

## OBTENTION ET ETUDE DE DOUBLES MUTANTS CHLORATE-RESISTANTS CHEZ *ESCHERICHIA COLI* K12

J. MARCOT et E. AZOULAY

Laboratoire de Chimie Bactérienne, C.N.R.S. 31, chemin J. Aiguier, 13 Marseille, France

Received 28 December 1970

Three double mutants were prepared from single mutant *chl*-r strains of *Escherichia coli* K12 lacking nitrate reductase activity. When extracts of these three double mutants were mixed, nitrate reductase activity was reconstituted.

### 1. Introduction

Comme il a déjà été mentionné [1, 2], la résistance au chlorate chez *Escherichia coli* K12 est partagée par cinq groupes de mutants génétiquement distincts. Les quatre premiers groupes sont formés de gènes pléiotropes qui ont le phénotype *nit*<sup>-</sup>*gas*<sup>-</sup>: *chl* A<sup>-</sup> [3], *chl* B<sup>-</sup> [4], *chl* D<sup>-</sup> [5], *chl* E<sup>-</sup> [6]. Ces mutants ont perdu la capacité de réduire NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en NO<sub>2</sub><sup>-</sup> et de produire de l'hydrogène gazeux à partir du formiate résultant de la fermentation du glucose. Les mutants du dernier groupe *chl* C<sup>-</sup> [7] sont *nit*<sup>-</sup>*gas*<sup>+</sup>.

La reconstitution in vitro de l'activité nitrate-réductase par 'complémentation' à partir des extraits des mutants *chl* A<sup>-</sup> et *chl* B<sup>-</sup> a permis à Azoulay et al. [8] d'étudier expérimentalement le rôle des produits de ces deux gènes et du cytochrome *b*<sub>1</sub> qui sont présents à l'état soluble dans les préparations acellulaires des souches mutées. Cette reconstitution s'accompagne de la formation de particules qui, après examen au microscope électronique se sont révélées identiques aux particules membranaires obtenues à partir de la souche sauvage d' *E. coli* K12 [9].

Afin de mieux comprendre l'importance relative et le rôle des produits de chacun de ces gènes et en particulier des trois plus importants (*chl* A, *chl* B et *chl* C) nous nous sommes proposés de préparer à partir de ces mutants les trois doubles mutants possibles, de façon à n'avoir dans chacun d'eux qu'un seul de ces trois gènes qui soit sauvage.

Nous décrivons dans ce court mémoire l'obtention et l'étude des mutants *chl* A<sup>-</sup>*chl* B<sup>-</sup>*chl* C<sup>-</sup> et *chl* A<sup>-</sup>

*chl* C<sup>-</sup> d' *E. coli* K12 souche PA601 (no. 356 de notre collection).

### 2. Resultats et discussion

#### 2.1. Obtention des mutants

1) La souche *chl* A<sup>-</sup>*chl* B<sup>-</sup> (no. 510 de notre collection) a été obtenue par transduction du gène *chl* A<sup>-</sup> (mutant 356<sub>15</sub> de notre collection) dans la souche *chl* B<sup>-</sup> (mutant 356<sub>24</sub>) par le bactériophage de transduction généralisée P<sub>1</sub> k<sub>C</sub> développé sur la souche *chl* A<sup>-</sup> suivant la technique de Lennox [10]. Nous avons sélectionné les transductants *gal*<sup>+</sup> et recherché parmi eux ceux qui ont reçu le gène *chl* A<sup>-</sup>. Dans ce but nous avons effectué le croisement de chaque isolement *gal*<sup>+</sup> (*xyl*<sup>-</sup> *mtl*<sup>-</sup>) par une Hfr *chl* B<sup>+</sup> (*xyl*<sup>+</sup> *mtl*<sup>+</sup>). Nous avons sélectionné les recombinants susceptibles de fermenter soit le xylose soit le mannitol et avons déterminé pour chacun d'entre eux après isolement les caractères *nit* et *gas*. On conserve comme souches *chl* A<sup>-</sup>*chl* B<sup>-</sup> ceux des transductants *gal*<sup>+</sup> qui dans les croisements avec l'Hfr *chl* B<sup>+</sup> donnent le phénotype *nit*<sup>-</sup>*gas*<sup>-</sup> pour tous les recombinants *xyl*<sup>+</sup> *mtl*<sup>+</sup>, puisque ceux des transductants *gal*<sup>+</sup> qui sont *chl* A<sup>-</sup>*chl* B<sup>-</sup> gardent le phénotype *nit*<sup>-</sup>*gas*<sup>-</sup> quand ils acquièrent le caractère B<sup>+</sup> au cours de la conjugaison.

