

BBA 46288

ETUDE DES MUTANTS CHLORATE-RESISTANTS *D'ESCHERICHIA COLI K12*IV. ISOLEMENT, PURIFICATION ET ETUDE DE LA NITRATE-REDUCTASE RECONSTITUEE *IN VITRO* PAR COMPLEMENTATION

E. AZOULAY, P. COUCHOUD-BEAUMONT ET J. M. LEBEAULT

Laboratoire de Chimie Bactérienne, C.N.R.S., 31, chemin J. Aiguier, Marseille (France)

(Recu le 27 septembre, 1971)

SUMMARY

Study on chlorate-resistant mutants of Escherichia coli K12. IV. Isolation, purification and study of nitrate-reductase restored in vitro by complementation

By mixing the cell-free extracts of the two mutants *chl A*⁻ and *chl B*⁻ of *Escherichia coli* K12, previously freed from particle membranes, we achieved restoration of nitrate reductase activity. The activity is restored first in a soluble form, then in a particulate form. This mechanism is called "complementation". In the soluble state, the purified enzyme reduces NO₃⁻ and ClO₃⁻, using reduced benzyl viologen or FMNH₂ as electron donors. It is sensitive to KCN, NaN₃, *p*-hydroxymercuribenzoate (1 mM) and *N*-ethylmaleimide (0.1 mM).

The soluble form is sensitive neither to phospholipase C, nor to 2-*n*-heptyl-4-hydroxyquinoline-*N*-oxide; it associates with phospholipids and cytochrome *b*₁ to form particles in which nitrate reductase activity is no longer sensitive to ethyl *N*-maleimide and *p*-hydroxymercuribenzoate, but, conversely, becomes sensitive to 2-*n*-heptyl-4-hydroxyquinoline-*N*-oxide.

These results clearly demonstrate that it is possible to study the mechanism of integration of the enzyme leading to active membranes particles without any previous solubilisation of the original material.

INTRODUCTION

L'utilisation du chlorate permet de sélectionner dans les populations d'*Escherichia coli* K12 (*chl*-s) des mutants défectifs pour plusieurs activités enzymatiques spécifiques de la respiration anaérobie¹⁻³. Ces mutants *chl*-r ont été étudiés, ce qui a permis de les différencier en cinq groupes correspondant à autant de gènes⁴⁻⁷: *chl A*⁻, *chl B*⁻, *chl D*⁻, *chl E*⁻ et *chl C*⁻; les quatre premiers sont pléiotropes et donnent le phénotype nit⁻ gas⁻ alors que le cinquième présente le phénotype nit⁻ gas⁺. AZOULAY *et al.*⁸, SCHNAITMAN⁹ et ONODERA *et al.*¹⁰ ont montré que le caractère de cette mutation est lié à la nature membranaire des activités enzymatiques affectées.

Chez *E. coli* K12 la nitrate-réductase A (FMNH₂:nitrate (chlorate) oxydo-

réductase A selon FORGET¹¹) catalyse la réduction du NO_3^- en NO_2^- et du ClO_3^- en ClO_2^- . Cette enzyme, induite en présence de KNO_3 est réprimée par l'oxygène. De nature particulaire, la nitrate réductase a été localisée dans les membranes cytoplasmique d'*E. coli*, de *Proteus vulgaris*¹² et de divers micro-organismes¹³⁻¹⁷. L'isolement en vue de la purification et de l'étude de cette enzyme membranaire a été réalisé en solubilisant au préalable par divers procédés la membrane cytoplasmique des bactéries la contenant. LAM ET NICHOLAS¹⁶ ont ainsi montré que la nitrate-réductase purifiée de *Micrococcus denitrificans* contient du molybdène mais pas de flavines ni de cytochromes. TANIGUCHI ET ITAGAKI¹⁷ isolent chez *E. coli* une nitrate-réductase de couleur brune contenant 40 atomes de fer par molécule et dont le poids moléculaire est voisin de 1 million.

VAN 'T RIET ET PLANTA¹⁸ trouvent que l'enzyme d'*Aerobacter aerogenes* existe sous deux formes polymérisées avec un monomère de poids moléculaire égal à $2 \cdot 10^5$. Enfin FORGET¹¹ travaillant sur l'enzyme purifiée de *M. denitrificans* met en évidence la présence de flavines, de 4 à 8 atomes de fer par molécule ($M_r = 160\,000$), suivant les préparations, et de sulfure labile correspondant à une quantité d'hydrogène sulfuré libéré à partir de ces métallo-protéines lorsqu'elles sont soumises à l'action d'acide dilué ou après dénaturation par d'autres méthodes.

