

BBA 67022

## LES NITRATE-REDUCTASES BACTERIENNES SOLUBILISATION, PURIFICATION ET PROPRIETES DE L'ENZYME A DE *MICROCOCOCCUS HALODENITRIFICANS*

J.-P. ROSSO, P. FORGET ET F. PICHINOTY

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

(Reçu le 7 mai, 1973)

---

### SUMMARY

*Bacterial nitrate reductases. Solubilization, purification and properties of the enzyme A of Micrococcus halodenitrificans*

**Solubilization and purification.** Crude extract is prepared from cells of *Micrococcus halodenitrificans* grown anaerobically in the presence of  $\text{NO}_3^-$ . Nitrate reductase A is solubilized by an alkali-acetone treatment of particles. The purification consists of four steps: Sephadex gel filtration; elimination of nucleic acids by protamine sulfate precipitation; two successive absorptions and elutions on  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  gel. The enzyme is purified 40-fold with a yield of 12%. Polyacrylamide gel electrophoresis show the preparation to be homogeneous.

**Properties.** Molecular weight: (electrophoresis) 165 000. Flavins: no FMN or FAD. Purified preparations have a brown color. Absorption increases continuously from 600 to 280 nm. The spectrum has a shoulder at 410 nm, but no peak in the visible or near-ultraviolet. The enzyme contains approximately 2 Fe atoms, 1 Mo atom and 4 "labile sulfide groups in acid medium" per mole ( $M_w = 165\ 000$ ). It has a high content in aspartic and glutamic acids. Electron donors: the enzyme uses the reduced forms of viologen indicators,  $\text{FMNH}_2$  but not NADH and NADPH. It uses  $\text{NO}_3^-$  and  $\text{ClO}_3^-$  as substrates. Cyanide and azide inhibit its activity. The inhibition by azide is competitive. The enzyme's affinity for azide is about a thousand times greater than for  $\text{NO}_3^-$  or  $\text{ClO}_3^-$ . Activity is maximal at pH 6.3 ( $\text{NO}_3^-$ ) and 6.4 ( $\text{ClO}_3^-$ ). NaCl does not activate the enzyme.

**Conclusion.** Nitrate reductase A of *M. halodenitrificans* is a non-heme Fe protein containing Mo.

---

### INTRODUCTION

*M. halodenitrificans* est une bactérie dénitrifiante, halophile modérée au sens de Larsen<sup>1</sup>, qui croît de façon optimale dans un milieu complexe contenant entre 4.4-8.8% de NaCl. En anaérobiose, elle utilise  $\text{NO}_3^-$  ou  $\text{NO}_2^-$  comme substrats

respiratoire. Ces composés sont réduits en  $N_2$  (réf. 2). Davis *et al.*<sup>3</sup> ont proposés d'inclure *M. halodenitrificans*, ainsi que l'espèce non halophile *M. denitrificans*, dans le genre *Paracoccus*, car, d'une part ces deux organismes sont morphologiquement et physiologiquement très proches, d'autre part leur inclusion dans le genre *Micrococcus* s'est révélée incorrecte.

La nitrate-réductase de *M. halodenitrificans* a été identifiée à l'enzyme A (réf. 4). Dans les extraits bruts de cette bactérie, elle est solidaire des particules respiratoires<sup>4</sup>. Dans le présent article, nous décrivons sa solubilisation, les différentes étapes de sa purification, ainsi que ses principales propriétés.

#### MATERIEL ET METHODES

##### *Organisme*

Nous avons utilisé la souche 286 (ATCC 13 511) de *M. halodenitrificans*, isolée par Robinson et Gibbons<sup>2</sup>, qui est déposée à la collection tchèque de microorganismes (Brno).

##### *Cultures*

La bactérie est entretenue sur des géloses nutritives inclinées contenant par l: protéose-peptone, 5 g; tryptone, 5 g; NaCl, 80 g; agar, 20 g.

Les cultures de masse sont faites à 32 °C, dans un fermenteur de 200 l contenant le milieu suivant: protéose-peptone (Difco), 3,5 g; tryptone (Difco), 3,5 g; lactate de sodium, 2 g;  $KNO_3$ , 1,5 g; NaCl, 80 g; eau, 1000 ml. On ensemence avec un inoculum de 40 l. Les conditions d'anaérobiose sont créées par un barbotage continu de  $N_2$ . Après 24 h de culture, les cellules sont recueillies par centrifugation continue avec une centrifugeuse Sharples.

##### *Préparation des extraits enzymatiques*

Les cellules sont lavées avec une solution de NaCl à 8% contenant des traces de désoxyribonucléase (désoxyribonucléate oligonucléotido-hydrolase, EC 3.1.4.5), par centrifugation continue. L'addition de cet enzyme supprime la viscosité élevée des suspensions, qui est provoquée sans doute par une lyse partielle des cellules. Les bactéries sont ensuite remises en suspension dans l'eau distillée et traitées à la presse automatique Manton-Gaulin. L'extrait est débarrassé des débris bactériens par centrifugation à  $18\,000 \times g$  pendant 15 min.

##### *Mesure des activités enzymatiques*

Les activités nitrate- et chlorate-réductases sont mesurées en présence d'un tampon phosphate (pH 7) et à 37 °C, à l'aide d'une méthode manométrique<sup>5</sup>. Le benzyl-viologène réduit joue le rôle de donneur d'électrons.

