

## ÉTUDE DES MUTANTS CHLORATE-RÉSISTANTS CHEZ *ESCHERICHIA COLI* K 12

### I. RECONSTITUTION *IN VITRO* DE L'ACTIVITÉ NITRATE-RÉDUCTASE PARTICULAIRE CHEZ *ESCHERICHIA COLI* K 12

E. AZOULAY, J. PUIG ET P. COUCHOUD-BEAUMONT

*Laboratoire de Chimie Bactérienne, C.N.R.S., Marseille (France)*

(Reçu le 2 août, 1968)

---

#### SUMMARY

*Study of chlorate-resistant mutants in Escherichia coli K 12. I. Restoration in vitro of nitrate reductase activity in particular*

Using chlorate as a selective agent, we have isolated two genetically distinct types of chlorate-resistant mutants in *Escherichia coli* K 12: *chl A*<sub>15</sub> and *chl B*<sub>24</sub>. Both of these types are defective in several enzymatic activities specific to anaerobic respiration, and in particular, in nitrate reductase (NADH:nitrate oxidoreductase, EC 1.6.6.1) and hydrogen lyase (formate:cytochrome *b*<sub>1</sub> oxidoreductase, EC 1.2.2.1).

By mixing the cell-free extracts of these two mutants under certain precise conditions, we achieve a restoration of the nitrate reductase activity lost by each of the two organisms. When this complementation is performed with high-speed supernatants of the extracts ( $170\ 000 \times g$  for 90 min), particles having nitrate reductase activity are formed *de novo*. The behavior of these particles on sucrose gradients is the same as that of particles having nitrate reductase activity isolated from the wild strain. We describe the conditions for this type of complementation, the nature of the reaction, and the biochemical characteristics of the synthesized particles. The restoration of nitrate reductase activity by complementation occurs only in the absence of O<sub>2</sub>, in a narrow range of temperature and pH (32°, pH 7-7.6), and at certain protein concentrations. The kinetics of complementation were studied by following the increase of nitrate reductase activity. The reaction is complete after 2 h of incubation.

The enzymatic activity thus reconstituted is equal to 19 units/mg of total protein and represents a tenth of the wild-type activity. In the course of complementation 15-20% of the total soluble protein becomes particulate. This includes the cytochrome *b*<sub>1</sub> which was present in the soluble state in the mutant extracts.

From these results, we present an hypothesis as to the nature and role of the *chl B* gene product.

---

#### INTRODUCTION

L'introduction du chlorate dans des cultures anaérobies d'*Escherichia coli* permet de sélectionner des mutants déficients pour plusieurs activités enzymatiques spéci-

fiques de la respiration anaérobique<sup>1,2</sup>. L'effet pléiotrope de cette mutation caractérisée par la résistance au chlorate et la perte simultanée des activités nitrate-réductase (NADH:nitrate oxydo-réductase, EC 1.6.6.1) et hydrogène-lyase (formate:cytochrome *b*<sub>1</sub> oxydo-réductase, EC 1.2.2.1), peut s'expliquer par des altérations soit de la structure des constituants des "particules" où sont localisés ces enzymes soit du mécanisme d'assemblage de ces constituants.

Chez *E. coli* K 12 et chez *Proteus vulgaris* l'activité nitrate-réductase a été localisée dans des "particules" de taille définie et relativement homogènes situées dans la membrane cytoplasmique<sup>3</sup>. Ces "particules" ont été séparées des extraits acellulaires provenant de suspensions bactériennes par centrifugation dans un gradient de concentration linéaire en saccharose de 20-80% (en poids).

De plus, l'analyse des extraits "particulaires" obtenus à partir des cellules du mutant *chl A* d'*E. coli* K 12 sur un gradient de concentration de saccharose préparé dans les mêmes conditions que pour la souche sauvage permet de constater la disparition d'un important pic de protéines, qui chez les souches sauvages coïncide avec celui de l'activité enzymatique.

La résistance au chlorate chez *E. coli* K 12 apparaît pour trois groupes de mutants génétiquement distincts<sup>4</sup>: *chl A*, *chl B* et *chl C*. Une étude biochimique sommaire effectuée chez ces mutants a abouti à la reconstitution *in vitro* "d'architectures" à partir d'éléments protéiniques solubles et dans le cas particulier de la nitrate-réductase cette reconstitution a entraîné simultanément une apparition d'activité enzymatique. De ce fait nous disposons d'un modèle biochimique simple susceptible de fournir tous les éléments de résolution quant à la nature et au nombre de constituants participant effectivement au transport des électrons au cours de la réduction du nitrate.

#### MATÉRIEL ET MÉTHODES

*Organismes.* Souche d'*Escherichia coli* K 12. PA 601 (Institut Pasteur) No. 356 de notre collection et ses 2 mutants résistants au  $KClO_3$ . Le premier 356<sub>15</sub> de notre collection est un mutant du gène *chl A* situé au voisinage de la région *gal b*, et le second 356<sub>24</sub> est un mutant du gène *chl B* situé dans la région *mtl* (bibl. 2, 4). Ces deux mutations provoquent le même effet pléiotropique et font perdre simultanément les activités nitrate-réductase et hydrogène-lyase.

*Cultures.* Les cellules de ces organismes sont obtenues à partir de milieux de culture classiques contenant:  $Na_2HPO_4 \cdot 12 H_2O$  3.575 g;  $KH_2PO_4$  0.98 g;  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$  0.03 g;  $NH_4Cl$  0.5 g;  $FeSO_4$  et  $CaCl_2$  traces; extrait de levure Difco 0.5 g; bouillon peptoné Difco 0.5 g; glucose 1 g;  $KNO_3$  0.5 g; eau distillée 1000 ml (pH 7). Toutes les cultures ont été réalisées en anaérobiose sous vide ou sous atmosphère d'azote à 32°. Après 16 h d'incubation les cellules sont recueillies, lavées et remises en suspension dans un tampon Tris 0.04 M (pH 7.6).

*Méthodes.* Les extraits acellulaires bruts sont obtenus après traitement des suspensions bactériennes dans une cellule de pression (French-Press) et centrifugation à 10 000 tours/min pendant 15 min des mélanges pour éliminer les débris cellulaires. Les extraits "surnageant" sont préparés à partir de ces extraits bruts en les soumettant à une nouvelle centrifugation à 170 000 × g pendant 90 min dans une Spinco modèle L (Rotor SW 39) et en éliminant les fractions particulières qui ont sédimen-té.

