHIBITEURS

Inhibiteurs		Concentrations (M)	% d'inhibition
Métaux lourds	Cu ⁺⁺	10^{-3}	100
		10^{-4}	0
	Hg ⁺⁺	10^{-3}	100
		10^{-4}	85
		10^{-5}	12
	Zn ⁺⁺	10^{-3}	0
Arsénite de soude		10^{-2}	49
		10^{-3}	22
Iodacétate de soude		10^{-2}	29
Hydrazine		10^{-2}	65
		10^{-3}	23
Phényl-hydrazine		10^{-2}	80
		10^{-3}	57
		10^{-4}	34
		10^{-5}	0
Phényl-uréthane		1/3 saturation	50
		1/30 saturation	12
		1/300 saturation	8
Azothhydrate de soude (N_3Na)		10^{-2}	79
		10^{-3}	24
Cyanure de potassium		10^{-3}	73
		10^{-4}	57
		10^{-5}	36
Oxydants	CrO ₄ K ₂	10^{-4}	100
		10^{-5}	12
	Cr ₂ O ₇ K ₂	10^{-4}	100
		10^{-5}	19
	IO ₄ K	$2.5 \cdot 10^{-3}$	100
		$2.5 \cdot 10^{-4}$	67
		$2.5 \cdot 10^{-5}$	15

Les inhibiteurs les plus actifs sont les métaux lourds (Cu⁺⁺ et Hg⁺⁺), les oxydants forts (bichromate, chromate et periodate), KCN et la phényl-hydrazine, dont SUZUKI ET SUZUKI³¹ ont déjà constaté qu'elle inhibe spécifiquement la réduction de NH₂OH

par *Azotobacter vinelandii*. Le cuivre, le mercure et les agents oxydants sont également de puissants inhibiteurs de l'hydrogénase et leur action s'explique vraisemblablement par l'inhibition de cet enzyme.

En ce qui concerne KCN, l'action de cet inhibiteur paraît être de nature différente. On a constaté, en effet, que les cellules inhibées par le cyanure retrouvent une partie de leur activité initiale si on ajoute au système manométrique une faible concentration ($10^{-4} M$) de benzyl-viologène. D'autre part, on a observé qu'un extrait dialysé contre une solution de KCN $10^{-2} M$ pendant trois heures, puis pendant deux heures, contre un grand volume d'eau plusieurs fois renouvelée, possède encore la totalité de son activité initiale. Ces observations paraissent indiquer que l'inhibition par le cyanure ne porte pas sur l'hydrogénase mais sur le transporteur d'électrons, et que ce processus ne consiste vraisemblablement pas dans la formation d'un complexe soluble et dialysable entre le KCN et un métal libre ou faiblement lié.

En traitant les extraits par d'autres agents complexants, on obtient des résultats qui sont également peu en faveur de la participation d'un métal libre dans le système. L'*ortho*-phénanthroline $10^{-3} M$ diminue la vitesse de réduction de NH_2OH de 35% seulement et, à la même concentration, la salicyl-aldoxime n'a aucun effet.

Il convient enfin de souligner que l'ion NH_4^+ inhibe la réduction de NH_2OH par les extraits lorsque la concentration en $CINH_4$ atteint $M/30$. Cette inhibition devient totale pour une concentration $M/3$.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

1. Les suspensions non-proliférantes et les extraits de *Desulfovibrio desulfuricans* réduisent stoechiométriquement l'hydroxylamine en ammoniaque, aux dépens de l'hydrogène moléculaire.
2. La réduction de l'hydroxylamine par les cellules entières est, dans le cas d'une des souches étudiées, ralentie par un phénomène lié à la diffusion intra-cellulaire du substrat. La nature de ce phénomène est discutée.
3. L'activité des cellules et des extraits est inhibée lorsque la concentration en substrat, c'est-à-dire en hydroxylamine, dépasse un certain seuil. Elle est également inhibée par le nitrite et par différents inhibiteurs dont l'un des plus actifs est le cyanure.
4. Le mécanisme enzymatique de la réaction sera décrit dans un mémoire ultérieur.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

1. Resting cells and cell-free extracts of *Desulfovibrio desulfuricans* reduce hydroxylamine stoichiometrically to ammonia, at the expense of molecular hydrogen.
2. The reduction of hydroxylamine by intact cells is, in the case of one of the studied strains, slowed down by a phenomenon linked with the intra-cellular diffusion of the substrate. The nature of this phenomenon is discussed.
3. The activity of intact bacteria and cell-free extracts is inhibited when the substrate (*i.e.* hydroxylamine) concentration exceeds a given value. Activity is also inhibited by nitrite and by several inhibitors, of which cyanide is one of the most active.
4. The enzymic mechanism of the reaction will be described in a forthcoming paper.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ A. J. KLUYVER, *Symposia Microbiol. Metabolism, Rome, 1954*, p. 71.
- ² V. VERHOEVEN, *Inorganic Nitrogen Metabolism*, Johns Hopkins Press, Baltimore, 1956, p. 61.
- ³ A. I. VIRTANEN ET N. RAUTANEN, J. B. SUMNER ET K. MYRBÄCK, *The Enzymes*, Vol. II, Part 2, Academic Press Inc., New York, 1951.
- ⁴ E. AUBEL, *Compt. rend. soc. biol.*, 128 (1938) 45.
- ⁵ D. D. WOODS, *Biochem. J.*, 32 (1938) 2000.
- ⁶ L. H. STICKLAND, *Biochem. J.*, 25 (1931) 1543.

