

of an antibonding h.o.m.e.o. It may be useful to quote in connection with this result that, unlike methylene blue, this compound probably does not autoxidize: thus capri blue (III), whose structure is very similar to the one that we have calculated does not reoxidize spontaneously, or does so only very slowly⁴.

This work was sponsored by grant CY-3073 of the U.S. Public Health Service.

*Université de Paris, Laboratoire de Chimie Théorique,
13 rue Pierre Curie, Paris (France)*

B. PULLMAN
A. PULLMAN

¹ B. PULLMAN AND A. PULLMAN, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 45 (1959) 136.

² B. PULLMAN AND A. PULLMAN, *Les théories électroniques de la chimie organique*. Masson Ed. Paris, 1952.

³ A. SZENT-GYÖRGYI, *Biochem. Z.*, 150 (1924) 195.

⁴ A. SZENT-GYÖRGYI, private communication.

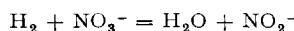
Received February 7th, 1959

Extraction et propriétés de la nitrate-réductase d'*Aerobacter aerogenes*

Dans le cadre des recherches que nous avons entreprises^{1, 2} sur la réduction bactérienne de l'azote minéral à partir de l'hydrogène, nous avons étudié la réduction du nitrate par *Aerobacter aerogenes* (Souche L III-1), à l'aide de suspensions et d'extraits de cet organisme cultivé sur milieu liquide peptone-glucose, en l'absence de nitrate et en anaérobiose (cultures massives et profondes, non-agitées). Sous atmosphère d'H₂, les suspensions non-proliférantes provenant de ces cultures réduisent le nitrate en nitrite sans phase de latence, à condition d'opérer en présence d'une quantité catalytique de benzyl-viologène qui joue le rôle de transporteur artificiel d'électrons, mais elles sont par contre dépourvues de toute activité en l'absence de cet indicateur d'oxydroréduction. Ce comportement, qui avait déjà été signalé par LASCELLES ET STILL³ pour une autre souche du même organisme, montre que les cellules ainsi cultivées possèdent une hydrogénase et une nitrate-réductase, mais sont dépourvues de transporteur naturel capable de coupler physiologiquement les deux enzymes considérés.

Les extraits ont été préparés suivant la technique décrite par NICHOLAS ET NASON⁴ et le nitrite formé a été dosé colorimétriquement, après précipitation des protéines par l'acétone. Pour mesurer les consommations d'H₂, on a employé la méthode respirométrique de Warburg, dans les conditions suivantes: température, 37°; pH 7.0 (tampon phosphates), systèmes de 3 ml, contenant 100 µg de benzyl-viologène et 50 µmoles de KNO₃. La réduction et l'oxydation des pyridine-nucléotides ont été estimées spectrophotométriquement à 340 mµ, à la température du laboratoire.

1. En présence d'un grand excès de KNO₃ (50 µmoles), la consommation d'H₂ par les extraits est linéaire en fonction du temps (Fig. 1, courbe 3). Lorsque, par contre, la concentration initiale du substrat est faible (3 µmoles), l'activité passe successivement par deux phases linéaires (courbe 2), dont la première correspond à la conversion quantitative du nitrate en nitrite:



Le second segment est parallèle à la droite obtenue si on remplace dans les systèmes le nitrate par 3 µmoles de nitrite (courbe 1) et correspond à la réduction de NO₂⁻ en ammoniaque par le processus non-enzymatique que nous avons décrit dans

une publication antérieure². En tenant compte du fait que, dans cette dernière réaction, 3 moles d' H_2 sont consommées par mole de nitrite réduite, on voit que le processus non-enzymatique est environ 8 fois moins rapide que la réduction du nitrate en nitrite par la nitrate-réductase.

2. L'activité à l'égard du nitrate est de $104 \mu\text{l}$ d' H_2 consommés par heure et par mg d'azote protéique, valeur très inférieure à l'activité hydrogénasique du même extrait mesurée en présence de benzyl-viologène comme accepteur final d'hydrogène ($-Q_{H_2} = 1,030$).

3. La vitesse de consommation de l'hydrogène est proportionnelle à la quantité d'extrait. Elle croît avec la concentration en benzyl-viologène (Fig. 2) et atteint sa valeur limite, correspondant à la saturation du système, lorsque la concentration du transporteur artificiel est $8.1 \cdot 10^{-5} M$ ($100 \mu\text{g}$ par manomètre). En fonction du pH, l'activité présente un optimum entre pH 8.3 (tampon phosphates) et 7.9 (tampon acétate-véronal); elle est réduite de 50 % à pH 6 et 9.5. L'énergie d'activation, déterminée entre 25° et 43° , est de 9,250 cal. L'influence de la concentration en substrat sur l'activité est difficile à déterminer de façon précise, l'enzyme étant saturé par des concentrations en KNO_3 voisines de la limite de sensibilité des mesures manométriques. La valeur numérique de la constante de Michaëlis paraît cependant proche de $K_m = 3 \cdot 10^{-4} M$.