L'activité nitrate-réductase, mesurée suivant des techniques déjà publiées<sup>5</sup>, est

déterminée à partir des vitesses de consommation de l'hydrogène dans des systèmes manométriques contenant  $H_2$ , de l'hydrogénase purifiée, du benzyl-viologène, l'extrait enzymatique et du  $KNO_3$ . Cette activité enzymatique est exprimée en unités:  $\mu$ moles de  $NO_3^-$  réduit par h et mg de protéines.

L'analyse des particules "natives" (provenant de la souche sauvage d'*E. coli* K 12 cultivée en présence de  $KNO_3$  et préparées suivant les indications d'AZOULAY, PUIG ET PICHINOTY<sup>3</sup>); ou "néo-formées" (résultant d'une "complémentation" entre les extraits des 2 mutants) est réalisée suivant la technique de MARTIN ET AMES<sup>6</sup> légèrement modifiée: elle est effectuée en soumettant les extraits particulaires (3 à 5 mg de protéines) à une ultracentrifugation (39 000 tours/min, 5 h) sur un gradient de concentration linéaire en saccharose compris entre 20 et 80% en poids de saccharose. On recueille ensuite des fractions de 2 gouttes chacune (0.13 ml) on y ajoute 0.5 ml de tampon Tris 0.04 M (pH 7.6) et on y détermine les activités enzymatiques et les concentrations en protéines.

La nature et la concentration des cytochromes dans les extraits acellulaires ont été déterminées par référence aux normes de FUJITA<sup>7</sup>. Les protéines ont été dosées suivant la méthode de LOWRY *et al.*<sup>8</sup>.

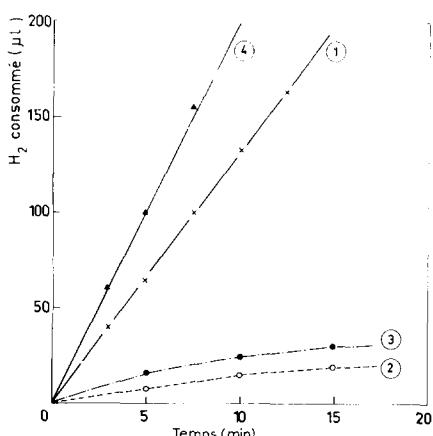


Fig. 1. Activité nitrate-réductase des extraits acellulaires d'*E. coli* K 12 souche sauvage (1) et mutants *chl A* (2), *chl B* (3) et du mélange "complémenté" des extraits *chl A/chl B* pendant 60 min à 32° (4). Systèmes expérimentaux contenant respectivement 80  $\mu$ g (1) et 1200  $\mu$ g (2, 3, 4) de protéines.

## RÉSULTATS

### Reconstitution *in vitro* de l'activité nitrate-réductase

Les cellules des deux types de mutants *chl A* et *chl B*, lorsqu'elles ont été cultivées en anaérobiose et en présence de  $KNO_3$  donnent des préparations dépourvues d'activité nitrate-réductase (Fig. 1). La complémentation, c'est-à-dire, le mélange des extraits acellulaires des deux mutants pléiotropes *chl A* (356<sub>15</sub>) et *chl B* (356<sub>24</sub>) en proportions équivalentes et dans des conditions parfaitement définies, sur lesquelles nous reviendrons plus loin, permet de reconstituer *in vitro* l'activité nitrate-réductase perdue par chacun des deux organismes (Fig. 1, Courbe 4).

TABLEAU I

RECONSTITUTION *in vitro* DE L'ACTIVITÉ NITRATE-RÉDUCTASE D'*E. coli* K 12

L'activité nitrate-réductase est reconstituée par "complémentation" des préparations acellulaires des mutants *chl A* et *chl B* pendant 60 min à 32°.

Mutants cultivés en anaérobiose	Nature des préparations acellulaires		Activité nitrate- reductase reconstituée (unités)*
	<i>chl A</i>	<i>chl B</i>	
Sans KNO <sub>3</sub>	Extrait brut	Extrait brut	3.6
Avec KNO <sub>3</sub>	Extrait brut	Extrait brut	8-15
	Surnageant	Surnageant	7.5-19
	Particules	Particules	0
	Surnageant	Particules	0
	Particules	Surnageant	0

\* Cette activité mesurée sur le mélange après "complémentation" est exprimée en unités nitrate-réductase ( $\mu$ moles de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> formées par h et par mg de protéines).

L'activité enzymatique ainsi obtenue après 1 h d'incubation à 32° des extraits bruts est égale à 11 unités par mg de protéines totales (Tableau I) et correspond au dixième de l'activité nitrate-réductase mesurée dans les mêmes conditions pour les extraits bruts de la souche sauvage (Fig. 1, Courbe 1). Cette reconstitution n'est possible que pour des préparations acellulaires des mutants *chl A* et *chl B* qui incubent à 32° en l'absence d'oxygène dans un milieu tamponné (Tris 0.04 M (pH 7.6)).

Il résulte des données expérimentales rapportées sur le Tableau I que les surnageants obtenus par ultracentrifugation des extraits bruts à 170 000 × g pendant 2 h "complémentent" dans les mêmes conditions que les extraits bruts et parfois même avec une efficacité supérieure en donnant des activités de l'ordre de 19 unités par mg de protéines. D'autre part, la reconstitution de la nitrate-réductase n'est guère possible lorsque nous remplaçons l'un des surnageants par les particules correspondantes.

Il convient de souligner l'importance de ce résultat qui permet d'écartier l'hypothèse suivant laquelle cette "reconstitution" serait la conséquence d'une réactivation d'un enzyme respiratoire particulaire par adjonction d'un transporteur d'électrons altéré chez l'un des mutants chlorate-résistants puisque l'activité nitrate-réductase "native" est de nature particulaire chez les souches sauvages d'*E. coli* K 12 et sédimente intégralement par centrifugation à 170 000 × g pendant 2 h.

Dans le même ordre d'idées nous avons vérifié que la complémentation est impossible si on interpose entre les 2 préparations acellulaires provenant des mutants une membrane imperméable aux protéines.

