

## LA GERMINATION DE LA SPORE DE *BACILLUS SUBTILIS*

III. — MISE EN ÉVIDENCE D'UNE ALANINE DÉSHYDROGÉNASE  
ET D'UNE LEUCINE DÉSHYDROGÉNASE DANS LES EXTRAITS DE SPORES <sup>(1)</sup>

J. HERMIER

avec la collaboration technique de Micheline ROUSSEAU

*Station centrale de Recherches laitières, et de Technologie des Produits animaux*  
*Centre national de Recherches zootechniques, F78 — Jouy-en-Josas*

---

### SOMMAIRE

L'extrait de spores dialysé de *Bacillus subtilis* souche SJ 2, désamine, à pH 9,9, les acides aminés inducteurs de la phase initiale de la germination : L-alanine, acide L- $\alpha$ -aminobutyrique, L-valine, L-norvaline, L-leucine, L-isoleucine et L-norleucine. La désamination de ces acides aminés est couplée avec la réduction du nicotinamide adénine dinucléotide et n'est pas observée à pH 8,2 ou à pH 11,0. La réaction inverse, amination de l'acide  $\alpha$ -cétonique, a été démontrée à pH 9,5 par identification de l'acide aminé formé.

L'extrait de spores contient une alanine déshydrogénase et une leucine déshydrogénase séparables par électrophorèse en gel d'amidon et de même mobilité électrophorétique que les enzymes correspondants présents dans l'extrait de cellules végétatives de la même souche.

Le rôle de ces deux aminoacide déshydrogénases dans la phase initiale de la germination est discuté.

---

### INTRODUCTION

O'CONNOR et HALVORSON (1961) ont apporté la preuve que la phase initiale de la germination des spores de *Bacillus cereus* souche T, incubées dans une solution de L-alanine, était contrôlée par une alanine déshydrogénase (AlaDH) <sup>(2)</sup>, enzyme

<sup>(1)</sup> Une partie des résultats a été présentée dans une Thèse soutenue en janvier 1964 devant la Faculté des Sciences de Paris, a bénéficié d'une subvention de l'U.S. Department of Agriculture (Contract N° FG Fr-121<sup>(1)</sup>)

<sup>(2)</sup> Abréviations : NAD : nicotinamide adénine dinucléotide ; NADH : forme réduite du NAD ; NADP : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; Tris : tris (hydroxyméthyl) aminométhane ; AlaDH : alanine déshydrogénase ; LeuDH : leucine déshydrogénase.

qui catalyse la désamination de la L-alanine en acide pyruvique. Cet enzyme est également présent dans les cellules végétatives de la même souche (McCORMICK et HALVORSON, 1964).

Nous avons montré (HERMIER, 1962 a), que la phase initiale de la germination, chez *Bacillus subtilis* souche SJ 2, pouvait être obtenue en incubant les spores dans une solution de l'un des acides aminés suivants : L-alanine, L-valine et L-isoleucine. Or les extraits de cellules végétatives de la même souche, en présence de NAD, désaminent ces acides aminés (SIEGENTHALER et HERMIER, 1964), car ils contiennent une AlaDH et une leucine déshydrogénase (LeuDH) qui catalysent respectivement la désamination d'une part de la L-alanine, d'autre part de la L-valine et de la L-isoleucine (HERMIER et al., 1965). On peut donc supposer, par analogie avec ce qui a été observé chez *B. cereus* souche T, que la spore de *B. subtilis* SJ 2 contient ces deux enzymes ; ceux-ci contrôlèrent la germination des spores incubées dans une solution d'un acide aminé.

Dans une étude préliminaire (HERMIER, 1962 c), nous avons observé que les extraits de spores de *B. subtilis* SJ 2 sont capables, en présence de NAD, de désaminer la L-alanine et la L-valine. Dans le présent travail, nous montrons que ces extraits contiennent effectivement une AlaDH et une LeuDH.

## MATÉRIEL, ET MÉTHODES

### 1. Préparation des spores

Les spores sont obtenues dans le milieu de culture suivant : acide L-glutamique 14,7 g, extrait de levure Difco 1 g, solution de sels minéraux (composition pour un litre :  $\text{MgSO}_4$ ,  $7\text{H}_2\text{O}$  20 g ;  $\text{FeSO}_4$ ,  $7\text{H}_2\text{O}$  1 g ;  $\text{MnSO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  0,7 g) 10 ml, solution de  $\text{CaCl}_2$ ,  $2\text{H}_2\text{O}$  (à 7,35 g par litre) 10 ml, tampon phosphate 0,067 M à pH 7 980 ml.

Les conditions de culture et de récolte des spores sont celles décrites par BERGÈRE et HERMIER (1964).

### 2. Préparation des extraits de spores

Les extraits de spores sont obtenus par broyage des spores à l'aide d'un broyeur cellulaire (BRAUN) construit d'après le principe décrit par MERKENSCHLAGER, SCHLOSSMANN et KURZ (1957) et refroidi par détente directe de gaz carbonique.