##### *Dosage des protéines*

Les protéines sont dosées par le réactif de Folin<sup>6</sup>, la courbe de référence étant établie avec l'albumine de boeuf.

##### *Dosage des métaux lourds*

L'échantillon est introduit dans un matras avec 2 ml de  $H_2SO_4$  concentré. Le

mélange est porté lentement à l'ébullition. Dès que les vapeurs blanches apparaissent, on laisse refroidir, puis l'on ajoute une goutte de  $\text{H}_2\text{O}_2$  à 110 vol. Le mélange est de nouveau porté à l'ébullition. Ces opérations sont répétées jusqu'à décoloration complète. L'acidité est alors neutralisée par l'addition de 7 à 8 ml d'ammoniaque concentrée. On mène parallèlement un essai à blanc. Le fer et le molybdène sont dosés colorimétriquement suivant les techniques respectives de Sandell<sup>7</sup> et de Johnson et Arkley<sup>8</sup>.

#### *Dosage des groupes "sulfure labile"*

Les groupes "sulfure labile en milieu acide" sont dosés par la technique de Fogo et Popowsky<sup>9</sup>, modifiée par Brumby *et al.*<sup>10</sup>.

#### *Electrophorèses*

L'homogénéité des préparations de nitrate-réductase est testée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, à pH 8.4, à l'aide d'un appareil Canalco, selon la méthode de Davis<sup>11</sup>. La concentration du gel séparateur est de 7%, celle du gel de stockage, de 3.5%. Le courant électrique a une intensité de 3 mA par tube. L'échantillon contenant 25  $\mu\text{g}$  de protéines est mélangé au gel de stockage. L'électrophorèse dure 3 h. Les gels sont plongés, pendant 30 min, dans une solution d'acide acétique à 7% contenant 0.5% de noir d'aniline. Ils sont ensuite décolorés par l'acide acétique à 7%.

L'activité nitrate-réductase est révélée de la manière suivante. Au lieu d'être coloré par le noir d'aniline, le gel est immergé, après l'électrophorèse, dans une solution contenant le tampon phosphate (pH 7), le benzyl-viologène et l'hydrogénase. On fait barboter  $\text{H}_2$  pour réduire l'indicateur d'oxydoréduction. On laisse en incubation pendant 20 min. Après ce laps de temps, le gel est uniformément coloré en violet. On le plonge ensuite dans une solution de  $\text{KNO}_3$ . Un anneau de décoloration très net, dû à la réoxydation du benzyl-viologène, signale la bande correspondant à la nitrate-réductase. Dans chaque cas, l'on utilise deux gels; l'un sert à révéler les protéines, l'autre, l'activité.

Le poids moléculaire est déterminé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide<sup>12</sup>.

#### *Composition en acides aminés*

L'analyse de la composition en acides aminés de la protéine est faite par chromatographie au moyen d'un appareil Beckman, modèle Unichrom, selon le procédé de Moore et Stein<sup>13</sup>. L'échantillon est hydrolysé par  $\text{HCl}$  6 M, à 110 °C, pendant 24 h, en tubes scellés sous vide.

### RESULTATS

#### *Solubilisation et purification*

*Séparation des particules.* On ajoute du  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  à l'extrait brut contenant  $\text{MgCl}_2$  1 mM, maintenu à 4 °C et à pH 7 (par l'addition de  $\text{NaOH}$  0.02 M), jusqu'à ce que la concentration atteigne 50% de la saturation. L'agitation est maintenue pendant l'addition du sel. Après centrifugation à  $35\,000 \times g$  pendant 30 min, le culot est recueilli, puis remis en suspension dans du tampon phosphate de potassium

0.1 M (pH 6.2), de façon à obtenir une concentration en protéines voisine de 20 mg/ml. On dialyse ensuite contre une solution de  $\text{MgCl}_2$  1 mM, à 4 °C, pendant 7 h.

*Traitement acétonique.* On ajoute 100 volumes de la solution de protéines à 1000 volumes d'acétone contenant 1 volume d'ammoniaque concentrée. L'opération est effectuée à -12 °C, sous agitation constante, pendant 30 min. On laisse décanter, on centrifuge à  $12\,000 \times g$  pendant 5 min, puis on recueille le culot. Ce dernier est mis à sécher sous vide pendant 1 h. On reprend dans du tampon phosphate 0.1 M (pH 8.3) contenant du versène 1 mM. Le volume de tampon est choisi de sorte que la concentration en protéines soit d'environ 30 mg par ml. Une fois rendue homogène, la suspension est agitée faiblement sous un courant d'air, à 2 °C, pendant 3 h. La durée de cette dernière étape exerce une influence déterminante sur le rendement de la solubilisation. On centrifuge à  $35\,000 \times g$  pendant 40 min. On recueille le surnageant. L'acétone est évaporée de nouveau sous vide.

