

BBA 12171

RECHERCHES SUR LA TÉTRATHIONATE-RÉDUCTASE D'UNE BACTÉRIE ANAÉROBIE FACULTATIVE

FRANCIS PICPINOTY ET JACQUELINE BIGLIARDI-ROUVIER

*Laboratoire de Chimie Bactérienne, Centre National de la Recherche Scientifique,
Marseille (France)*

(Reçu le 27 juillet, 1962)

SUMMARY

Study on the tetrathionate-reductase of a facultative anaerobic bacterium

In this article a method is described by which the tetrathionate reductase activity of bacterial enzymic extracts may be measured. It depends on the fact that benzyl viologen establishes a chemical coupling between hydrogenase and reductase. The activity is calculated from the rate of consumption of hydrogen determined by the manometric technique of Warburg. By means of our method, the affinity constant and activation energy of the enzyme were measured. The pH optimum has been determined and the inhibitions by cyanide and azide have been studied. The aerobic cultures do not reduce tetrathionate. Atmospheric oxygen inhibits reversibly the activity of the reductase. In anaerobic cultures the biosynthesis of the enzyme is induced by tetrathionate. In aerobic cultures its formation is completely repressed by oxygen.

RÉSUMÉ

Nous décrivons dans le présent mémoire une méthode qui permet de mesurer l'activité tétrathionate-réductase des extraits enzymatiques bactériens. Son principe est basé sur le fait que le benzyl-viologène établit un couplage chimique entre l'hydrogénase et la réductase. L'activité est calculée à partir de la vitesse de consommation de l'hydrogène déterminée par la méthode manométrique de Warburg. A l'aide de notre méthode, la constante d'affinité et l'énergie d'activation de l'enzyme ont été mesurées. Nous avons également déterminé le pH d'activité optimum et étudié l'inhibition par le cyanure et l'azothydrate. Les cultures aérobies ne réduisent pas le tétrathionate. L'oxygène atmosphérique inhibe réversiblement le fonctionnement de la réductase. Dans les cultures anaérobies la biosynthèse de l'enzyme est induite par le tétrathionate. Dans les cultures aérobies sa formation est complètement réprimée par l'oxygène.

INTRODUCTION

En 1943, POLLACK ET KNOX¹ découvrirent chez une bactérie anaérobie facultative un enzyme inducible² qui catalyse la réduction du tétrathionate en thiosulfate. Par

la suite, la tétrathionate-réductase ne retint point l'attention des biochimistes et ne fit l'objet d'aucune étude importante. Nous décrivons ici une méthode précise qui permet de mesurer son activité dans les extraits. Il a été possible à l'aide de notre technique d'étudier ses propriétés les plus importantes. Mais le problème qui a tout particulièrement retenu notre attention est celui de la régulation *in vivo* de la biosynthèse et de l'activité de cet enzyme. Les principaux résultats rapportés dans le présent mémoire ont déjà été publiés dans une note préliminaire³.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

On prépare le tétrathionate en oxydant le thiosulfate de potassium par un large excès de chlorure ferrique. Le sel de potassium ayant pour formule $K_2S_4O_6$ est séparé du mélange et purifié par une série de précipitations alcooliques en milieu acide. La structure et les propriétés du benzyl-viologène ont été décrites dans une publication antérieure⁴.

Nous avons utilisé une bactérie anaérobie facultative dont les principaux caractères ont été étudiés par POLLOCK⁵. Cet organisme fermente le lactose, le glucose et le mannitol avec production d'acides. Il est citrate positif et Voges-Proskauer négatif et donne une réaction positive avec le rouge de méthyle. Il produit de l'hydrogène sulfuré mais pas d'indole. La souche 1433 est conservée sur gélose nutritive dépourvue de tétrathionate. Pour les cultures, on emploie un milieu de base tamponné à pH 7 dont la composition a déjà été décrite¹. On y ajoute de la bacto-peptone (0.25 g/1000 ml) et de l'extrait de levure Disco (0.25 g/1000 ml). Le glucose stérilisé à part est ajouté avant l'ensemencement. Les solutions de $K_2S_4O_6$, $Na_2S_2O_3$ et $Na_2S_2O_4$ (1 g/1000 ml) sont stérilisées par filtration. Les cultures aérobies sont réalisées dans des flacons à toxine agitées. Les cultures anaérobies sont placées dans des ballons sous vide. On récolte les bactéries après 16 h d'incubation à 32°. Avant de centrifuger les cultures aérobies, on leur ajoute du chloramphénicol (25 µg/ml) pour empêcher les processus d'adaptation de nature protéique. Cet antibiotique n'exerce pas d'inhibition à l'égard de l'enzyme.

Les extraits sont préparés par traitement sonique (10 min) des suspensions cellulaires dans un appareil Raytheon. Ils sont séparés des débris bactériens par centrifugation (15 000 tours/min; 20 min). Leur teneur en azote est estimée par micro-Kjeldahl. La préparation d'hydrogénase est obtenue par traitement sonique d'une suspension de *D-sulfobacillus desulfuricans*. La densité des suspensions bactériennes est déterminée par mesure de l'absorbance après dilution.

La croissance des cultures est estimée en mesurant l'absorbance à 450 m μ dans une cuve de 1 cm avec un spectrophotomètre Jean et Constant. Dans les expériences de croissance, on emploie le milieu habituel avec 2 g/1000 ml de $K_2S_4O_6$ et 4 g/1000 ml de glucose.