Lorsque les mutants sont cultivés en l'absence d'inducteur, leurs extraits peuvent complémenter en donnant une activité nitrate-réductase de l'ordre de 3 unités (Tableau I) qui correspond probablement à l'activité de base que l'on mesure chez la souche sauvage cultivée sous vide en l'absence de nitrate. Cependant le niveau enzymatique obtenu par "reconstitution", représente le cinquième de l'activité "reconstituée" chez les mutants cultivés en présence d'inducteur. La même détermination d'activité enzymatique effectuée chez la souche sauvage donne une différence de niveau de l'ordre du dixième.

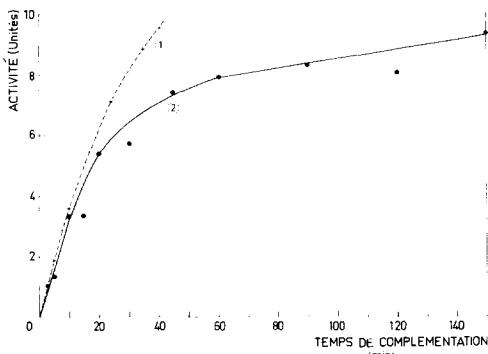


Fig. 2. Cinétique de reconstitution de l'activité nitrate-réductase par "complémentation" des préparations acellulaires. 1, Extraits bruts; 2, surnageants de centrifugation à 170 000 × g des mutants *chl A* et *chl B*. Systèmes expérimentaux contenant 0.1 ml (800 µg en protéines) de chacun des 2 extraits; 0.3 ml de tampon Tris 0.04 M (pH 7.6), incubant à 32° sous vide et pour des temps variant de 5-150 min. La "complémentation" est arrêtée en introduisant l'air dans les systèmes refroidis à 0°. L'activité enzymatique est ensuite déterminée sur ces mélanges et exprimée en unités nitrate-réductase.

#### Complémentation des préparations acellulaires des mutants *chl A* et *chl B*

La restauration de l'activité nitrate-réductase chez les mutants déficients en cet enzyme, est consécutive à une complémentation réalisée à partir d'éléments solubles contenus dans les préparations acellulaires. De ce fait nous définirons l'activité de complémentation à partir de l'accroissement d'activité nitrate-réductase (exprimée en unités) formée par min et par mg de protéines totales contenues dans le mélange en cours d'incubation.

Dans la Fig. 2, nous avons mesuré l'activité nitrate-réductase (unités) reconstituée pour des temps différents d'incubation. Nous pouvons constater que la valeur de cette activité augmente en fonction du temps. Après 15 min d'incubation, il y a un changement important de pente dans les cinétiques de "complémentation" et ce changement est plus significatif pour les surnageants que pour les extraits bruts. Ces vitesses sont nettement plus élevées pour les préparations acellulaires provenant de

TABLEAU II

ACTIVITÉ DE "COMPLÉMENTATION" DES PRÉPARATIONS ACELLULAIRES DES MUTANTS *chl A* ET *chl B* D'*E. coli* K 12

Mutants cultivés en anaérobiose	Nature des préparations acellulaires	Activité déterminée*		
		Premières minutes d'incubation	Après 45 min d'incubation	Après 2 h d'incubation
Avec $\text{KNO}_3$	Extraits bruts	0.32	0.21	—
	Surnageants de centrifugation à 170 000 × g	0.47	0.10	0.005
Sans $\text{KNO}_3$	Extraits bruts	0.06	—	—

\* L'activité de "complémentation" est exprimée à partir de l'accroissement d'activité nitrate-réductase (unités nitrate-réductase) par min et par mg de protéines mesurées dans le mélange en cours d'incubation.

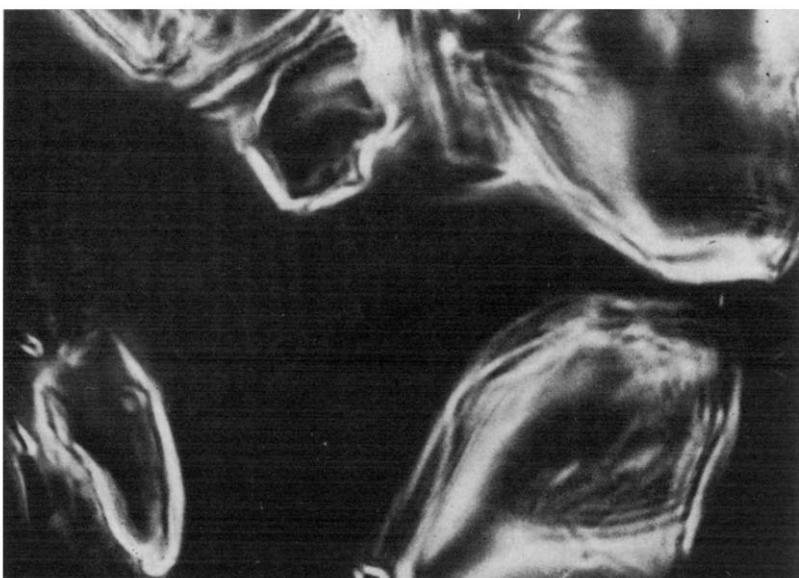


Fig. 3. Photographie des particules "néo-formées" après une "complémentation" de 15 min des extraits "surnageants- $170\ 000 \times g$ " des mutants *chl* A et *chl* B. Les particules sont séparées du mélange par ultracentrifugation à  $170\ 000 \times g$ , lavées dans du tampon Tris 0.04 M (pH 7.6), remises en suspension dans ce même tampon et examinées au microscope optique Zeiss.

mutants *chl* A et *chl* B cultivés en présence de  $\text{KNO}_3$  (Tableau II). Pour les extraits solubles de ces mutants la vitesse de complémentation de l'ordre de 0.47 unités par min diminue progressivement avec le temps. Cette diminution est plus faible pour les extraits bruts (Tableau II), bien que l'activité de "complémentation" mesurée avec ces extraits bruts dans les premières minutes soit inférieure à celle qui est déterminée dans les mêmes conditions pour les extraits solubles obtenus à partir de ces

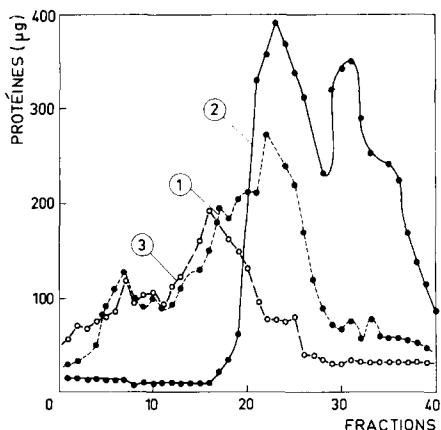


Fig. 4. Comparaison des profils de sédimentation sur gradient de saccharose des préparations "particulaires" d'*E. coli* K 12 cultivé en présence de  $\text{KNO}_3$ . 1, Type sauvage; 2, particules "néo-formées" par "complémentation" de 2 h des extraits surnageants  $170\ 000 \times g$  des mutants *chl* A et *chl* B; 3, mutant *chl* A.