- ⁷ J. LASCELLES ET J. L. STILL, *Australian J. Exptl. Biol. Med.*, 24 (1946) 159.
- ⁸ M. LEMOIGNE, A. DE SOMER ET M. CROSON, *Bull. soc. chim. biol.*, 33 (1951) 1423.
- ⁹ S. TANIGUCHI, H. MITSUI, J. TOYODA, T. YAMADA ET F. EGAMI, *J. Biochem. (Japan)*, 40 (1953) 175.
- ¹⁰ R. KLAUSMEIER ET R. BARD, *J. Bacteriol.*, 68 (1954) 129.
- ¹¹ G. G. ROUSSOS, H. TAKAHASHI ET A. NASON, *J. Bacteriol.*, 73 (1957) 594.
- ¹² M. ZUCKER ET A. NASON, *J. Biol. Chem.*, 213 (1955) 463.
- ¹³ R. SATO ET F. EGAMI, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 22 (1949) 137.
- ¹⁴ L. VERNON, *J. Biol. Chem.*, 222 (1956) 1035 et 1045.
- ¹⁵ V. VERHOEVEN ET Y. TAKEDA, *Inorganic Nitrogen Metabolism*, Johns Hopkins Press, Baltimore, 1956, p. 159.
- ¹⁶ J. C. SENEZ, F. PICHINOTY ET M. KONOVALTSCHIKOFF, *Compt. rend.*, 242 (1956) 570.
- ¹⁷ J. MILLET, *Compt. rend.*, 238 (1954) 408.
- ¹⁸ G. BOSCO, *Ann. Igiene Microbiol.*, 6 (1955) 35.
- ¹⁹ J. C. SENEZ, *Bull. soc. chim. biol.*, 37 (1955) 1135.
- ²⁰ H. MCILWAIN, *J. Gen. Microbiol.*, 2 (1954) 288.
- ²¹ G. ENDRES ET L. KAUFMANN, *Anal. Chem.*, 18 (1946) 96.
- ²² E. J. CONWAY, *Microdiffusion Analysis*, Crosby Lockwood, London, 1950.
- ²³ H. DAVSON ET J. F. DANIELLI, *The Permeability of Natural Membranes*, Cambridge University Press, 1952.
- ²⁴ P. MITCHELL ET J. MOYLE, *Bacterial Anatomy*, Cambridge University Press, 1956, p. 150.
- ²⁵ D. LITTLEWOOD ET J. R. POSTGATE, *J. Gen. Microbiol.*, 16 (1957) 596.
- ²⁶ OSTERHOUT, cité dans ²³, p. 188.
- ²⁷ H. V. RICKENBERG, G. N. COHEN, G. BUTTIN ET J. MONOD, *Ann. Inst. Pasteur*, 91 (1956) 829.
- ²⁸ C. MICHAËLIS ET E. S. HILL, *J. Gen. Physiol.*, 16 (1933) 859.
- ²⁹ S. YAMAGATA, *Acta Phytochim. (Japan)*, 11 (1939) 145.
- ³⁰ K. G. PAUL, en J. B. SUMNER ET K. MYRBACK, *The Enzymes*, Vol. II, Part I, Academic Press, Inc., New York, 1951, p. 378.
- ³¹ N. SUZUKI ET S. SUZUKI, *Science Repts. Tôhoku Univ., Fourth Ser.*, 20 (1954) 195.

Reçu le 23 septembre 1957

CRÉATINE, PHOSPHOCRÉATINE ET ADÉNOSINETRIPHOSPHATE DANS L'UTÉRUS DE RAT

INFLUENCE DE QUELQUES HORMONES ET DE LA CONGÉLATION SUR CES FRACTIONS

DANIÈLE GAUTHERON* ET G. V. R. BORN

Nuffield Institute, Oxford (England)

Dans de précédents travaux¹, il a été montré que des injections d'oestradiol et de progestérone provoquent chez le rat impubère une augmentation considérable des phosphates labiles de l'utérus, mesurés à la fois par la méthode de LOWRY ET LOPEZ² et après hydrolyse acide de l'extrait, à 100°, dans HCl N, pendant 7 minutes (phosphate 7 minutes). D'autre part, l'adrénaline, injectée 45-50 minutes avant décapitation de l'animal, diminue notablement la teneur de l'utérus en phosphates labiles chez le jeune rat pubère³. Les méthodes utilisées au cours de ces travaux ne

* Fellow of the British Council. Adresse actuelle: Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté des Sciences, 96, Bd. Raspail, Paris 6ème, France.