

BBA 47048

# ETUDE DU MÉCANISME DE L'INFLUENCE DU pH EXTRACELLULAIRE SUR LA SYNTHÈSE DU COMPLEXE OXYDASIQUE (CYTOCHROMES $a+a_3$ ) CHEZ *BACILLUS COAGULANS*

## RELATION AVEC "L'EFFET GLUCOSE" ET RÔLE DE LA COPROPORPHYRINE III EXCRÉTÉE

RAYMOND FRADE et PAULETTE CHAIX

Laboratoire de Chimie Biologique, U.E.R. 58, Université Pierre et Marie Curie, 96, Bd Raspail, 75006 Paris (France)

(Received July 28th, 1975)

### SUMMARY

*Study of the mechanism of the effect of extracellular pH on the synthesis of the oxidative complex (cytochrome  $a+a_3$ ) of *Bacillus coagulans*: relationship to the "glucose effect" and role of excreted coproporphyrin III*

During the "respiratory adaptation" of *Bacillus coagulans*, it was possible to dissociate the kinetics of cytochrome  $a$  and  $a_3$  synthesis with carbon monoxide. The synthesis of cytochrome  $a_3$  is preferentially repressed when the pH of the incubation medium is pH 6.5 instead of pH 5.5. However, though the total synthesis of tetrapyrrole compounds is the same at both pH values, the excretion of coproporphyrin III is much increased at pH 6.5. *Bacillus coagulans*, sensitive to the "glucose effect", shows the "pH effect" only in the presence of high glucose concentrations. The repression of the oxidase complex synthesis by a slight increase of the extracellular pH appears directly related to the increase of the extracellular coproporphyrin III.

---

### RÉSUMÉ

Il a été possible, à l'aide de l'oxyde de carbone, de dissocier les cinétiques de synthèse du cytochrome  $a$  et du cytochrome  $a_3$  au cours de "l'adaptation respiratoire" de *Bacillus coagulans*. La synthèse du cytochrome  $a_3$  est, par rapport aux essais à pH 5.5, préférentiellement réprimée quand le pH du milieu d'incubation est égal à 6.5. Cependant, alors que la quantité totale de composés tétrapyrroliques synthétisés est la même à pH 5.5 et à pH 6.5, l'excretion de coproporphyrine III est plus grande à pH 6.5. *Bacillus coagulans*, sensible à "l'effet glucose", ne présente cet "effet pH" qu'en présence de glucose à forte concentration. Une analyse quantitative de ces résultats montre que la répression de la synthèse du complexe oxydasique

---

Abbréviations: *Bacillus*<sub>5.5</sub> ou *Bacillus*<sub>6.5</sub>, *Bacillus coagulans* cultivé sur milieu complexe glucosé à 5 % dont le pH est maintenu constant par pH stat soit à pH 5.5, soit à pH 6.5. "Composés copro": coproporphyrinogène III + coproporphyrine III.

par une faible augmentation du pH extracellulaire (de 5.5–6.5) est directement reliée à une augmentation de l'excrétion de coproporphyrine III.

## INTRODUCTION

Ayant précédemment [1] mis en évidence le fait qu'une faible variation de pH de 5.5–6.5 du milieu de culture ou du milieu "d'adaptation respiratoire" [2] de *Bacillus coagulans* influence la synthèse du système cytochromique et, d'une façon prépondérante, celle du cytochrome  $a_3$ , nous avons tenté d'analyser cet "effet pH".

Nos expériences ont eu principalement pour objet de préciser dans quelle mesure cet "effet pH" s'exerçait au niveau des voies de synthèse des groupements hématiniques et dans quelle mesure il était ou non associé à "l'effet glucose".

Nos résultats établissent notamment l'existence d'une corrélation entre excrétion de coproporphyrine III et répression de la synthèse des cytochromes. Les hypothèses qu'ils suggèrent à propos du mécanisme de la répression très spécifique de la synthèse du cytochrome  $a_3$  sous l'effet d'une variation du pH du milieu glucosé de 5.5 à 6.5 sont détaillées dans la discussion.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

Les conditions de culture et de récolte de *B. coagulans* ATCC 11.369, les conditions "d'adaptation respiratoire", la méthode de fractionnement et d'isolement des membranes totales ainsi que les méthodes de dosages spectrophotométriques des cytochromes en absence ou en présence de CO sont exposées dans de précédentes publications [1–3].

### Identification et dosage de coproporphyrine III

L'extraction des porphyrines est effectuée par la technique décrite par Brouillet et al. [4].

Les chromatographies des porphyrines sur plaque de silice sont faites d'après la technique d'Eriksen [5] en présence d'échantillons témoins (uroporphyrine III, coproporphyrine III et protoporphyrine IX) obtenus par hydrolyse acide des esters commerciaux correspondants.

La coproporphyrine III en solution dans 3 M HCl est dosée spectrophotométriquement à  $\lambda = 402$  nm, en utilisant le coefficient d'extinction  $\epsilon_{mM} = 489$ , d'après la technique de Labbe [6].

La détermination des proportions de forme oxydée (coproporphyrine III) ou de forme réduite (coproporphyrinogène III) des "composés copro" est effectuée en dosant dans une première prise d'essais, la quantité de coproporphyrine III extraite par HCl 3 M, et dans une deuxième prise d'essais, la quantité totale des "composés copro", après oxydation totale du coproporphyrinogène III par l'iode (0.1 M) (suivie d'une réduction par la cystéine de l'iode en excès). La différence entre les deux dosages donne la quantité de coproporphyrinogène III présente.

