

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

II. NATURE DU SYSTÈME ENZYMATIQUE ET DU TRANSPORTEUR D'ÉLECTRONS INTERVENANT DANS LA RÉACTION

JACQUES C. SENEZ ET FRANCIS PICHINOTY

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

Dans le premier mémoire de cette série¹, on a établi que *Desulfovibrio desulfuricans* réduit stoechiométriquement l'hydroxylamine en ammoniac aux dépens de l'hydrogène moléculaire, par un processus lié à l'hydrogénase dont cet organisme est doué.

Les observations qui vont être rapportées précisent le mécanisme de la réaction et montrent que celle-ci consiste en un couplage non spécifique entre l'hydrogénase et l'hydroxylamine, par l'intermédiaire du cytochrome c_3 .

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les caractères des souches étudiées, ainsi que les techniques employées pour la culture des bactéries, leur extraction et la mesure de l'activité hydroxylamine-réductase ont été décrits dans le mémoire précédent¹.

On a utilisé deux échantillons différents de cytochrome c_3 , dont l'un nous a été aimablement donné par le Dr. J. R. POSTGATE et l'autre a été préparé suivant la méthode de cet auteur². Le cytochrome c a été extrait de coeur de boeuf et purifié par la technique classique de KEILIN ET HARTREE³.

Les concentrations en cytochromes et la pureté des échantillons utilisés ont été déterminées avec un spectrophotomètre Jobin et Yvon, d'après les coefficients millimolaires d'extinction correspondant aux maximum des bandes α , c'est à dire $\epsilon_{553}^{m\mu} = 54$ pour le cytochrome c_3 ², et $\epsilon_{550}^{m\mu} = 27.7$ pour le cytochrome c ⁴. Les résultats des dosages spectrophotométriques ont été exprimés en milli-micro-unités de cytochrome ($1 \text{ m}\mu\text{U} = 1 \text{ }\mu\text{mol.}$) ou en microgrammes, en considérant que les deux cytochromes ont un poids moléculaire² identique et égal à 13,000.

Le coenzyme I réduit (DPNH) (Pabst Laboratories) nous a été obligeamment procuré par le Dr. A. NASON. Le coenzyme I oxydé (DPN), et les flavines mononucléotide (FMN) et dinucléotide (FAD) sont des produits commerciaux (California Foundation). Le benzyl-viologène (BV) est un produit BDH et le bromure de cétyletri-ammonium (CeTAB) est le détergent commercialisé sous le nom de "Cetavlon".

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

I. Nature du transporteur d'électrons

1. *Inhibition des cellules par le CeTAB; réactivation par le cytochrome c_3 et par le benzyl-viologène.* POSTGATE² a récemment montré que *D. desulfuricans* possède un cytochrome particulier, le cytochrome c_3 , et que ce pigment joue un rôle fonctionnel, comme transporteur d'électrons, dans la réduction des composés minéraux soufrés.

Bibliographie p. 369.

Le même auteur a signalé, d'autre part, que le bromure de cétyle tri-ammonium (CeTAB) a la propriété de rendre les cellules de *D. desulfuricans* sélectivement perméables au cytochrome qu'elles contiennent. Les bactéries traitées par ce détergent conservent leur hydrogénase et continuent à réduire le bleu de méthylène sous atmosphère d'hydrogène. Elles sont par contre incapables de réduire le sulfite, mais retrouvent en partie leur activité à l'égard de ce substrat si on leur ajoute artificiellement une faible quantité de cytochrome c_3 purifié. Le benzyl-viologène a un effet analogue et restaure partiellement l'activité sulfite-réductase des cellules inhibées par le CeTAB.

Ces faits nous ont conduits à étudier l'action du CeTAB sur la réduction de l'hydroxylamine par les cellules et à rechercher si le cytochrome c_3 et le benzyl-viologène assurent dans cette réaction un rôle analogue à celui qu'ils jouent dans la réduction des composés du soufre.

Les expériences ont été réalisées dans les conditions suivantes: les bactéries (souche Gaz 54) ont été lavées à deux reprises, remises en suspension dans l'eau distillée, puis traitées par le CeTAB (0.1 mg/mg de bactéries, poids sec) pendant 1 h, à la température du laboratoire. Après centrifugation et lavage, l'activité des cellules traitées a été déterminée manométriquement sous atmosphère d'hydrogène, avec et sans addition de cytochrome c_3 (500 m μ U/mg de bactéries) ou de benzyl-viologène (100 μ g/mg de bactéries). L'agent réactivant a été systématiquement placé dans le compartiment central des fioles de Warburg, avec la suspension bactérienne, et le substrat (NH₂OH:9 μ mol.) dans le diverticule latéral. De cette façon, le benzyl-viologène est totalement réduit par l'hydrogénase des cellules avant que celles-ci ne soient mises en contact avec le substrat et la faible consommation d'H₂ correspondante (environ 0.1 μ mol.) n'intervient pas dans les mesures.

TABLEAU I

INHIBITION DES SUSPENSIONS BACTÉRIENNES PAR LE CeTAB; RÉACTIVATION PAR LE CYTOCHROME c_3 ET PAR LE BENZYL-VIOLOGÈNE

Suspension bactérienne	$-O_{H_2}$
Non traitée	124
Non traitée + B.V.	480
Traitée par le CeTAB	0
Traitée par le CeTAB + B.V.	240
Traitée par le CeTAB + cytochrome c_3	3,300

Conditions expérimentales: suspension bactérienne de la souche Gaz 54; tampon phosphatique pH 7.4; NH₂OH: 3.10⁻³ M; bromure de cétyle tri-ammonium (CeTAB): 0.1 mg/mg de cellules (poids sec); benzyl-viologène (B.V.): 0.1 mg par mg de cellules (poids sec); cytochrome c_3 : 0.5 μ U (6.5 mg) par mg de cellules et par cm³.

Les résultats obtenus (Tableau I) montrent que les bactéries traitées par le CeTAB sont totalement inactives en présence de l'hydroxylamine et que l'addition de cytochrome c_3 leur restitue une activité 26 fois supérieure à celle des bactéries-témoins, non traitées. Le benzyl-viologène a un effet "cytochrome-like" très net et remplace effectivement le système transporteur éliminé par le CeTAB. A la concentration employée (10⁻⁴ M), il confère aux cellules inhibées une activité sensiblement double de celle de la suspension initiale.

Bibliographie p. 369.

L'interprétation suivant laquelle le benzyl-viologène agit en remplaçant le transporteur naturel d'électrons, et non pas en supprimant une inhibition réversible du système enzymatique par le CeTAB, est confirmée par le fait que son addition accroît l'activité des cellules, même lorsque celles-ci n'ont pas été au préalable inhibées par le CeTAB. L'augmentation de $-QH_2$ relevée dans ce cas est de 287 %.

2. *Réactivation des extraits purifiés et dépourvus de cytochrome c_3* . L'addition de benzyl-viologène $10^{-4} M$ accroît dans les mêmes proportions, c'est à dire environ 4 fois, l'activité des extraits bruts, contenant du cytochrome c_3 . Une constatation semblable a été faite par ISHIMOTO, KOYAMA ET NAGAI⁵ avec l'activité thiosulfate-réductase des extraits de *D. desulfuricans*, qui est également accrue par le benzyl-viologène et par d'autres indicateurs d'oxydo-réduction.