Dans le flacon de verre qui doit être soumis à l'agitation on introduit 15 ml d'une suspension de spores contenant environ  $5.10^{10}$  spores par ml et 50 g de billes de verre de 0,17 à 0,18 mm de diamètre. Le broyage est fractionné en périodes de 30 secondes séparées par des intervalles de 10 minutes pendant lesquels le flacon est immergé dans de l'eau glacée. Grâce à ces arrêts la température à l'intérieur du flacon ne dépasse pas 20°C. Le temps total du broyage, non compris les périodes d'arrêt, est de 2 minutes. Le mélange constitué par le broyat et les billes de verre est passé sur un filtre constitué par de grosses billes de verre qui retient les perles de verre ; il est ensuite centrifugé à 27 000 g pendant 15 minutes puis à 105 000 g pendant 60 minutes, à la température de 4°C. Le surnageant est éventuellement dialysé, à la température de 4°C, d'abord contre de l'eau pendant une nuit, puis deux fois de suite contre du tampon bicarbonate-carbonate 0,1 M à pH 9,9. L'extrait est réparti en tubes, à raison de 5 à 6 ml par tube, et conservé à — 30°C jusqu'à emploi.

### 3. Préparation des extraits de cellules végétatives

Les conditions d'obtention des cellules végétatives et de préparation des extraits de cellules végétatives sont celles décrites par HERMIER et al. (1965).

#### 4. Mesure des activités enzymatiques

La formation ou la disparition du NADH dans les réactions catalysées par les extraits de spores est mesurée par spectrophotométrie d'absorption en ultra-violet, à la longueur d'onde de 340 m $\mu$ , à l'aide d'un spectrophotomètre enregistreur (CARY) ; la température dans le compartiment des cellules est de 25 à 27°C.

Dans le cas où l'on désire effectuer les mesures d'absorption sous atmosphère d'azote, la cuve est remplacée par un petit flacon en quartz à faces parallèles relié à un montage qui permet le barbotage d'un courant d'azote « R » dans le mélange réactionnel, ainsi que l'introduction du NAD ou du NADH dans le mélange, tout en maintenant l'atmosphère d'azote au-dessus de ce dernier.

L'activité est exprimée en micromoles de NADH formé ou oxydé par minute et par millilitre d'extrait.

##### a) Réduction du NAD en NADH en présence d'un acide aminé.

Composition du mélange réactionnel : 2,9 ml d'extrait de spores en tampon bicarbonate-carbonate 0,1 M à pH 9,9 ; 0,35 ml d'une solution d'acide aminé 0,1 M ; 0,35 ml d'une solution de NAD 0,01 M.

##### b) Oxydation du NADH en NAD en présence d'un acide cétonique.

Composition du mélange réactionnel : 3 ml d'extrait de spores dilué au 1/6 en tampon bicarbonate-carbonate 0,1 M à pH 9,9 ; 0,4 ml d'une solution d'acide cétonique 0,1 M ; 0,15 ml d'une solution de chlorure d'ammonium 3 M ; 0,35 ml d'une solution de NADH 0,01 M.

La cuve contenant l'extrait de spores est placée dans le compartiment des cellules du spectrophotomètre, puis on ajoute successivement les autres constituants du mélange réactionnel : NADH, acide cétonique, chlorure d'ammonium. Entre chaque addition, on mesure l'évolution de l'absorption du NADH pendant 5 minutes ; l'intervalle de temps entre le début de l'addition et la mise en marche du spectrophotomètre est dans tous les cas de 30 secondes.

Pour calculer l'activité, on mesure graphiquement la vitesse maximum d'oxydation du NADH sur la courbe d'absorption en fonction du temps, obtenue quand tous les constituants du mélange réactionnel, (extrait, NADH, chlorure d'ammonium, acide cétonique) sont dans la cuve ; on mesure de même la vitesse maximum d'oxydation du NADH quand la cuve contient seulement l'extrait et le NADH. L'activité due à l'amination de l'acide cétonique correspond à la différence entre ces deux vitesses d'oxydation du NADH.

##### c) Oxydation du NADH en absence d'acide aminé.

Composition du mélange réactionnel : 3 ml d'extrait de spores dilué au 1/6 en tampon bicarbonate-carbonate 0,1 M à pH 9,9 ; 0,35 ml d'une solution de NADH 0,01 M.

#### 5. Électrophorèse en gel d'amidon

L'extrait de spores ou de cellules végétatives est dialysé contre une solution de sulfate d'ammonium à 45 p. 100 de saturation. Le précipité est écarté par centrifugation et le surnageant est dialysé contre une solution de sulfate d'ammonium à 70 p. 100 de saturation. Le précipité après avoir été recueilli par centrifugation est redissous dans du tampon Tris-citrate 0,1 M, et analysé par électrophorèse en gel d'amidon suivant la méthode de SMITHIES (1955), en utilisant les techniques décrites par FINE et COSTELLO (1963). Les tampons sont ceux du système Tris-borate de POULIK (1957) : tampon borate 0,3 M à pH 8,6 dans le compartiment des électrodes et tampon Tris-citrate 0,076 M à pH 8,6 pour la préparation du gel d'amidon.

Après migration de l'extrait enzymatique, le gel est découpé en trois couches ; la couche intermédiaire est découpée en autant de bandes qu'il y avait de réservoirs. Chaque bande est incubée pendant 120 minutes à 37°C dans 20 ml de la solution colorante suivante (HERMIER *et al.*, 1965) : phénazine méthosulfate 0,02 mg/ml, nitrobleu de tétrazolium 0,15 mg/ml, NAD 0,6 mg/ml, acide aminé 0,05 M, en solution dans du tampon Tris-citrate 0,1 M à pH 8,6.

#### 6. Identification des acides aminés

Les acides aminés sont identifiés par chromatographie unidimensionnelle sur papier. Sur une feuille de papier Whatman n° 1 on dépose côte à côte 20  $\mu$ l du mélange réactionnel et 10  $\mu$ l d'une

solution aqueuse 0,1 M de l'acide aminé dont on recherche la présence dans le mélange réactionnel. Le solvant utilisé pour la migration a la composition suivante : butanol 75, acide formique 15, eau 10 (v/v).