*Filtration sur Sephadex G-200.* Le volume est préalablement réduit par passage sur une colonne de Sephadex G-25 fine. On ajoute la poudre à la solution, maintenue sous agitation, jusqu'à ce qu'elle constitue une pâte à peine liquide. On verse le mélange dans une colonne pourvue d'un verre fritté. L'élution est faite avec de l'eau distillée. Le volume de la solution, recueillie après deux concentrations successives, est d'environ 75 ml. On utilise deux colonnes de Sephadex G-200, disposées en série. Leur longueur totale est 170 cm, leur diamètre, 5 cm, leur débit, 45 ml/h. La filtration est ascendante. L'élution est faite avec un tampon phosphate 0.2 M (pH 7.4) contenant  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0.075 M. Elle dure 36 h. On réunit les fractions les plus actives. Le rendement moyen de l'opération atteint 75%. Les résultats se trouvent sur la Fig. 1. On dialyse la solution obtenue contre du tampon Tris-HCl 0.01 M (pH 7.4), pendant 7 h, pour éliminer le  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

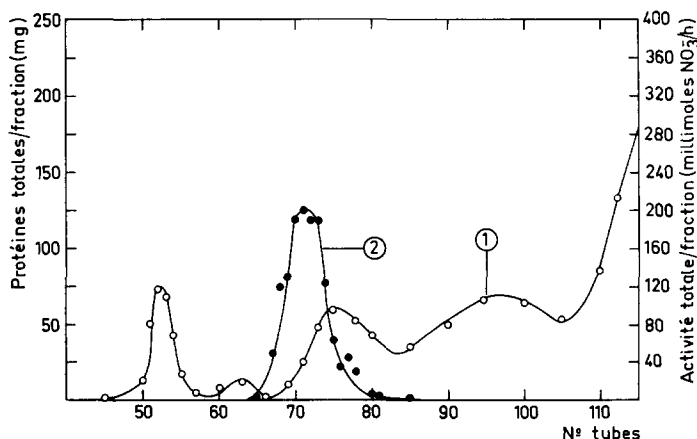


Fig. 1. Filtration sur Sephadex G-200: diagramme d'élution. (1) protéines; (2) activité.

*Élimination des acides nucléiques.* A ce stade de la purification, le pourcentage en acides nucléiques est encore très élevé, puisque le rapport des absorbances à 280 et 260 nm approche de 0.5. On effectue une précipitation par le sulfate de protamine. Les meilleures conditions expérimentales sont les suivantes: le rapport pondéral des

concentrations de protéines et de sulfate de protamine doit atteindre l'unité, le pH doit être compris entre 7 et 7.5, la durée du contact doit être d'une heure. On utilise une solution de sulfate de protamine dans du tampon Tris-HCl 10 mM (pH 7.4). Le culot, recueilli après centrifugation, est repris dans du tampon Tris-HCl 0.05 M (pH 7.4) contenant NaCl 0.25 M. Après centrifugation, l'on retrouve l'enzyme dans le surnageant. On le précipite par le  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  entre 40 et 65% de la saturation. Le culot, issu de la centrifugation, est repris dans du tampon Tris-HCl 0.01 M (pH 7.4), puis dialysé pendant 7 h contre le même tampon. Les acides nucléiques sont alors pratiquement éliminés, puisque le rapport des absorbances à 280 et 260 nm atteint une valeur se situant aux alentours de 1.6.

*Chromatographies sur gel de phosphate de calcium.* On fait passer la solution sur une colonne contenant un gel de phosphate de calcium, préparé selon le procédé de Paneque *et al.*<sup>14</sup>, ayant une hauteur de 10 cm et un diamètre de 4 cm. On élue ensuite les protéines de façon discontinue par des tampons phosphate (pH 7.4) de molarité croissante. Le procédé s'avère reproductible. L'enzyme est élué par le tampon 0.2 M (Fig. 2). On retrouve la majeure partie des impuretés dans les tampons 0.01 ou

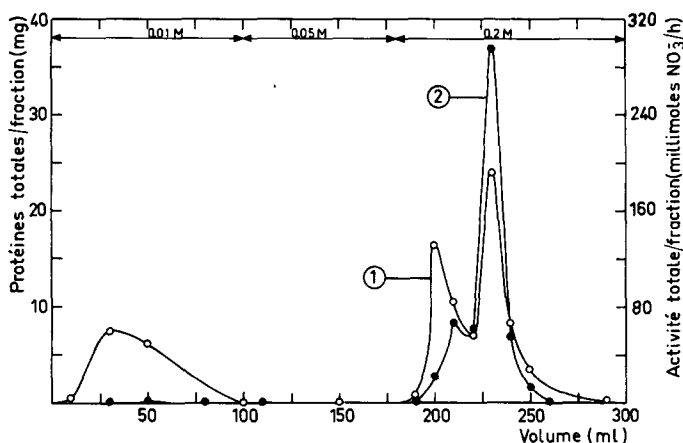


Fig. 2. Première chromatographie sur gel de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ; diagramme d'élution. (1) protéines; (2) activité.

0.03 M. Le tampon 0.05 M provoque une migration et un étalement de la bande colorée due à la nitrate-réductase. Ceci semble provenir de la séparation progressive d'un contaminant de nature cytochromique lié à l'enzyme. On réunit les fractions les plus actives. Une dialyse est effectuée contre du tampon Tris-HCl 10 mM (pH 7.4) pendant 7 h. Les ions phosphate sont ainsi éliminés. La fraction obtenue est dénommée  $\text{GP}_1$ .

On procède à 1<sup>re</sup> chromatographie sur gel de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , dans les mêmes conditions que précédemment. L'enzyme est alors élué par le tampon phosphate 0.05 M (Fig. 3). Les dernières impuretés passent dans les tampons de plus faible molarité. La nitrate-réductase purifiée est conservée dans son tampon d'élution. Il s'agit de la Fraction  $\text{GP}_2$ .