Ces observations préliminaires ont été reprises avec des extraits purifiés et dépourvus de cytochrome c_3 par le traitement suivant: un extrait brut, obtenu par autolyse des bactéries séchées (souche Gaz 54) est progressivement additionné de SO_4Am_2 , à 0° et sous agitation continue, jusqu'à 70 % de la saturation en sulfate d'ammonium. Les protéines précipitées sont centrifugées ($26,000 \times g$; + 4°; 5 min) et redissoutes dans un faible volume d'eau distillée. Elles sont précipitées une seconde fois par SO_4Am_2 à la même concentration (0.7 sat.), centrifugées et reprises par l'eau distillée. La solution finale est débarrassée du sulfate d'ammonium par dialyse prolongée à 0° contre une solution diluée de KCl.

L'extrait ainsi purifié est dépourvu de cytochrome c_3 et contient la totalité de l'hydrogénase initiale, mais est totalement inactif à l'égard de l'hydroxylamine. L'activité à l'égard de ce substrat est restaurée par l'addition de quantités catalytiques de cytochrome c_3 ou de benzyl-viologène et dépend de la concentration de ces deux agents réactivants, suivant les modalités qui seront exposées avec la cinétique de la réaction.

Les flavine-nucléotides (FMN et FAD), ajoutés à la concentration $10^{-4} M$, n'ont aucun effet sur l'activité des extraits bruts ou purifiés. D'autre part, on a constaté que les préparations purifiées et réactivées conservent leur activité pendant plus d'un mois à -15° , ou encore après 6 jours de dialyse contre une solution très diluée de KCl; ou plusieurs heures contre une solution de pyrophosphate de soude $10^{-2} M$, à pH 8.0, conditions qui inactivent très rapidement l'hydroxylamine-réductase de *Neurospora crassa*⁶. Cette résistance est celle de l'hydrogénase elle-même, et contraste avec la sensibilité de l'enzyme isolé par ZUCKER ET NASON⁶.

Les résultats des expériences réalisées avec les cellules et les extraits purifiés conduisent à considérer que, chez *D. desulfuricans*, le système transporteur naturel assurant le couplage entre l'activité de l'hydrogénase et la réduction de l'hydroxylamine ne comporte qu'un seul constituant, le cytochrome c_3 . Ils démontrent, en outre, que ce transporteur naturel peut être efficacement remplacé par un système artificiel d'oxydo-réduction possédant un potentiel convenable, et notamment par le benzyl-viologène, dont le potentiel ($E'_0 = -0.359 V$) est intermédiaire entre celui du cytochrome c_3 ($-0.205 V$)² et celui de la réaction catalysée par l'hydrogénase ($-0.445 V$, à pH 7.0).

3. *Teneur en cytochrome c_3 dans les cellules et dans les extraits*. La teneur des cellules en cytochrome c_3 a été déterminée par les spectres d'absorption différentielle relevés entre une suspension bactérienne auto-oxydée (1 à 2 mg de cellules, poids sec, par ml) et la même suspension réduite par l'addition de quelques fragments de

$S_2O_4Na_2$ solide. Les mesures ont été effectuées dans des cuves de 1 cm, en interposant entre les cuves et la cellule photo-électrique un écran diffusant, suivant la technique que SHIBATA, BENSON ET CALVIN¹ ont préconisée pour la spectrophotométrie des suspensions cellulaires denses.

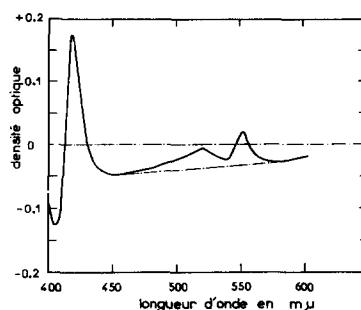


Fig. 1. Spectre différentiel d'une suspension de la souche Gaz 54 (1.05 mg de bactéries, poids sec, par ml), en tampon phosphate $M/15$ (pH 7.0). Densités optiques de la suspension réduite par l'hydrosulfite mesurées par rapport à celles de la suspension oxydée, prise comme référence.

Sur les spectres différentiels ainsi obtenus (Fig. 1), la ligne de base n'est pas rigoureusement rectiligne et ne se confond pas avec le zéro, mais présente une obliquité assez accusée. De ce fait, il est difficile de déterminer avec une précision suffisante la concentration en cytochrome d'après l'absorption différentielle correspondant au maximum de la bande α (552 $m\mu$). L'incertitude sur la position de la ligne de base a été éliminée en mesurant la teneur en cytochrome d'après la somme arithmétique des absorptions différentielles maxima pour les bandes γ de la forme oxydée (404 $m\mu$) et de la forme réduite (419 $m\mu$). Cette méthode assure une bonne reproductibilité des mesures et, dans ces conditions, le coefficient spécifique d'absorption, mesuré avec une série de solutions témoins de cytochrome c_3 purifié, est $\epsilon_{sp} = 25.2 \times mg^{-1} \times cm^{-1}$.

Les teneurs en cytochrome dans les cellules des deux souches Gaz 54 et El Agheila Z sont rapportées sur le Tableau II. En ce qui concerne El Agheila Z, la valeur trouvée est sensiblement double de celle que POSTGATE⁸ a relevée pour la même souche, en employant une technique de mesure différente. Quoi qu'il en soit, il est significatif que les cellules de cette souche, dont l'activité hydrogénasique est très faible ($-Q_{H_2} = 200$) et qui est trois fois moins active à l'égard de NH_2OH que la souche Gaz 54, contiennent également trois fois moins de cytochrome c_3 .

Dans les extraits bruts provenant de l'autolyse des bactéries séchées, on ne retrouve que 3 à 4 % seulement du cytochrome c_3 contenu par les cellules extraites.

TABLEAU II
TENEUR DES CELLULES EN CYTOCHROME c_3

Souche	Densité bactérienne de la suspension (mg/ml)	Absorptions différentielles		Teneur en cytochrome c_3	
		As γ_{ox} (405 $m\mu$)	As γ_{red} (419 $m\mu$)	$\mu g/mg$	$m\mu U/mg$
Gaz 54	2.10	0.270	0.380	12.2	0.94
Id ⁹	1.05	0.126	0.176	11.4	0.88
El Agheila Z	1.88	0.053	0.126	3.8	0.29

Conditions expérimentales: Bactéries cultivées en milieu usuel, lavées à deux reprises et mises en suspension dans du tampon phosphatique $M/15$, à pH 7.9. Densités bactériennes exprimées en mg de cellules (poids sec) par ml. Spectres différentiels relevés entre deux cuves de 1 cm, dans l'une desquelles le cytochrome est réduit par une faible quantité de $S_2O_4Na_2$ solide.

Bibliographie p. 369.

Comme on l'a déjà indiqué, la totalité du cytochrome présent dans ces extraits bruts se retrouve dans les surnageants de la précipitation par le sulfate d'ammonium et les extraits purifiés en sont complètement dépourvus.