Pour doser le thiosulfate on place les prélèvements dans 3 à 5 ml d'alcool éthylique. Ce traitement inactive immédiatement l'enzyme. On dilue ensuite avec plusieurs volumes d'eau et on titre par iode N/10 ou N/200 en présence d'embois d'amidon. La précision des dosages n'est pas altérée par la présence de bactéries ou de protéines.

Toutes les expériences sont réalisées à 37° en tampon phosphates pH 7. Les $-Q_{H_2}$ représentent les vitesses de consommation de H_2 et sont exprimés en mm³

de gaz (conditions normales) par heure et par mg de bactéries (poids sec) ou par mg d'azote pour les extraits. Ils sont mesurés par la technique manométrique de Warburg avec des coupes ayant un volume de 10 ml et contenant 3 ml de liquide. L'unité de tétrathionate-réductase est la quantité d'enzyme qui catalyse la réduction d'une μ moles de $S_4O_6^{2-}$ en une heure.

L'oxydation des pyridine-nucléotides réduits (DPNH et TPNH) et du FMNH₂ est étudiée à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman suivant des techniques antérieurement décrites⁶.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

Consommation de H₂ par des cellules intactes en présence de tétrathionate et de thiosulfate

On utilise une culture anaérobie sur milieu contenant $K_2S_4O_6$. Ces bactéries consomment H₂ en présence de tétrathionate ($-Q_{H_2} = 275$; courbe 1, Fig. 1). Leur activité est notablement accrue par l'addition d'une faible quantité de benzyl-viologène ($-Q_{H_2} \sim 448$; courbe 2). Nos observations suggèrent que la souche utilisée synthétise en anaérobiose l'hydrogénase, la tétrathionate-réductase et un transporteur d'électrons capable de réaliser un couplage efficace entre les deux enzymes.

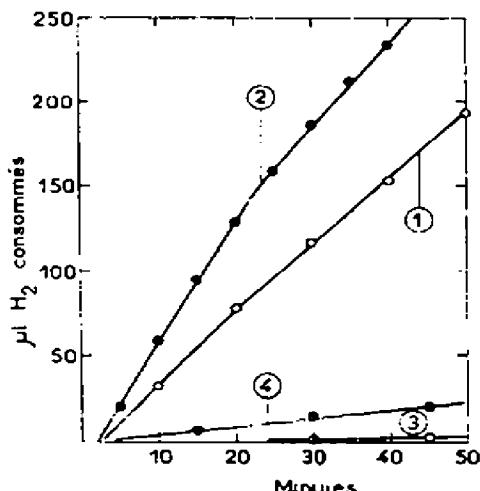
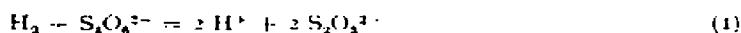


Fig. 1. Consommation de H₂ en fonction du temps par une suspension cellulaire. Bactéries, 1 mg (poids sec); tampon, $K_2S_4O_6$ ou $Na_2S_4O_6$, 20 μ moles; $CdCl_2$ (puits central), 1, $S_4O_6^{2-}$; 2, $S_4O_6^{2-}$; benzyl-viologène, 100 μ g; 3, $S_2O_3^{2-}$; 4, $S_2O_3^{2-}$; benzyl-viologène, 100 μ g.

L'activation provoquée par l'indicateur d'oxydoréduction s'explique sans doute par le fait que le transporteur physiologique constitue le facteur limitant de la chaîne. Avec le thiosulfate, les vitesses de consommation de H₂ sont extrêmement faibles. On trouve $-Q_{H_2} = 4$ en l'absence d'indicateur et $-Q_{H_2} = 30$ en présence de benzyl-viologène. Un fait important qui ressort de l'expérience décrite est l'inactivité des bactéries à l'égard du thiosulfate. On doit par conséquent s'attendre à ce que les cultures et les suspensions cellulaires réduisent quantitativement le tétrathionate en thiosulfate. L'étude de la tétrathionate-réductase et la réalisation des bilans se trouveront ainsi facilitées par l'absence de thiosulfate-réductase chez l'organisme utilisé.

Mesure de l'activité des extraits à l'aide de la méthode manométrique

Chaque système contient 0.05 ml de la préparation d'hydrogénase, 100 µg de benzyl-viologène, le tampon phosphates (pH 7) et l'extrait bactérien (culture anaérobiose sur tétrathionate). Une solution contenant 20 µmoles de $K_2S_4O_6$ est placée dans le diverticule. Le volume de la phase liquide est complété à 3 ml avec de l'eau. Après avoir été remplis de H_2 , les manomètres sont mis à incuber dans un bain à 37°. Lorsque le milieu a pris la coloration violacée caractéristique de l'indicateur réduit, la solution de $K_2S_4O_6$ est renversée dans la coupe (temps 0). Les mesures sont ensuite effectuées à intervalles de temps réguliers. On déduit les $-Q_{H_2}$ des pentes mesurées à l'origine des courbes représentant les volumes de H_2 consommés en fonction du temps. Précisons que l'éventualité d'une oxydation chimique du benzyl-viologène par le tétrathionate se trouve exclue par le fait qu'aucune consommation de H_2 ne se produit en l'absence d'extrait bactérien. Enfin la réaction étudiée est bien de nature enzymatique puisque le chauffage à 100° fait perdre à l'extrait la totalité de son activité. Avec la concentration de tétrathionate utilisée ($6.65 \cdot 10^{-3}$ M), les courbes sont linéaires pendant la majeure partie de l'expérience. Calculés sur un grand nombre d'essais, les bilans établissent que la réduction d'une µmole de $S_4O_6^{2-}$ consomme 0.935 µmole de H_2 et donne 2 µmoles de $S_2O_3^{2-}$. Aux erreurs près, ils correspondent à la réaction (1):