*Tests de pureté.* Les résultats des électrophorèses se trouvent sur les Figs 4 et 5. La bande correspondant à la nitrate-réductase est repérée par son activité sur les

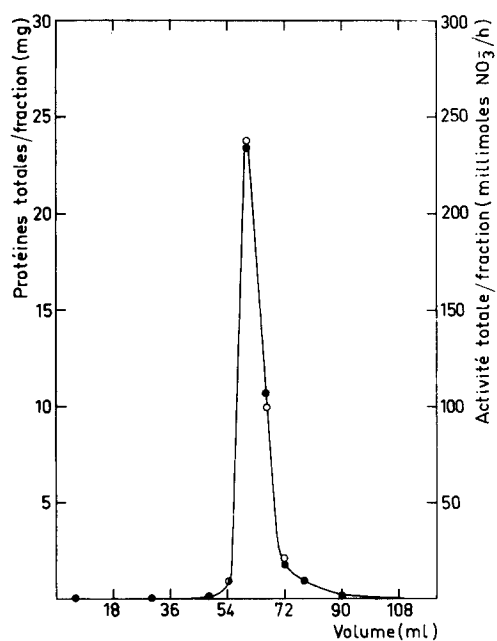


Fig. 3. Seconde chromatographie sur gel de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ : diagramme d'élution. ○—○, protéines; ●—●, activité.

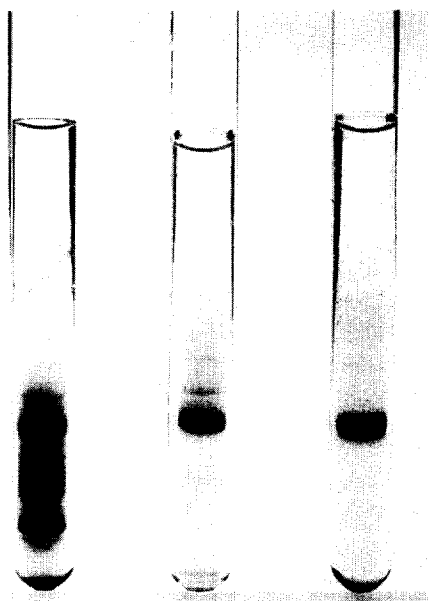


Fig. 4. Electrophorèse de différentes fractions sur gel de polyacrylamide à pH 8.4. L'origine est située au sommet du gel. Tube de gauche, après filtration sur Sephadex G-200; tube central, Fraction  $\text{GP}_1$ ; tube de droite, Fraction  $\text{GP}_2$ .

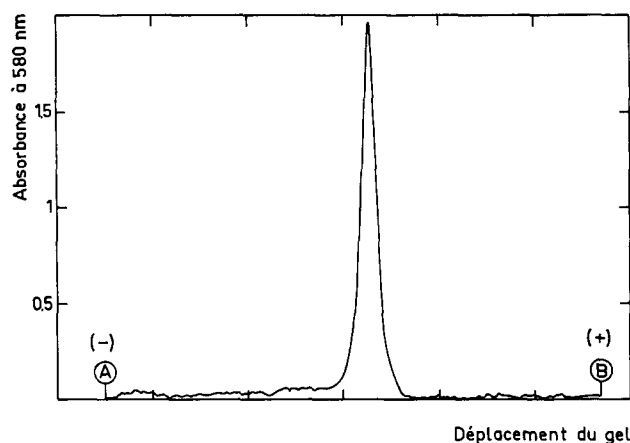


Fig. 5. Absorption de la Fraction  $GP_2$ : lecture du gel coloré par le noir d'aniline. Le déplacement s'effectue de A vers B.

gels non colorés par le noir d'aniline. Après la filtration sur Sephadex G-200, de nombreuses bandes apparaissent; la plus foncée, qui se trouve sensiblement au milieu du gel, est due à la nitrate-réductase. La Fraction  $GP_1$  présente seulement quelques faibles bandes dues à des protéines contaminantes. On observe, dans le cas de la Fraction  $GP_2$ , une seule bande, qui correspond à l'enzyme.

Le rendement final est proche de 12%, et le taux de purification atteint 40 fois. La Fraction  $GP_2$  a une activité spécifique proche de  $10^4$   $\mu\text{moles NO}_3^-/\text{h}$  par mg protéine, à 37 °C. Dans le Tableau I, figurent les différentes étapes d'une purification complète.

TABLEAU I

PURIFICATION

Activité totale:  $\mu\text{moles NO}_3^-/\text{h}$ . Activité spécifique:  $\mu\text{moles NO}_3^-/\text{h}$  par mg protéine.

	Volume (ml)	Quantité totale de protéines (mg)	Activité totale	Activité spécifique	Taux de puri- fication	Rende- ment (%)
Extrait brut	880	14 000	3500	250	1	100
Séparation des particules par précipitation au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	650	9 500	3050	320	1.3	87
Traitement acétonique	350	1 800	2100	1 150	4.6	60
Filtration sur Sephadex G-200	450	500	1400	2 800	11.2	40
Traitement par le sulfate de protamine et précipitation au $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	50	220	775	3 600	14.4	22
Première chromatographie sur gel de phosphate ( $GP_1$ )	56	66	550	8 300	33	15
Seconde chromatographie sur gel de phosphate ( $GP_2$ )	25	42	420	10 000	40	12

Propriétés

L'étude des propriétés a été faite sur diverses Fractions  $GP_2$  homogènes à l'électrophorèse.