4. *Action du benzyl-viologène sur la réduction de l'hydroxylamine par les cellules d'autres espèces bactériennes possédant une hydrogénase.* Ces expériences ont été réalisées avec les organismes suivants, dont les souches nous ont été aimablement communiquées par le Dr. A. R. PRÉVOT et par le Dr. J. MONOD, de l'Institut Pasteur: *Proteus vulgaris* (244), *Aerobacter aerogenes* (L III-I), *Escherichia coli* (ML 321) et *Welchia perfringens* (*Clostridium welchii*) (I.P.).

P. vulgaris a été cultivé sur le milieu et dans les conditions employées par KRASNA ET RITTENBERG⁹ pour l'étude de la nitrataase de ce germe. Les autres bactéries ont été cultivées en bouillon glucosé ordinaire. L'activité des suspensions non proliférantes à l'égard de NH_2OH a été déterminée sous atmosphère d'hydrogène, avec et sans addition de benzyl-viologène ($10^{-4} M$).

En l'absence de benzyl-viologène (Tableau III), aucun des quatre organismes étudiés n'est complètement inactif à l'égard de l'hydroxylamine, bien que, pour certains d'entre eux et en particulier pour *A. aerogenes*, l'activité soit, dans ces conditions, extrêmement faible ($-Q_{\text{H}_2} = 5$). D'autre part, l'effet du benzyl-viologène est très variable d'une bactérie à l'autre. Il est nul avec *P. vulgaris* et plus ou moins marqué avec les autres espèces. Dans le cas d'*A. aerogenes*, la réduction de l'hydroxylamine est 14 fois plus rapide en présence de benzyl-viologène et la vitesse de cette réaction devient égale à celle de l'activité hydrogénasique elle-même.

TABLEAU III

INFLUENCE DU BENZYL-VIOLOGÈNE SUR LA RÉDUCTION DE L'HYDROXYLAMINE PAR LES SUSPENSIONS DE DIVERSES BACTÉRIES POSSÉDANT UNE HYDROGÉNASE

Organisme	Activité hydrogénasique* ($-Q_{\text{H}_2}$)	Activité hydroxylamine-réductase** ($-Q_{\text{H}_2}$)	
		sans addition	+ BV (0.2 $\mu\text{mol.}$ manomètre)
<i>Proteus vulgaris</i> 244	143	34.6	34.6
<i>Aerobacter aerogenes</i> L III-I	80	5.3	71
<i>Escherichia coli</i> ML 321	—	10.8	47
<i>Welchia perfringens</i> IP	510	31	60

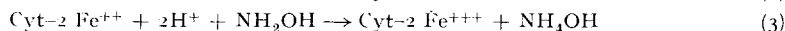
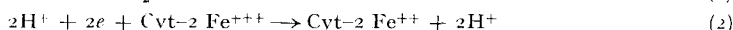
Expériences réalisées avec des suspensions non-proliférantes, dans les conditions habituelles: tampon phosphatique $M/15$, pH 7.4, t : 37°, atmosphère d' H_2 .

* Activité hydrogénasique mesurée dans des systèmes ne contenant pas de NH_2OH et où l'accepteur d'hydrogène est constitué par 20 $\mu\text{mol.}$ de benzyl-viologène (BV).

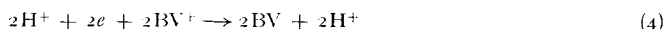
** Activité hydroxylamine-réductase mesuré dans des systèmes contenant 10 $\mu\text{mol.}$ de $\text{NH}_2\text{OH} \pm 0.2 \mu\text{mol.}$ de BV.

II. Nature du système enzymatique réalisant la réduction de l'hydroxylamine aux dépens de l'hydrogène moléculaire

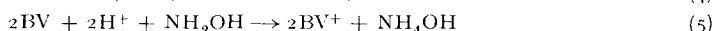
En tenant compte du fait que le cytochrome c_3 est une hémoprotéine bifonctionnelle², contenant deux groupements hème par molécule, le couplage assuré par ce transporteur naturel entre l'hydrogénase et l'hydroxylamine peut être représenté schématiquement de la manière suivante:



La réduction du benzyl-viologène correspond à la fixation d'un seul électron par molécule d'indicateur¹⁰ et, dans le cas des systèmes catalysés par ce transporteur artificiel, les réactions (2) et (3) sont remplacées par :



et

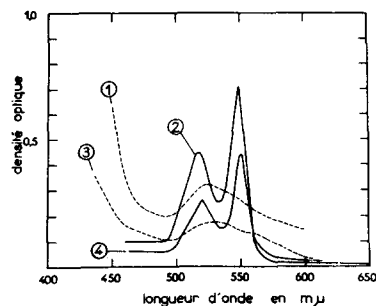


Il convient de se demander si les réactions (3) et (5) sont catalysées par un enzyme spécifique, c'est à dire par une hydroxylamine-réductase, ou si elles sont de nature purement chimique. Pour élucider ce point, la vitesse de réoxydation par l'hydroxylamine du ferro-cytochrome c_3 et du benzyl-viologène réduit (BVH) a été étudiée comparativement en présence et en l'absence de l'extrait bactérien. En ce qui concerne le cytochrome, ces expériences ont été réalisées en tubes de Thunberg et à pH 7.4, dans des systèmes contenant 0.5 ml d'extrait bactérien et 7.5 m μ U de cytochrome c_3 par ml. Les tubes sont remplis d'hydrogène et l'examen spectroscopique montre l'apparition presque immédiate de la bande α du ferro-cytochrome (552 m μ), réduit par l'hydrogénase. L'hydrogène est alors évacué, afin d'arrêter l'activité hydrogénasique du système. Une autre série de tubes de Thunberg est préparée, dans laquelle l'extrait est omis et le cytochrome est réduit chimiquement, sous vide, par une faible quantité (0.2 μ mol.) d'hydrosulfite de soude. Dans les deux séries de tubes, le renversement d'un diverticule latéral contenant 20 μ mol. de NH_2OH détermine presque instantanément, la disparition complète de la bande α du ferro-cytochrome.

Si on modifie les conditions expérimentales en n'évacuant par l'hydrogène, c'est à dire en introduisant l'hydroxylamine dans des systèmes où l'hydrogénase continue à exercer son activité, la disparition de la bande α est néanmoins instantanée et permanente, ce qui montre que, dans les systèmes complets et en état d'équilibre dynamique, la quasi-totalité du cytochrome se trouve sous forme oxydée.

Ces expériences ont été reprises spectrophotométriquement en mesurant à 552 m μ , avant et après addition de 20 μ mol. de NH_2OH , la densité optique d'une solution de cytochrome c_3 préalablement réduite par $\text{S}_2\text{O}_4\text{Na}_2$. On a constaté que la réoxydation chimique du ferro-cytochrome est complète (Fig. 2), et trop rapide pour que sa vitesse puisse être mesurée, du moins avec les concentrations en cytochrome dont on peut actuellement disposer.