TABLEAU III

“COMPLÉMENTATION” DES PRÉPARATIONS ACELLULAIRES DES MUTANTS *chl A* ET *chl B* D’*E. coli* K 12

Les préparations obtenues par “complémentation” de 2 h à 32° et soumises à une ultracentrifugation de 2 h à 170 000 × g donnent des extraits particulaires (1) et des surnageants (2) sur lesquels ont été effectués des mesures d’activité nitrate-réductase exprimée en % de l’activité enzymatique totale.

Mutants cultivés en anaérobiose	“Complémen- tation obtenue à partir :	Activité nitrate-réductase reconstituée (% activité totale)		Protéines particulaires synthétisées (% des protéines solubles totales)	Cytochrome <i>b</i> <sub>1</sub> fixé (nmoles/mg de protéines particulaires synthétisées)
		Type particulaire (1)	Type soluble (2)		
Avec KNO <sub>3</sub>	Extraits bruts	39	61	— 15 à 20	— 0.25
	Surnageants	24	76		
Sans KNO <sub>3</sub>	Surnageants	16	84	14 à 18	—

préparations. Il en est de même pour l’activité nitrate-réductase totale formée (Tableau I).

Il découle de ces données expérimentales que la nitrate-réductase “néo-formée” est liée à l’apparition d’un complexe qui est en fait le produit d’une réaction chimique du premier ordre si nous nous référons à l’allure des cinétiques de complémentation (Fig. 2).

#### *Synthèse de “particules” par complémentation*

La restauration de l’activité nitrate-réductase par complémentation des surnageants des extraits bruts des mutants *chl A* et *chl B* d’*E. coli* K 12 s’accompagne de la formation *de novo* de particules et la centrifugation à 170 000 × g pendant 30 min d’un tel mélange après une incubation de 15 min permet de récupérer à nouveau un culot de centrifugation. Ce culot est constitué par des éléments (larges particules) de grande taille, visibles au microscope optique (Fig. 3). Lorsque l’incubation est poursuivie au-delà de 15 min, ces éléments de grande taille disparaissent rapidement au profit de particules nettement plus petites, invisibles au microscope optique mais susceptibles de sédimerter par ultracentrifugation à 170 000 × g.

Les particules “néo-formées” après séparation et lavage, sont remises en suspension dans un tampon Tris 0.04 M (pH 7.6) et soumises à une centrifugation de 5 h à 39 000 tours/min sur un gradient de concentration linéaire en saccharose de 20 à 80% en poids<sup>3</sup>. L’examen de la Fig. 4 montre qu’une fraction importante de ces particules se comporte de la même manière que les particules natives. Une autre fraction moins dense et possédant aussi l’activité nitrate-réductase correspond aux éléments de grande taille précédemment décrits (Fig. 3).

Il convient de noter qu’après une complémentation de plus de 2 h, il reste encore de l’activité nitrate-réductase dans les surnageants de centrifugation à 170 000 × g des mélanges. Cette activité enzymatique correspondrait donc à la nitrate-réductase de type soluble et différerait de ce fait de l’activité enzymatique isolée chez la souche sauvage d’*E. coli* K 12.

Des résultats consignés dans le Tableau III découlent les constatations suivantes: (1) après une complémentation de 2 h, il n’y a pratiquement plus d’accroisse-

ment notable d'activité nitrate-réductase. (2) Des protéines solubles passent à l'état particulaire dans la proportion de 15-20%. (3) Les particules néo-formées contiennent comme les particules natives, un cytochrome de type  $b_1$ , dans la proportion de 0.25 nmole/mg de protéines. (4) L'activité nitrate-réductase totale synthétisée dans les mélanges en cours de complémentation, se différencie en activité particulaire et en activité soluble et le pourcentage de la fraction soluble est plus faible pour les complémentations réalisées avec les extraits bruts. Il convient de noter que la complémentation à partir des surnageants des mutants *chl A* et *chl B* cultivés en anaérobiose sans nitrate conduit à la formation de "particules". Le pourcentage de protéines "particulaires" synthétisées dans ces conditions est identique à celui déterminé pour les mêmes cellules induites en présence de nitrate. Ces résultats expérimentaux et tout particulièrement cette dernière observation, permettent de conclure que la complémentation porte essentiellement sur la synthèse de complexes protéiniques. Si nous nous référons, d'une part, aux précédentes cinétiques de complémentation déterminées à partir de l'accroissement de l'activité nitrate-réductase en fonction du temps, et d'autre part, aux trois formes de localisation de cette activité (soluble, larges particules et petites particules) nous pouvons penser que cette synthèse s'effectue par étapes; la forme soluble correspondrait à la première étape et les particules sédimentant aux environs de 130 S (bibl. 3) constituerait l'étape finale.

#### *Nature et nombre des constituants impliqués dans la complémentation*

La complémentation, lorsqu'elle est réalisée en interposant entre les préparations acellulaires des 2 mutants *chl A* et *chl B* une membrane imperméable aux grosses molécules, tel qu'un sac à dialyse ordinaire, ne donne aucune synthèse. Il en est de même si les préparations sont préalablement traitées à 0° par un mélange à parties égales de méthanol et d'éther avant l'incubation. Par contre, le même traitement préalable par l'iso-octane n'inhibe pas la synthèse de la nitrate-réductase au cours de la complémentation. De même les deux extraits bruts ou leurs surnageants dialysés pendant 6 h à 0° contre un tampon Tris 0.04 M (pH 7.2), sous vide, complémentent avec la même efficacité que ces extraits natifs avant traitement.