Les extraits ne consomment pas H_2 en présence de $Na_2S_2O_3$. Puisque d'autre part la totalité du tétrathionate se retrouve en fin de réaction sous forme de thiosulfate, nous avons là une nouvelle preuve que la bactérie étudiée est réellement dépourvue de thiosulfate-réductase. Dans les conditions précédemment définies, la réductase limite l'activité des systèmes puisque la vitesse de consommation de H_2 varie proportionnellement au volume d'extrait (Fig. 2). D'après la réaction 1, 22.4 mm³ de H_2 sont nécessaires pour assurer la réduction d'une µmole de $S_4O_6^{2-}$. Il est donc

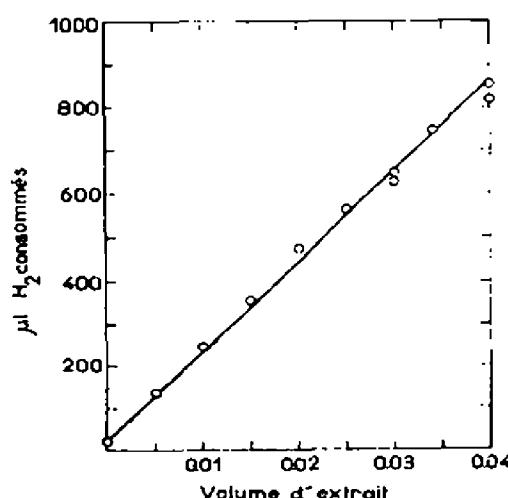
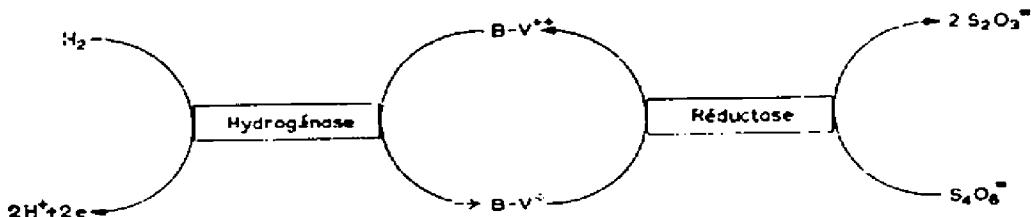


Fig. 2. Variation de la vitesse de consommation de H_2 (mm³/h/système) en fonction de la quantité d'extrait (ml).

facile de déduire du $-Q_{H_2}$ le nombre d'unités d'enzyme. On doit toutefois tenir compte de la faible activité tétrathionate-réductase de la préparation brute d'hydrogénase dont la valeur est fournie par l'ordonnée du point d'intersection de la courbe de la Fig. 2 avec l'axe vertical. Pour effectuer des mesures significatives, les volumes d'extrait doivent être choisis de sorte que la consommation de H_2 n'excède pas 70 mm³ en 5 min. Sur le schéma suivant figure le trajet suivi par les électrons dans le système étudié :



Étude de l'oxydation du benzyl-viologène réduit par le tétrathionate

Pour étudier le passage des électrons entre l'indicateur et le tétrathionate, on utilise une technique très simple basée sur l'emploi des tubes de Thunberg. Voici la manière d'opérer. Chaque tube contient 4.9 μmoles de benzyl--viologène, le tampon phosphates (pH 7), 0.05 ml d'hydrogénase et la tétrathionate-réductase (culture anaérobie sur tétrathionate). Dans la partie latérale est placée une solution contenant 20 μmoles de $K_2S_4O_6$. Le volume de la phase liquide est complété à 3 ml avec de

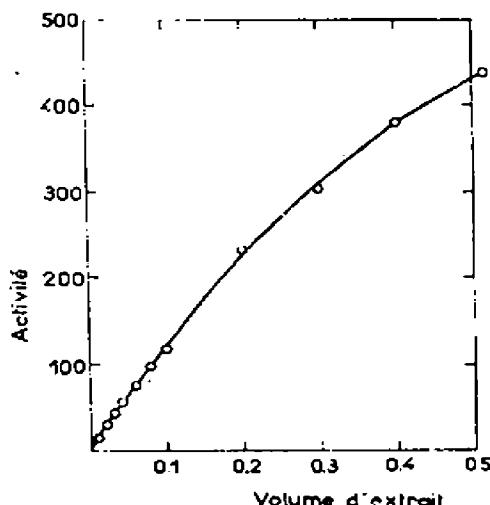
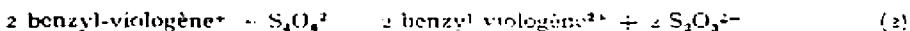


Fig. 3. Vitesse d'oxydation du benzyl-viologène (μ moles $S_4O_4^{2-}$ réduites/h/système) en fonction de la concentration de tétrathionate-réductase (ml d'extrait).