## RÉSULTATS

(I) *Cinétiques de la synthèse du cytochrome a et du cytochrome  $a_3$  au cours d'essais "d'adaptation respiratoire" de *B. coagulans*, en milieu minimum glucosé à 3 %, soit à pH 5.5, soit à pH 6.5*

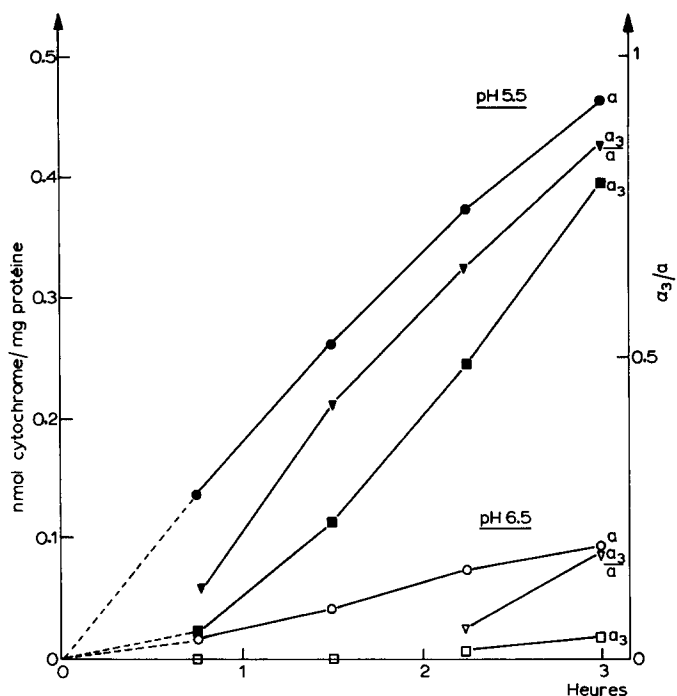


Fig. 1. Cinétiques de synthèse du cytochrome *a* et du cytochrome *a*<sub>3</sub> au cours d'essais "d'adaptation respiratoire" de *B. coagulans* sur milieu minimum glucosé (3 %) neutralisé par 2 M KOH à pH 5.5 et à pH 6.5. La teneur en cytochrome *a* et cytochrome *a*<sub>3</sub> des membranes totales est déterminée par spectres de différence (réduit dithionite/état oxydé) et (réduit dithionite+CO/réduit dithionite) à  $\lambda = 442$  nm et elle est exprimée en nmol de cytochromes/mg de protéines [8].

Les teneurs en cytochrome *a* et en cytochrome *a*<sub>3</sub> ont été déterminées, à  $\lambda = 442$  nm, d'après les spectres de différence réduit (dithionite)/oxydé et réduit (dithionite)/réduit(dithionite)+CO des préparations de membranes totales de *B. coagulans* d'après la technique décrite par Broberg et Smith [7].

Les cinétiques de leur synthèse sont représentées sur la Fig. 1. On voit que: à pH 5.5, c'est-à-dire, quand la synthèse du complexe oxydasique (cytochromes *a*+*a*<sub>3</sub>) est la plus élevée, il y a en premier lieu, synthèse du cytochrome *a*. Ce n'est qu'après 30–45 min que la teneur en cytochrome *a*<sub>3</sub> atteint des concentrations appréciables. On assiste ensuite à une accélération de la synthèse du cytochrome *a*<sub>3</sub> alors que la vitesse de synthèse du cytochrome *a* diminue; à  $t = 45$  min, le cytochrome *a*<sub>3</sub> représente 10 % de la totalité des cytochromes *a*+*a*<sub>3</sub> et à  $t = 180$  min, il en représente 45 %.

à pH 6.5, les cinétiques de synthèse du cytochrome *a* et du cytochrome *a*<sub>3</sub> sont plus lentes et c'est la synthèse du cytochrome *a*<sub>3</sub> qui est le plus fortement réprimée par la variation de pH du milieu extracellulaire de 5.5 à 6.5: à  $t = 45$  min, le cytochrome *a*<sub>3</sub> n'est pas décelable et à  $t = 180$  min, il ne représente que 15 % de la totalité des cytochromes *a*+*a*<sub>3</sub>.

Dans tous les cas, la synthèse du cytochrome *a* précède celle du cytochrome *a*<sub>3</sub>. Ces synthèses sont inhibées par le chloramphénicol (200  $\mu$ g/ml).

(II) Comparaison entre les quantités des composés tétrapyrroliques synthétisés par *Bacillus*<sub>5.5</sub> et par *Bacillus*<sub>6.5</sub> dans des conditions homologues données

Le fait que la variation de la teneur en cytochrome  $a_3$  de *Bc*<sub>5.5</sub> et de *Bc*<sub>6.5</sub> se manifeste par la variation d'intensité de son spectre dont les propriétés sont étroitement liées à la nature de son groupement prosthétique (hème a), nous a incité à rechercher dans quelle mesure l'effet du pH extracellulaire s'exerçait sur telle ou telle étape de sa synthèse. Pour ce faire, nous avons comparé (toutes choses égales d'ailleurs), la nature et la quantité des différents composés tétrapyrroliques (hémoprotéines ou composés tétrapyrroliques libres) présents dans le contenu cellulaire (cytosol-membranes) et dans le milieu extracellulaire (milieu de culture ou milieu d'adaptation).