Fig. 2. Réoxydation chimique du ferro-cytochrome c et du ferro-cytochrome c_3 par l'hydroxylamine. (1) solution de cytochrome c oxydé (325 $\mu\text{g/ml}$), (2) la même solution réduite par l'hydrosulfite, (3) solution de cytochrome c_3 (100 $\mu\text{g/ml}$), auto-oxydée, (4) la même solution réduite par l'hydrosulfite. Les spectres relevés sur les cuves 2 et 4 après introduction de 0.1 mmol. de NH_2OH se confondent exactement avec ceux des cuves témoins correspondantes (1 et 3).



Dans le cas du benzyl-viologène, par contre, la vitesse de réoxydation du transporteur réduit, bien qu'elle soit encore très grande, a néanmoins pu être estimée de *Bibliographie p. 369.*

façon plus précise à l'aide de deux séries de tubes de Thunberg analogues à ceux qui ont été employés pour le cytochrome, mais où ce dernier était remplacé par 10 μmol . de benzyl-viologène et où la quantité de NH_2OH introduite dans les diverticules latéraux était portée à 60 μmol . Les concentrations finales en BVH et en NH_2OH étaient respectivement $3.3 \cdot 10^{-3} M$ et $20 \cdot 10^{-3} M$. La réoxydation du BVH par l'hydroxylamine est complète et aussi rapide en l'absence qu'en présence de l'extrait. A 37° et dans les conditions décrites, sa vitesse moyenne est de l'ordre de 210 $\mu\text{mol./h}$. Les analyses chimiques effectuées en fin d'expériences montrent que la réoxydation des 10 μmol . de BVH correspond à la réduction en ammoniacque d'une quantité équivalente d'hydroxylamine (5 μmol .).

Dans une série d'expériences complémentaires, on a constaté que les extraits de *D. desulfuricans* n'oxydent pas le DPNH en présence d'hydroxylamine dans les conditions employées par ZUCKER ET NASON⁶ et ne contiennent donc pas l'enzyme que ces auteurs ont extrait de *N. crassa*. D'autre part, les extraits ne réduisent pas le DPN sous atmosphère d'hydrogène et ne réoxydent pas le DPNH en présence de ferri-cytochrome c_3 . Ces résultats négatifs démontrent l'absence d'enzymes transférant sur le coenzyme I l'hydrogène activé par l'hydrogénase, ou jouant pour le cytochrome c_3 une fonction analogue à celle de la DPN-cytochrome c réductase de MAHLER *et al.*¹¹.

Le fait que l'hydroxylamine réoxyde le ferro-cytochrome c_3 et le BVH aussi rapidement en l'absence qu'en présence d'extrait élimine l'hypothèse suivant laquelle ces réactions seraient catalysées par une hydroxylamine-réductase spécifique. En définitive, les extraits de *D. desulfuricans* réduisent NH_2OH aux dépens de l'hydrogène moléculaire suivant un mécanisme dont le seul facteur enzymatique est l'hydrogénase. Le cytochrome c_3 et le benzyl-viologène réduits par l'hydrogénase fonctionnent comme des transporteurs non-spécifiques et sont chimiquement réoxydés par l'accepteur final, c'est à dire par l'hydroxylamine qui est réduite en ammoniacque.

Il était intéressant de vérifier si ce mode de réoxydation chimique par l'hydroxylamine est particulier au cytochrome c_3 , ou s'il s'observe également avec d'autres types de cytochromes. On a préparé dans ce but un échantillon de cytochrome c extrait et purifié à partir du coeur de boeuf par la technique de KEILIN ET HARTREE³. Les résultats obtenus montrent que le ferro-cytochrome c réduit par l'hydrosulfite est complètement réoxydé par l'hydroxylamine (Fig. 2). Cependant, sa réoxydation, mesurée spectrophotométriquement à 548 $m\mu$, n'est pas instantanée comme celle du cytochrome c_3 . Dans le système considéré, contenant 75 $m\mu\text{U}$ de ferro-cytochrome c et

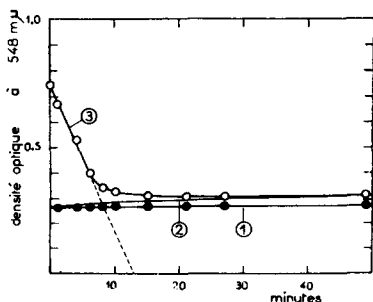


Fig. 3. Vitesse de la réoxydation chimique du ferro-cytochrome c par l'hydroxylamine. Mesures spectrophotométriques effectuées dans des cuves de 1 cm, à 548 $m\mu$ et à la température du laboratoire. Solution de cytochrome c (370 $\mu\text{g/ml}$ en tampon phosphate $M/15$, pH 7.4. (1) Cuve témoin contenant le cytochrome oxydé; (2) cuve témoin contenant le cytochrome oxydé et 100 μmol . de NH_2OH ; (3) cuve contenant le cytochrome réduit par l'hydrosulfite et dans laquelle on a introduit, au temps zéro, 100 μmol . de NH_2OH .

100 μmol . de NH_2OH , la vitesse de réoxydation (Fig. 3) est seulement de 0.75 $\mu\text{mol./h}$. Cette différence de comportement entre les deux cytochromes est très vraisemblable-

ment liée à la différence de leurs potentiels d'oxydo-réduction dont les E'_0 , à pH 7.0, sont respectivement de 0.254 V pour le cytochrome c_{12} et -0.205 V pour le cytochrome c_3 ².

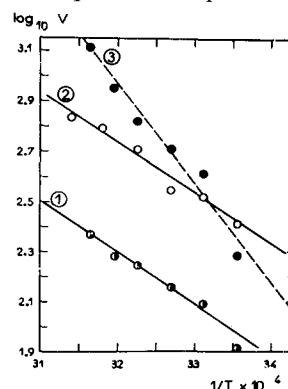
III. Cinétique de la réduction de l'hydroxylamine par les extraits

1. *Influence de la température et énergie d'activation.* L'influence de la température sur l'activité a été déterminée avec les cellules entières et les extraits de Gaz 54, entre +21° et +50° à intervalles de 5°.

Sur les graphiques représentant le logarithme de l'activité ($\log_{10} - Q_{H_2}$) en fonction de l'inverse de la température absolue ($1/T$), les points expérimentaux se placent sensiblement sur des droites (Fig. 4), et les systèmes étudiés suivent la loi d'Arrhénius avec une bonne approximation. A partir des droites les plus probables, tracées par la méthode des moindres carrés, les incréments critiques de température (μ) ont été calculés suivant la relation classique:

$$d(\log_{10} - Q_{H_2})/d\left(\frac{1}{T}\right) = -0,219 \mu.$$

Fig. 4. Détermination graphique de l'incrément critique de température (μ). En abscisses sont portés les inverses de la température absolue ($1/T$) et en ordonnées les logarithmes de $-Q_{H_2}$. (1) extrait purifié et réactivé par le benzyl-viologène ($3.3 \cdot 10^{-5} M$), en présence de NH_2OH ($3.3 \cdot 10^{-3} M$), (2) extrait brut en présence de NH_2OH $3.3 \cdot 10^{-3} M$, (3) activité hydrogénasique d'un extrait brut, mesurée en l'absence de NH_2OH , dans des systèmes contenant 100 $\mu mol.$ de benzyl-viologène.