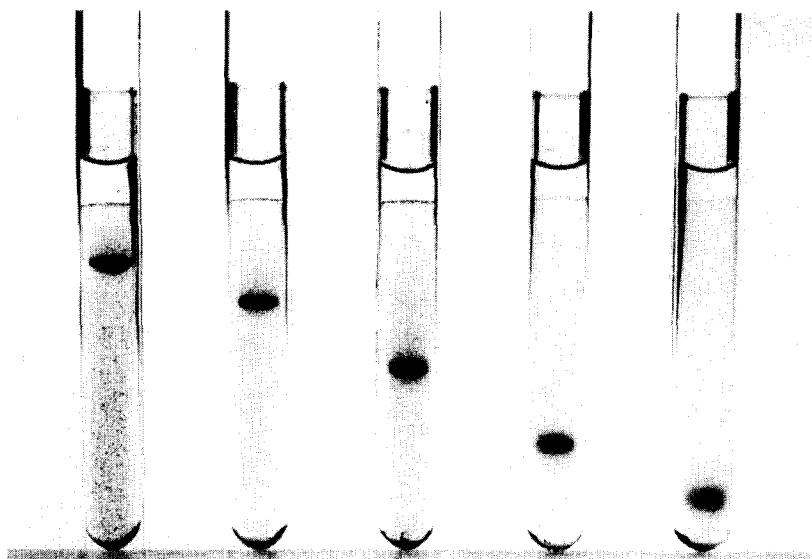


Fig. 6. Estimation du poids moléculaire. La nitrate-réductase (20  $\mu$ g) est soumise à l'électrophorèse sur des gels de différentes concentrations. Les concentrations en acrylamide, exprimées en pour cent, sont respectivement, de gauche à droite: 10.5; 8.75; 7; 5.25; 4.

*Poids moléculaire.* Les résultats obtenus au cours d'une détermination du poids moléculaire se trouvent sur les Figs 6 et 7. La moyenne des valeurs enregistrées avec trois préparations différentes est de 165 000. Compte tenu de la marge d'erreur inhérente à la méthode employée, on peut supposer que le poids moléculaire réel se situe entre 155 000 et 175 000.

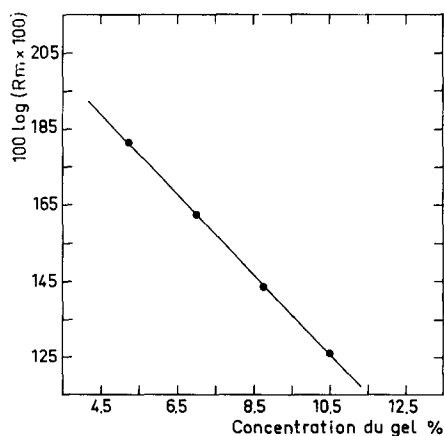


Fig. 7. Estimation du poids moléculaire. La mobilité relative ( $R_m$ ) de la protéine varie de façon exponentielle en fonction de la concentration du gel en acrylamide. C'est pourquoi la courbe représentant les variations de  $\log R_m$  est une droite. Le poids moléculaire de la protéine est proportionnel à la pente de cette droite, qui a pour valeur 104 dans l'expérience décrite. La courbe de référence a été obtenue avec des protéines de poids moléculaire connu: albumine de boeuf (68 000); hexokinase (ATP:D-hexose 6-phospho-transférase, EC 2.7.1.1) de levure (100 000); lactico-déshydrogénase (L-lactate:NAD-oxydoréductase, EC 1.1.1.27) de coeur de boeuf (144 000); phosphatase alcaline (monoester orthophosphorique-phosphohydrolase, EC 3.1.3.1) de muscle de lapin (183 000).



*Spectre d'absorption.* Les solutions de nitrate-réductase ont une coloration brune qui rappelle celle des solutions de sels ferriques. L'absorption croît progressivement de 600 à 280 nm. Aucun pic n'apparaît en dehors de celui qui est situé à 280 nm. L'épaule observée à 410 nm caractérise les ferroprotéines non hémiques (Fig. 8). L'absorption d'une solution contenant 1 g de protéine par l, mesurée dans une cuve ayant un passage lumineux de 10 mm, est de 0.385 à 410 nm, et de 2.91 à 280 nm.

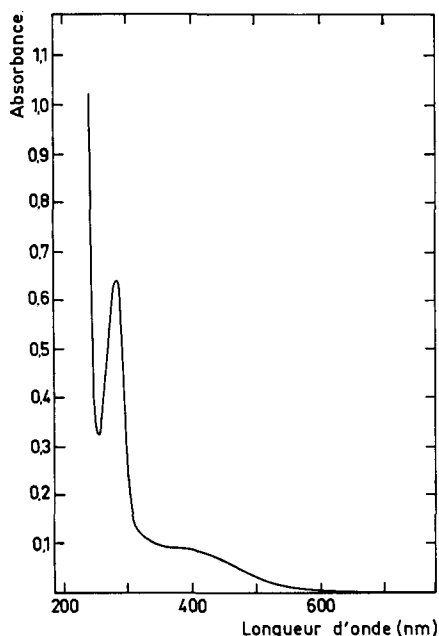


Fig. 8. Spectre d'absorption de la nitrate-réductase purifiée (Fraction GP<sub>2</sub>). La protéine est en solution dans du tampon phosphate 0.05 M (pH 7.4). Sa concentration est de 0.22 mg/ml. On emploie un spectrophotomètre Cary 14 et des cuves ayant un trajet optique de 10 mm. La cuve de référence contient le tampon.