Pour révéler les acides aminés, la feuille de papier est pulvérisée avec une solution de ninhydrine à 1,2 p. 100 dans du butanol (butanol 99 p. 100, acide formique 1. p 100), puis chauffée à 80-90°C pendant 10 minutes.

## RÉSULTATS

### 1) Mise en évidence de la réduction du NAD, en présence d'un acide aminé, par l'extrait de spores

Lorsque l'extrait est incubé avec la L-valine 0,01 M à pH 9,9 en présence de NAD la densité optique du mélange réactionnel augmente très lentement pendant une période de 15 à 30 minutes, suivant l'extrait utilisé ; puis la densité optique augmente beaucoup plus vite, d'abord à vitesse constante, puis à vitesse progressivement décroissante (fig. 1).

Le phénomène est le même quand la L-valine est remplacée par la L-alanine (fig. 1).

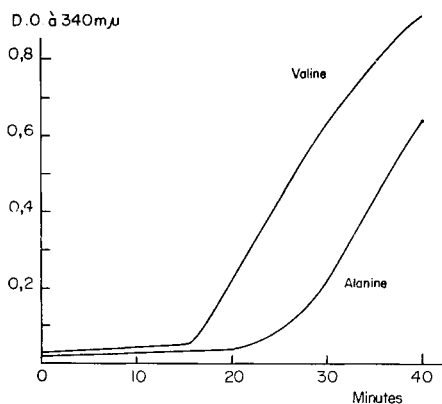


FIG. 1. — Réduction du NAD par l'extrait de spores non dialysé incubé en présence de L-alanine ou de L-valine

Composition du mélange réactionnel :  
extrait en tampon bicarbonate 0,1 M à pH 9,9 + acide aminé 0,01 M + NAD 0,001 M.

Les mêmes mesures d'activité de l'extrait effectuées après dialyse contre du tampon bicarbonate-carbonate 0,1 M à pH 9,9 (fig. 2) montrent que la réduction du NAD est mesurable dès son addition au mélange réactionnel ; elle est maximum au temps zéro des mesures puis décroît continuellement au fur et à mesure que se poursuit l'incubation. La vitesse maximum de formation du NADH est notablement plus faible que celle obtenue avec le broyat non dialysé (fig. 2).

Dans les essais précédents, les mesures d'activité enzymatique de l'extrait ont été effectuées en présence d'oxygène moléculaire, lequel était donc susceptible d'intervenir dans la réaction de désamination. Pour éliminer l'oxygène moléculaire nous avons établi des conditions réductrices dans le mélange réactionnel en ajoutant

0,1 p. 100 (concentration finale) de thioglycolate de sodium et l'atmosphère d'air au-dessus du liquide a été remplacée par une atmosphère d'azote « R ».

Dans de telles conditions, avec un extrait non dialysé incubé avec de la L-valine, la formation de NADH est observée 3 minutes après l'addition du NAD (fig. 2) ; la vitesse maximum de réduction du NAD en NADH est sensiblement la même que celle obtenue avec un mélange réactionnel ne contenant pas de thioglycolate et placé sous atmosphère d'air (fig. 2).

Quand le même essai est répété avec un extrait dialysé, la courbe donnant la quantité de NADH formé en fonction du temps d'incubation ne présente pas de temps de latence et est parallèle à la courbe obtenue avec l'extrait non dialysé en présence de thioglycolate (fig. 2).

### 2) *Oxydation du NADH par l'extrait de spores*

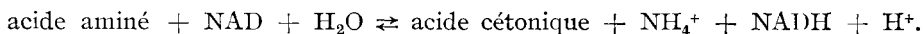
La réduction par l'extrait de spores du NAD en présence de L-valine n'est donc mesurable qu'après un certain temps de latence, qui est considérablement diminué par l'addition de thioglycolate de sodium au mélange réactionnel et est totalement supprimé si l'extrait a été dialysé contre du tampon bicarbonate-carbonate à pH 9,9.

Ce temps de latence pourrait être expliqué par la présence dans l'extrait d'un système oxydant le NADH et dont l'activité serait inhibée par des conditions réductrices ou par une dialyse de l'extrait.

Quand il est incubé à pH 9,9 en atmosphère d'air, l'extrait non dialysé oxyde en effet le NADH (fig. 3). Mais alors que la vitesse d'oxydation du NADH est considérablement diminuée par l'addition de thioglycolate (fig. 3), elle n'est pas modifiée par une dialyse de l'extrait (fig. 4). Dans les limites du temps d'incubation, la vitesse d'oxydation du NADH par l'extrait de spores non dialysé est constante, alors qu'elle varie dans le cas d'un extrait non dialysé contenant du thioglycolate ou d'un extrait dialysé.

### 3) *Propriétés de la réaction de réduction du NAD en présence d'un acide aminé*

La réduction par l'extrait de spores du NAD, en présence de L-valine ou de L-alanine, peut être attribuée à la présence dans l'extrait d'une ou plusieurs aminoacide déshydrogénases catalysant la réaction réversible suivante :



C'est pourquoi nous avons cherché à définir les autres propriétés de cette réaction, en utilisant un extrait dialysé contre du tampon bicarbonate-carbonate 0,1 M à pH 9,9.