l'eau. Après remplissage par H_2 les tubes sont mis à incuber dans un bain à 37° pendant 2 h. Ils sont agités de temps à autre afin de faciliter la diffusion du gaz dans le liquide. Lorsque l'indicateur est complètement réduit, l'hydrogène est évacué sous vide et les tubes sont de nouveau plongés dans le bain. La solution de

tétrathionate est alors renversée dans le tube (temps 0). On détermine visuellement à l'aide d'un chronomètre le temps exigé par la décoloration complète du milieu. A partir de cette dernière valeur, on calcule le nombre de µmoles d'indicateur oxydées par unité de temps dans chaque système. D'après la réaction 2, il est facile d'exprimer les résultats en µmoles de tétrathionate réduites:



Portons sur un graphique les valeurs trouvées en fonction de la concentration de tétrathionate--réductase (Fig. 3). Les points expérimentaux sont situés sur une courbe qui passe exactement par l'origine des ordonnées. En l'absence d'extrait le benzyl-viologène n'est pas oxydé par le tétrathionate, ce qui écarte une nouvelle fois l'éventualité d'une réaction spontanée de nature chimique. Nos observations confirment donc les résultats obtenus avec la méthode manométrique. Théoriquement, il devrait être possible de mesurer l'activité des extraits avec la technique colorimétrique décrite. Néanmoins le fait que la courbe de la Fig. 3 n'est pas rigoureusement linéaire nous a conduit à fixer notre choix sur la méthode manométrique qui ne présente pas de tels inconvénients.

Propriétés

Les expériences rapportées dans ce paragraphe ont été réalisées avec un extrait de culture anaérobie sur tétrathionate à l'aide de la technique manométrique précédemment décrite.

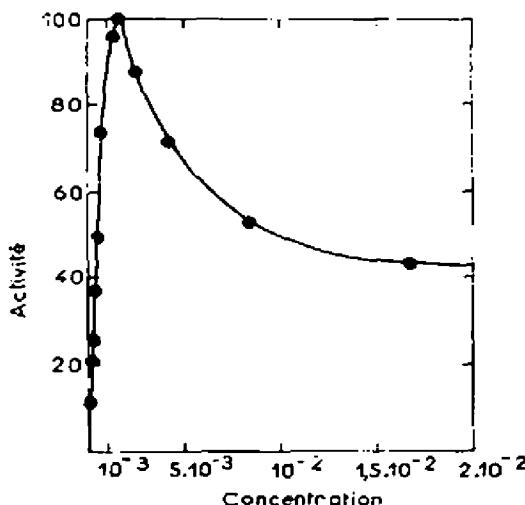


Fig. 4. Influence de la concentration de tétrathionate (moles/l) sur l'activité enzymatique (unités arbitraires).

Affinité de l'enzyme pour son substrat: On utilise un grand nombre de systèmes contenant une quantité fixe d'extrait et des concentrations différentes de $K_2S_4O_6$. La Fig. 4 nous enseigne que l'activité s'accroît d'abord d'une façon continue, atteint un maximum très accusé pour une concentration $1.6 \cdot 10^{-3}$ M et décroît rapidement ensuite. A des concentrations suffisamment élevées, le substrat exerce donc une

inhibition puissante à l'égard de l'enzyme. Nous avons calculé la constante d'affinité avec la méthode classique des inverses. Dans l'expérience précédente on trouve $V_{max} = 71 \mu\text{moles S}_4\text{O}_6^{2-}/\text{h/système}$ et $K_m = 2 \cdot 10^{-3} \text{ M}$. Le dithionate n'est pas un substrat de la tétrathionate-réductase puisqu'aucune consommation de H_2 ne se manifeste en présence de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_6$.

Énergie d'activation: Des mesures d'activité sont effectuées avec différents systèmes à des intervalles de 2° compris entre les températures extrêmes 32 et 42° . On trace sur un graphique les variations de $\log_{10}V$ en fonction de $1/T$. E est calculé à partir des pentes des droites qui sont égales à $-0.219 E$. Dans deux expériences distinctes réalisées avec des concentrations différentes de tétrathionate-réductase, nous avons trouvé les valeurs $30\ 600$ et $28\ 600$. La valeur moyenne des deux déterminations est $29\ 600$.

Infuence du pH sur l'activité: On utilise un tampon $\text{Na}_2\text{HPO}_4-\text{KH}_2\text{PO}_4$ dans la zone des pH acides ainsi qu'au voisinage de la neutralité et un tampon glycine- NaOH dans la zone des pH alcalins. Sur la Fig. 5 sont représentées les variations en fonction du pH de l'activité d'un certain nombre de systèmes contenant la même quantité d'extrait. L'enzyme est complètement inactif en deçà de pH 5.25 et au-delà de pH 11.2 ; son optimum d'activité se situe au voisinage de pH 7.5 .