*Recherche des groupes flaviniques.* La recherche des groupes flaviniques a été faite par mesure de la fluorescence émise après dénaturation de la protéine. La lumière excitatrice a une longueur d'onde de 450 nm. On calibre l'appareil avec une solution de FMN dans un tampon phosphate 0.1 M (pH 7.4). Celle-ci émet une lumière fluorescente dont le maximum se situe à 526 nm. On met l'enzyme en solution dans le même tampon contenant de l'urée 7.5 ou 9 M. Aucune émission ne se produit après 30 min d'incubation, ce qui prouve qu'aucune flavine n'est libérée au cours de la dénaturation de la protéine.

*Dosage du fer et du molybdène.* Le fer et le molybdène ont été dosés dans deux préparations différentes a et b, ayant une activité spécifique de  $10^4$   $\mu$ moles NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/h par mg protéine. Sur la base d'un poids moléculaire de 165 000, on trouve les teneurs suivantes: (a) 2.06 atomes de Fe et 0.78 atome de Mo par mole; (b) 1.75 atome de Fe et 0.94 atome de Mo par mole. Ainsi, l'enzyme contiendrait approximativement 2 atomes de fer et un atome de molybdène par mole.

*Groupes "sulfure labile".* Les groupes "sulfure labile en milieu acide" ont été dosés dans les préparations ayant servi au dosage des métaux. On trouve respective-

ment 4.15 et 3.5 groupes par mole d'enzyme dans les préparations a et b. La valeur moyenne se situe ainsi aux alentours de 4.

*Composition en acides aminés.* Les résultats d'une analyse sont rassemblés dans le Tableau II. La cystéine n'a pas été dosée. Etant donné la taille élevée de la protéine, les valeurs représentant le nombre de résidus par mole ne constituent qu'une estimation approximative. On remarquera les teneurs élevées en acides aspartique et glutamique, glycine, alanine et leucine.

TABLEAU II

## COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS

Corrections pour l'hydrolyse acide de 24 h: on ajoute 5% dans le cas de la thréonine, et 10% dans le cas de la sérine. Les valeurs figurant dans la colonne de droite ont été calculées sur la base d'un poids moléculaire de 165 000.

<i>Acide aminé</i>	<i>Nombre de résidus par mole de protéine</i>	<i>Poids par mole de protéine</i>
Lysine	65	8 320
Histidine	31	4 247
Arginine	82	12 792
Tryptophane	42	7 812
Acide aspartique	152	17 480
Thréonine	64	6 464
Sérine	64	11 068
Acide glutamique	168	21 672
Proline	78	7 566
Glycine	162	9 234
Alanine	122	9 150
Cystéine		
Valine	84	8 316
Méthionine	30	3 930
Isoleucine	68	6 596
Leucine	114	11 058
Tyrosine	50	8 150
Phénylalanine	50	7 350
Total	1426	162 105

*Donneurs d'électrons.* La nitrate-réductase purifiée ne catalyse pas la réduction de  $\text{NO}_3^-$  aux dépens du NADH ou du NADPH. Elle utilise, comme donneurs d'électrons, les formes réduites du benzyl- et du méthyl-viologène, ainsi que le FMNH<sub>2</sub>.

*Activité moléculaire.* L'activité moléculaire (ou constante catalytique) de plusieurs préparations, mesurée à pH 7 et à 37 °C, est proche de  $2.75 \cdot 10^4$  moles  $\text{NO}_3^-/\text{min}$  par mole d'enzyme.

*Substrats.* L'enzyme purifié utilise  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{ClO}_3^-$  comme substrats. Dans les conditions de saturation, le rapport des activités chlorate- et nitrate-réductases est de 1.5.

*Constantes de Michaelis.* Pour la détermination de  $K_{M-V}$ , le benzyl-viologène est remplacé par le méthyl-viologène. Les valeurs sont groupées dans le Tableau III.  $K_{\text{ClO}_3^-}$  est légèrement plus élevé que  $K_{\text{NO}_3^-}$ . La constante pour les deux donneurs d'électrons est sensiblement la même dans le cas de  $\text{NO}_3^-$  et  $\text{ClO}_3^-$ . Le cyanure et l'azoture inhibent l'activité. La cinétique observée dans le cas de  $\text{N}_3^-$  est celle d'une inhibition compétitive.  $K_{\text{N}_3^-}$  est très faible, de l'ordre de  $10^{-3}$  mM, dans le cas des deux substrats.