Pour notre part nous avons montré que la complémentation, dans des conditions parfaitement définies, des extraits préalablement débarrassés de tout matériel sédimentable et préparés à partir de cellules des deux mutants *chl A*⁻ et *chl B*⁻ d'*E. coli* K12 conduit à la restauration de l'activité nitrate-réductase perdue par chacun de ces organismes⁸. Le fait caractéristique de cette complémentation est qu'elle conduit à l'apparition d'activités nitrate-réductase successivement soluble et particulaire. Nous avons par ailleurs observé qu'après un traitement des extraits des deux mutants *chl A*⁻ et *chl B*⁻ par la phospholipase C, la complémentation est inhibée à 80% qu'il n'y a plus formation de particules et que la seule activité nitrate-réductase synthétisée dans ces conditions est de nature soluble¹⁹. Enfin MARCOT ET AZOULAY²⁰ ont signalé que la synthèse par complémentation des nitrate-réductases soluble et particulaire à partir des extraits des doubles mutants *chl A*⁻ *chl B*⁻, *chl A*⁻, *chl C*⁻ et *chl B*⁻ *chl C*⁻ impliquait la présence des produits des trois gènes *chl A*, *chl B* et *chl C*.

Nous nous proposons dans ce mémoire d'isoler, de purifier et d'étudier les propriétés de la nitrate-réductase de nature soluble synthétisée au cours de la première phase de la complémentation afin de la comparer à l'enzyme particulaire préparée par traitement des cellules de la souche sauvage d'*E. coli* K12 ou bien obtenue au cours de la deuxième phase de la complémentation.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Organismes

Souche d'*Escherichia coli* K12 PA 601 No. 356 de notre collection, sensible au KClO_3 présentant le phénotype nit^+ gas^+ et dont les caractères ont déjà été décrits²¹. Les mutants *chl A*⁻ (356₁₅) et *chl B*⁻ (356₂₄) sont résistants au ClO_3^- et ont le phénotype nit^- gas^- .

Cultures

Les cellules de ces organismes sont obtenues à partir de milieux de cultures classiques⁸ incubant dans des conditions déjà décrites⁸.

Méthodes

Préparation des extraits

Les cellules recueillies après culture sont lavées, remises en suspension homogène dans un tampon Tris 0.05 M (pH 7.5) et traitées dans une cellule de pression (French-Press). Les extraits bruts, obtenus après élimination des débris cellulaires par centrifugation à 10 000 tours/min pendant 15 min, sont soumis à une ultracentrifugation à 49 000 tours/min pendant 90 min dans une Spinco Modèle L4 (Rotor Ti 50). Les opérations sont ensuite menées de manière différente suivant l'origine de la préparation :

(1) Dans le cas des extraits préparés à partir de cellules de la souche sauvage (No. 356) le culot, repris avec un tampon phosphate 0.05 M (pH 7.3), soigneusement homogénéisé dans un Potter, donne l'extrait particulaire (3 à 5 mg de protéines par ml).

(2) Dans le cas des deux mutants (*chl A*⁻ et *chl B*⁻) les culots de centrifugation sont écartés et les surnageants sont soumis à une nouvelle centrifugation à $220\,000 \times g$ pendant 90 min. Les extraits surnageants ainsi obtenus, totalement dépourvus d'éléments sédimentables, sont mis à "complémenter" dans les conditions expérimentales déjà décrites⁸, c'est-à-dire en laissant incuber à 32° et en anaérobiose le mélange en proportions équivalentes des extraits des deux mutants. La complémentation est stoppée par refroidissement brutal à 0°.

Activités enzymatiques

L'activité *nitrate-réductase*, mesurée suivant une technique déjà publiée²², est déterminée, à partir des vitesses de consommation de l'hydrogène dans des systèmes manométriques contenant H₂, de l'hydrogénase, du benzyl-viologène 9 mM (ou du FMN 9 mM), tampon phosphates 0.33 mM (pH 7), du KNO₃ 0.25 M et l'extrait enzymatique. En présence de flavines, cette activité a été étudiée avec les systèmes réactionnels comprenant : tampon phosphates 0.33 M (pH 7) : 0.5 ml; FMN, FAD ou riboflavine suivant les cas : 0.2 μ mole; dithionite de sodium : 0.4 mmole; KNO₃ : 0.75 mmole, extrait enzymatique et eau pour compléter à 3 ml. On laisse incuber sous N₂ et on dose le nitrite formé suivant la technique de RIDER ET MELLON²³.

L'activité *chlorate-réductase* est mesurée dans les mêmes conditions que l'activité nitrate-réductase. Le KClO₃ 0.25 M remplaçant le KNO₃.

Ces activités enzymatiques sont exprimées en unités : μ moles de NO₃⁻ ou de ClO₃⁻ réduit par heure et par mg de protéines dosées suivant la méthode de LOWRY *et al.*²⁴.