#### a) *Acides aminés utilisés.*

La possibilité pour un extrait de spores de réduire le NAD en présence d'un acide aminé a été testée avec tous les acides aminés inducteurs de la phase initiale de la germination chez *Bacillus subtilis* SJ2 (HERMIER, 1962 a ; 1964). En présence

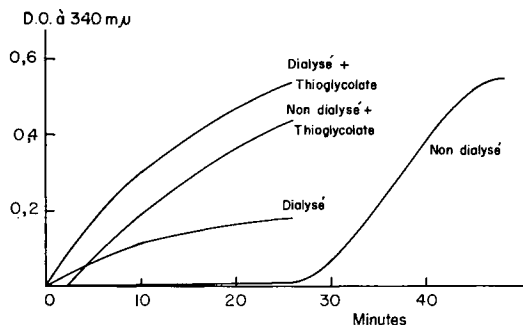


FIG. 2. — Influence d'une dialyse de l'extrait sur la vitesse de réduction du NAD en présence de L-valine par l'extrait de spores

Composition du mélange réactionnel : extrait dialysé ou non en tampon bicarbonate-carbonate 0,1 M à pH 9,9 + L-valine 0,01 M + NAD 0,001 M + éventuellement thioglycolate de sodium 0,1 p. cent. Le mélange réactionnel est incubé sous atmosphère d'azote quand il contient du thioglycolate.

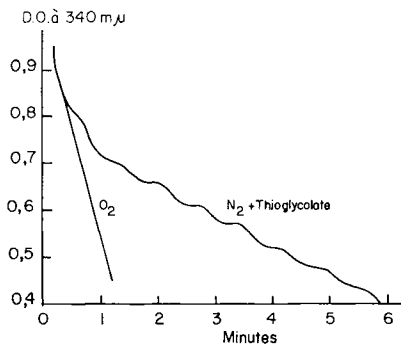


FIG. 3. — Oxydation du NADH par l'extrait de spores

Composition du mélange réactionnel : extrait en tampon bicarbonate-carbonate 0,1 M à pH 9,9 + NADH 0,001 M + éventuellement thioglycolate de sodium 0,1 p. cent. Le mélange réactionnel est incubé sous atmosphère d'azote quand il contient du thioglycolate.

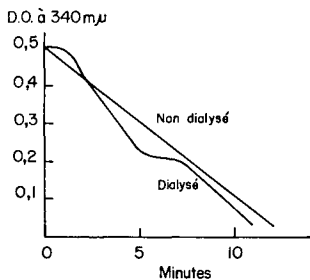


FIG. 4. — Influence d'une dialyse de l'extrait sur l'oxydation du NADH par l'extrait de spores

Composition du mélange réactionnel : extrait dialysé ou non en tampon bicarbonate-carbonate 0,1 M à pH 9,9 + NADH 0,001 M.

de tous les acides aminés essayés on observe la réduction du NAD (tabl. 1) ; la vitesse la plus élevée est obtenue avec la L-leucine.

TABLEAU I

*Réduction du NAD, en présence d'un acide aminé, par l'extrait de spores*

Composition du mélange réactionnel : extrait en tampon bicarbonate-carbonate 0,1 M à pH 9,9 + acide aminé 0,01 M + NAD 0,001 M.

	Vitesse de réduction du NAD (en $\mu\text{moles/mn} \times 10^3$ )
L-alanine .....	23,1
Acide L- $\alpha$ -aminobutyrique .....	18,3
L-valine .....	22,1
L-norvaline .....	23,5
L-leucine .....	30,0
L-isoleucine .....	19,7
L-norleucine .....	19,7
O.....	0

b) *Mise en évidence de la formation d'ammoniaque.*

Après incubation de l'extrait de spores à 30°C en présence de NAD et d'un acide aminé pendant une heure, correspondant au temps nécessaire pour obtenir la quantité maximum de NADH, l'ammoniaque a été recherché directement dans le mélange réactionnel à l'aide du réactif de NESSLER. L'ammoniaque est présent quand le mélange réactionnel contient un des acides aminés reconnus indispensables pour la réduction du NAD en NADH par l'extrait. Il n'y a pas d'ammoniaque formé en l'absence d'acide aminé.

Ainsi la réduction du NAD en NADH par l'extrait de spores, en présence d'un acide aminé, est associée à la désamination de l'acide aminé.

TABLEAU 2

*Influence du pH sur la réduction du NAD,  
en présence d'un acide aminé, par l'extrait de spores*

Composition du mélange réactionnel : extrait + acide aminé 0,01 M + NAD 0,001 M.

Le pH de l'extrait (en tampon bicarbonate-carbonate 0,1 M à pH 9,9) est éventuellement modifié par addition de soude ou d'acide chlorhydrique N/1.

	Vitesse de réduction du NAD (en $\mu\text{moles/mn} \times 10^3$ )		
	pH 8,2	pH 9,9	pH 11
L-alanine .....	0	21,1	0
L-valine .....	0	22,0	0
L-leucine .....	0	37,5	0

c) *Nature du coenzyme.*

Quand l'extrait est incubé pendant une heure avec de la L-alanine et du NADP, on n'observe pas de réduction du NADP. Il en est de même quand la L-alanine est remplacée par la L-valine ou la L-leucine.

d) *Influence du pH.*

Après une heure d'incubation (tabl. 2), on n'observe pas de réduction du NAD, quand le pH du mélange réactionnel au lieu d'être à 9,9 a été amené au préalable à 11,0 par addition de soude 0,1 N ou à 8,2 par addition d'acide chlorhydrique 0,1 N.

Cette absence d'activité a été constatée avec la L-alanine, la L-valine et la L-leucine comme substrats.