(1) Mise en évidence d'une excrétion de coproporphyrine III. Il nous a été possible d'extraire du milieu extracellulaire un pigment absorbant à  $\lambda = 401.5$  nm

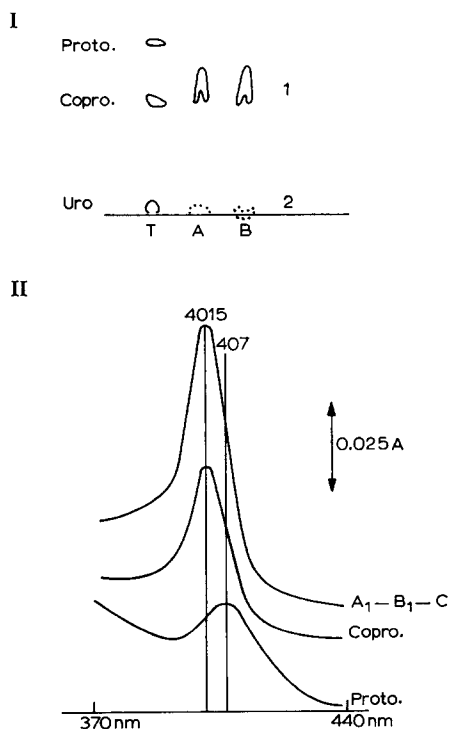


Fig. 2. Identification de la coproporphyrine III présente dans les cytosols et les milieux de culture de *B. coagulans* cultivé sur milieu complexe glucosé soit à pH 5.5, soit à pH 6.5. (I) Chromatographie sur plaque de silice dans le solvant 2,6-lutidine/H<sub>2</sub>O (5:3, v/v) en présence de vapeurs d'ammoniac. A, dépôt du cytosol de *Bacillus*<sub>5.5</sub>; B, dépôt du cytosol de *Bacillus*<sub>6.5</sub>; T, dépôt des témoins: Proto, protoporphyrine IX; Copro, coproporphyrine III; Uro, Uroporphyrine III. (II) Spectre d'absorption de la porphyrine extraite: A<sub>1</sub> et B<sub>1</sub>, à partir des taches 1 et 2 des dépôts A et B (cf. chromatographie ci-dessus); C, à partir des milieux de culture à pH 5.5 ou à pH 6.5. Spectres témoins de la Coproporphyrine III et de la protoporphyrine IX.

TABLEAU I

Comparaison des synthèses des composés tétrapyrroliques effectuées par *B. coagulans* cultivé en aérobiose sur milieu complexe glucosé (5 %) soit à pH 5.5, soit à pH 6.5. Dans les deux cas, la détermination est effectuée en phase exponentielle de croissance (à  $A = 0.7$ ) et pour 3 l de milieu (10 g poids frais de cellules). La teneur en cytochromes  $a+a_3$  ( $\lambda_{603\text{ nm}}$ ) et en cytochromes  $b+c$  ( $\lambda = 560\text{ nm}$ ) est déterminée par spectre de différence (réduit dithionite/oxydé) sur la préparation des membranes totales des cellules. La teneur en composés copro intracellulaires est déterminée à  $\lambda = 402\text{ nm}$  sur la préparation de cytosol de ces cellules (surnageant  $250\,000 \times g$ ). La teneur en coproporphyrine III extracellulaire est déterminée à  $\lambda = 402\text{ nm}$  sur le milieu extracellulaire. Les résultats, exprimés en nmol, sont les moyennes de quatre séries d'expériences réalisées dans les mêmes conditions.

	Cultures aérobies à	
	pH 5.5	pH 6.5
Cytochromes ( $a+a_3$ )	38.4	4.8
( $b+c$ )	12.8	9.6
( $a+a_3$ )+(b+c)	51.2	14.4
Composés copro. intracellulaires	4.6	2.6
Coproporphyrine extracellulaire	74	119
Coproporphyrine total	78.6	121.6
( $a+a_3$ )+(b+c)+Copro. total	129.8	136

TABLEAU II

Comparaison des synthèses des composés tétrapyrroliques effectuées par *B. coagulans* au cours d'essais "d'adaptation respiratoire" sur milieu minimum glucosé, soit à pH 5.5, soit à pH 6.5. Après une croissance en anaérobiose (indifféremment à pH 5.5 ou à pH 6.5) sur milieu complexe glucosé, les cellules sont récoltées à  $A = 0.7$  et lavées par du tampon phosphate  $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 M, pH 7. A  $t = 0\text{ min}$ , 24 g de cellules sont incubées à pH 5.5 dans 1600 ml de milieu minimum glucosé dans un ballon de 6 l (aération 1 l d'air/min per l de milieu) et 24 g de cellules sont incubés, dans les mêmes conditions de volume et d'aération, à pH 6.5. A  $t = 0, t = 45, t = 90, t = 135$  et  $t = 180\text{ min}$ , la détermination des composés tétrapyrroliques est réalisée, chaque fois, sur 6 g de poids frais de cellules incubées, soit à pH 5.5, soit à pH 6.5. Les quantités totales des cytochromes  $a+a_3$ , cytochromes  $b+c$  de composés copro. intracellulaires et coproporphyrine extracellulaire sont déterminées comme précédemment (cf. Tableau I). Les résultats, exprimés en nmol, sont les moyennes de trois séries d'expériences réalisées dans les mêmes conditions.