Le traitement des extraits enzymatiques par la phospholipase C

Le traitement a été réalisé dans les conditions suivantes : 1 ml d'extrait surnageant (10 à 15 mg protéines) incube à 37° pendant 30 min avec 1 ml de solution de phospholipase C (6 mg/ml) (Worthington Biochem. Corp.) dans un tampon Trizma (pH 7.3) contenant du CaCl₂ (0.05 M). Après incubation le mélange est centrifugé à 0° et 49 000 tours/min pendant 15 min pour éliminer les traces de phospholipase C insoluble.

RÉSULTATS

Nitrate-réductase d'*E. coli* K12 souche sauvage

La nitrate-réductase est localisée dans la membrane d'*E. coli* K12 et les extraits particuliers préparés à partir de cellules de la souche sauvage 356 cultivée en an-

aérobiose en présence de nitrate contiennent la totalité de l'activité enzymatique des extraits bruts.

1 ml d'un extrait particulière obtenu par centrifugation à 49000 tours/min pendant 90 min et préalablement dilué 2 fois avec un tampon phosphate 0.05 M (pH 7.3) est déposé sur 4 ml d'un gradient de concentration linéaire en saccharose de 20 à 60% (p/v) et centrifugé pendant 12 h à 39000 tours/min dans un rotor SW 39. Nous constatons ainsi que l'activité nitrate-réductase se retrouve intégralement localisée dans les fractions légères de densité comprise entre 1.10 et 1.18 mesurée à 5° (Fig. 1).

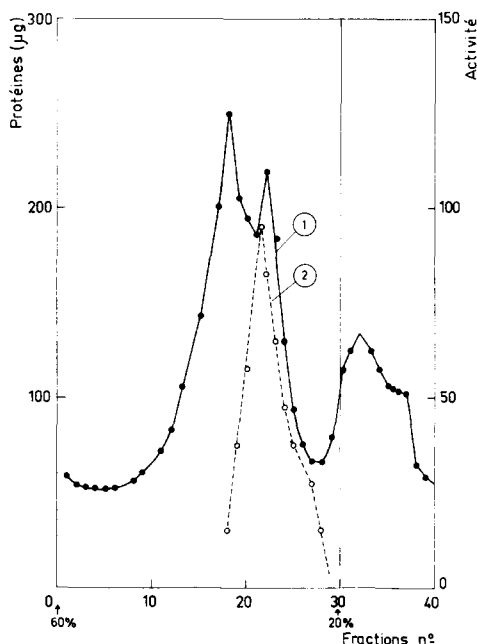


Fig. 1. Profil de sédimentation sur gradient de saccharose de concentration linéaire (p/v) de 20 à 60% d'une préparation particulière d'*E. coli* K12 cultivé en anaérobiose avec KNO_3 . Sur les fractions recueillies après 12 h de centrifugation à 39000 tours/min ont été déterminées les protéines (Courbe 1) l'activité nitrate-réductase (Courbe 2).

Ces particules porteuses de l'activité nitrate-réductase nous ont servi de matériel d'étude pour déterminer les propriétés de l'enzyme particulière natif. Dans le Tableau I nous avons rassemblé les valeurs de l'activité nitrate-réductase mesurée avec différents accepteurs d'électrons. Ces particules qui possèdent une activité nitrate-réductase (180 à 360 unités) ont aussi une activité chlorate-réductase (190 à 250 unités) et formiate-déshydrogénase (15 à 20 unités).

Cette nitrate-réductase de nature particulière est thermo-résistante. La cinétique d'inactivation thermique mesurée à 63° nous a permis de calculer le temps de demi-vie qui est égal à 30 min.

Le K_m à l'égard du nitrate mesuré en présence de benzyl-viologène réduit comme donateur d'électrons est égal à $7.8 \cdot 10^{-4}$ M; la constante d'affinité à l'égard du chlorate est égale à 2.5 mM lorsqu'elle est déterminée dans les mêmes conditions.

TABLEAU I

PROPRIÉTÉS DE LA NITRATE-REDUCTASE D'*E. coli* K12 SOUS SES DIFFÉRENTES FORMES

Activité spécifique déterminée avec KNO_3 (0.25 M) en présence d' H_2 et d'hydrogénase pour le benzyl-viologène, le FMN, le FAD ou la ménadione soit en présence de pyridines nucléotides réduits ou de formiate seuls (3 mM) soit de dithionite de Na (0.2 μmole) et de FMN, et exprimée en μmoles de NO_3^- réduit par h par mg de protéines et ramenée en % de l'activité mesurée avec le benzyl-viologène.