4) *Réversibilité de la réaction de désamination*

Nous avons examiné la possibilité de la réaction inverse de la réaction de désamination, c'est-à-dire l'amination d'un acide cétonique en présence de NADH.

Quand on ajoute du NADH à l'extrait de spores dialysé on observe, par suite de l'activité d'oxydation du NADH de l'extrait une diminution en fonction du temps de l'absorption à 340 m $\mu$  due au NADH (fig. 5). L'addition ultérieure d'acide  $\alpha$ -cétoisovalérianique (l'acide cétonique correspondant à la valine) ne modifie pas la pente de la courbe ; mais si l'on ajoute ensuite du chlorure d'ammonium, on observe une augmentation de la vitesse de disparition du NADH. Il en est de même si l'acide  $\alpha$ -cétoisovalérianique est remplacé par l'acide  $\alpha$ -cétoisocaproïque (correspondant à la leucine) ou l'acide pyruvique (correspondant à l'alanine).

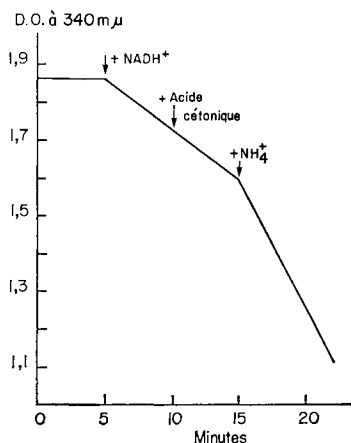


FIG. 5. — Oxydation du NADH en présence d'un acide cétonique par l'extrait de spores

Composition du mélange réactionnel : extrait dilué au 1/6 en tampon bicarbonate-carbonate 0,1 M à pH 9,9. Les autres constituants sont ajoutés au moment indiqué sur la figure par une flèche : NADH 0,001 M, acide  $\alpha$ -cétoisovalérianique 0,01 M, NH<sub>4</sub>Cl 0,15 M (le pH du mélange réactionnel complet est de 9,5).

Dans le tableau 3 figurent les vitesses d'oxydation du NADH attribuable à la présence de l'acide cétonique dans le mélange réactionnel. On constate que la réaction est beaucoup plus rapide en présence d'acide  $\alpha$ -cétoisovalérianique, qu'en pré-



sence des deux autres acides cétoniques. Ainsi, alors que la vitesse maximum de désamination est obtenue avec la L-leucine, la vitesse maximum d'amination est obtenue avec l'acide cétonique correspondant à la L-valine.

Une autre constatation est qu'à pH 9,9 la réaction d'amination est beaucoup plus rapide que celle de désamination : les rapports entre la vitesse d'amination et la vitesse de désamination sont les suivants : valine 23, alanine 2,4, leucine 2,2.

Ces chiffres n'ont qu'une valeur indicative, puisque les pH auxquels ont été effectuées les mesures d'activité ne sont pas nécessairement les pH optimum des réactions.

TABLEAU 3

*Oxydation du NADH en présence d'un acide cétonique par l'extrait de spores*

Composition du mélange réactionnel : extrait dilué au 1/6 en tampon bicarbonate-carbonate 0,1 M à pH 9,9 + acide cétonique 0,01 M + NH<sub>4</sub>Cl 0,15 M + NADH 0,001 M (le pH du mélange réactionnel est de 9,5).

	Vitesse d'oxydation du NADH (en $\mu\text{moles}/\text{mn} \times 10^3$ )
Acide pyruvique .....	49,7
Acide $\alpha$ -cétoisovalérianique .....	508
Acide $\alpha$ -cétoisocaproïque .....	82,6

Pour démontrer la formation d'un acide aminé au cours de la réaction d'oxydation du NADH l'extrait a été incubé avec du NADH, du chlorure d'ammonium et de l'acide  $\alpha$ -cétoisovalérianique pendant 30 minutes à 30°C ; à la fin de l'incubation, 20  $\mu\text{l}$  ont été prélevés pour la chromatographie. Après développement, le chromatogramme montre une tache colorable par la ninhydrine et de même R<sub>F</sub> que la valine. De la même façon, quand l'acide  $\alpha$ -cétoisovalérianique est remplacé par de l'acide  $\alpha$ -cétoisocaproïque, on observe la formation d'une tache de même R<sub>F</sub> que la leucine. Il n'a pas été possible de mettre en évidence une tache colorable par la ninhydrine et de même R<sub>F</sub> que l'alanine quand le mélange réactionnel contient comme acide cétonique l'acide pyruvique ; cet échec peut être attribué à la faible activité d'amination de l'acide pyruvique manifestée par l'extrait (tabl. 3).

5) *Mise en évidence par électrophorèse en gel d'amidon d'une AlaDH et d'une LeuDH dans l'extrait de spores*

Nous avons montré dans un travail précédent (HERMIER *et al.*, 1965) que l'extrait de cellules végétatives de *B. subtilis* SJ 2 contient une AlaDH et une LeuDH séparables par électrophorèse en gel d'amidon. Ce résultat est rappelé dans la figure 6 : on obtient deux bandes après incubation de la bande de gel d'amidon dans une solution colorante où l'acide aminé substrat de la réaction colorée est apporté sous forme de L-alanine et de L-leucine ; une seule bande est observée quand l'acide aminé est constitué soit par la L-alanine soit par la L-leucine.