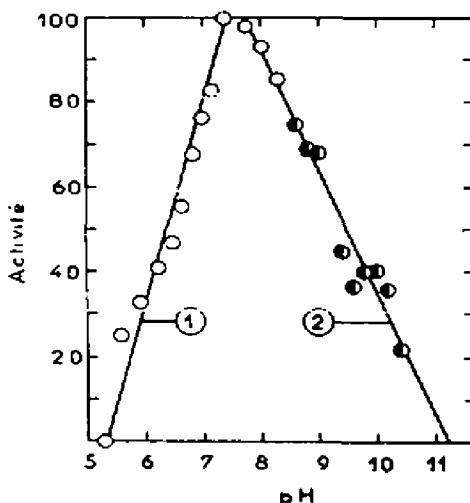


Fig. 5. Activité en fonction du pH. 1, tampon $\text{Na}_2\text{HPO}_4-\text{KH}_2\text{PO}_4$; 2, tampon glycine- NaOH .

Nature particulière: Nous avons étudié la répartition de l'activité dans le surnageant et le sédiment d'un extrait après centrifugation à grande vitesse ($150\ 000 \times g$; 2 h) dans une machine Spinco. Les résultats sont donnés en unités enzymatiques par mg d'azote: extrait initial, 8150 ; sédiment, $16\ 300$; surnageant, 2600 . L'activité spécifique du sédiment est égale à 6 fois celle du surnageant. Ces observations établissent la structure particulière de la tétrathionate-réductase.

Inhibition par le cyanure et l'azothydrate: Une concentration 10^{-3} M d'azothydrate de sodium n'exerce aucune action inhibitrice. En ce qui concerne le cyanure de potassium, on observe des taux d'inhibition de 41 et 83% pour des concentrations 10^{-3} et 10^{-2} M .

*Réduction du tétrathionate *in vitro* en présence de transporteurs physiologiques d'hydrogène*

Pyridine-nucléotides: L'addition de $K_2S_4O_6$ ne modifie pas sensiblement les vitesses d'oxydation enzymatique du DPNH et du TPNH par l'oxygène atmosphérique. Dans la discussion, nous reviendrons sur la signification qu'il convient d'attribuer à ces observations négatives.

Flavine-mononucléotide: Les expériences devant être obligatoirement réalisées en anaérobiose, on opère en présence d'une faible quantité d'hydrosulfite qui réduit le FMN et empêche la diffusion de l'oxygène dans la solution. Dès l'addition du substrat, l'oxydation du $FMNH_2$ commence à se manifester (courbe 1, Fig. 6). Au début

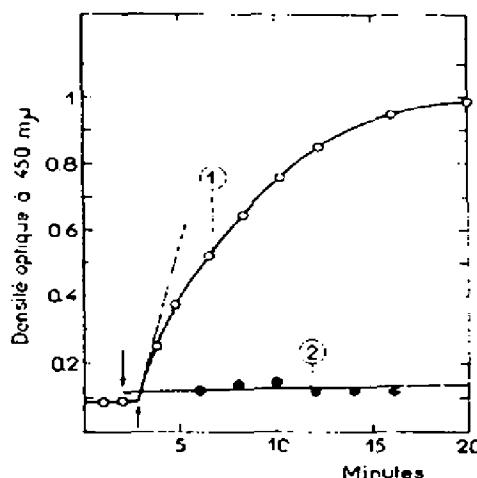
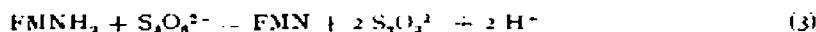


Fig. 6. Oxydation par le tétrathionate du flavine-mononucléotide réduit. Chaque système contient: tampon; FMN, 0,245 μ mole; hydrosulfite de sodium, 4 μ moles; $K_2S_4O_6$, 100 μ moles; volume total, 3 ml. 1, extrait 0,1 ml; 2, témoin sans extrait. Les flèches marquent l'instant où l'on ajoute $K_2S_4O_6$.

la vitesse est très élevée mais elle décroît rapidement ensuite. La nature enzymatique de la réaction étudiée est établie par le fait qu'elle ne se produit pas en l'absence d'extrait (courbe 2, Fig. 6). La réaction qui se produit entre le tétrathionate et le $FMNH_2$ doit être conforme à l'équation 3:



Effet de l'aération sur la réduction du tétrathionate par les cultures

On compare la formation de thiosulfate à partir du tétrathionate dans deux cultures, l'une aérobie et l'autre anaérobiose. En anaérobiose, l'accumulation de thiosulfate subit une progression exponentielle pendant toute la durée de la croissance de la culture (courbes 1 et 2, Fig. 7). Par contre, la culture aérobie ne forme jamais de thiosulfate en quantité appréciable (courbe 4, Fig. 7). L'origine de cette différence de comportement sera précisée par la suite. Néanmoins nous allons voir qu'une expérience très simple apporte sur ce point quelques éclaircissements. Une fraction de culture anaérobiose en phase exponentielle de croissance est additionnée de chloram-

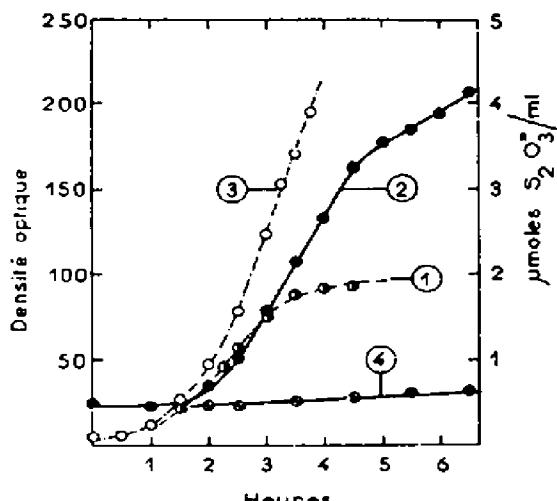


Fig. 7. Influence de l'aération sur la réduction du tétrathionate par les cultures. La densité bactérienne est exprimée en unités arbitraires (spectrophotomètre Jean et Constant, cuve de 1 cm, $\lambda = 450 \text{ m}\mu$). 1, croissance de la culture anaérobie; 2, production de thiosulfate par la culture anaérobie; 3, croissance de la culture aérobio; 4, production de thiosulfate par la culture aérobio.