2) La souche *chl* A<sup>-</sup>*chl* C<sup>-</sup> (no. 555) a été obtenue par transduction du gène *chl* A<sup>-</sup> dans la souche *chl* C<sup>-</sup> (*nit*<sup>-</sup>*gas*<sup>+</sup>) par le bactériophage P<sub>1</sub> k<sub>C</sub> suivant la même technique. La vérification des caractères de la nouvelle souche est faite en transmettant in-

Tableau 1  
Activité\* de 'complémentation' des préparations acellulaires des doubles mutants *chl*-résistants d'*E. coli* K12.

Origine des préparations acellulaires	Reconstitution de l'activité nitrate-réductase	Activité spécifique (unités)
<i>chl A</i> <sup>-</sup> <i>chl B</i> <sup>-</sup> + <i>chl B</i> <sup>-</sup> <i>chl C</i> <sup>-</sup>	—	0
<i>chl A</i> <sup>-</sup> <i>chl B</i> <sup>-</sup> + <i>chl A</i> <sup>-</sup> <i>chl C</i> <sup>-</sup>	—	0
<i>chl B</i> <sup>-</sup> <i>chl C</i> <sup>-</sup> + <i>chl A</i> <sup>-</sup> <i>chl C</i> <sup>-</sup>	—	0
<i>chl A</i> <sup>-</sup> <i>chl B</i> <sup>-</sup> + <i>chl B</i> <sup>-</sup> <i>chl C</i> <sup>-</sup> + <i>chl A</i> <sup>-</sup> <i>chl C</i> <sup>-</sup>	+	2,04

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

Tableau 2  
Activité\* de 'complémentation' des différentes combinaisons de préparations acellulaires des mutants *chl*-r simples et doubles.

Extrait du mutant simple	Extrait du double mutant		
	<i>chl A</i> <sup>-</sup> <i>chl B</i> <sup>-</sup>	<i>chl B</i> <sup>-</sup> <i>chl C</i> <sup>-</sup>	<i>chl A</i> <sup>-</sup> <i>chl C</i> <sup>-</sup>
<i>chl A</i> <sup>-</sup>	0	1,92	0
<i>chl B</i> <sup>-</sup>	0	0	1,68
<i>chl C</i> <sup>-</sup>	2,36	0	0

\* Voir tableau 1.

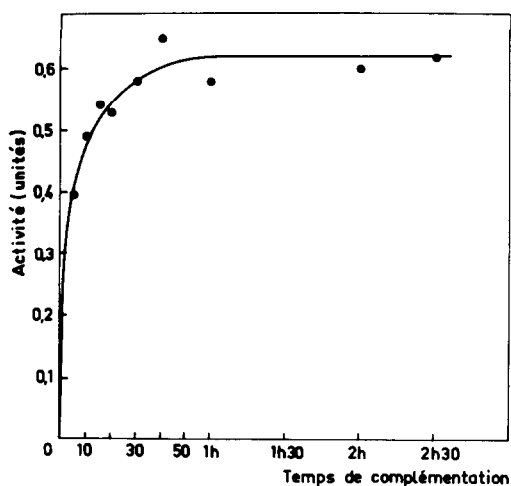


Fig. 1. Cinétique de reconstitution de l'activité nitrate-réductase de 'complémentation' réalisée en mélangeant les 3 surnageants préparés par centrifugation à 170.000 g des extraits bruts des trois doubles mutants. Systèmes expérimentaux contenant 0,1 ml (600 à 800 µg en protéines) de chacun des 3 extraits; 0,3 ml de tampon tris 0,04 M (pH 7,6) incubant à 32° sous vide et pour des temps variant de 5 à 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.

dépendamment à des souches sauvages soit les caractères *chl A*<sup>-</sup>*gal*<sup>+</sup> par cotransduction par des lysats du phage P<sub>1</sub> K<sub>C</sub> développé sur cette souche, soit, de la même manière, les caractères *chl C*<sup>-</sup>*try*<sup>+</sup>.