	Adaptation respiratoire à									
	pH 5.5					pH 6.5				
	$t_0$	$t_{45}$	$t_{90}$	$t_{135}$	$t_{180}$	$t_0$	$t_{45}$	$t_{90}$	$t_{135}$	$t_{180}$
Cytochromes ( $a+a_3$ )	0	5	10.9	17.3	24.2	0	1.2	1.6	2.4	3.2
( $b+c$ )	0	2.5	6	10	13	0	2	5.5	8	12
( $a+a_3$ )+(b+c)	0	7.5	16.9	27.3	37.2	0	3.2	7.1	10.4	15.2
Composés copro. intracellulaires	1.8	1.9	2.4	3.3	4.5	1.8	0.5	1.2	1.5	1.6
Copro.(ine) extracellulaire	0	7.6	21	36.3	50.5	0	14.5	30.4	56	72.9
Copro. total	1.8	9.5	23.4	39.6	55	1.8	15	31.6	57.5	74.5
( $a+a_3$ )+(b+c)+copro. total	1.8	17	40.3	66.9	92.2	1.8	18.2	38.7	67.9	89.7

(cf. Fig. 2) identifié par chromatographie sur plaque de silice comme étant de la coproporphyrine III\*.

La quantité de coproporphyrine III excrétée croît en fonction de la durée de l'incubation; elle est influencée par la variation du pH du milieu extracellulaire.

Il ne nous a été possible de déceler ni protohème, ou hème a libre, ni produit de dégradation du noyau tétrapyrrolique tel que la bilirubine [9].

(2) *Bilans comparés des composés tétrapyrroliques synthétisés par Bacillus<sub>5.5</sub> et par Bacillus<sub>6.5</sub>*. Ces bilans ont été déterminés soit au cours de cultures aérobies, en phase exponentielle ( $A = 0.7$ ) (taux de croissance égal à 1.5 identique pour *Bacillus<sub>5.5</sub>* et pour *Bacillus<sub>6.5</sub>*), soit au cours d'essais "d'adaptation respiratoire" à pH 5.5 ou à pH 6.5 (cf. Tableaux I et II).

Pour une expérience donnée, ils représentent la somme, exprimée en nmol, des quantités de cytochromes  $a+a_3$  et de cytochromes  $(b+c)$  intramembranaires; des "composés copro" du cytosol, et de la coproporphyrine III du milieu extracellulaire.

Les quantités de catalase synthétisées, calculées d'après des mesures polarographiques de l'activité catalasique, en prenant comme activité spécifique moléculaire  $10^{-7}$  [10], sont de l'ordre de  $10^{-2}$  nmol, c'est-à-dire négligeables vis-à-vis des quantités des autres composés tétrapyrroliques considérés.

En ce qui concerne le cytochrome O [1], la mise en évidence d'une faible variation de sa teneur en fonction du pH, du même ordre que celle des cytochromes b [3] auxquels on a tendance à l'assimiler [11, 12], nous ont conduit à ne pas en tenir compte dans les bilans.

Ces bilans montrent que la quantité totale de molécules tétrapyrroliques synthétisées par *Bacillus<sub>5.5</sub>* et par *Bacillus<sub>6.5</sub>*, est sensiblement la même, alors que la quantité de cytochromes  $a+a_3$  synthétisés par *Bacillus<sub>6.5</sub>* est abaissée de 85 % par rapport à celle de *Bacillus<sub>5.5</sub>* et que la quantité de coproporphyrine III excrétée par *Bacillus<sub>6.5</sub>* est toujours plus grande (d'environ 30 %) que celle de *Bacillus<sub>5.5</sub>*.

A noter que dans le milieu extracellulaire, on ne trouve que de la coproporphyrine III alors que dans le cytosol il existe à la fois de la coproporphyrine III et du coproporphyrinogène III; cette dernière substance représente 60-75 % de la totalité des composés copro intracellulaires quel que soit le pH extracellulaire.

Ces résultats, compte tenu de ce que l'on sait à propos de la voie de synthèse des hèmes (résumées dans le schéma proposé par Lemberg et Barrett [13]) permettent de conclure que: d'une part, l'accroissement du pH du milieu est sans influence sur les voies de synthèse du noyau tétrapyrrolique jusqu'au coproporphyrinogène; d'autre part, l'accroissement du pH entraîne un blocage partiel de la synthèse du protohème se manifestant par une excrétion accrue de coproporphyrine III.

(III) *Mise en évidence d'un effet répresseur du glucose vis-à-vis de la synthèse des cytochromes de B. coagulans cultivé en aérobiose: Relation entre effet pH et effet glucose*

L'effet répresseur de la variation du pH extracellulaire de 5.5 à 6.5 sur la synthèse des cytochromes et plus particulièrement sur la synthèse du cytochrome  $a_3$ , s'est toujours manifesté au cours d'expériences réalisées avec *B. coagulans*, soit cultivé

\* Cette identification a été réalisée en collaboration avec Melle N. Brouillet [4] que nous tenons à remercier très vivement.

en milieu complexe glucosé à 5 %, soit au cours d'essais "d'adaptation respiratoire" en milieu glucosé à 3 ou à 5 %.

Sachant d'une part que le glucose à de telles concentrations est susceptible de réprimer la synthèse de nombreux enzymes (effet glucose) [14-21], et sachant d'autre part que cet effet porte notamment sur la synthèse du système respiratoire [22-25], en affectant en premier lieu la synthèse des cytochromes de type *a* [26-30], il nous a paru intéressant de savoir si la variation de la concentration en glucose du milieu de culture jouait un rôle dans "l'effet répreuseur" du pH (de 5,5 à 6,5) sur la synthèse du cytochrome *a*<sub>3</sub>. Pour ce faire, *B. coagulans* a été cultivé sur milieu complexe soit en présence de glucose 5 % (*I* = 1.5), ou en présence de glucose 0.5 % (*I* = 0.7), soit en absence de glucose (*I* = 0.6), soit en présence de succinate de sodium 5 % (*I* = 1.3), tantôt à pH 5.5 tantôt à pH 6.5. Quel que soit le taux de croissance, les cellules ont été récoltées en phase exponentielle de croissance à *A* = 0.7. Le dosage des cytochromes a été fait sur les membranes totales.