phénicol ($25 \mu\text{g/ml}$) puis mise à aérer. Cet antibiotique ne provoque aucune inactivation de l'enzyme mais bloque immédiatement sa formation. Dès le début de l'aération, la vitesse d'accumulation du thiosulfate est réduite à la moitié de sa valeur initiale (courbes 1 et 2, Fig. 8). Après 2 h d'incubation aérobio, le tétrathionate cesse d'être réduit et une fraction du thiosulfate formé disparaît. La concentration de $S_2O_3^{2-}$ demeure ensuite rigoureusement constante. Il serait vain de vouloir ex-

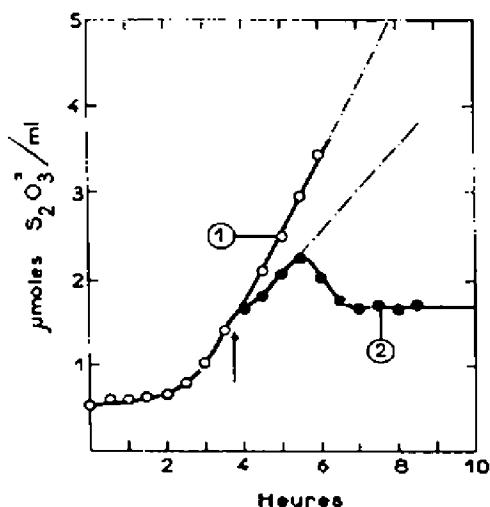


Fig. 8. Effet de l'aération sur la réduction du tétrathionate par une culture anaérobie. 1, culture anaérobie; 2, fraction de culture anaérobie soumise à l'aération et additionnée de chloramphénicol au moment indiqué par la flèche.

pliquer la forme curieuse de la courbe 2. Bornons nous à tirer une conclusion qualitative: l'oxygène inhibe le fonctionnement de la tétrathionate-réductase dans les cultures.

Réduction du tétrathionate et du thiosulfate par une suspension cellulaire en présence de glucose et en anaérobiose

On utilise des bactéries provenant d'une culture anaérobiose sur tétrathionate. Pour éviter qu'elles puissent synthétiser l'enzyme en cours d'expérience, on opère en présence d'un inhibiteur spécifique des biosynthèses protéiques, le chloramphénicol. Deux expériences distinctes sont réalisées, l'une avec le tétrathionate et l'autre avec le thiosulfate. Chaque système comprend par ml: glucose, 50 μ moles; chloramphénicol, 50 μ g; tampon phosphates (pH 7), 40 μ moles; $K_2S_4O_6$, 50 μ moles ou $Na_2S_2O_3$, 10 μ moles; bactéries, 2 mg (poids sec). Les expériences sont effectuées en anaérobiose dans des tubes à essais profonds. Le tampon, le glucose et le chloramphénicol sont ajoutés à la suspension bactérienne 10 min avant le temps 0. On ajoute les solutions de $K_2S_4O_6$ et de $Na_2S_2O_3$ puis on prélève à intervalles de temps réguliers des échantillons de 1 ml qui servent au dosage du thiosulfate. L'activité tétrathionate-réductase constante au début, décroît progressivement en fin d'expérience. Ce phénomène est vraisemblablement provoqué par l'acidification du milieu dont le pouvoir tampon est très faible. Nous verrons dans le prochain paragraphe qu'il ne se manifeste pas lorsque la concentration en phosphates est accrue de 5 fois. La diminution du pH s'explique par le fait que 2 protons sont libérés par mole de tétrathionate réduite (réaction 3). Le thiosulfate ne subit aucune transformation chimique, ce qui confirme l'absence de thiosulfate-réductase chez notre organisme.

Inhibition par l'oxygène du fonctionnement de la tétrathionate-réductase dans les suspensions cellulaires non proliférantes

Lorsqu'on emploie un milieu fortement tamponné contenant par ml 200 μ moles de phosphates, les bactéries induites (culture anaérobiose sur $K_2S_4O_6$) réduisent en anaérobiose le tétrathionate en thiosulfate à un taux constant pendant toute la durée de l'expérience (courbe 1, Fig. 9). Si l'on aère vigoureusement la suspension, la vitesse de formation du thiosulfate est réduite de 93% (courbe 2, Fig. 9). Mais dès que cesse le barbotage d'air, elle reprend très vite une valeur identique à celle observée avec la suspension anaérobiose. Cette expérience a été réalisée en présence de chloramphénicol, c'est-à-dire dans des conditions où toute biosynthèse protéique est impossible. Elle établit par conséquent d'une manière irréfutable que l'oxygène inhibe réversiblement le fonctionnement de la réductase intracellulaire.