Avec les suspensions de bactéries entières et les extraits bruts, c'est à dire dans les conditions où le transporteur d'hydrogène est le cytochrome c_3 , les valeurs de (μ) relevées sont respectivement 8,500 et 9,000 calories (Tableau IV). On obtient sensiblement la même valeur (9,700 calories) pour les systèmes réalisés avec des extraits purifiés et dans lesquels le transport de l'hydrogène est assuré artificiellement par une quantité catalytique de benzyl-viologène (0.1 $\mu mol./manomètre$). Cette identité des

TABLEAU IV
INFLUENCE DE LA TEMPÉRATURE

Systèmes	Q_{10}	Incrément critique de température (μ) (calories)	Erreur-type d'estimation (σ_{xH})
1. Bactéries entières + NH_2OH	1.47	8,568	± 40.6
2. Extrait brut + NH_2OH	1.62	9,249	± 38.8
3. Extrait purifié + NH_2OH + BV	1.62	9,721	± 92.8
4. Extrait purifié + BV	2.55	17,360	± 27.6

Expériences effectuées avec des suspensions et des extraits de la souche Gaz 54; Q_{10} relevés entre +33° C et +43° C, à pH 7.4 (tampon phosphatique). Systèmes (2): extrait brut contenant du cytochrome c_3 ; (3): extrait dépourvu de cytochrome et réactivé par l'addition d'une quantité catalytique (0.1 $\mu mol./manomètre$) de benzyl-viologène (BV); (4): activité hydrogénasique mesurée en l'absence d'hydroxylamine et en présence de benzyl-viologène (105 $\mu mol./manomètre$).

Bibliographie p. 369.

incréments thermiques paraît indiquer que, dans les deux types de systèmes, l'activité est limitée par la même réaction. La réaction limitante n'est manifestement pas celle qui est catalysée par l'hydrogénase. En effet, dans les systèmes ne contenant pas l'hydroxylamine et où on mesure l'activité hydrogénasique en présence de benzyl-viologène ($3.5 \cdot 10^{-2} M$) comme seul accepteur, on relève une valeur de (μ) très différente et sensiblement double des précédentes (17,000 calories). Il est vraisemblable que l'activité à l'égard de NH_2OH soit régie, quelque soit la nature du transporteur, par l'étape purement chimique du mécanisme déjà analysé. Cette interprétation concorde avec le fait que les valeurs de (μ) relevées pour ces systèmes sont remarquablement faibles par rapport à celle de l'hydrogénase et par rapport à celles qui caractérisent, d'une manière générale, les réactions enzymatiques¹³.

2. *Influence de la concentration en extrait.* La vitesse de consommation de l'hydrogène en présence de NH_2OH ($3.3 \cdot 10^{-3} M$) est proportionnelle à la concentration d'extrait brut contenant du cytochrome. Cette proportionnalité est très sensiblement linéaire dans toute la gamme des concentrations étudiées (Fig. 5).

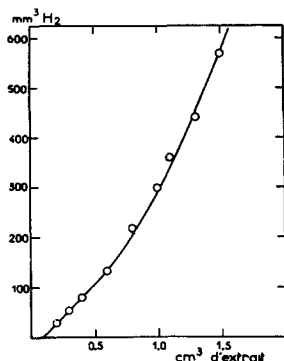


Fig. 5. Activité (mm^3 d' H_2 consommés par heure et par manomètre) de systèmes contenant des quantités croissantes d'extrait brut et une concentration fixe en NH_2OH ($3.3 \cdot 10^{-3} M$).

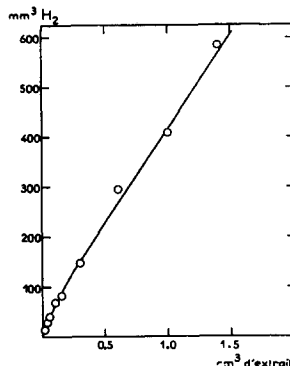


Fig. 6. Activité de systèmes contenant des quantités croissantes d'extrait purifié et des concentrations fixes de benzyl-viologène ($2.2 \cdot 10^{-5} M$) et de NH_2OH ($3.3 \cdot 10^{-3} M$).

Ainsi qu'on l'a déjà indiqué, les extraits purifiés par le sulfate d'ammonium sont totalement inactifs. Si on les réactive par addition de cytochrome c_3 ($1.3 \cdot 10^{-6} M$) ou de benzyl-viologène ($2.2 \cdot 10^{-5} M$), leur activité est directement proportionnelle à la quantité d'extrait contenue dans les systèmes (Fig. 6).

3. *Influence de la concentration en hydroxylamine.* Si on maintient constante la quantité d'extrait et si on fait varier la concentration de NH_2OH entre la limite inférieure que permet la sensibilité des mesures manométriques (environ $1 \mu mol./$ manomètre) et la valeur pour laquelle débute l'inhibition ($2 \cdot 10^{-2} M$), on constate que, dans le cas des extraits bruts, l'activité demeure constante (Fig. 7).

Ce comportement n'est pas dû à la saturation de l'hydrogénase mais à celle du transporteur d'hydrogène, c'est à dire du cytochrome c_3 dont on a vu que la teneur dans les extraits bruts est relativement très faible. En effet, l'activité de la même quantité d'extrait brut, dans des systèmes où la teneur en transporteur est artificiellement complétée par l'addition de benzyl-viologène $4.4 \cdot 10^{-5} M$, croît avec la concentration de l'hydroxylamine en tendant asymptotiquement vers une vitesse limite

(Fig. 7). La concentration en hydroxylamine qui assure la moitié de la vitesse limite est indépendante de la quantité d'extrait et la valeur numérique moyenne de cette constante, établie par la méthode graphique de LINEWEAVER ET BURK¹⁴ sur une série de plusieurs expériences (Fig. 8), est: $k_s = 4.3 \cdot 10^{-3} M$.

4. *Influence de la concentration en transporteur.* Dans les systèmes contenant une concentration fixe en extrait purifié et en substrat (NH_2OH $3.3 \cdot 10^{-3} M$) et des concentrations croissantes en benzyl-viologène, l'activité tend également vers une limite (Fig. 9) qui exprime la saturation des systèmes par le transporteur artificiel. La constante correspondante, déterminée par le procédé de LINEWEAVER ET BURK¹⁴ à partir de deux expériences différentes (Fig. 10), est: $k_t = 2.9 \cdot 10^{-5} M$ ($\pm 7\%$).

Les constantes k_s et k_t définissent la cinétique des systèmes catalysés par le benzyl-viologène indépendamment de leur concentration en extrait. Elles présentent donc une certaine analogie avec des constantes de Michaelis, mais on ne peut cependant

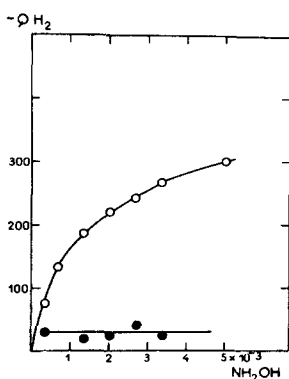


Fig. 7. Activité en fonction de la concentration en substrat. Systèmes contenant une quantité fixe d'extrait. Courbe (—●—●—): extrait brut, non-activé; courbe (—○—○—): extrait brut activé par une concentration uniforme de benzyl-viogène ($4.4 \cdot 10^{-5} M$).