TABLEAU III

## CONSTANTES DE MICHAELIS

Chaque valeur représente la moyenne d'au moins deux déterminations indépendantes. La détermination des constantes à l'égard des substrats et de l'azoture a été faite en présence de benzyl-viologène réduit comme donneur d'électrons. B-V, benzyl-viologène; M-V, méthyl-viologène. Les trois exemples suivants illustrent la nomenclature employée:  $K_{\text{NO}_3^-}$ , constante envers le nitrate;  $K_{\text{N}_3^-}$  ( $\text{NO}_3^-$ ), constante d'inhibition à l'égard de l'azoture, mesurée en présence de  $\text{NO}_3^-$  comme substrat;  $K_{\text{B-V}}$  ( $\text{NO}_3^-$ ), constante envers le benzyl-viologène, mesurée en présence de  $\text{NO}_3^-$  comme substrat.

	$K_m$ ou $K_i$ (M)
$K_{\text{NO}_3^-}$	$1.3 \cdot 10^{-3}$
$K_{\text{ClO}_3^-}$	$5 \cdot 10^{-3}$
$K_{\text{N}_3^-}$ ( $\text{NO}_3^-$ )	$2 \cdot 10^{-6}$
$K_{\text{N}_3^-}$ ( $\text{ClO}_3^-$ )	$1.1 \cdot 10^{-6}$
$K_{\text{B-V}}$ ( $\text{NO}_3^-$ )	$0.7 \cdot 10^{-4}$
$K_{\text{B-V}}$ ( $\text{ClO}_3^-$ )	$1.2 \cdot 10^{-4}$
$K_{\text{M-V}}$ ( $\text{NO}_3^-$ )	$0.8 \cdot 10^{-3}$
$K_{\text{M-V}}$ ( $\text{ClO}_3^-$ )	$1.5 \cdot 10^{-3}$

*Action de NaCl sur l'activité.* La concentration de NaCl varie de 0.167 à 1.67 M. Aucune activation n'est observée.

*Activité en fonction du pH.* On emploie une série de tampons phosphate dont le pH varie entre 5.29 et 8.04. La concentration finale en ions  $\text{PO}_4^{3-}$  dans le milieu est 1.113 M. Les courbes sont très étalées. Les pH correspondant à l'activité optimale se situent à 6.3 dans le cas de  $\text{NO}_3^-$ , et à 6.4 dans le cas de  $\text{ClO}_3^-$ .

## DISCUSSION

La nitrate-réductase A (FMN $\text{H}_2$ :nitrate(chlorate)-oxydoréductase A) de *M. denitrificans* a été solubilisée et purifiée. Il s'agit d'une molybdo-ferroprotéine non héminique, dépourvue de groupe prosthétique flavinique, ayant un poids moléculaire de 160 000. Les préparations obtenues contenaient 0.3 atome de molybdène et 4-8 atomes de fer par mole, ainsi que des groupes "sulfure labile en milieu acide"<sup>15</sup>. Les spectres RPE ont confirmé la présence de ces métaux et révélé l'existence de signaux attribuables à Mo(V) et Fe(III)<sup>16</sup>.

Seules quelques modifications mineures ont été apportées au procédé antérieurement mis au point par l'un de nous<sup>15</sup> pour purifier l'enzyme A de *M. denitrificans*. L'élimination des acides nucléiques par le traitement au sulfate de protamine s'effectue avec un rendement variable. Dans le cas des deux chromatographies sur gel de  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , l'élution a été faite à pH 7.4. Il se peut que l'emploi d'un tampon légèrement acide, de pH 6.2, lors de la première chromatographie, soit responsable de la perte d'une partie du molybdène initialement présent dans l'enzyme de *M. denitrificans*<sup>15</sup>. Mais ceci n'a pas été établi avec certitude.

L'absence de pics  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  révèle que la nitrate-réductase A de *M. halodeni-trificans* ne contient pas de groupe héminique. D'autre part, le spectre d'absorption, et surtout les analyses par fluorescence, établissent l'absence de FMN ou de FAD. Nous avons trouvé approximativement 4 groupes "sulfure labile en milieu acide", 1 atome de Mo et 2 atomes de Fe pour un poids moléculaire de 165 000. La teneur en fer est plus faible que celle des nitrate-réductases A de *M. denitrificans*<sup>15</sup> et *Esche-*

*richia coli*<sup>17</sup>, ou de molybdo-ferroprotéines bien connues telles que la xanthine-oxydase (xanthine:O<sub>2</sub>-oxydoréductase, EC 1.2.3.2), l'aldéhyde-oxydase (aldéhyde:O<sub>2</sub>-oxydoréductase, EC 1.2.3.1) et la molybdo-ferrédoxine, constituant essentiel du système "nitrogénase" bactérien<sup>18</sup>. Il n'est pas possible de savoir si une partie du fer a été perdue en cours de purification. Malgré l'absence de preuves directes, on peut supposer que le fer et le molybdène jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement de l'enzyme A de *M. halodenitrificans*. De façon générale, les nitrate-réductases de *M. denitrificans*<sup>15</sup> et *M. halodenitrificans* ont des propriétés catalytiques ou physico-chimiques identiques ou très proches. Elles utilisent les mêmes donneurs d'électrons et les mêmes substrats, ont des poids moléculaires sensiblement identiques et présentent des constantes de Michaelis très voisines.

Les enzymes des bactéries halophiles modérées sont fréquemment activées par des concentrations élevées de NaCl<sup>1</sup>. C'est, en particulier, le cas de la cytochrome-oxydase de *M. halodenitrificans*<sup>19</sup>. Nous avons vu, par contre, que la nitrate-réductase de cette bactérie ne présente aucun caractère halophile.