	Enzyme particulaire * (particules légères natives)	Enzyme particulaire ** (particules néo-formées)	Enzyme purifiée
Activité spécifique (%) mesurée avec:			
Benzyl-viologène	100	100	100
FMN (réduit + H_2)	50	26	26
FMN (réduit + $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)	7	—	—
FAD	40	20	0
Riboflavine	30	35	0
Ménadione	16	31	0
Formiate	2	4	0
NADH	2	0	0
NADPH	0	0	0
$K_m \text{ NO}_3^-$ benzyl-viologène	$7.8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	$3.1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	$5.2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
$K_m \text{ ClO}_3^-$ benzyl-viologène	$2.5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	$1.1 \cdot 10^{-3} \text{ M}$	$1.8 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
K_m benzyl-viologène	—	$6.2 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	$6 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
K_m FMN	—	$2.8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$	$1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$
Temps de demi-vie à 63°	30 min	23 min	30 min

* Fractions particulières légères de la souche sauvage.

** Particules "néo-formées" par complémentation des extraits des mutants *chl A*⁻ et *chl B*⁻.

Réconstitution de la nitrate-réductase *in vitro* par complémentation des extraits des mutants *Chl A*⁻ et *Chl B*⁻

Les surnageants d'extraits bruts, préparés à partir de cellules des deux mutants *chl-r* cultivés en anaérobiose en présence de nitrate, sont dépourvus d'activité nitrate-réductase et de particules sédimentables à $220\,000 \times g$.

Ces extraits sont soumis à une filtration stérile sur filtre Millipore et mélangés dans des proportions équivalentes en protéines (7 à 10 mg/ml de chacun des extraits) en vue d'une complémentation réalisée en anaérobiose à 32° . Après 3 h d'incubation 15 à 20% des protéines passent de l'état soluble à l'état particulaire; dans le même temps, 15 à 20 unités de nitrate-réductase ont été synthétisées par mg de protéines totales; 35% de l'activité enzymatique reconstituée est de nature particulaire, le reste se retrouve intégralement dans le surnageant obtenu après ultra-centrifugation des mélanges complémentés à $220\,000 \times g$ pendant 90 min.

Dans un autre type d'expérience nous avons stoppé la complémentation après 15 min d'incubation en introduisant le mélange réactionnel dans un bain refroidi à 2° . Dans de telles conditions l'activité nitrate-réductase fournie est intégralement de nature soluble.

Purification de la nitrate-réductase soluble reconstituée par complémentation

Comme nous venons de l'indiquer plus haut, la complémentation conduit à la

formation d'une nitrate-réductase de nature soluble. La purification de cette enzyme a été entreprise avec un matériel préparé dans les conditions suivantes:

20 ml de surnageant de chacun des extraits des deux mutants *chl-r* sont mis à compléter, la reconstitution est: soit stoppée à -2° après 15 min d'incubation, soit poursuivie durant 3 h à 32° . Ce mélange est ensuite centrifugé à $220\,000 \times g$ pendant 90 min.

Le schéma de purification illustré par le Tableau II comporte différentes étapes.

L'extrait surnageant ainsi obtenu est appliqué sur une colonne (3 cm \times 25 cm) de DEAE-cellulose équilibrée dans un tampon Tris-HCl 0.02 M (pH 7.7). L'élution est réalisée par un gradient linéaire de NaCl (0-0.8 M) dans le même tampon. Les fractions actives éluées entre 0.30 et 0.40 M NaCl sont réunies et précipitées par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 60 % de saturation; le précipité obtenu est redissout dans 5 ml de tampon Tris-HCl 0.02 M (pH 7.7) puis filtré sur une colonne (2.5 cm \times 70 cm) de Bio-gel P100 équilibrée avec le même tampon. L'activité enzymatique est éluée dans la première fraction suivant le volume d'exclusion, ces fractions actives sont réunies et appliquées sur une deuxième colonne (3 cm \times 15 cm) de DEAE-cellulose équilibrée

TABLEAU II

SCHEMA DE PURIFICATION DE LA NITRATE-RÉDUCTASE SOLUBLE

	Proteines totales (mg)	Activité spécifique*	Activité totale
Extrait surnageant brut	299.6	145	43 680
Premier passage colonne DEAE-cellulose	57.2	476	27 227
Précipitation $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + passage Bio-gel P 100	13.6	1050	14 300
Deuxième passage colonne DEAE-cellulose	2	1325	2 650
Précipitation $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + passage Bio-gel A 1.5 M	0.084	4250	356

* Activité spécifique: μl consommé en 5 min par mg protéines (mesurée en présence de benzyl-viologène réduit).