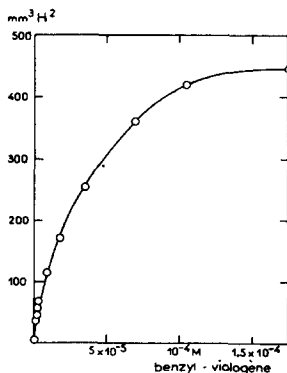


Fig. 9. Activité en fonction de la concentration en benzyl-viogène. Systèmes contenant des quantités fixes d'extrait purifié et de substrat (NH_2OH $5.3 \cdot 10^{-3} M$).

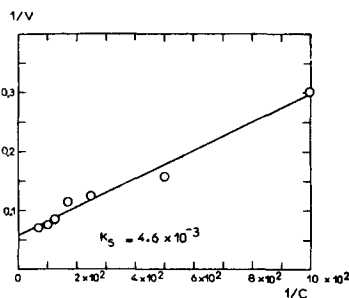


Fig. 8. Détermination graphique de k_s . En abscisses sont portés les inverses de la concentration moléculaire de NH_2OH , et en ordonnées les inverses de $-Q_{H_2}$ ($1/v$). Droite tracée par la méthode des moindres carrés.

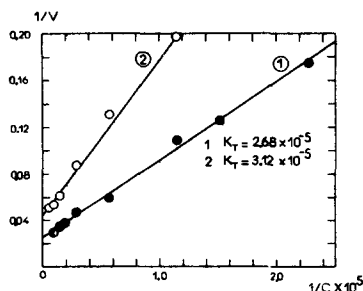


Fig. 10. Détermination graphique de k_t . En abscisses sont portés les inverses de la concentration moléculaire du benzyl-viogène et en ordonnées les inverses de $-Q_{H_2}$ ($1/v$). Les droites (1) et (2) correspondent à deux séries de systèmes contenant chacune une quantité différente d'extrait purifié. Droites tracées par la méthode des moindres carrés.

pas leur attribuer la même signification. On doit se borner à considérer qu'elles expriment l'influence respective de la concentration en substrat et de la concentration en transporteur sur l'activité de systèmes complexes où s'établit un équilibre dynamique entre la vitesse de la réduction du transporteur par l'hydrogénase et celle de sa réoxydation chimique par l'hydroxylamine. D'autre part, il convient de souligner que les valeurs numériques de k_s et de k_t qui ont été déterminées ne s'appliquent pas à un système quelconque, mais seulement aux systèmes où elles ont été établies. Il est évident, en effet, que la valeur numérique de k_s croît proportionnellement à la concentration en transporteur et qu'une relation analogue existe entre k_t et la concentration en substrat.

Il aurait été intéressant de déterminer comparativement k_s dans des systèmes réactivés par le cytochrome c_3 , mais on a constaté que l'activité des extraits purifiés demeure directement proportionnelle à la concentration en cytochrome (Fig. 11), lorsque celle-ci est comprise entre $9 \cdot 10^{-7}$ et $6 \cdot 10^{-6}$ M, (11.7 à 78 $\mu\text{g/ml}$). Pour saturer les systèmes en cytochrome, il serait nécessaire d'employer des concentrations beaucoup plus élevées que ne le permettent les quantités de cytochrome actuellement disponibles.

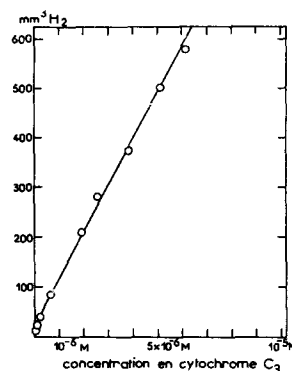


Fig. 11. Influence du cytochrome c_3 sur l'activité d'un extrait purifié. En abscisses sont portées les concentrations moléculaires du cytochrome c_3 et en ordonnées les activités exprimées en mm^3 d' H_2 consommés par heure et par système. Extrait purifié: 0.3 ml par manomètre; NH_2OH $3.3 \cdot 10^{-3}$ M.

5. *Efficacité relative du cytochrome c_3 et du benzyl-viologène comme transporteurs d'hydrogène.* Cette comparaison a été faite en mesurant l'activité de systèmes manométriques contenant un volume fixe d'un même extrait purifié et une quantité constante de NH_2OH (10 $\mu\text{mol.}$), en présence de 50 μg (0.131 $\mu\text{mol.}$) de benzyl-viologène ou de 50 μg (3.84 m μU) de cytochrome c_3 . Dans ces conditions, les vitesses de réaction, exprimées en molécules d'hydrogène transportées par minute et par molécule de transporteur, sont de 33.4 pour le cytochrome et 1.9 seulement pour le benzyl-viologène.

Ces vitesses sont évidemment très inférieures aux turnover maxima, c'est à dire aux vitesses qui seraient obtenues dans des systèmes théoriques où le transporteur serait saturé par des concentrations infinies en hydrogénase et en substrat, mais leur rapport (17.6:1) exprime cependant l'efficacité relative du cytochrome c_3 et du benzyl-viologène dans des conditions comparables.

DISCUSSION

Le fait que les indicateurs colorés d'oxydo-réduction peuvent réduire chimiquement certaines formes de l'azote minéral a été signalé, dès 1937, par AUBEL *et al.*¹⁵, qui ont

constaté la recoloration rapide du leuco-bleu de méthylène par le nitrite, en l'absence de tout agent enzymatique. Par la suite, LASCELLES ET STILL¹⁶ ont étudié une souche d'*E. coli* dont les cellules ne réduisent pas le nitrate, sous atmosphère d'hydrogène, au delà du stade nitrite. Ces auteurs ont observé que, si on ajoute du benzyl-viologène dans les systèmes, les cellules de cette souche acquièrent la propriété de réduire le nitrite et l'hydroxylamine en ammoniacque. Une des hypothèses avancées pour expliquer ce phénomène était que le benzyl-viologène catalyse une réduction non enzymatique des substrats azotés, mais les expériences réalisées ne permettaient pas de préciser si les particularités de la souche étudiée étaient dues à l'absence de "réductases" spécifiques, à l'absence d'un transporteur d'hydrogène convenable, ou encore à ces deux facteurs simultanément.

Nos observations confirment que le benzyl-viologène réduit par l'hydrogénase est réoxydé chimiquement par NH_2OH . Elles montrent, d'autre part, que certains transporteurs naturels réalisent physiologiquement un couplage chimique entre l'hydrogénase et l'hydroxylamine. Chez *D. desulfuricans*, le cytochrome c_3 joue ce rôle fonctionnel et assure la réduction de l'hydroxylamine aux dépens de l'hydrogène moléculaire par un mécanisme relativement simple, ne comportant pas d'"hydroxylamine-réductase" spécifique et dont le seul facteur enzymatique est l'hydrogénase. Dans ce système, NH_2OH a un rôle comparable à celui de l'oxygène qui, ainsi que l'a montré POSTGATE², réoxyde chimiquement le cytochrome c_3 et assure, chez ces bactéries anaérobies, la possibilité d'un couplage entre H_2 et O_2 .