Les résultats de ces expériences sont présentés dans les Tableaux III et IV.

D'après le Tableau III, on voit qu'à un pH donné, 5.5 ou 6.5, lorsque la concentration en glucose du milieu passe de 0 à 5 %, la teneur en cytochromes *a*+*a*<sub>3</sub> et *b*+*c* des membranes totales diminue. Ainsi, est-il mis en évidence que le système de synthèse des cytochromes de *B. coagulans* est sensible à "l'effet glucose". On voit de plus: à pH 5.5, que la présence de glucose 5 % entraîne une diminution de synthèse des cytochromes *a*+*a*<sub>3</sub> de deux fois et de synthèse des cytochromes *b*+*c* de trois fois, par rapport aux cytochromes synthétisés dans un milieu complexe non glucosé; à pH 6.5, que la présence de glucose 5 % entraîne une diminution de synthèse des cytochromes *a*+*a*<sub>3</sub> de 15 fois, et une diminution de synthèse des cytochromes *b*+*c* de 10 fois par rapport aux cytochromes synthétisés dans un milieu complexe non-glucosé.

D'autre part, d'après les résultats présentés dans le Tableau IV, on voit que: à pH 5.5, le rapport des concentrations cytochrome *a*<sub>3</sub>/cytochromes *a*+*a*<sub>3</sub> reste constant quelle que soit la concentration en glucose; la teneur en cytochrome *a*<sub>3</sub> représente toujours environ 45 % de la concentration totale en cytochromes *a*+*a*<sub>3</sub>;

TABLEAU III

Concentration en cytochromes *a*+*a*<sub>3</sub> et cytochromes *b*+*c* en nmol/mg protéine des membranes totales de *B. coagulans* récolté à *A* = 0.7 en phase exponentielle de croissance aérobie sur milieu complexe additionné ou non de glucose et maintenu soit à pH 5.5, soit à pH 6.5. \* Teneur en cytochromes *a*+*a*<sub>3</sub> et *b*+*c* lorsque *B. coagulans* est cultivé soit à pH 6.5 sur milieu complexe sans glucose, soit à pH 5.5 ou à pH 6.5 sur milieu complexe plus succinate de sodium 5 %. La détermination est faite par spectre de différence (réduit dithionite/oxydé) sur des membranes totales mises en suspension dans du tampon phosphate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) à pH 7.0.

Cultures sur milieu complexe	Cytochromes					
	<i>(a+a<sub>3</sub>)</i>		<i>(b+c)</i>		<i>(a+a<sub>3</sub>)</i>	
	(nmol/mg protein)		(nmol/mg protein)		<i>(b+c)</i>	
	pH 5.5	pH 6.5	pH 5.5	pH 6.5	pH 5.5	pH 6.5
+ Glucose 5 %	0.740	0.086	0.22	0.12	> 1	< 1
+ Glucose 0.5 %	1.300	0.790	0.69	0.60	> 1	≥ 1
sans Glucose	1.390	1.300*	0.68	1.20*	> 1	≥ 1*

TABLEAU IV

Concentration en cytochrome  $a$  et en cytochrome  $a_3$  (nmol/mg protéines) des membranes totales de *B. coagulans* récolté à  $A = 0.7$ , en phase exponentielle de croissance aérobie, sur milieu complexe additionné ou non de glucose et maintenu soit à pH 5.5 soit à pH 6.5. (\* mêmes conditions qu'au Tableau III). La concentration en cytochromes  $a+a_3$  est déterminée par spectre de différence (réduit CO/réduit). La concentration en cytochrome  $a$  est déterminée par différence entre la concentration des cytochromes  $a+a_3$  et celle du cytochrome  $a_3$ .

Cultures sur milieu complexe	Cytochromes					
	$a$ (nmol/mg protein)		$a_3$ (nmol/mg protein)		$\frac{a_3}{a+a_3}$	
	pH 5.5	pH 6.5	pH 5.5	pH 6.5	pH 5.5	pH 6.5
+Glucose 5 %	0.407	0.073	0.333	0.013	0.45	0.15
+Glucose 0.5 %	0.715	0.553	0.585	0.237	0.45	0.30
sans Glucose	0.764	0.715*	0.626	0.585*	0.45	0.45*

à pH 6.5, le rapport des concentrations cytochrome  $a_3$ /cytochromes  $a+a_3$  varie suivant la concentration du glucose présent dans le milieu; la teneur en cytochrome  $a_3$  représente 15, 30 et 45 % de la concentration totale en cytochromes  $a+a_3$  en présence respectivement de glucose 5, 0.5 % ou sans glucose.

La concentration en cytochrome  $a_3$  est 45 fois plus élevée dans les membranes de *B. coagulans* cultivé sans glucose que dans celle de *B. coagulans* cultivé en présence de glucose 5 %. Dans les mêmes conditions, la variation de concentration du cytochrome  $a$  n'est que de 10 fois.

Il est important de souligner que lorsque *B. coagulans* est cultivé sur milieu complexe dans lequel le glucose est remplacé par le succinate de sodium 5 %, à pH 5.5 ou à pH 6.5, la teneur en cytochromes  $a+a_3$  et  $b+c$  des cellules est sensiblement égale à celle des cellules cultivées sur milieu complexe non-glucosé à pH 6.5.