Ces résultats excluent la participation dans ce phénomène de complémentation de petites molécules libres: co-facteurs flaviniques, pyridines-nucléotides ou quinones, mais n'éliminent pas la possibilité d'intervention au cours de cette réaction de ces mêmes molécules à l'état lié.

L'examen des spectres d'absorption relevés sur les préparations acellulaires (surnageants 170 000 × g) provenant de la souche sauvage et de ses mutants *chl A* et *chl B*, montre une différence importante quant à la présence et à la concentration de cytochromes entre la souche sauvage et ses deux mutants (Fig. 5). La présence d'une bande à 418 m $\mu$ , correspondant au pic de Soret, dans le spectre des extraits des 2 mutants et l'absence de cette même bande pour la souche sauvage sont en faveur d'une solubilisation de certains cytochromes chez ces mutants. La complémentation qui conduit à la formation de "particules" et à la récupération de l'activité nitrate-réductase entraîne simultanément la disparition du pic de Soret pour le mélange après séparation des particules "néo-formées" (Fig. 5, Courbe 4). Ce cytochrome a été mis en évidence dans ces "particules" et l'examen de son spectre a permis de l'identifier à un cytochrome de type  $b_1$  suivant les données de DEEB ET HAGER<sup>9</sup>. Cette observation concorde avec les résultats d'analyse de cytochromes effectués directement sur

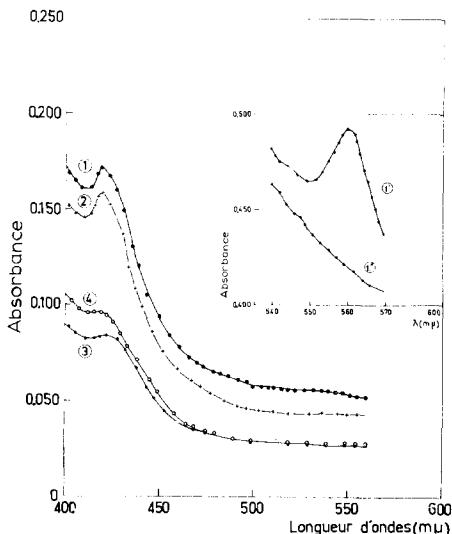


Fig. 5. Spectre d'absorption d'extraits acellulaires provenant de préparations centrifugées à  $170\ 000 \times g$  pendant 90 min. Systèmes expérimentaux contenant 4.5 mg de protéines par ml d'extract. 1, Mutant *chl A*; 2, mutant *chl B*; 3, souche sauvage; 4, mélange "complémenté" 2 h après élimination des particules "néo-formées". En médaillon: spectre d'absorption oxydé 1" et réduit 1' de préparations acellulaires du mutant *chl A* contenant 26 mg de protéines par ml.

les extraits (surnageants  $170\ 000 \times g$ ) du mutant *chl A* (Fig. 5, médaillon) qui donnent des concentrations en cytochrome  $b_1$  solubilisé de l'ordre de 0.12 nmole de cytochrome  $b_1$  par mg de protéines solubles.

#### *Caractères biochimiques de la complémentation*

La réaction de complémentation qui aboutit, d'une part à l'apparition d'une activité enzymatique et d'autre part, à la reconstitution de "particules" ne peut se réaliser que pour certaines conditions expérimentales. Elle a son maximum d'efficacité lorsque le mélange introduit dans un tube de Thunberg est préparé avec des quantités égales d'extrait des mutants *chl A* et *chl B* et que l'incubation est réalisée sous vide ou sous atmosphère d'hydrogène ou d'azote. Cette réaction dépend des conditions de préparation des extraits acellulaires et en particulier de la nature, de la molarité et du pH des tampons utilisés: les tampons phosphates 0.04 M (pH 7.2) et Tris 0.04 M (pH 7.6) donnent les meilleures résolutions. Une augmentation de leurs molarités entraîne des pertes d'activité de l'ordre de 80%. Aucune complémentation n'est possible pour des extraits préalablement chauffés à 100° pendant 10 min. Il en est de même si un seul des deux extraits, indifféremment l'un ou l'autre, est soumis à ce traitement. La conservation des extraits à l'état actif est très difficile, en présence d'oxygène elle n'est possible que pendant 20 h au maximum, sous vide elle peut être prolongée jusqu'à 3 jours, après on constate une perte d'activité de 87%; la congélation est aussi néfaste pour l'activité de "complémentation".

La reconstitution *in vitro* de l'activité nitrate-réductase s'effectue à vitesse maximum pour une zone étroite de pH (32° et pH 7 à 7.6). Elle est fortement inhibée par de nombreux composés comme le montrent les résultats consignés dans le Tableau IV et en particulier par les ions divalents, l'oxygène et les dérivés à groupement

SH. Parmi ces derniers composés il convient de souligner l'influence de la cystéine qui constitue avec l'oxygène l'inhibiteur le plus efficace de la complémentation, ce phénomène est à rapprocher de notre observation sur le rôle de la cystéine ajoutée aux cultures de la souche sauvage d'*E. coli* K 12 (bibl. 10). L'ascorbate de sodium ne protège la complémentation que très faiblement contre l'action de l'oxygène. De tous les composés testés, seul le  $\text{NO}_3^-$  s'est avéré être un activateur de la complémentation.

TABLEAU IV

RECONSTITUTION DE L'ACTIVITÉ NITRATE-RÉDUCTASE D'*E. coli* K 12 À PARTIR DES MUTANTS *chl A* ET *chl B*

L'activité nitrate-réductase est reconstituée par "complémentation" des préparations acellulaires des mutants *chl A* et *chl B* pendant 60 min à 32° en présence de tampon Tris 0.04 M (pH 7.6).