On peut s'attendre *a priori* à ce que ce mode de réduction de l'hydroxylamine ne soit pas particulier aux bactéries sulfato-réductrices mais soit réalisé par tout organisme possédant une hydrogénase, à la condition que soit présent un transporteur naturel ou artificiel convenablement choisi. Corrélativement, il est vraisemblable que, parmi les bactéries hydrogénasiques, celles qui sont incapables de réduire NH_2OH aux dépens de l'hydrogène moléculaire doivent ce caractère à l'absence d'un transporteur naturel ayant le potentiel d'oxydo-réduction requis, et non pas à l'absence d'une hydroxylamine-réductase. Les résultats des expériences réalisées avec d'autres espèces bactériennes aérobies ou anaérobies, et notamment l'activation considérable des suspensions d'*A. aerogenes* par le benzyl-viologène, sont en faveur de cette interprétation, mais elles ne sont cependant pas concluantes, du fait qu'en l'absence de benzyl-viologène aucun des organismes étudiés n'est absolument inactif à l'égard de l'hydroxylamine.

Il convient de souligner que les hydroxylamine-réductases individualisées au cours de ces dernières années ont été exclusivement mises en évidence dans des cellules et des extraits qui réduisent NH_2OH aux dépens d'un donateur organique d'hydrogène, par un processus couplé avec les pyridine-nucléotides et les déshydrogénases. La réductase extraite de *Bacillus pumilis* par TANIGUCHI *et al.*¹⁷ est ainsi couplée avec la formico-déshydrogénase. Les préparations obtenues à partir de *Bacillus subtilis* par KLAUSMEIER ET BARD¹⁸ contiennent une alcool-déshydrogénase et catalysent la réduction de l'hydroxylamine en ammoniacque aux dépens du 2,3-butane-diol, du glucose-6-phosphate ou du DPNH. ZUCKER ET NASON⁶ ont étudié de façon très complète le couplage entre les pyridine-nucléotides et l'hydroxylamine par la réductase de *N. crassa*. Pour cet enzyme, le DPNH est un donateur d'hydrogène deux fois plus efficace que le TPNH et l'activité est fortement accrue par le FAD, mais n'est pas modifiée par le FMN. Il est, d'autre part, vraisemblable que l'activité est liée à la présence d'un métal, mais celui-ci, à la différence de ce qui a été établi pour

la nitratase et pour la nitrite-réductase du même organisme, n'est pas le molybdène. La nature enzymatique de la réaction a été démontrée par le fait que le DPNH n'est pas réoxydé par NH_2OH en l'absence de l'extrait, même lorsque les systèmes sont complétés par l'addition de FAD.

Les tentatives que nous avons faites afin de déceler chez *D. desulfuricans* un couplage analogue entre les pyridine-nucléotides et la réduction de l'hydroxylamine ont été entièrement négatives. Les extraits ne réoxydent pas le DPNH en présence de NH_2OH , ne réduisent pas les pyridine-nucléotides à partir de l'hydrogène moléculaire et ne contiennent pas de DPNH-cytochrome c_3 réductase. Enfin, on a vérifié qu'en l'absence d'extrait, le FAD réduit chimiquement n'est pas réoxydé par l'hydroxylamine.

Il est remarquable que, malgré ces différences, la cinétique de la réduction de NH_2OH soit pratiquement identique dans le cas de *D. desulfuricans* et dans celui de *N. crassa*. ZUCKER ET NASON²³ ont déterminé les constantes de Michaelis de leur hydroxylamine-réductase pour le substrat d'une part et pour le DPNH de l'autre. Les valeurs qu'ils ont trouvées sont respectivement $K_m = 3.8 \cdot 10^{-3} M$ et $K_m = 7 \cdot 10^{-5} M$, c'est à dire remarquablement proches de celles que nous avons nous mêmes obtenues pour les constantes k_s ($4.3 \cdot 10^{-3} M$) et k_t ($2.9 \cdot 10^{-5} M$) des systèmes activés par le benzyl-viologène.

En ce qui concerne le rôle fonctionnel du cytochrome c_3 comme transporteur d'électrons au cours de la réduction de NH_2OH , nos résultats confirment et complètent l'observation d'ISHIMOTO ET KOYAMA¹⁹ qui ont incidemment signalé la réoxydation de ce cytochrome par l'hydroxylamine. Ils étendent, d'autre part, aux composés minéraux de l'azote une fonction physiologique dont POSTGATE² a déjà montré qu'elle intervient dans la réduction des composés minéraux du soufre par le même organisme. A ce sujet, il est d'ailleurs possible que certains intermédiaires de la réduction du sulfate en sulfure soient directement réduits par l'hydrogénase et le ferro-cytochrome c_3 , sans intervention d'une réductase et par un processus identique à celui que nous avons observé pour l'hydroxylamine.

Plusieurs auteurs ont observé des faits tendant à démontrer que les cytochromes participent au transport des électrons dans la réduction du nitrate et de ses intermédiaires par d'autres bactéries. SATO ET EGAMI²⁰ ont mis en évidence chez *E. coli* un cytochrome b qui est réoxydé par le nitrate ou par le nitrite et qu'ils ont d'abord identifié avec une réductase. Par la suite, SATO ET NIWA²¹ ont modifié cette première interprétation et considéré que le cytochrome fonctionne comme transporteur d'hydrogène intermédiaire entre les déshydrogénases et une réductase spécifique. VERNON²² a extrait de *Micrococcus denitrificans* et de différents *Pseudomonas* un cytochrome b_1 qui est réoxydé par le nitrate. VERHOEVEN ET TAKEDA²³ ont préparé à partir de *Ps. aeruginosa* un cytochrome c qui est réoxydé par N_2O , NO_2K et NH_2OH . Dans le cas de ce dernier organisme, le cytochrome couple la réduction des composés minéraux de l'azote avec les déshydrogénases à pyridine-nucléotides, et les extraits actifs contiennent, en dehors du cytochrome et d'une DPNH-cytochrome réductase, une cytochrome-oxydase, qui catalyse la réoxydation du cytochrome par l'oxygène et qui est spécifiquement inhibée par le cyanure. Il s'agit, par conséquent, d'un système différent du nôtre, où intervient un cytochrome auto-oxydable², qui ne relie pas la réduction de l'hydroxylamine aux déshydrogénases mais uniquement à l'hydrogénase. Les publications des auteurs précédents ne contiennent d'ailleurs qu'un

petit nombre de faits expérimentaux concernant le cas particulier de la réoxydation des ferro-cytochromes par l'hydroxylamine et ne permettent pas de déterminer de façon certaine si ces réactions sont catalysées par des enzymes spécifiques ou si elles sont de nature purement chimique.

Il résulte de nos expériences qu'aussi bien le ferro-cytochrome *c* que le ferro-cytochrome *c*₃ sont réoxydés par NH₂OH suivant un processus non-enzymatique qui paraît ainsi être une propriété générale des cytochromes et même des hémoprotéines. En effet, COLTER ET QUASTEL²⁴ ont constaté, au cours de leur importante étude sur la conversion catalytique de NH₂OH en N₂ et NH₃ par l'hémoglobine, que la première étape de la réaction consiste dans la réduction de l'hydroxylamine en ammoniacque et, simultanément l'oxydation du fer ferreux de l'hémoglobine, avec formation de méthémoglobine.