Il apparaît ainsi que l'effet répresseur de l'accroissement de pH de 5.5 à 6.5; s'exerçant préférentiellement sur la synthèse du cytochrome  $a_3$ , n'a lieu que si le glucose est présent dans le milieu à concentration relativement élevée (5 %). Ceci témoigne d'une corrélation entre "effet glucose" et "effet pH" et ceci indique que l'effet répresseur, par diminution de la concentration en protons du milieu extérieur, sur la synthèse du cytochrome  $a_3$  doit s'exercer par l'intermédiaire d'un médiateur dont l'activité (ou la synthèse) est en relation avec le mécanisme de la répression par le glucose.

#### (IV) Recherche du médiateur responsable de la répression de la synthèse du système oxydasique (cytochromes $a+a_3$ )

Bien que nous ayons mis en évidence des variations importantes de la modalité de dégradation du glucose entre *Bacillus*<sub>5.5</sub> et *Bacillus*<sub>6.5</sub>, il ne paraît pas possible d'attribuer à l'un des produits de dégradation du glucose le rôle de médiateur responsable de la répression préférentielle de la synthèse du cytochrome  $a_3$  [3].

En revanche, nous avons constaté que dans les différentes conditions de culture précédemment décrites, plus la répression de synthèse des cytochromes est forte, et plus la quantité de coproporphyrine III excrétée augmente (cf. Fig. 3).



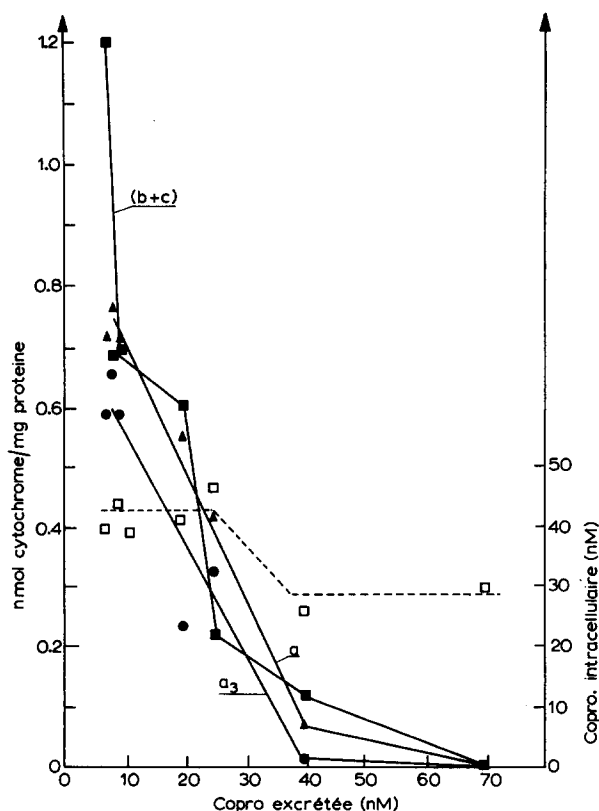


Fig. 3. Variation de la concentration en cytochromes  $a, a_3$  et  $b+c$  (nmol de cytochromes/mg de protéines) des membranes totales de *B. coagulans*, en fonction de la concentration de coproporphyrine III (nM) excrétée dans le milieu de culture (à  $A = 0.7$ ), dans différentes conditions de cultures (aérobiose ou anaérobiose, concentration en glucose et valeur de pH du milieu de culture variables (cf. Tableau V). (Copro excrétée: coproporphyrine III extracellulaire) (nM).  $\square$ — $\square$ , teneur en composés copro intracellulaires (nM).

A noter que dans ces différentes conditions, la concentration en composés copro intracellulaires varie peu.

En rapprochant ces faits, des observations de Charalampous [31] à propos de l'action inhibitrice de la coproporphyrine III sur la synthèse "de novo" du système oxydasique des mitochondries de levure, nous avons été conduits à examiner les effets de l'augmentation de la concentration extracellulaire de coproporphyrine III. Pour cela, nous avons ajouté dans des essais "d'adaptation respiratoire" réalisés à pH 5.5 (c'est-à-dire dans les conditions de synthèse maximum) de la coproporphyrine III 187.5 nmolaires (concentration déterminée à  $t = 180$  min à pH 6.5, cf. Tableau II). On constate, après 3 h d'incubation, que l'essai additionné de coproporphyrine III présente, par rapport à l'essai témoin (sans coproporphyrine III), une répression de la synthèse des cytochromes  $a+a_3$  de 80 % alors que la synthèse des cytochromes  $b+c$  n'est réprimée que de 20 %.

Ce résultat montre que la coproporphyrine III extracellulaire exerce un effet

répresseur sur la synthèse du système oxydasique (cytochromes  $a+a_3$ ) de *B. coagulans*.

## DISCUSSION ET CONCLUSION

En tenant compte à la fois des résultats expérimentaux qui viennent d'être exposés et des données bibliographiques s'y rapportant, nous nous proposons d'analyser quel pourrait être le mécanisme de la répression très spécifique de la synthèse du cytochrome  $a_3$  au sein du complexe oxydasique (cytochromes  $a+a_3$ ) sous l'effet d'une augmentation relativement faible du pH (de 5.5 à 6.5) du milieu (milieu de culture glucosé ou milieu "d'adaptation respiratoire" glucosé) que nous avons mises en évidence.

Chez les prokaryotes, le complexe oxydasique a été peu étudié et on ignore le nombre de sous-unités protéiques et le type de l'acide désoxyribonucléique contrôlant leurs synthèses.