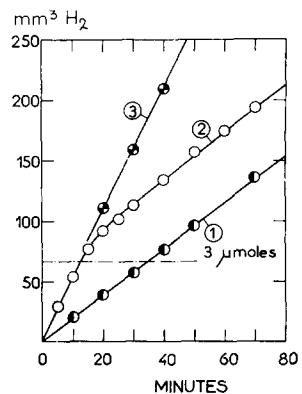


Fig. 1. Consommation de l'hydrogène en fonction du temps. Systèmes manométriques contenant: extrait, 1 ml; tampon phosphates (pH 7), 1 ml; benzyl-viologène, $100 \mu\text{g}$; (1) KNO_2 , 3 μmoles ; (2) KNO_3 , 3 μmoles ; (3) KNO_3 , 50 μmoles .

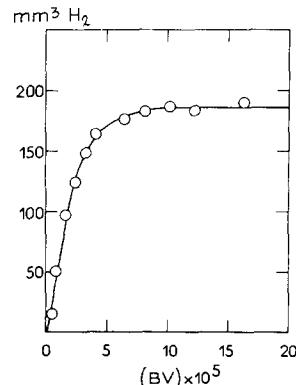


Fig. 2. Activité de l'extrait en fonction de la concentration molaire en benzyl-viologène (BV). Systèmes contenant: tampon phosphates (pH 7), 1.5 ml; extrait, 0.5 ml; KNO_3 , 50 μmoles . Les activités sont exprimées en $\text{mm}^3 H_2$ consommés par h.

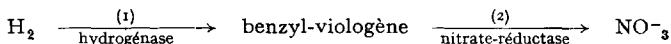
4. L'activité enzymatique est complètement inhibée par le nitrite de sodium et le cyanure de potassium $10^{-3} M$, le seuil de sensibilité à l'égard de ces deux inhibiteurs étant $3 \cdot 10^{-6} M$ pour NaN_3 et $10^{-6} M$ pour KCN . D'autre part, le sulfure de sodium $10^{-4} M$ réduit l'activité de 80 % et l'effet de cet inhibiteur ne paraît pas être lié à l'abaissement du potentiel d'oxydo-réduction, car on n'a pas constaté d'inhibition par des concentrations $10^{-3} M$ d'autres agents réducteurs tels que l'hydrosulfite, l'acide ascorbique et le thioglycollate de soude.

La réduction du nitrate est également insensible aux agents complexants suivants: α - α' -dipyridyl, salicylaldoxime, Versène et thiourée.

5. La réduction des pyridine-nucléotides par l'extrait a été étudiée en tubes de Thunberg sous atmosphère d' H_2 et en présence de benzyl-viologène. Dans ces conditions, seul le triphosphopyridine-nucléotide est réduit, vraisemblablement par un système enzymatique analogue à celui que PECK ET GEST⁵ ont découvert chez les *Clostridies*.

6. L'extrait catalyse l'oxydation par l'oxygène des pyridine-nucléotides réduits. Les vitesses de réaction sont de 158 m μ moles de diphospho- et 30 m μ moles de triphosphopyridine-nucléotides réoxydées par min et par mg d'azote protéique, et ne sont pas modifiées par l'addition de 10 μ moles de KNO_3 , ce qui élimine la possibilité d'un couplage entre ces donneurs d'hydrogène et le nitrate.

Ces observations fournissent quelques précisions sur le processus de la réduction du nitrate par le système et dans les conditions étudiées. Elles montrent notamment que les pyridine-nucléotides et les cations métalliques libres ne participent pas au transport des électrons entre l'hydrogénase et la nitrate-réductase par le benzyl-viologène:



Afin de vérifier que la deuxième réaction de ce système n'est pas un simple processus chimique et nécessite l'intervention d'un enzyme spécifique, on a mesuré la vitesse de réoxydation du benzyl-viologène réduit par KNO_3 , en présence de quantités croissantes d'extrait. Ces expériences ont été réalisées dans des tubes de Thunberg où l'indicateur était réduit sous atmosphère d' H_2 par l'hydrogénase. Après évacuation de l'hydrogène, de façon à arrêter l'activité hydrogénasique de l'extrait, la solution de KNO_3 , placée dans le diverticule, était renversée dans le tube central. On a constaté que le temps nécessaire pour la décoloration complète de l'indicateur est inversement proportionnel à la concentration en extrait, ce qui démontre la nature enzymatique de la réaction. D'autre part, on a constaté que si on remplace l'extrait d'*A. aerogenes* par un extrait de *Desulfovibrio desulfuricans*^{1,2}, contenant une hydrogénase mais dépourvu d'activité nitrate-réductase, le benzyl-viologène réduit n'est pas réoxydé par KNO_3 .