<i>Reconstitution réalisée en présence de :</i>	<i>Concn.</i> (M)	<i>Activation</i> (%)	<i>Inhibition</i> (%)
Glucose	0.2	—	65
$\text{KNO}_3$	0.1	30	—
Cystéine	$5 \cdot 10^{-3}$	—	92
Oxygène	—	—	98
Ascorbate de sodium	$10^{-3}$	0	0
Oxygène + ascorbate de sodium	$10^{-3}$	—	65
Glutathion réduit	$5 \cdot 10^{-3}$	—	42
$\beta$ -Mercaptoéthanol	$5 \cdot 10^{-3}$	—	12
EDTA	0.1	—	62
EDTA	$10^{-3}$	15	—
$\text{Ca}^{2+}$	0.1	—	95
$\text{Mg}^{2+}$	0.1	—	75
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.4	—	67
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.2	—	17
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.02	—	12

*La réaction de complémentation est dépendante de la température.* Elle est irréalisable à 0°, optimale à 32° et une incubation à 50° pendant 30 min ne permet de synthétiser que 20% de l'activité nitrate-réductase obtenue à 32°. Les courbes d'inactivation thermique ont été déterminées à partir du pourcentage d'enzyme synthétisé dans les conditions normales de complémentation en fonction du temps d'incubation à 50° de chacun des deux extraits des 2 mutants *chl A* et *chl B*, mesuré séparément. Pour les préparations acellulaires du *chl A* (contenant le facteur d'assemblage  $f_a$ ) soumises à l'action de la température, le temps de demi-vie à 50° est de 17 min, dans les mêmes conditions expérimentales la température de 50° est sans aucun effet sur les préparations du mutant *chl B*.

*L'oxygène est l'inhibiteur le plus efficace de cette réaction.* Aucune synthèse d'enzyme ou de "particule" n'a été mise en évidence lorsque l'incubation est réalisée en présence d'air. Lorsque les préparations acellulaires du mutant *chl B* sont soumises à un barbottage d'oxygène pendant 15 min la réaction de "complémentation" avec un extrait du *chl A* non traité par l'air est inhibée de 50%. Inversement en traitant dans les mêmes conditions les préparations du mutant *chl A* par l'air, nous ne constatons aucune inhibition de la complémentation en présence d'extraits du *chl B* non traités par l'oxygène, ce n'est qu'après une action prolongée et vigoureuse (7-8 h) sur les préparations du *chl A* que l'inhibition commence à se manifester.

*L'effet de la concentration en protéines introduites dans le système réactionnel est*

différent suivant que celles-ci proviennent des extraits du mutant *chl A* ou du mutant *chl B*.

Nous avons mesuré l'accroissement d'activité de complémentation exprimée en unités nitrate-réductase synthétisée après 60 min d'incubation en fonction de la quantité d'extrait du mutant *chl A* introduite dans les mélanges contenant des quantités identiques (14 mg de protéines) d'extrait du mutant *chl B*. L'activité augmente liné-

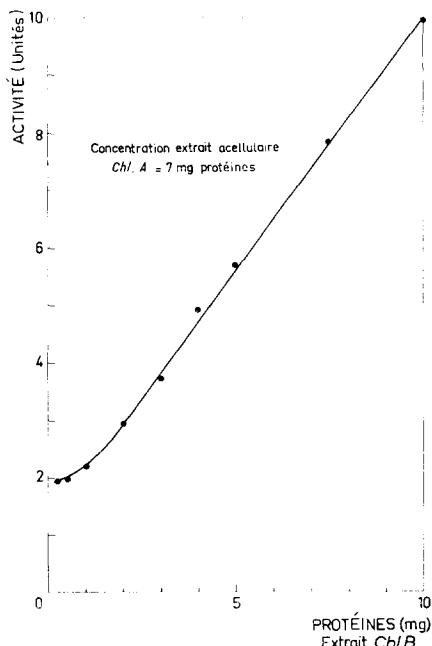


Fig. 6. Accroissement de l'activité nitrate-réductase reconstituée après "complémentation" de 60 min à 32° dans des systèmes expérimentaux de 0,5 ml contenant: tampon Tris 0,04 M (pH 7,6), extrait "surnageant" du mutant *chl A* (7 mg protéines) et des concentrations variables d'extrait "surnageant" du mutant *chl B*.

airement avec la concentration en protéines pour atteindre un plateau pour des valeurs supérieures à 5 mg en protéines.

Inversement, à une même concentration en extrait du mutant *chl A* (7 mg de protéines) nous avons ajouté des quantités croissantes d'une préparation acellulaire du mutant *chl B* et mesuré les activités de complémentation pour chacun de ces systèmes (Fig. 6). L'activité nitrate-réductase "reconstituée" augmente linéairement en fonction de la concentration en extrait du mutant *chl B* en donnant une droite qui ne passe pas par l'origine, de plus pour une quantité de protéines inférieure à 0,5 mg, l'activité nitrate-réductase formée est pratiquement nulle.

#### *Aperçu général sur la nature des activités enzymatiques liées aux "particules néo-formées"*

Les particules "néo-formées" après une complémentation de 4 h avec les surnageants de centrifugation des préparations acellulaires de 2 mutants *chl A* et *chl B*, ont été séparées du mélange par ultracentrifugation, lavées avec du tampon Tris 0,04 M (pH 7,6), remises en suspension dans le même tampon et étudiées.

Ces préparations particulaires riches en cytochrome de type  $b_1$  ont une activité nitrate-réductase avec une constante d'affinité pour  $\text{NO}_3^-$  de l'ordre de  $3.1 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ , donc inférieure et de ce fait plus efficace que celle qui a été déterminée ( $K_m 0.78 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ) sur les extraits particulaires préparés à partir de la souche sauvage d'*E. coli* K 12 cultivée en présence de  $\text{KNO}_3$ . Cette activité nitrate-réductase, insensible au  $\text{ClO}_3^-$ , est inhibée par  $\text{NaN}_3$  et  $\text{KCN}$ . Elle est thermo-résistante comme l'activité nitrate-réductase native et son temps de demi-vie calculé à partir des courbes d'inactivation thermique, déterminé à  $62^\circ$  est égal à 35 min. Ces préparations catalysent la réduction du  $\text{ClO}_3^-$  dans les mêmes conditions que le  $\text{NO}_3^-$  avec des  $K_m$  de l'ordre de  $2.5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ . Enfin il convient de noter que ces "particules néo-formées" sont exemptes d'activité pyruvique (cytochrome  $b_1$ ) déshydrogénase mesurée suivant la méthode de WILLIAMS ET HAGER<sup>11</sup> d'activités NADH-ferricyanure-réductase déterminés suivant les données de BRAGG ET HOU<sup>12</sup>, elles possèdent par contre une faible activité NADH-oxydase, qui correspond au 1/100ième environ de l'activité mesurée dans les extraits particulaires de la souche sauvage.