Quand cette expérience est répétée avec l'extrait de spores on obtient les mêmes résultats (fig. 6) : deux bandes en présence de L-alanine + L-leucine, une seule bande en présence soit de la L-alanine, soit de la L-leucine. De plus les deux bandes présentent une mobilité électrophorétique identique à celle des bandes obtenues après électrophorèse de l'extrait de cellules végétatives.

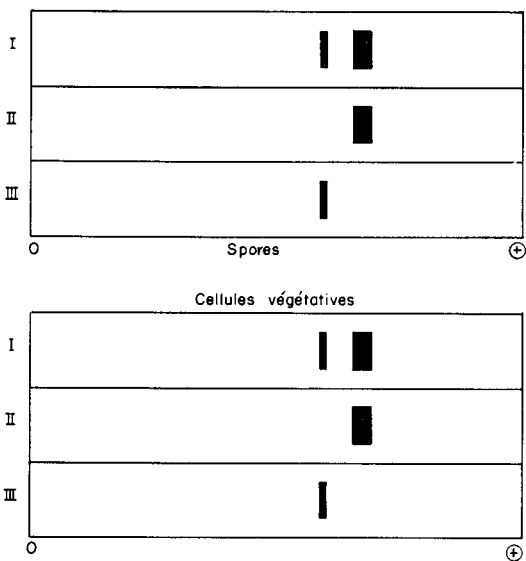


FIG. 6. — Électrophorèse de l'extrait de spores ou de cellules végétatives

Composition de la solution colorante (en tampon Tris-citrate 0,1 M à pH 8,6) : phénazine méthosulfate 0,02 mg/ml, nitrobleu de tétrazolium 0,15 mg/ml, NAD 0,6 mg/ml, et :

- I : L-alanine 0,05 M + L-leucine 0,05 M
- II : L-alanine 0,05 M
- III : L-leucine 0,05 M

## DISCUSSION

Quand l'extrait de spores de *B. subtilis* SJ 2 est incubé à pH 9,9 en présence de L-leucine et de NAD, on observe la formation de NADH et d'ammoniaque. Inversement quand l'extrait est incubé à pH 9,5, avec de l'acide  $\alpha$ -cétoisocaproïque, du chlorure d'ammonium et du NADH, il se forme de la leucine et du NAD. Cette réaction réversible de désamination d'un acide aminé, couplée avec la réduction du NAD en NADH, a été également démontrée avec la L-valine ou la L-alanine et les acides cétoniques correspondants. On peut donc en conclure que l'extrait de spores contient un système aminoacide déshydrogénase catalysant la désamination de la leucine, de la valine et de l'alanine.

La mise en évidence de ce système dans la spore de *B. subtilis* SJ 2 s'est heurtée à des difficultés que n'avaient pas rencontrés O'CONNOR et HALVORSON (1960) dans leurs recherches consacrées à l'équipement enzymatique de la spore de *Bacillus cereus* souche T. Les extraits de spores chez *Bacillus cereus* T, ne montrent pas d'activité d'oxydation du NADH à pH 9,4 qui correspond au pH optimum de la réaction

de désamination de la L-alanine catalysée par l'AlaDH. En revanche, les extraits de spores dialysés ou non, de *Bacillus subtilis* SJ 2, manifestent une activité d'oxydation du NADH importante à pH 9,4, ce qui rendait aléatoire la démonstration de la réduction du NAD par l'extrait incubé avec la L-alanine. Par ailleurs, la réduction du NAD par l'extrait de spores non dialysé incubé avec un acide aminé n'est observable qu'après un certain temps d'incubation, qui est d'au moins 12 minutes dans les cas les moins défavorables. En cela résidait la difficulté la plus considérable puisqu'elle pouvait conduire à la conclusion fautive que l'extrait de spores non dialysé de *Bacillus subtilis* SJ 2 ne manifestait pas d'activité désaminatrice en présence de NAD. C'est peut-être pour cette raison que FALCONE, SALVATORE et COVELLI (1959) n'ont pu démontrer la présence de l'AlaDH dans la spore de la souche de *B. subtilis* étudiée par eux.

Quand du thioglycolate de sodium a été ajouté au mélange réactionnel, le NADH apparaît dans ce dernier après 3 minutes d'incubation et quand l'extrait a été dialysé au préalable, le NADH apparaît dès le début de l'incubation. Pour expliquer ceci on peut supposer que l'extrait non dialysé contient un (ou plusieurs) composé(s) oxydable(s) et dialysable(s). Le NADH formé au début de l'incubation du mélange réactionnel serait réoxydé en NAD par ce ou ces composé(s) et ne s'accumulerait dans le mélange réactionnel qu'à partir du moment où la totalité de ce ou ces composés serait sous forme réduite. La présence dans l'extrait d'un système enzymatique oxydant le NADH ne peut être invoqué pour expliquer l'oxydation du NADH puisque la dialyse ne modifie pas l'activité de ce système.

Par électrophorèse en gel d'amidon, le système aminoacide déshydrogénase de la spore de *B. subtilis* SJ 2 peut être décomposé en deux aminoacide déshydrogénases. Celle de mobilité électrophorétique la plus élevée catalyse la désamination de la L-alanine, mais pas celle de la L-leucine, alors qu'inversement celle de mobilité électrophorétique la moins élevée catalyse la désamination de la L-leucine, mais pas celle de la L-alanine. Ces propriétés sont identiques à celles de l'AlaDH et de la LeuDH qui ont été mises en évidence dans l'extrait de cellules végétatives de la même souche (HERMIER et al., 1965). Comme la LeuDH de la cellule végétative de *B. subtilis* SJ 2 (HERMIER et al., 1965) et contrairement à la LeuDH de la cellule végétative de *B. subtilis* IRC I (ZINK et SANWAL, 1962), la LeuDH de la spore de *B. subtilis* SJ 2 n'a pas d'activité à pH 11,0 et présente une activité d'amination maximum avec l'acide  $\alpha$ -cétoisocaproïque (l'acide cétonique correspondant à la valine). Enfin les deux aminoacide déshydrogénases de la spore présentent la même mobilité électrophorétique que celles de la cellule végétative. On peut donc en conclure que l'extrait de spores contient une AlaDH et une LeuDH très probablement identiques à celles présentes dans les cellules végétatives de la même souche.