Effet du tétrathionate sur la respiration des cellules

Il vient d'être établi que l'oxygène inhibe la réduction du tétrathionate. On était en droit de se demander si le tétrathionate exerce un effet similaire sur la réduction de l'oxygène. Nous avons mesuré l'activité respiratoire d'une suspension (culture anaérobiose sur tétrathionate) en présence de glucose, dans des systèmes avec et sans $K_2S_4O_6$. Le CO_2 dégagé est absorbé par KOH à 10% (puits central).

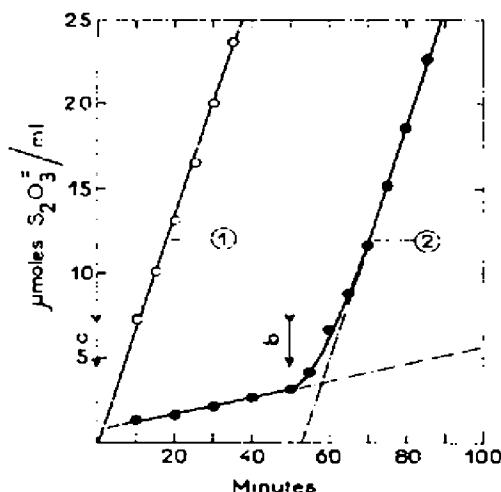


Fig. 9. Effet de l'aération sur l'activité de la tétrathionate-réductase d'une suspension cellulaire. Les flèches a et b marquent respectivement le début et la fin de l'aération. Chaque système contient par ml: bactéries, 2,1 mg; glucose, 50 μmoles; $K_2S_4O_6$, 50 μmoles; chloramphénicol, 50 μg; tampon phosphates (pH 7), 200 μmoles. 1, système constamment maintenu en anaérobiose; 2, système maintenu en acrobie pendant 50 min puis en anaérobiose.

Le glucose et le tétrathionate sont employés à la concentration de 20 μmoles par 3 ml. Les courbes qui représentent les consommations de O_2 en fonction du temps sont parallèles. Il en résulte donc que des bactéries possédant leur système respiratoire et la tétrathionate-réductase, utilisent préférentiellement l'oxygène comme accepteur d'hydrogène.

Influence des conditions de croissance sur la biosynthèse de l'enzyme

Examinons les résultats groupés sur le Tableau I. On voit que les cultures anaérobies contenant du tétrathionate possèdent une activité spécifique 20 fois

TABLEAU I

INFLUENCE DES CONDITIONS DE CULTURE SUR L'ACTIVITÉ DES EXTRAITS

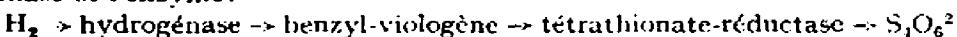
On donne dans chaque cas les résultats de deux expériences. U représente le nombre d'unités enzymatiques par mg d'azote. Les activités sont mesurées par la méthode manométrique.

	Cultures anaérobies			Cultures acrobie		
	+ $K_2S_4O_6$	+ $Na_2S_4O_6$	-	+ $K_2S_4O_6$	+ $Na_2S_4O_6$	-
	— Q_{H_2}	— Q_{H_2}	— Q_{H_2}	— Q_{H_2}	— Q_{H_2}	— Q_{H_2}
	15 200	1350	625	0	0	0
	11 550	635	605	0	0	0
	680	60	28	0	0	0
U	515	28	27	0	0	0

supérieure à celle des cultures anaérobies qui en sont dépourvues. Nos expériences établissent ainsi le caractère inducible de la réductase. Elles montrent d'autre part que le produit de la réaction, l'ion $S_2O_2^{2-}$ n'exerce aucun effet inducteur ou répresseur: l'addition de thiosulfate aux cultures sans tétrathionate n'entraîne aucune modification sensible de l'activité. Précisons également que l'ion dithionate $S_2O_6^{2-}$ ne provoque pas d'induction dans les cultures anaérobies. La souche utilisée réalise une synthèse de base puisqu'une faible quantité d'enzyme est formée en anaérobiose et en l'absence d'inducteur. Quelle que soit la composition du milieu, les cultures aérobies sont totalement dépourvues d'activité. Expliquons maintenant l'origine de ce phénomène. L'addition d'un extrait inactif de culture aérobie ne modifie point l'activité d'un extrait de culture anaérobie. Il faut donc d'emblée exclure l'hypothèse suivant laquelle les bactéries synthétiseraient en aérobiose un inhibiteur de l'enzyme. D'autre part, l'éventualité d'une inactivation irréversible de la réductase au contact de l'oxygène est écartée par le fait qu'un extrait de culture anaérobie conserve toute son activité après 5 h d'aération. En définitive, une seule possibilité semble devoir être retenue: l'oxygène atmosphérique réprime la formation de la tétrathionate-réductase.