L'activité nitrate-réductase résiduelle de type soluble mise en évidence dans les mélanges après complémentation et centrifugation à  $170\,000 \times g$  pendant 90 min a été testée. Elle présente les mêmes caractères que l'activité de type particulaire "néo-formée" sauf en ce qui concerne la constante d'affinité à l'égard du  $\text{NO}_3^-$  qui est égale à  $K_m 0.78 \cdot 10^{-3} \text{ M}$  et sa thermo-résistance qui est plus faible; les courbes d'inactivation thermique à  $62^\circ$  déterminées pour cet extrait et cette activité enzymatique présentent des pentes différentes des courbes d'inactivation mesurées dans les mêmes conditions pour la nitrate-réductase liée aux particules "néo-formées".

#### DISCUSSION

La sélection chez *E. coli* K 12 de deux groupes de mutants chlorate-résistants: *chl A* et *chl B*, incapables de réduire le  $\text{NO}_3^-$ , tous deux pléiotropes pour une autre activité enzymatique, bien que génétiquement distincts, nous offre la possibilité de déterminer de manière précise le nombre et la nature des constituants participant à la synthèse d'éléments particulaires qui possèdent la plupart des caractères des extraits particulaires provenant de la souche sauvage et en particulier l'activité nitrate-réductase. Les résultats expérimentaux que nous venons de décrire définissent les conditions pour lesquelles cette synthèse est réalisable, la nature de la réaction déclenchée, et les caractères biochimiques des éléments "particulaires" formés. Par analogie avec d'autres phénomènes de même nature nous avons appelé complémentation cette réaction de reconstitution de particules douées d'activité nitrate-réductase.

La complémentation conduit à la restauration de l'activité enzymatique perdue par mutation chez les 2 organismes sélectionnés: les souches *chl A*<sub>15</sub> et *chl B*<sub>24</sub>. Ce modèle de reconstitution d'une activité enzymatique de nature membranaire et intégrée à des particules<sup>3</sup> diffère totalement des systèmes de reconstitution mis en évidence chez *E. coli* par MUKHERJEE *et al.*<sup>13</sup> pour le complexe  $\alpha$ -céto-glutarate-déshydrogénase et par KOIKE, REED ET CARROLL<sup>14</sup> pour les complexes  $\alpha$ -céto-acides-déshydrogénases. En effet cette déshydrogénéation est la résultante d'une série de réactions chimiques catalysées par des enzymes différents intégrés dans des complexes "multi-enzymes" et la reconstitution du complexe est instantanée à partir des protéines purifiées après solubilisation de l'agrégat. De plus, il est important de signaler que la nitrate-réduc-

tase catalyse une réaction terminale de transfert d'électrons, que la solubilisation des "particules" entraîne la disparition de l'activité enzymatique et que la reagglomération par simple mélange de ces constituants ne permet ni la restauration de l'activité nitrate-réductase ni la reconstitution de particules possédant des caractères de sédimentation identiques aux particules natives<sup>10</sup>.

La restauration de l'activité nitrate-réductase par complémentation s'accompagne de la formation *de novo* de particules ayant pour la plupart en gradient de saccharose le même comportement que les particules de la souche sauvage. Dans l'état actuel de nos expériences, il ne nous a pas été possible de déterminer une cinétique d'agglomération, parallèlement à la cinétique d'apparition de l'activité nitrate-réductase en fonction du temps de complémentation. Nous pouvons donc considérer que le mélange des préparations acellulaires des deux types de mutants étudiés contient à l'état soluble tous les facteurs qui chez la souche sauvage existent à l'état particulaire.

Si nous considérons le nombre de groupes de mutants *chl-r* isolés et le nombre d'activités enzymatiques perdus au cours de ces mutations chez *E. coli* K 12 nous pensons que 6 constituants au moins participent à la réaction de formation *in vitro* de ces "particules". En dehors du cytochrome *b*<sub>1</sub>, des produits des gènes *chl A* et *chl B* il convient d'y ajouter les protéines correspondantes aux 3 enzymes impliquées dans cette mutation à savoir la nitrate-réductase A, l'hydrogène-lyase et enfin une chlorate-réductase C que nous avons récemment mise en évidence chez les mutants non pléiotropes *chl C* d'*E. coli* K 12. Par ailleurs il est probable que des phospholipides participent à cette agglomération bien que dans l'état actuel de nos expériences nous ne puissions l'affirmer. De manière plus précise et dans un but de simplification nous pouvons à priori considérer que la mutation *chl A* dont l'effet est pléiotrope correspond à l'altération d'une protéine importante pour la structure de la particule, ce facteur que nous désignerons sous le terme de *P<sub>s</sub>* serait synthétisé à l'état soluble chez l'autre mutant pléiotrope, le mutant *chl B*. Par contre, le produit de ce gène, *chl B* pourrait être assimilé à un "facteur d'assemblage" et serait désigné sous le terme *f<sub>a</sub>*. À l'appui de notre hypothèse relative à cette notion de facteur d'assemblage, il convient de souligner qu'elle découle de la nature même de la réaction de complémentation qui s'effectue à vitesse maximum pour une zone étroite de température et de pH et qui de plus exige une quantité de protéines provenant du mutant *chl B* nettement plus importante que celle apportée par l'extrait du mutant *chl A* susceptible de contenir ce facteur.

De plus, les essais de purification entrepris dans une série d'expériences préliminaires se sont avérés positifs pour ce facteur d'assemblage et nous ont permis de constater qu'il suffit d'une très faible concentration de cette fraction partiellement purifiée pour obtenir une formation de "particules" *in vitro*.

Il reste cependant que dans le cadre de nos observations, nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse suivant laquelle ce facteur d'assemblage se comporte comme une protéine de structure ce qui assimilerait notre système à celui mis en évidence chez *Neurospora crassa* par MUNKRES ET WOODWARD<sup>15</sup>.

La complémentation réalisée sur les extraits "surnageants" des 2 mutants *chl A* et *chl B* conduit à l'apparition d'activités nitrate-réductase successivement soluble, particulaire: larges particules et particules identiques aux particules "natives" dont les proportions relatives varient en fonction du temps de complémentation. Ce qui

semble indiquer que l'agglomération suit une loi d'organisation parfaitement définie.