BAILLIE et NORRIS (1963) ont constaté que l'estérase et la catalase des extraits cellulaires de *B. cereus* présentaient une mobilité électrophorétique différente, suivant que les extraits avaient été préparés à partir de cellules végétatives ou de spores. Les deux catalases diffèrent par leur spécificité immunoélectrophorétique (NORRIS et BAILLIE, 1964) et correspondent donc à deux formes de structure moléculaire différente. Il semblerait que ce phénomène n'est pas général, puisqu'il n'a pas été retrouvé pour les aminoacide déshydrogénases de *B. subtilis* SJ 2.

Tous les acides aminés substrats de l'AlaDH et de la LeuDH de la spore de *B. subtilis* SJ 2 sont des inducteurs de la germination (HERMIER, 1962 a, 1964). On

peut donc supposer que le rôle de la réaction de la désamination des acides aminés catalysée par l'AlaDH et de la LeuDH est de réduire le NAD en NADH. Cette réaction pourrait être couplée avec celle catalysée par le système d'oxydation du NAD, qui réoxyderait le NADH en NAD.

Cette corrélation entre les acides aminés inducteurs de la germination et les acides aminés substrats des aminoacide déshydrogénases n'a pas été observée chez *B. cereus* souche T (O'CONNOR et HALVORSON, 1961). En effet parmi les acides aminés substrats de l'AlaDH, la L-alanine et l'acide L- $\alpha$ -aminobutyrique sont des inducteurs de la germination, contrairement à la L-leucine ou la L-valine. O'CONNOR et HALVORSON (1961) en ont déduit que seuls pouvaient induire la germination, les acides aminés dont le squelette carboné était susceptible de servir de source de carbone pendant la germination. Pour ces auteurs donc, le rôle de la réaction de désamination de l'acide aminé catalysée par l'AlaDH est de produire des acides cétoniques, sources d'énergie. Cette hypothèse ne peut être adoptée pour *B. subtilis* SJ 2, puisque la L-valine, la L-isoleucine et la L-leucine, composés inducteurs de la germination, ne peuvent servir de source de carbone pour la croissance des cellules végétatives (HERMIER, 1962*b*). Réciproquement, notre hypothèse relative à la réduction du NAD en NADH ne peut expliquer pourquoi la L-leucine et la L-valine ne sont pas des inducteurs de la germination chez *B. cereus* T.

Il existe donc un facteur autre que l'AlaDH qui chez *B. cereus* T contrôle l'action des acides aminés sur la spore. La situation est la même dans le cas de *B. subtilis* SJ2. En effet, si l'on admet que l'AlaDH et la LeuDH de la spore sont identiques aux enzymes correspondant de la cellule végétative — en particulier en ce qui concerne la spécificité de substrat — on constate alors une absence de corrélation entre les propriétés des acides aminés en tant qu'inducteurs de la germination et en tant que substrats de l'AlaDH et de la LeuDH.

En effet, suivant leur action sur la spore, les acides aminés peuvent être classés de la façon suivante : 1° L-alanine et acide L- $\alpha$ -aminobutyrique, sans action sur les spores non activées par la chaleur (HERMIER, 1962*a*) ; 2° L-valine, L-norvaline, L-isoleucine, L-norleucine, inducteurs de la germination des spores chauffées ou non (HERMIER, 1962*a*) ; 3° L-leucine, sans action à 30°C, mais inducteur de la germination à 45°C (HERMIER, 1964).

En revanche ces mêmes acides aminés peuvent être classés de façon différente conformément à la spécificité de substrat des deux aminoacide déshydrogénases de la cellule végétative : 1° L-alanine, substrat de l'AlaDH ; 2° acide L- $\alpha$ -aminobutyrique, substrat de l'AlaDH et de la LeuDH ; 3° L-valine, L-norvaline, L-leucine, L-isoleucine, L-norleucine, substrats de la LeuDH.

La comparaison entre ces deux classements montre que la leucine, qui est le meilleur substrat de la LeuDH n'a pas d'action sur les spores à 30°C, contrairement aux autres substrats de cet enzyme. Par ailleurs, l'acide L- $\alpha$ -aminobutyrique est un substrat de la LeuDH, au même titre que la L-valine ou la L-isoleucine ; or ces deux derniers acides aminés induisent la germination des spores non chauffées, contrairement à l'acide L- $\alpha$ -aminobutyrique.

En conséquence, si l'on conserve l'hypothèse de l'identité des aminoacide déshydrogénases de la spore et de la cellule végétative, il faut admettre en plus que l'action des acides aminés est contrôlée par au moins deux facteurs. L'un de ceux-ci est l'acide L- $\alpha$ -aminobutyrique puisque seuls peuvent être inducteurs de la germination

les acides aminés substrats de ces aminoacide déshydrogénases. L'autre, à identifier, contrôlerait le mode d'action des acides aminés suivant que la spore a été activée ou non par la chaleur et aussi suivant la température à laquelle se déroule la germination.