Les nitrate-réductases assimilatrices de l'algue verte *Chlorella*<sup>20</sup> et du champignon *Neurospora crassa*<sup>21</sup> contiennent aussi du molybdène. Cependant, elles diffèrent de l'enzyme A respiratoire bactérien, puisqu'elles possèdent des activités diaphorase, NADH (ou NADPH)-nitrate-réductase et FMNH<sub>2</sub> (ou FADH<sub>2</sub>)-nitrate-réductase<sup>20, 21</sup>.

#### RESUME

*Solubilisation et purification.* L'extrait brut est préparé à partir de cellules de *M. halodenitrificans* ayant crû, en anaérobiose, en présence de NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. La nitrate-réductase A est solubilisée par un traitement acétonique des particules en milieu alcalin. La purification comprend quatre étapes: une filtration sur Sephadex; l'élimination des acides nucléiques par précipitation au sulfate de protamine; deux chromatographies successives sur gel de Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>. L'enzyme est purifié 40 fois avec un rendement de 12 %. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide montre que la préparation est homogène.

*Propriétés.* Poids moléculaire: (électrophorèse) 165 000. Flavines: absence de FMN ou de FAD. Les préparations purifiées ont une coloration brune. L'absorption augmente continuellement de 600 à 280 nm. Le spectre présente un épaulement à 410 nm, mais pas de pic dans le visible ou le proche ultra-violet. L'enzyme contient approximativement 2 atomes de fer, 1 atome de molybdène et 4 groupes "sulfure labile en milieu acide" par mole ( $P_m = 165\ 000$ ). Il a une teneur élevée en acides aspartique et glutamique. Donneurs d'électrons: l'enzyme utilise les formes réduites des indicateurs viologènes et le FMNH<sub>2</sub>, mais pas le NADH ou le NADPH. Il utilise NO<sub>3</sub><sup>-</sup> et ClO<sub>3</sub><sup>-</sup> comme substrats. Le cyanure et l'azoture inhibent son activité. L'inhibition provoquée par l'azoture est compétitive. L'affinité de la nitrate-réductase pour l'azoture est approximativement mille fois plus élevée que celle pour NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ou ClO<sub>3</sub><sup>-</sup>. L'activité est maximale aux pH 6.3 (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) et 6.4 (ClO<sub>3</sub><sup>-</sup>). Le NaCl n'active pas l'enzyme.

*Conclusion.* La nitrate-réductase A de *M. halodenitrificans* est une molybdo-ferroprotéine non hémينية.

## REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient Mr M. Iwatsubo (Centre de Génétique Moléculaire, C.N.R.S., Gif-sur-Yvette) qui a bien voulu se charger de la recherche des flavines par fluorescence, ainsi que Mme J. Bigliardi-Rouvier, Mr R. Rimassa et Mme G. Bovier-Lapierre, pour leur précieuse collaboration technique.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 Larsen, H. (1962) in *The Bacteria* (Gunsalus, I. C., Stanier, R. Y., eds), Vol. 4, pp. 297-342, Academic Press, New York
- 2 Robinson, J. et Gibbons, N. E. (1952) *Can. J. Botany* 30, 147-154
- 3 Davis, D. H., Doudoroff, M. et Stanier, R. Y. (1969) *Int. J. Syst. Bacteriol.* 19, 375-390
- 4 Pichinoty, F. (1971) *Arch. Mikrobiol.* 76, 83-90
- 5 Pichinoty, F. et Piéchaud, M. (1968) *Ann. Inst. Pasteur* 114, 77-98
- 6 Sutherland, E. W., Cori, C. F., Haynes, R. et Olsen, N. S. (1949) *J. Biol. Chem.* 180, 825-837
- 7 Sandell, E. B. (1957) *Chemical Analysis*, Vol. 3, p. 537, Interscience Publishers, New York
- 8 Johnson, C. M. et Arkley, T. H. (1954) *Anal. Chem.* 26, 572-574
- 9 Fogo, J. K. et Popowsky, M. (1949) *Anal. Chem.* 21, 732-734
- 10 Brumby, P. E., Miller, R. W. et Massey, V. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 2222-2228
- 11 Davis, B. J. (1964) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404-427
- 12 Hedrick, J. L. et Smith, A. J. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* 126, 155-164
- 13 Moore, S. et Stein, W. H. (1963) in *Methods in Enzymology* (Colowick, S. P., Kaplan, N. O., eds), Vol. 6, pp. 819-831, New York
- 14 Paneque, A., Del Campo, F. F., Ramirez, J. M. et Losada, M. (1965) *Biochim. Biophys. Acta* 109, 79-85
- 15 Forget, P. (1971) *Eur. J. Biochem.* 18, 442-450
- 16 Forget, P. et DerVartanian, D. V. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* 256, 600-606
- 17 Taniguchi, S. et Itagaki, E. (1960) *Biochim. Biophys. Acta* 44, 263-279
- 18 Postgate, J. R. (1970) *Nature* 226, 25-27
- 19 Baxter, R. M. et Gibbons, N. E. (1956) *Can. J. Microbiol.* 2, 599-606
- 20 Vega, J. Ma., Herrera, J., Aparicio, P. J., Paneque, A. et Losada, M. (1971) *Plant Physiol.* 48, 294-299
- 21 Garrett, R. H. et Nason, A. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 2870-2882