Il est manifeste que le couplage entre la nitrate-réductase et les pyridine-nucléotides exige un ou plusieurs enzymes absents de nos préparations. Dans le cas du système qu'ils ont étudié, SADANA ET McELROY⁶ ont montré qu'un cytochrome et une cytochrome-réductase étaient nécessaires pour coupler l'oxydation du diphosphopyridine nucléotide réduit avec la réduction de NO_3^- . Utilisant des lysats purifiés d'*Achromobacter fischeri*, ces auteurs ont montré, d'autre part, que leur système n'exige aucun cofacteur ou cation métallique lorsque le benzyl-viologène réduit est le donneur d'hydrogène.

Nous avons constaté que nos extraits ne contiennent pas de cytochromes décelables par examen spectrophotométrique. Il est donc possible que la raison pour laquelle ces préparations ne peuvent pas coupler les pyridine-nucléotides au nitrate soit l'absence de système cytochromique dans les cellules d'*A. aerogenes* cultivées en anaérobiose. A ce sujet, il convient de souligner que les nitrate-réductases bactériennes couplées avec les pyridine-nucléotides, qui ont été étudiées par NICHOLAS ET NASON⁴ et par SADANA ET McELROY⁶, ont été extraites à partir de cellules cultivées en aérobiose forcée.

- ¹ J. C. SENEZ ET F. PICHINOTY, *Biochim. Biophys. Acta*, 27 (1958) 569, et 28 (1958) 355.
- ² J. C. SENEZ ET F. PICHINOTY, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 40 (1958) 2099.
- ³ J. LASCELLES ET J. L. STILL, *Austral. J. Exptl. Biol. Med. Sci.*, 24 (1946) 159.
- ⁴ D. J. D. NICHOLAS ET A. NASON, *J. Bacteriol.*, 69 (1955) 580.
- ⁵ H. D. PECK ET H. GEST, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 587.
- ⁶ J. C. SADANA ET W. D. McELROY, *Arch. Biochem.*, 67 (1957) 16.

Reçu le 15 janvier 1959

Influence of light on dark carboxylation reactions in etiolated barley leaves

Exposure of etiolated plants to white light results in rapid chlorophyll formation and visible greening within a few hours. Extensive investigations have shown no definite correlation between the development of chlorophyll and photosynthetic ability with increasing exposure to light¹⁻³. SMITH⁴ showed with etiolated barley leaves that the increasing O_2 -evolving power resulted from both metabolic and photochemical reactions. TOLBERT AND GAILEY⁵ found that when etiolated barley plants were placed in light, 2-3 h were required for the rate of chlorophyll synthesis to increase measurably and then a further 1-2 h of light were required before photosynthesis commenced, as measured by $^{14}CO_2$ fixation.

Large differences have been observed between green and etiolated barley leaves in the fixation of $^{14}CO_2$ by a number of substrates in crude homogenates (our unpublished data). For this reason changes in dark fixation of CO_2 with time of exposure of etiolated barley to white light were studied.

Week-old etiolated barley seedlings (*Hordeum vulgare*), var. Atlas, grown in sand with distilled water, were used in the experiments. The plants were illuminated in growth rooms at 22° with approximately 1000 ft. candles of continuous white light from 300-W "Champion" bulbs. Uniform samples (the leaf blade above the first sheath on each occasion) were taken from zero time up to 66 h after illumination started.

Samples of 0.5 g fresh weight of leaves were taken for chlorophyll analysis⁶. Samples of 5.0 g fresh weight were ground in a mortar with 5.0 ml 0.2 M Tris buffer, pH 8.0. The homogenate was strained through 2 layers of cheesecloth. Aliquots of 0.2 ml of this crude homogenate were added to each reaction mixture which also contained $H^{14}CO_3^-$. The mixture was incubated for 10 min at 37°; the reaction was stopped by adding 0.1 ml 1 N HCl which also expelled unreacted $H^{14}CO_3^-$. After centrifugation at 1000 $\times g$, 0.2 ml of the supernatant was pipetted into a pyrex-glass planchet and dried under forced air at room temperature for approximately 1 h and counted with a thin-window Geiger-Müller tube. This method is the same as that reported previously from this laboratory⁷.

Fig. 1 shows dark fixation of $^{14}CO_2$ by various substrates, and also the chlorophyll content, at various time intervals after the etiolated plants were first illuminated. Dark CO_2 fixation with G6P as a substrate and with ATP + Mg⁺⁺ with no added

Abbreviations: Tris, tris(hydroxymethyl)aminomethane; ATP, adenosine triphosphate; G6P, glucose-6-phosphate; PEP, phosphoenolpyruvate; F6P, fructose-6-phosphate; R5P, ribose-5-phosphate; GSH, glutathione; RuDP, ribulose diphosphate; EDDHA, ethylenediamine α -hydroxy-phenylacetic acid; TPN, triphosphopyridine nucleotide.