Dans le cas de *B. coagulans*, nos expériences fournissent les précisions suivantes:

(1) La cinétique de synthèse du cytochrome  $a$  et celle du cytochrome  $a_3$  (dissociées en faisant intervenir CO) ne sont pas synchrones: la synthèse du cytochrome  $a$  précède celle du cytochrome  $a_3$  (cf. Fig. 1). Ceci a été aussi observé pour des cellules eukaryotes [32, 33] chez lesquelles les différences de réactivité du cytochrome  $a$  et du cytochrome  $a_3$  dépendraient d'un agencement du complexe oxydasique, commandé principalement par au moins sept sous-unités protéiques [34–36] synthétisées les unes par le système cytoplasmique, les autres par le système mitochondrial [37–39].

(2) Ces synthèses correspondent à une formation de protéines "de novo" car l'addition de chloramphénicol (200  $\mu\text{g/ml}$ ) à des essais "d'adaptation respiratoire" inhibe la synthèse des cytochromes  $a$  et  $a_3$ .

(3) Quel que soit le pH (5.5 ou 6.5) du milieu de culture anaérobie, c'est la variation du pH de "l'adaptation respiratoire" qui entraîne une répression préférentielle de la synthèse de l'oxydase.

Ainsi, la répression préférentielle du cytochrome  $a_3$  par rapport au cytochrome  $a$  de *B. coagulans* sous l'effet d'une faible variation du pH extracellulaire dépendrait de la répression préférentielle de la synthèse d'une ou plusieurs sous-unités protéiques du complexe oxydasique.

D'autre part, les bilans des composés tétrapyrroliques synthétisés par les cellules cultivées soit à pH 5.5 soit à pH 6.5 (cf. Tableaux I et II) montrent que les quantités totales des composés tétrapyrroliques formés sont sensiblement les mêmes pour les cellules cultivées à pH 5.5 ou à pH 6.5. Ainsi, "l'effet pH" n'interviendrait pas au niveau des étapes précédant la synthèse du coproporphyrinogène III.

Toutefois, ces bilans montrent aussi que l'excrétion de coproporphyrine III est influencée par la variation du pH extracellulaire de 5.5 à 6.5. Cette excrétion accrue de coproporphyrine III nous a conduit à mettre en évidence que l'addition de coproporphyrine III dans le milieu "d'adaptation respiratoire" de *B. coagulans*, à pH 5.5 (c'est-à-dire dans les meilleures conditions de synthèse) à la concentration déterminée lorsque les cellules sont incubées à pH 6.5, entraîne une inhibition préfé-

rentielle de la synthèse du complexe oxydasique, identique à celle provoquée par l'élévation à pH 6.5 du pH extracellulaire.

En 1969, Shanmugan et Berger [40] avaient supposé que la coproporphyrine III excrétée par *Rhodopseudomonas* sphéroïdes pouvait être responsable de la répression de la synthèse de l'apocatalase, et en 1974, Charalampous [31] a mis en évidence l'action inhibitrice spécifique de la coproporphyrine III sur la synthèse "de novo" des sous-unités protéiques du complexe oxydasique, dans les protoplastes de *Saccharomyces carlbergensis*.

D'une part, la présence de composés copro intracellulaires principalement sous forme réduite (sans action inhibitrice [31]) et d'autre part, le rôle inhibiteur de la "coproporphyrine III ajoutée" sur la synthèse des cytochromes  $a+a_3$  de *B. coagulans*, nous conduisent à penser que la synthèse des cytochromes  $a+a_3$  de *B. coagulans* est contrôlée par la concentration extracellulaire de coproporphyrine III excrétée par un mécanisme comportant un récepteur localisé au niveau de la membrane cytoplasmique.

De plus, nos expériences établissent que l'effet pH est corrélatif de l'effet glucose. Or, pour une valeur donnée de pH, l'excrétion de coproporphyrine III est d'autant plus forte que la concentration en glucose est plus élevée (cf. Tableau V).

Poulson et Polglase [41] ont mis en évidence que le glucose réprime la synthèse de la protoporphyrinogénase, enzyme catalysant la transformation du protoporphyrinogène IX en protoporphyrine IX.

L'oxygène moléculaire est nécessaire à la conversion du coproporphyrinogène III en protoporphyrine IX [42, 43]. En anaérobiose, il y a une importante excrétion de coproporphyrine III dans le cas de nombreuses cellules [44].

Ainsi, le passage de l'aérobiose à l'anaérobiose, ou la présence de glucose à forte concentration, peuvent par des mécanismes différents, avoir la même conséquence, à savoir le blocage de la conversion du coproporphyrinogène III en protoporphyrine IX et l'excrétion de coproporphyrine III.

En conclusion, les faits que nous avons mis en évidence (cf. Tableaux I et II) témoignent, à notre avis, de l'existence d'un système d'excrétion de coproporphyrine III particulièrement sensible aux variations du pH extracellulaire. Le coproporphyrinogène III peut, soit être transformé dans la cellule en protoporphyrine IX soit être excrété et oxydé en coproporphyrine III. Le pH apparaît dès lors comme un agent

TABLEAU V

Coproporphyrine III excrétée par *B. coagulans* ( $A = 0.7$ ) phase exponentielle de croissance) cultivé sur milieu complexe en fonction de l'aérobiose ou de l'anaérobiose, de la concentration en glucose et du pH (pH 5.5 ou pH 6.5) du milieu de culture. Les résultats exprimés en nmol/l de milieu de culture sont les moyennes d'expériences, dont le nombre est indiqué entre parenthèses.

pH	Cultures			
	Aérobies			Anaérobies
	Glucose: 0	0.5 %	5 %	5 %
5.5	8(4)	9(4)	25(4)	70(5)
6.5	7.5(4)	20(4)	40(4)	70(5)

régulateur. Lorsque la voie de conversion du coproporphyrinogène III en protoporphyrine IX est partiellement bloquée par le glucose à forte concentration, la coproporphyrine III excrétée atteindrait un seuil de concentration capable d'agir d'une façon plus ou moins directe sur l'acide desoxyribonucléique sous membranaire et sur la synthèse d'une ou plusieurs sous-unités protéiques du complexe oxydasique de *B. coagulans* entraînant sa modification structurale et fonctionnelle se manifestant par la répression du cytochrome  $a_3$  (cf. schéma donné réf. 3).