Reçu pour publication en juillet 1965.

## SUMMARY

### GERMINATION OF THE SPORES OF « *BACILLUS SUBTILIS* ».

#### 3. DEMONSTRATION OF AN ALANINE DEHYDROGENASE AND A LEUCINE DEHYDROGENASE IN EXTRACTS OF THE SPORES

The non-dialysed extracts of spores of *Bacillus subtilis* strain SJ2, incubated at pH 9.9 with L-alanine or L-valine reduced nicotinamide adenine dinucleotide (NAD); there was a latent phase to this reduction which was considerably lessened when the reaction was effected in the absence of air and was completely suppressed when the extract was dialysed. This latent phase could not be attributed to the action of the « NADH-oxidase » system since the activity of that system is not modified by dialysis of the extract.

At pH 9.9 the dialysed extract of spores deaminated the amino acids which induce the initial phase of germination: L-alanine, L- $\alpha$ -aminobutyric acid, L-valine, L-norvaline, L-leucine, L-iso-leucine and L-norleucine. The deamination of these amino acids was coupled with the reduction of NAD and was not seen at pH 8.2 or pH 11.0. The reverse reaction, amination of  $\alpha$ -ketonic acid was demonstrated at pH 9.5 by identification of the amino acid formed.

The extract of spores contained an alanine dehydrogenase and a leucine dehydrogenase which could be separated by electrophoresis on starch gel, and of the same electrophoretic mobility as the corresponding enzymes in the extract of vegetative cells of the same strain.

It may thus be concluded that deamination of amino acids by the extract of spores is catalysed by an alanine dehydrogenase and a leucine dehydrogenase. These two enzymes would control the induction of the initial phase of germination of the spore by the amino acids.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BAILLIE A., NORRIS J. R., 1963. Studies of enzyme changes during sporulation in *Bacillus cereus*, using starch gel electrophoresis. *J. Appl. Bacteriol.*, **26**, 102-106.
- BERGÈRE J. L., HERMIER J., 1964. Étude des facteurs intervenant dans la production massive des spores de *Bacillus subtilis*. *Ann. Inst. Pasteur*, **106**, 214-235.
- FALCONE G., SALVATORE G., COVELLI I., 1959. Mechanism of induction of spore germination in *Bacillus subtilis* by L-alanine and hydrogen peroxide. *Biochim. Biophys. Acta*, **36**, 390-397.
- FINE I. H., COSTELLO L. A., 1963. The use of starch electrophoresis in dehydrogenase studies: In COLOWIK S. P., KAPLAN N. O. *Methods in Enzymology*, **6**, 958-972.
- HERMIER J., 1962a. La germination de la spore de *Bacillus subtilis* I. Action des sucres et des acides aminés sur la phase initiale de la germination. *Ann. Inst. Pasteur*, **102**, 629-643.
- HERMIER J., 1962b. La germination de la spore de *Bacillus subtilis*. II. Action comparée des acides aminés sur la phase de croissance de la germination et sur la croissance végétative. *Ann. Inst. Pasteur*, **103**, 728-742.
- HERMIER J., 1962c. Oxydation de la L-alanine et de la L-valine par l'extrait brut de spores de *Bacillus subtilis*. *C. R. Acad. Sci.*, **254**, 2 865-2 867.
- HERMIER J., 1964. *Étude du mécanisme enzymatique de l'induction par les acides aminés de la germination de la spore de Bacillus subtilis*. Thèse, Univ. Paris.
- HERMIER J., SIEGENTHALER P. A., BLONDEL-QUÉROIX J., BERGÈRE J. L., 1965. Séparation et propriétés de la leucine déshydrogénase et de l'alanine déshydrogénase de *Bacillus subtilis*. *Bull. Soc. Chim Biol.* **47**, 1217-1234.
- MCCORMICK N. G., HALVORSON H. O., 1964. Purification and properties of L-alanine dehydrogenase from vegetative cells of *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.*, **87**, 68-74.

- MERKENSCHLAGER M., SCHLOSSMANN K., KURZ W., 1957. Ein mechanischer Zellhomogenisator und seine Anwendbarkeit auf biologische Probleme. *Biochem. Z.*, **329**, 332-340.
- NORRIS J. R., BAILLIE A., 1964. Immunological specificities of spore and vegetative cell catalases of *Bacillus cereus*. *J. Bacteriol.*, **88**, 264-265.
- O'CONNOR R. J., HALVORSON H. O., 1960. Intermediate metabolism of aerobic spores. V. The purification and properties of L-alanine dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **91**, 290-299.
- O'CONNOR R. J., HALVORSON H. O., 1961. L-alanine dehydrogenase : a mechanism controlling the specificity of amino acid-induced germination of *Bacillus cereus* spores. *J. Bacteriol.*, **82**, 706-713.
- POULIK M. D., 1957. Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature*, **180**, 1 477-1 479.
- SIEGENTHALER P. A., HERMIER J., 1964. Nature des systèmes enzymatiques responsables de l'utilisation des acides aminés sources d'azote chez *Bacillus subtilis*. *Ann. Inst. Pasteur*, **106**, 194-213.
- SMITHIES O., 1955. Zone electrophoresis in starch gels : group variations in the serum proteins of normal human adults. *Biochem. J.*, **61**, 629-641.
- ZINK M. W., SANWAL B. D., 1962. The distribution and substrate specificity of L-leucine dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **99**, 72-77.
-