DISCUSSION

Nous avons montré qu'il est possible de mesurer l'activité tétrathionate-réductase des extraits bactériens en présence d'hydrogène à l'aide de la méthode manométrique de Warburg. Par son principe, notre technique est en tous points semblable à celle que nous avons utilisée dans le cas des nitrate⁴⁻, thiosulfate²⁻ et fumarate-réductases⁸. Elle repose sur un couplage réalisé par le benzyl-viologène entre l'hydrogénase et l'enzyme:



Il a été vérifié que: (a) le transfert des électrons entre l'indicateur et le tétrathionate ne peut s'effectuer qu'en présence de l'enzyme; (b) dans les conditions de nos expériences, aucune réduction chimique ou enzymatique du thiosulfate ne se produit. Il est hautement probable que le passage des électrons entre le benzyl-viologène et la réductase est direct, c'est-à-dire qu'il ne se produit point par l'intermédiaire d'un transporteur physiologique d'hydrogène. Cependant, la vérification expérimentale de l'hypothèse précédente qui nécessiterait l'emploi d'un enzyme purifié n'a pas été réalisée au cours du présent travail. Deux propriétés importantes de la tétrathionate-réductase méritent d'être soulignées: (a) son énergie d'activation remarquablement élevée; (b) son inhibition par des concentrations élevées de tétrathionate. Cet enzyme constitue vraisemblablement l'oxydase terminale d'une véritable chaîne respiratoire. Toutefois la place qu'il occupe réellement dans l'économie de la cellule bactérienne demeure encore assez mal définie.

Les observations les plus importantes de notre travail concernent la régulation de la biosynthèse et de l'activité de la tétrathionate-réductase. En comparant les activités des cultures anaérobies avec et sans tétrathionate, nous avons pu confirmer le caractère inducible de l'enzyme initialement établi par KNOX ET POLLOCK² avec des suspensions cellulaires non proliférantes. Nous sommes logiquement amenés à considérer que l'inductivité et la fonction de substrat sont étroitement liées au pont disulfure de l'ion tétrathionate puisque le thiosulfate et le dithionate ne sont ni des substrats ni des inducteurs. Nos recherches n'ont pas été étendues aux tri-

penta- et hexa-thionates dont la purification présente de sérieuses difficultés. Comme on pouvait s'y attendre, la formation de la tétrathionate-réductase est complètement réprimée par l'oxygène. On ne se trouve point là en face d'un cas isolé puisque toutes les réductases bactériennes étudiées jusqu'ici et intervenant dans les métabolismes soufré⁷, carboné⁸ et azoté⁹⁻¹² ne sont pas synthétisées en quantité appréciable par les cultures aérobie. D'une façon générale, cette régulation répressive permet aux bactéries anaérobies facultatives de modifier leur équipement enzymatique en fonction des conditions de vie. Elle leur confère essentiellement la faculté de s'abstenir de synthétiser en aérobiose des réductases nécessaires au seul métabolisme oxydatif anaérobie.

L'oxygène inhibe d'une manière réversible le fonctionnement de la tétrathionate-réductase dans les suspensions et les cultures bactériennes. Tout récemment, nous avons pu préciser l'origine d'un phénomène semblable qui se manifeste dans le cas de la nitrate-réductase d'*Aerobacter aerogenes*⁶. Des flavines libres ou des flavoprotéines constituant la source ultime d'électrons pour l'enzyme sont oxydées très rapidement par l'oxygène, ce qui entraîne une inhibition indirecte du fonctionnement de la réductase. Dans le cas présent, l'existence d'un mécanisme du même type doit être prise en considération. En faveur de notre manière de voir, retenons le fait que le FMNH₂ sert de donneur d'hydrogène dans la réduction du tétrathionate *in vitro*. Nous avons vu que les pyridine-nucléotides réduits ne sont pas oxydés par le tétrathionate en présence de l'enzyme. Cette anomalie trouve sans aucun doute son origine dans l'action inhibitrice de l'oxygène.

Pour conclure, il n'est pas inutile de rapprocher nos résultats de ceux obtenus avec la nitrate-réductase d'*Aerobacter aerogenes*^{4,6}. Une même technique permet de mesurer l'activité des deux enzymes. L'oxygène réprime leur synthèse et inhibe leur fonctionnement. Enfin les deux réductases sont associées au matériel particulaire extrait des bactéries par traitement sonique.

REMERCIEMENTS

Au cours du présent travail, M. POLLOCK n'a cessé de nous prodiguer ses conseils et ses critiques. Nous tenons à lui exprimer notre sincère reconnaissance.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ M. R. POLLOCK ET R. KNOX, *Biochem. J.*, 37 (1943) 476.
- ² R. KNOX ET M. R. POLLOCK, *Biochem. J.*, 38 (1944) 299.
- ³ F. PICHINOTY ET J. BIGLIARDI-ROUVIER, *Antonie van Leeuwenhoek, J. Microbiol. Serol.*, 28 (1962) 14.
- ⁴ F. PICHINOTY, *Ann. Inst. Pasteur*, 104 (1963) 219.
- ⁵ M. R. POLLOCK, *Brit. J. Exptl. Pathol.*, 27 (1946) 419.
- ⁶ F. PICHINOTY, *Ann. Inst. Pasteur*, sous presse.
- ⁷ F. PICHINOTY, *Experientia*, 18 (1962) 501.
- ⁸ F. PICHINOTY ET G. COUDERT, *Experientia*, 18 (1962) 257.
- ⁹ F. PICHINOTY ET L. D'ORNANO, *Biochim. Biophys. Acta*, 48 (1961) 218.
- ¹⁰ F. PICHINOTY ET L. D'ORNANO, *Compt. Rend.*, 252 (1961) 2294.
- ¹¹ F. PICHINOTY ET L. D'ORNANO, *Biochim. Biophys. Acta*, 52 (1961) 386.
- ¹² F. PICHINOTY ET L. D'ORNANO, *Ann. Inst. Pasteur*, 101 (1961) 418.