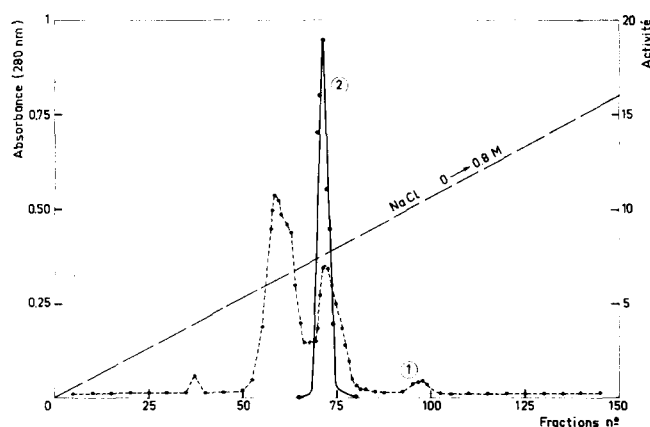


Fig. 2. Profil d'élution d'une fraction protéique (15 mg), riche en nitrate-réductase, reconstituée par complémententation chromatographiée sur une colonne de DEAE-cellulose équilibrée dans un tampon Tris-HCl 0.02 M (pH 7.7). Elution avec 750 ml d'un gradient de concentration linéaire de NaCl 0 à 0.8 M dans un tampon Tris 0.02 M (Courbe 1). Activité nitrate-réductase mesurée dans les différentes fractions (Courbe 2): $\mu\text{moles de NO}_3^-$ réduit par h.

avec le même tampon et l'élution est réalisée dans les mêmes conditions que précédemment. Le profil d'élution est illustré par la Fig. 2. L'activité nitrate-réductase se retrouve dans un même pic; les fractions actives sont à nouveau précipitées par du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ à 90% de saturation. Le précipité est repris par 5 ml de tampon Tris 0.02 M (pH 7.7) dialysé contre le même tampon puis filtré sur une colonne (2.5 cm \times 70 cm) de Bio-gel A 1.5 M équilibrée dans le même tampon contenant du NaCl 0.1 M. Le profil d'élution des protéines, actives enzymatiquement, est illustré par la Fig. 3.

L'examen du Tableau II montre que la nitrate-réductase a été purifiée environ 30 fois avec un rendement de purification, malheureusement très faible. L'enzyme ainsi obtenue peut être conservée une semaine entre 0 et 4° en solution dans un tampon Tris 0.02 M à pH 7.7 contenant du NaCl 0.3 M, la fraction active est colorée en jaune.

Des essais préliminaires de détermination de masse moléculaire par filtration sur Bio-gel A 1.5 M (de 50 à 100 mesh), par comparaison à des échantillons d'alcool-déshydrogénase (baker's yeast) et de glutamate-déshydrogénase purifiées "Sigma" de poids moléculaires respectivement égaux à 150 000 et à 35 000, nous ont donné

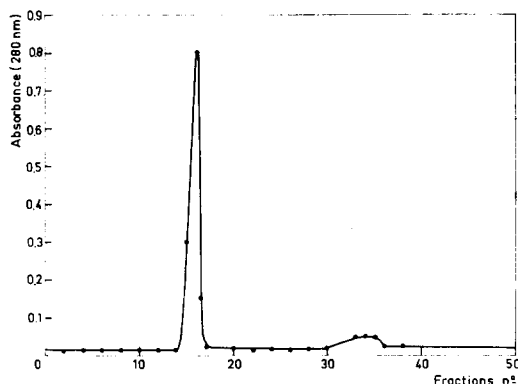


Fig. 3. Filtration sur Bio-gel A 1.5 M d'une fraction protéique partiellement purifiée et élution avec un tampon Tris 0.02 M contenant du NaCl 0.3 M (pH 7.7).

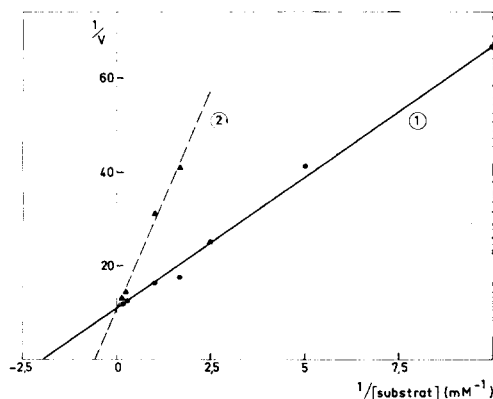


Fig. 4. Influence de la concentration en NO_3^- (Courbe 1) et en ClO_3^- (Courbe 2) sur la vitesse de réduction de ces substrats mesurée en présence de benzyl-viologène réduit, et de nitrate-réductase purifiée. Représentation graphique selon la méthode de Lineweaver-Burk.

des valeurs approximatives pour la nitrate-réductase de l'ordre de 250 000. Cependant de telles valeurs ne peuvent être données qu'à titre indicatif.