3) La souche *chl B*<sup>-</sup>*chl C*<sup>-</sup> (no. 517) a été obtenue par croisement d'une Hfr *chl B*<sup>-</sup>str-s (souche 495) avec la F<sup>-</sup>*chl C*<sup>-</sup>str-r (souche 426) suivant la technique de Wollmann et Jacob.

## 2.2. Etude biochimique

Ces trois doubles mutants présentent le même phénotype que les mutants dont ils sont issus et ne possèdent ni l'activité nitrate-réductase (mesurée sur cellules entières et les extraits suivant la technique de Pichinoty [12]) ni l'activité hydrogène-lyase déterminée dans les conditions décrites par Azoulay et Marty [13].

Nous avons effectué conformément aux indications données par Azoulay et al. [8] des expériences de reconstitution de l'activité nitrate-réductase. Les résultats consignés dans le tableau 1 montrent qu'après 2 h de 'complémentation' la reconstitution de l'activité nitrate-réductase ne peut être obtenue que pour le mélange des extraits des trois doubles mutants, seule combinaison qui apporte les produits des trois gènes actifs.

Cette reconstitution accompagnée de formation de particules peut être aussi obtenue par le mélange des extraits d'un mutant simple et d'un mutant double (tableau 2) à condition que la combinaison réalisée apporte les produits des trois gènes sauvages *chl A*<sup>+</sup>, *chl B*<sup>+</sup>, *chl C*<sup>+</sup>.

La cinétique de reconstitution de l'activité nitrate-réductase à partir des extraits des trois doubles mutants est illustrée par la fig. 1; elle est analogue à celle observée par Azoulay et al. [8] dans le cas des mutants simples.

En conclusion, les observations rapportées mettent en évidence l'utilité de ces doubles mutants qui permettent de démontrer de manière indubitable l'importance individuelle des produits de chacun des trois gènes considérés. Par ailleurs l'étude de leur régulation devient plus facile et permettra ultérieurement de résoudre les problèmes de morphogénèse des 'particules' intégrées aux membranes cytoplasmiques d'*E. coli*.

## Références

- [1] M. Piechaud, J. Puig, F. Pichinoty, E. Azoulay et L. Le Minor, Ann. Inst. Pasteur 112 (1967) 24.
- [2] W.A. Venables et J. Gest, J. Mol. Gen. Genet. 103 (1968) 127.
- [3] J. Puig, E. Azoulay et F. Pichinoty, Compt. Rend. Acad. Sci. Paris 264 (1967) 1507.
- [4] F. Casse, Biochem. Biophys. Res. Commun. 39 (1970) 429.
- [5] S. Adahya, P. Cleary et A. Campbell, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 61 (1968) 956.
- [6] J. Puig, E. Azoulay, F. Pichinoty et J. Gendre, Biochem. Biophys. Res. Commun. 35 (1969) 659.
- [7] J. Puig et E. Azoulay, Compt. Rend. Acad. Sci. Paris 264 (1967) 1916.
- [8] E. Azoulay, J. Puig et P. Couchoud-Beaumont, Biochim. Biophys. Acta 171 (1969) 238.
- [9] E. Azoulay, communication personnelle.
- [10] E.S. Lennox, Virology 1 (1955) 190.
- [11] E. Wollman et F. Jacob, La Sexualité des Bactéries (Masson, Paris).
- [12] F. Pichinoty, Ann. Inst. Pasteur 104 (1963) 219.
- [13] E. Azoulay et B. Marty, European J. Biochem. 13 (1970) 168.