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 Frade, R. et Chaix, P. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 325, 424-432
- 2 Frade, R. et Chaix, P. (1973) *Biochimie* 55, 99-101
- 3 Frade, R. (1975) Thèse de Doctorat d'Etat, CNRS AO 11482, Paris
- 4 Brouillet, N., De Chateaubodeau, G. et Volland, C. (1975) *Biochimie* 57, 647-655
- 5 Eriksen, L. (1953) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 5, 155-157
- 6 Labbe, P. (1972) Thèse de Doctorat d'Etat, CNRS 5937, Paris
- 7 Broberg, P. L. et Smith, L. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 131, 479-489
- 8 Van Gelder, B. F. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 118, 36-46
- 9 Falk, J. E. (1964) *Porphyrins and Metalloporphyrins* p. B.B.A. Library, Elsevier Publishing Co., Amsterdam, London, New York
- 10 Ogura, Y. (1955) *Arch. Biochem. Biophys.* 57, 288-299
- 11 Cheah, K. S. (1969) *Biochim. Biophys. Acta* 180, 320-333
- 12 Daniel, R. M. (1970) *Biochim. Biophys. Acta* 216, 328-342
- 13 Lemberg, R. et Barrett, J. (1973) *Cytochromes*, p. 448, Academic Press, London.
- 14 Epps, H. M. R. et Gale, E. F. (1942) *Biochem. J.* 36, 619-623
- 15 Mac Quillan, A. M. et Halvorson, H. O. (1962) *J. Bacteriol.* 84, 31-36
- 16 Epstein, W., Naono, S. et Gros, F. (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24, 588-602
- 17 Duntle, W., Neumann, D. et Holzer, H. (1968) *Eur. J. Biochem.* 3, 326-331
- 18 Pastan, I. et Perlman, R. L. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 5836-5842
- 19 Ullman, A. (1971) *Biochimie* 53, 3-8
- 20 Poole, R. K. et Lloyd, D. (1973) *Biochem. J.* 136, 195-207
- 21 Bonkowsky, H. L., Collins, A., Doherty, J. M. et Tschudy, D. P. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 320, 561-576
- 22 Ephrussi, B., Slonimski, P. P., Yotsuyanagi, Y. et Tavlitsky, J. (1956) *Compte Rendu Lab. Carlsberg* 26, 87-102
- 23 Polakis, E. S., Bartley, W. et Meck, G. A. (1964) *Biochem. J.* 90, 369-374
- 24 Negrotti, T. et Wilkie, D. (1968) *Biochim. Biophys. Acta* 153, 341-349
- 25 Labbe, P. (1972) *Biochimie* 54, 513-528
- 26 Linnane, A. W. (1964) *Oxidases and Related Redox systems* King, T. E., Mason, H. S. et Morrison, M. (eds.), Vol. 2, p. 1102
- 27 Reilly, C. et Sherman, F. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 95, 640-651
- 28 Jayaraman, J., Cotman, C., Mahler, H. R. et Sharp, C. W. (1966) *Arch. Biochem. Biophys.* 116, 224-251
- 29 Rickard, P. A. D., Moss, F. J., Philipps, D. et Mok, J. C. K. (1971) *Biotech. Bioeng.* Vol. XIII, 169-184
- 30 Mahler, H. R. et Perlman (1971) *Biochemistry* 10, 2979-2990
- 31 Charalampous, F. C. (1974) *J. Biol. Chem.* 236, 1850-1856
- 32 Chen, W. C. et Charalampous, F. C. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 294, 329-341
- 33 Poole, R. K., Lloyd, D. et Chance, B. (1974) *Biochem. J.* 138, 201-210
- 34 Tzagoloff, A., Rubin, M. S. et Sierra, M. F. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 301, 71-104
- 35 Mason, T. et Schatz, G. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 1355-1360
- 36 Rubin, M. S. et Tzagoloff, A. (1973) *J. Biol. Chem.* 248, 4275-4279
- 37 Sebald, W., Weiss, H. et Jackl, G. (1972) *Eur. J. Biochem.* 30, 413-417
- 38 Werner, S. (1974) *Eur. J. Biochem.* 43, 39-48
- 39 Von Ruecke, A., Werner, S. et Neupert, W. (1974) *FEBS Lett.* 47, 290-294

- 40 Shanmugan, K. T. et Berger, L. R. (1969) Arch. Mikrobiol. 69, 197-205
- 41 Poulson, R. et Polglase, W. J. (1974) FEBS Lett. 40, 258-260
- 42 Battle, A. M. del C., Benson, A. et Rimington, C. (1965) Biochem. J. 97, 731-740
- 43 Jacobs, N. J., Maclosky, E. R. et Jacobs, J. M. (1967) Biochim. Biophys. Acta. 148, 645-654
- 44 Lascelles, J. (1962) The Bacteria (Gunsalus, I. C. et Stanier, R. Y., eds.), Vol. III, p. 335, Academic, Press, New York