Il convient de souligner que le taux d'activité nitrate-réductase reconstituée ainsi que le pourcentage de protéines aggrégées dépend de la concentration dans les préparations, du cytochrome  $b_1$  soluble qui se retrouve en fin de réaction lié aux protéines particulières.

Le cytochrome solubilisé a été identifié comme étant un cytochrome de type  $b_1$  et diffère de ce fait du cytochrome de type  $c$  mis en évidence au cours d'observations réalisées sur un autre de nos mutants *chl A* (376) par O'HARA *et al.*<sup>16</sup>. De plus ce résultat expérimental confirme les observations de SATO<sup>17</sup> et de TANIGUCHI, SATO ET EGAMI<sup>18</sup> qui avaient mis en évidence à partir de déterminations de taux d'inhibition par le 2-heptyl-4-hydroxyquinoléine-N-oxyde le rôle du cytochrome  $b_1$  dans la manifestation de l'activité nitrate-réductase.

L'apparition de l'activité nitrate-réductase parallèlement à cette aggrégation ouvre un champ d'investigation très vaste sur la nature et le fonctionnement du site actif des enzymes particulières.

Il faut donc souligner l'importance de l'isolement de cette catégorie de mutants *chl B* pléiotropes chez *E. coli* K 12, puisque d'une part, ils permettent de localiser sur le chromosome d'*E. coli* le gène de ce facteur d'assemblage et d'autre part, de fournir des préparations acellulaires contenant à l'état soluble tous les éléments nécessaires à la synthèse des particules qui en fait font partie intégrante de la membrane cytoplasmique.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement le Dr. E. WOLLMAN de l'Institut Pasteur pour l'aide apportée au cours de ce travail et en particulier pour avoir bien voulu mettre à notre disposition sa collection de souches.

#### RÉSUMÉ

L'utilisation du chlorate comme agent sélectif permet d'isoler chez *E. coli* K 12 2 types de mutants chlorate-résistants: *chl A<sub>15</sub>* et *chl B<sub>24</sub>*. Ces deux groupes de mutants, distincts génétiquement, sont tous deux déficients, pour plusieurs activités enzymatiques, spécifiques de la respiration anaérobie et en particulier de l'activité nitrate-réductase (NADH:nitrate oxydo-réductase, EC 1.6.6.1) et hydrogène-lyase (formate:cytochrome  $b_1$  oxydo-réductase, EC 1.2.2.1).

La complémentation dans des conditions parfaitement définies des extraits acellulaires de ces deux mutants conduit à la restauration de l'activité nitrate-réductase perdue par chacun des deux organismes. Cette complémentation réalisée avec les surnageants des extraits bruts centrifugés à 170 000  $\times g$  pendant 90 min s'accompagne de la formation *de novo* de particules ayant en gradient de saccharose le même comportement que les particules douées de l'activité nitrate-réductase de la souche sauvage.

Les résultats expérimentaux que nous décrivons définissent les conditions pour lesquelles ce type de complémentation est réalisable, la nature de la réaction déclenchée et les caractères biochimiques des éléments particulaires synthétisés. La restauration de l'activité nitrate-réductase au cours de la complémentation n'est possible

qu'en l'absence d' $O_2$  dans un milieu tamponné (Tris 0.04 M (pH 7.6)) pour une zone étroite de température et de pH (32°, pH 7 à 7.6) et pour des concentrations déterminées en protéines. Elle n'est totale qu'après deux heures d'incubation en donnant des activités nitrate-réductase qui augmentent avec le temps de complémentation suivant une cinétique qui a été étudiée.

L'activité enzymatique ainsi reconstituée est égale à 19 unités/mg de protéines totales et correspond au dizième de l'activité mesurée chez la souche sauvage. Parallèlement, au cours de cette réaction 15–20% des protéines solubles passent à l'état particulaire en fixant le cytochrome  $b_1$  présent à l'état soluble dans les extraits des mutants chlorate-résistants.

À partir de ces observations une hypothèse est présentée quant à la nature et au rôle du produit du gène *chl B*.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 M. PLECHAUD, J. PUIG, F. PICHIOTY, E. AZOULAY ET L. LE MINOR, *Ann. Inst. Pasteur*, 112 (1967) 24.
- 2 J. PUIG, E. AZOULAY ET F. PICHIOTY, 264 *Compt. Rend.* (1967) 1507.
- 3 E. AZOULAY, J. PUIG ET F. PICHIOTY, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 27 (1967) 270.
- 4 J. PUIG ET E. AZOULAY, *Compt. Rend.*, 264 (1967) 1916.
- 5 F. PICHIOTY, *Ann. Inst. Pasteur*, 104 (1963) 219.
- 6 R. G. MARTIN ET B. N. AMES, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 1372.
- 7 T. FUJITA, *J. Biochem.*, 60 (1966) 204.
- 8 O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- 9 S. S. DEEB ET L. P. HAGER, *J. Biol. Chem.*, 239 (1964) 1024.
- 10 E. AZOULAY, J. PUIG ET M. ROSADO DE SOUSA, *Ann. Inst. Pasteur*, sous presse.
- 11 F. R. WILLIAMS ET L. P. HAGER, *Methods in Enzymology*, Vol IX, 1966, p. 265.
- 12 P. D. BRAGG ET C. HOU, *Can. J. Biochem.*, 45 (1967) 1108.
- 13 B. B. MUKHERJEE, J. MATTHEWS, D. L. HORNEY ET L. J. REED, *J. Biol. Chem.*, 240 (1960) 2268.
- 14 M. KOIKE, L. J. REED ET W. R. CARROLL, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 1924.
- 15 K. D. MUNKRES ET D. O. WOODWARD, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 55 (1966) 1217.
- 16 J. O'HARA, C. T. GRAY, J. PUIG ET F. PICHIOTY, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 28 (1967) 951.
- 17 R. SATO, dans, *Inorganic Nitrogen Metabolism*, John Hopkins Press, Baltimore, 1956, p. 163.
- 18 S. TANIGUCHI, R. SATO ET F. EGAMI, dans, *Inorganic Nitrogen Metabolism*, John Hopkins Press, Baltimore, 1956, p. 87.