Propriétés de la nitrate-réductase soluble purifiée

La fraction purifiée catalyse la réduction du nitrate et du chlorate. Dans de telles conditions les seuls donateurs d'électrons utilisables sont le benzyl-viologène et le FMN réduits. Les pyridine-nucléotides réduites, le FAD, la riboflavine réduits, le formiate et la ménadione sont sans effet. Les constantes de Michaëlis déterminées en présence de KNO_3 à l'égard du benzyl-viologène réduit et du FMNH_2 sont respectivement égales à $6 \cdot 10^{-4}$ M et $1 \cdot 10^{-4}$ M. L'influence de la concentration en KNO_3 et KClO_3 sur la vitesse initiale de réduction de ces deux substrats mesurée en présence de benzyl-viologène réduit est illustrée par la Fig. 4. Ces K_m à l'égard du KNO_3 et du KClO_3 donnent des valeurs respectivement égales à: $5.2 \cdot 10^{-4}$ M et $18 \cdot 10^{-4}$ M. Le v_{\max} est identique pour ces deux substrats. L'activité spécifique mesurée en présence de FMN réduit représente 26 % de l'activité mesurée dans les mêmes conditions en présence de benzyl-viologène réduit (Tableau I).

En fonction du pH, l'activité enzymatique présente un optimum entre 6.5 et 7.2.

La nitrate-réductase purifiée se comporte comme une enzyme thermorésistante et l'incubation pendant 10 min à une température de 60° n'entraîne aucune perte d'activité. Les cinétiques d'inactivation thermique déterminées à 63° nous ont permis de calculer le temps de demi vie pour cette température qui est égal à 30 min; cette valeur est identique à celle que nous avons trouvée pour l'enzyme particulière de la souche sauvage.

Propriétés de la nitrate-réductase particulière obtenue par complémentation

La complémentation, réalisée avec les surnageants des deux mutants *chl A*⁻ et *chl B*⁻, conduit à la formation de particules enzymatiquement actives qui peuvent être séparées par ultra-centrifugation, à $220\,000 \times g$ pendant 90 min reprises par du tampon Tris 0.02 M (pH 7.2) après lavage dans le même tampon, pour donner une préparation particulière. Les propriétés de la nitrate-réductase de ces particules ont été étudiées et les valeurs obtenues rassemblées dans le Tableau I; il est important de souligner que l'enzyme particulière, comme l'enzyme soluble de la même origine, est active en présence de NO_3^- ou ClO_3^- (18 à 25 unités) mais ne catalyse pas la réduction de ces deux substrats en présence de pyridine-nucléotides réduits.

Influence des inhibiteurs sur la nitrate-réductase

Cette étude a été réalisée de manière comparative en présence de KNO_3 , de benzyl-viologène réduit et de nitrate-réductase sous ses différentes formes: (1) particulière et provenant des fractions membranaires de la souche sauvage, (2) particulière mais obtenue par complémentation, (3) purifiée. Il résulte des valeurs consignées dans le Tableau III que:

(a) le KCN et le NaN_3 sont des inhibiteurs aussi efficaces sur les trois formes de la nitrate-réductase; (b) les inhibiteurs spécifiques des groupements SH ne sont actifs que sur la forme soluble purifiée; (c) un inhibiteur spécifique du cytochrome b_1 comme le 2-*n*-heptyl-4-hydroxyquinoléine-*N*-oxyde est actif uniquement sur les formes particulières.

TABLEAU III

INFLUENCE DE DIFFÉRENTS INHIBITEURS SUR L'ACTIVITÉ NITRATE-RÉDUCTASE (SOLUBLE ET PARTICULAIRE) MESURÉE AVEC LE BENZYL-VIOLOGÈNE RÉDUIT ET LE KNO_3

Inhibiteur	Concn. (M)	Inhibition (%)		
		Enzyme purifiée	Particules "néo-formées"	Particules natives (souche sauvage)
KCN	10^{-2}	82	95	100
	10^{-3}	50	90	90
NaN_3	10^{-3}	90	90	90
	10^{-4}	87	76	50
Ascorbate	10^{-4}	84	0	0
Thioglycollate	10^{-3}	82	0	0
EDTA	10^{-3}	82	70	70
	10^{-4}	82	—	—
Iodacetate	10^{-2}	0	25	0
2,2'-Dipyridyl	10^{-2}	17—25	27	0
Dithiol	10^{-3}	100	100	100
2-n-Heptyl-4-hydroxyquinoléine- N-oxyde	10^{-3}	0	55	67
N, N'-Diéthyl thiocarbamate	10^{-3}	0	0	26
N-Ethyl-maléimide	10^{-3}	76	0	0
	10^{-4}	76	0	0
Hydroxy-mercuri- benzoate	10^{-3}	70	0	0
	10^{-4}	70	0	0

L'étude de l'action de la N-éthyl-maléimide (10^{-3} ou 10^{-4} M) permet de constater que l'incubation de l'enzyme purifiée en présence de KNO_3 diminue l'efficacité de l'inhibition provoquée par ce composé et ramène le pourcentage d'inhibition de 76 à 22%.

Enfin il convient de souligner que l'enzyme purifiée est particulièrement sensible à l'action de l'oxygène et de ce fait doit toujours être conservé sous vide ou sous atmosphère d'azote.