On peut se demander dans quelle mesure la réoxydation chimique des ferro-cytochromes explique à elle seule le mécanisme de la réduction de l'hydroxylamine par les microorganismes. Dans le cas du cytochrome *c*₃ et des bactéries sulfato-réductrices il semble bien qu'il en soit ainsi, étant donnée la grande vitesse de la réaction. Par contre, la réoxydation du ferro-cytochrome *c* est beaucoup plus lente et il est possible que, chez les organismes possédant des cytochromes du type habituel, dont les potentiels sont relativement élevés, ceux-ci ne peuvent assurer la réduction de NH₂OH à une vitesse physiologiquement significative que si la réaction est catalysée par une cytochrome-oxydase spécifique. Pour élucider ce point, il faudrait que la vitesse de réoxydation des ferro-cytochromes ait été mesurée comparativement en présence et en l'absence des cellules ou des extraits. De telles mesures n'ayant pas été faites, il est possible que la réoxydation des cytochromes *b* et *c* par l'hydroxylamine soit un phénomène incident, sans signification physiologique.

REMERCIEMENTS

Les auteurs tiennent à remercier le Dr. J. R. POSTGATE pour les précieux échanges de vues qu'ils ont eus avec lui au cours de ce travail.

RÉSUMÉ

1. Les extraits de *Desulfovibrio desulfuricans* réduisent l'hydroxylamine aux dépens de l'hydrogène moléculaire par un processus non-spécifique et dont le seul facteur enzymatique est l'hydrogénase. Le mécanisme de la réaction consiste dans la réduction par l'hydrogénase d'un transporteur naturel d'électrons, le cytochrome *c*₃, lequel est chimiquement réoxydé par NH₂OH, sans intervention d'une réductase spécifique.

2. Le benzyl-viologène peut remplacer le cytochrome *c*₃ et assurer le couplage chimique entre l'hydrogénase et l'hydroxylamine. L'efficacité de ce transporteur artificiel d'hydrogène est cependant inférieure à celle du cytochrome *c*₃.

3. Le ferro-cytochrome *c* du coeur de boeuf est, comme le cytochrome *c*₃, réoxydé chimiquement par l'hydroxylamine, mais la vitesse de sa réoxydation est moins élevée.

4. La cinétique de la réduction de l'hydroxylamine par les extraits a été étudiée en fonction de la température, de la concentration en substrat et de la concentration en transporteur naturel ou artificiel.

5. Des expériences réalisées avec d'autres espèces bactériennes paraissent indiquer que ce mode de réduction de l'hydroxylamine par l'hydrogénase et un transporteur non-spécifique, naturel ou artificiel, n'est pas particulier aux bactéries sulfato-réductrices, mais est réalisé par tous les organismes possédant une hydrogénase.

Bibliographie p. 369.

SUMMARY

1. Cell-free extracts from *Desulfovibrio desulfuricans* reduce hydroxylamine to ammonia at the expense of molecular hydrogen by a non-specific process in which hydrogenase is the only enzymic factor. The mechanism consists of the reduction by hydrogenase of a natural electron carrier, cytochrome c_3 , which is chemically reoxidized by hydroxylamine without the intervention of a specific reductase.

2. Benzyl-viologen can be substituted for the cytochrome and ensure the chemical coupling of hydrogenase activity with hydroxylamine reduction. However, the efficiency of this artificial carrier is less than that of cytochrome c_3 .

3. Purified ferro-cytochrome c from beef heart is, like cytochrome c_3 , chemically reoxidized by hydroxylamine, but its rate of reoxidation is lower.

4. The kinetics of hydroxylamine reduction by the extracts have been studied as a function of temperature, substrate concentration, and carrier concentration (both natural and artificial).

5. Experiments which have been performed with other anaerobic and aerobic bacteria provide some evidence that the reduction of hydroxylamine by hydrogenase and a non-specific natural or artificial carrier is not confined to the sulphate-reducing bacteria but can be effected by any organism possessing hydrogenase.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. C. SENEZ ET F. PICHINOTY, *Biochim. Biophys. Acta*, 27 (1958) 569.
- ² J. R. POSTGATE, *J. Gen. Microbiol.*, 14 (1956) 545.
- ³ D. KEILIN ET E. F. HARTREE, *Biochemical Preparations*, Vol. II, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1952, p. 1.
- ⁴ K. G. PAUL, *Methods in Enzymology*, Vol. II, Academic Press, Inc., New York, 1955, p. 749.
- ⁵ M. ISHIMOTO, J. KOYAMA ET Y. NAGAI, *J. Biochem. Japan*, 42 (1955) 41.
- ⁶ M. ZUCKER ET A. NASON, *J. Biol. Chem.*, 213 (1955) 463.
- ⁷ K. SHIBATA, A. A. BENSON ET M. CALVIN, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 461.
- ⁸ J. R. POSTGATE, *J. Gen. Microbiol.*, 15 (1956) 186.
- ⁹ A. I. KRASNA ET D. RITTENBERG, *J. Bacteriol.*, 68 (1954) 53.
- ¹⁰ C. MICHAELIS ET E. S. HILL, *J. Gen. Physiol.*, 16 (1933) 859.
- ¹¹ H. R. MAHLER, N. K. SARKAR, L. P. VERNON ET R. A. ALBERTY, *J. Biol. Chem.*, 199 (1952) 585.
- ¹² K. G. PAUL, *The Enzymes*, Vol. II, Part 1, Academic Press, Inc., New York, 1951.
- ¹³ P. W. WILSON, in H. A. LARDY, *Respiratory Enzymes*, Burgess Inc., New York, 1949.
- ¹⁴ H. LINEWEAVER ET D. BURK, *J. Am. Chem. Soc.*, 56 (1934) 658.
- ¹⁵ E. AUBEL, O. SCHWARZKOPF ET R. GLASER, *Compt. rend. soc. biol.*, 125 (1937) 12 et 223.
- ¹⁶ J. LASCELLES ET J. L. STILL, *Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, 24 (1946) 159.
- ¹⁷ S. TANIGUCHI, H. MITSUI, J. TOYODA, T. YAMADA ET F. EGAMI, *J. Biochem. Japan*, 40 (1953) 175.
- ¹⁸ R. KLAUSMEIER ET R. BARD, *J. Bacteriol.*, 68 (1954) 129.
- ¹⁹ M. ISHIMOTO ET J. KOYAMA, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 28 (1955) 231.
- ²⁰ R. SATO ET F. EGAMI, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 22 (1949) 137.
- ²¹ R. SATO ET M. NIWA, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 25 (1952) 202.
- ²² L. VERNON, *J. Biol. Chem.*, 222 (1956) 1035 et 1045.
- ²³ W. VERHOEVEN ET T. TAKEDA, *Inorganic Nitrogen Metabolism*, The Johns Hopkins Press, Baltimore, 1956, p. 159.
- ²⁴ J. S. COLTER ET J. H. QUASTEL, *Arch. Biochem.*, 27 (1950) 368.

Reçu le 23 septembre 1957