Influence de la phospholipase C

Le traitement préalable des surnageants des mutants *chl A⁻* et *chl B⁻* d'*E. coli* K12 par la phospholipase C (6 mg/ml d'extrait) à 37° pendant 30 min, donne des préparations qui complètent sans qu'il y ait formation de particules. L'activité nitrate-réductase totale ainsi reconstituée qui correspond à 50% environ de l'activité reconstituée dans les conditions normales est intégralement de nature soluble.

L'enzyme obtenue au cours de cette complémentation a été ensuite isolée et purifiée suivant les normes déterminées pour l'enzyme soluble néo-formée au cours de complémentations normales. Les propriétés de cette nitrate-réductase après purification sont identiques à celles qui ont été déjà décrites.

Enfin il convient de souligner qu'après avoir soumis à l'action de la phospholipase C (6 mg pendant 30 min) les fractions purifiées de la nitrate-réductase reconstituée par complémentation, nous n'avons constaté aucune perte d'activité enzymatique.

DISCUSSION

La complémentation, réalisée avec les extraits des deux mutants *chl A⁻* et *chl B⁻* d'*E. coli* K12, dans les conditions que nous décrivons, aboutit à la reconstitution

de particules sédimentables par ultracentrifugation et porteuses d'activité nitrate-réductase; avec ces mêmes extraits, préalablement traités par la phospholipase C, donc dépourvus de phospholipides, la complémentation conduit uniquement à la formation de nitrate-réductase soluble. Dans la première phase de ce phénomène la reconstitution porte essentiellement sur la synthèse de l'enzyme sous sa forme soluble et à fin de la complémentation, soit après 3 h d'incubation et élimination des particules néo-formées, il reste encore dans le mélange réactionnel de l'activité nitrate-réductase soluble. L'extraction et la purification de cette enzyme nous ont permis d'apporter un certain nombre d'informations sur les propriétés de cette protéine. L'intérêt de nos observations réside essentiellement dans ce qu'elles ont été obtenues avec une enzyme soluble avant son intégration dans les fractions membranaires, elles diffèrent donc de celles obtenues dans les conditions classiques après solubilisation par divers traitements des membranes bactériennes.

La nitrate-réductase soluble, après purification, a des propriétés très voisines de celles décrites par LAM ET NICHOLAS¹⁶ pour l'enzyme solubilisée de *M. denitrificans*. Le poids moléculaire de notre nitrate-réductase (250 000) est très nettement inférieur à celui qui a été déterminé par TANIGUCHI ET ITAGAKI¹⁷ pour l'enzyme d'*E. coli* ($M_r = 1\,000\,000$) qui pourrait être cependant considérée comme un polymère proche de la forme particulaire.

L'enzyme purifiée est active à l'égard des ions NO_3^- et ClO_3^- en présence de benzyl-viologène réduit ou de FMNH₂ uniquement. L'absence d'activité de la protéine purifiée avec les pyridine-nucléotides réduits se retrouve avec les particules néo-formées qui, par ailleurs, sont actives en présence de formiate ou de ménadione. Ces résultats rejoignent les données de FORGET¹¹ et de LAM ET NICHOLAS¹⁶ qui ont montré que la nitrate-réductase A n'est pas une enzyme à NAD ou à NADP. De plus ils permettent de mieux comprendre l'importance des éléments protéiques ou phospholipidiques, qui, ajoutés à l'enzyme soluble, confèrent aux particules néo-formées des propriétés nouvelles permettant de coupler directement le formiate au NO_3^- sans toutefois atteindre le degré d'organisation le plus efficace qui est celui des particules natives d'origine membranaire préparées à partir des cellules de la souche sauvage d'*E. coli* K12 et qui peuvent coupler le NADH au NO_3^- .

Il convient par ailleurs de souligner le rôle des phospholipides dont la présence est nécessaire pour restaurer une activité multienzymatique telle que la formiate-nitrate-réductase. En ce qui concerne l'action des inhibiteurs des métaux lourds, nos travaux confirment ceux d'autres auteurs: le cyanure et l'azoture sont très actifs sur la protéine purifiée et les formes particulières. Par contre l'action du 2-*n*-heptyl-4-hydroxyquinoléine-*N*-oxyde ne se manifeste sur l'enzyme qu'à l'état particulaire, ce qui laisse penser que sous cette forme le transport des électrons jusqu'au nitrate s'effectue par l'intermédiaire du cytochrome b_1 et probablement aussi des quinones, ce qui rejoint les observations décrites par KRÖGER *et al.*²⁵ sur le rôle des quinones dans le transport des électrons chez *Proteus ruttgeri*.

Enfin l'observation la plus intéressante a été obtenue avec les inhibiteurs des groupements SH qui ne sont actifs que sur la forme soluble de l'enzyme, purifiée ou non; la nitrate-réductase sous ses formes particulières est par contre totalement insensible à l'hydroxy-mercuri-benzoate et à la *N*-éthyl-maléimide. Ce résultat semble indiquer que l'intégration de la nitrate-réductase soluble dans des structures complexes de type membranaire entraîne simultanément certaines modifications au

niveau du site actif de l'enzyme. Il convient cependant de souligner qu'un tel changement de conformation, s'il existe, n'entraîne aucune modification de l'affinité de l'enzyme pour son substrat (NO_3^- ou ClO_3^-) ou de son comportement à l'égard de la température.

RÉSUMÉ

Les préparations acellulaires, débarrassées de particules membranaires, des deux mutants pléiotropes *chl A*⁻ et *chl B*⁻ d'*Escherichia coli* K12, complètent pour reconstituer la nitrate-réductase sous sa forme soluble puis particulaire.

L'enzyme soluble, après purification, catalyse la réduction du NO_3^- et du ClO_3^- en présence de benzyl viologène ou de FMN réduits, est sensible au KCN et au NaN_3 à l'hydroxy-mercuri-benzoate et à la *N*-éthyl-maléimide (1 mM et 0.1 mM). Cette protéine de poids moléculaire 250000, insensible à l'action de la phospholipase et du 2-*n*-heptyl-4-hydroxyquinoléine-*N*-oxyde, s'associe aux phospholipides et au cytochrome *b*₁ pour donner des particules dont l'activité nitrate-réductase devient insensible à la *N*-éthyl-maléimide et à l'hydroxy-mercuri-benzoate mais sensible au 2-*n*-heptyl-4-hydroxyquinoléine-*N*-oxyde.

Ces résultats ouvrent la voie à une étude plus approfondie sur les mécanismes d'intégration d'une enzyme membranaire dans des structures particulières complexes sans avoir à solubiliser la membrane où se trouve localisé cette enzyme.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 M. PIECHAUD, J. PUIG, F. PICHINOTY, E. AZOULAY ET L. LE MINOR, *Ann. Inst. Pasteur*, 112 (1967) 24.
- 2 J. PUIG, E. AZOULAY ET F. PICHINOTY, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 264 (1967) 1507.
- 3 S. ADADYA, P. CLEARY ET A. CAMPBELL, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 61 (1968) 956.
- 4 J. PUIG ET E. AZOULAY, *C. R. Acad. Sci. Paris*, 264 (1967) 1916.
- 5 F. CASSE, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39 (1970) 429.
- 6 W. A. VENABLES ET J. GEST, *J. Mol. Gen. Genet.*, 103 (1968) 127.
- 7 J. PUIG, E. AZOULAY, F. PICHINOTY ET J. GENDRE, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 35 (1969) 659.
- 8 E. AZOULAY, J. PUIG ET P. COUCHOUD-BEAUMONT, *Biochim. Biophys. Acta*, 171 (1969) 238.
- 9 C. A. SCHNAITMAN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 37 (1969) 1.
- 10 K. ONODERA, B. ROLFE ET A. BERNSTEIN, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 39 (1970) 969.
- 11 P. FORGET, *Eur. J. Biochem.*, 18 (1971) 442.
- 12 E. AZOULAY, J. PUIG ET F. PICHINOTY, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 27 (1967) 270.
- 13 F. PICHINOTY, *Arch. Mikrobiol.*, 68 (1969) 51.
- 14 F. PICHINOTY, *Arch. Mikrobiol.*, 68 (1969) 65.
- 15 M. K. SHOWE ET J. A. DEMOSS, *J. Bacteriol.*, 95 (1968) 1305.
- 16 Y. LAM ET D. J. D. NICHOLAS, *Biochim. Biophys. Acta*, 178 (1969) 225.
- 17 S. TANIGUCHI ET E. ITAGAKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 44 (1960) 263.
- 18 J. VAN 'T RIET ET R. J. PLANTA, *FEBS Lett.*, 5 (1969) 249.
- 19 E. AZOULAY, *Xe Congr. Int. de Microbiologie, Recent Advances in Microbiology, Mexico, July, 1970*, (1971) 209.
- 20 J. MARCOT ET E. AZOULAY, *FEBS Lett.*, 13 (1971) 137.
- 21 E. AZOULAY, S. MUTAFSCHIEV ET M. L. MARTINS ROSADO DE SOUSA, *Biochim. Biophys. Acta*, 237 (1971) 579.
- 22 F. PICHINOTY, *Ann. Inst. Pasteur*, 104 (1963) 219.
- 23 B. F. RIDER ET M. G. MELLON, *Ind. Eng. Chem.*, 18 (1946) 96.
- 24 O. H. LOWRY, J. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 25 A. KRÖGER, V. DADAK, M. KLINGENBERG ET F. DIEMER, *Eur. J. Biochem.*, 21 (1971) 322.