

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ À

L'INSTITUT ARMAND-FRAPPIER
COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA
MAÎTRISE EN MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE

PAR

TOGOLA DAOUA

ÉTUDE DU MÉTABOLISME RESPIRATOIRE
DU BACILLE DE LA LÈPRE HUMAINE

SEPTEMBRE 1995

À Mon fils Muhammad Daoud Togola

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	ii
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES FIGURES	vii
SOMMAIRE	XI
INTRODUCTION	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
1. SUBSTRATS OXYDABLES	6
2. CULTURE <i>IN VITRO</i>	12
3. LES VOIES MÉTABOLIQUES	16
3.1 La voie de la glycolyse	17
3.2 Le cycle de l'acide tricarboxylique	19
4. TRANSPORT D'ELECTRON	29
4.1 Composants de la respiration	29
4.2 Séquence des composants de la respiration de <i>M. leprae</i>	35
CHAPITRE I	42
TRANSPORT DES ÉLECTRONS	43
1. INTRODUCTION	43
2. MATÉRIEL ET MÉTHODES	43
2.1 Microorganismes	43
2.2 Croissance et préparation de la suspension cellulaire de <i>M. leprae</i>	44
2.2.1 Traitement au NaOH	45
2.2.2 Traitement au zephiran	46

2.2.3	Vérification de l'authenticité des bacilles comme <i>M. leprae</i>	46
2.3	Croissance et préparation de la suspension cellulaire de <i>M. lepraemurium</i>	49
2.4	Croissance et la préparation de la suspension cellulaire de <i>M. phlei</i>	49
2.5	Préparation de la suspension cellulaire du BCG	50
2.6	Préparation des différentes fractions (extrait) cellulaires	50
2.7	Extraction des cytochromes	51
2.8	Mesure du spectre différentiel	53
2.9	Le poids sec	54
2.10	Détermination des protéines	54
2.11	Coloration et comptage des cellules	54
2.12	Réactifs	55
3.	RÉSULTATS	56
3.1	Composants de la chaîne respiratoire dans les suspensions cellulaires et extraits cellulaires de <i>M. leprae</i>	56
3.2	Localisation des composants respiratoires chez <i>M. leprae</i>	75
3.3	La chaîne respiratoire chez <i>M. leprae</i>	78
4.	DISCUSSION	93
CHAPITRE II		100
RESPIRATION		101
1.	INTRODUCION	101
2.	MATÉRIEL ET MÉTHODES	102
2.1	Microorganismes	102
2.2	Croissance des microorganismes et préparation des suspensions cellulaires	103

2.3	Les substrats et produits chimiques	103
2.4	Les inhibiteurs de la respiration	104
2.5	Mesure de l'oxydation des substrats de la glycolyse, des intermédiaires du cycle de Krebs, des hydrates de carbone, des composés sulfhydryls et des acides gras, etc.	104
2.6	Activité de l'adénosine monophosphatase	107
2.7	Préparation de suspension de tissus de coussinets plantaires de souris nues sans <i>M. leprae</i>	108
2.8	Préparation de suspension de <i>M. leprae</i> traitées avec du NaOH et non-traitées	108
2.9	Mesure de l'oxydation du NADH par les cellules de <i>M. leprae</i>	109
2.10	Mesure de l'activité du NADH oxydase dans l'extrait cellulaire	110
2.11	Effet du pH sur l'oxydation du palmitate	110
3.	RÉSULTATS	111
3.1	Effet du pH et de la température sur l'oxydation du palmitate	113
3.2	Oxydation du NADH par différentes préparations de <i>M. leprae</i>	121
3.3	Oxydation de la dihydroxyphénylalanine (DOPA)	126
3.4	Oxydation des intermédiaires du cycle de Krebs par la suspension et l'extrait cellulaire de <i>M. leprae</i>	127
3.5	Oxydation du palmitate	130
3.6	Oxydation des sphingolipides	145
3.6.1	Oxydation des sphingolipides par <i>M. leprae</i>	146
3.6.2	Oxydation des sphingolipides par BCG, <i>M. phlei</i> et <i>M. lepraemurium</i>	153
3.6.3	Effet des inhibiteurs de la respiration sur l'oxydation de la sphingomyéline soluble par <i>M. leprae</i>	155
4.	DISCUSSION	158
	CONCLUSION	167

REMERCIEMENTS

169

BIBLIOGRAPHIE

171

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I.	Tableau comparatif des pigments respiratoires dans l'extrait cellulaire de <i>M. leprae</i> , <i>M. lepraemurium</i> et BCG.	72
TABLEAU II.	Activité AMP-ase des suspensions de <i>M. leprae</i> traitées et non-traitées avec le NaOH.	112
TABLEAU III.	Effet du pH sur l'oxydation du palmitate soluble par les suspensions cellulaires de <i>M. leprae</i> .	114
TABLEAU IV.	Effet de la température sur l'oxydation du palmitate soluble par les suspensions cellulaires de <i>M. leprae</i> .	115
TABLEAU V.	Substrats non oxydés par les suspensions cellulaires de <i>M. leprae</i> isolé des coussinets plantaires de souris nues.	117
TABLEAU VI.	Substrats oxydés par les suspensions cellulaires de <i>M. leprae</i> isolé des coussinets plantaires de souris nues.	120
TABLEAU VII.	Distribution de l'activité du NADH oxydase dans les différentes fractions de <i>M. leprae</i> .	125
TABLEAU VIII.	Effet des inhibiteurs classiques de la respiration sur l'oxydation du palmitate par <i>M. leprae</i> .	139
TABLEAU IX.	Oxydation de la cyclodextrine et du palmitate soluble par les suspensions cellulaires de <i>M. leprae</i> .	144

TABLEAU X.	Respiration endogène et exogène de différentes préparations de suspensions cellulaires de <i>M. leprae</i> isolés des coussinets plantaires de souris nues en présence des sphingolipides	147
TABLEAU XI.	Oxydation des sphingolipides solubles et insolubles par différentes préparations de <i>M. phlei</i> , <i>M. lepraemurium</i> et BCG.	154
TABLEAU XII.	Effet des inhibiteurs sur l'oxydation de la sphingomyéline soluble par <i>M. leprae</i> .	156

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.	Représentation schématique de la chaîne de transport d'électrons chez <i>M. phlei</i> .	38
FIGURE 2.	Spectre différentiel de la suspension cellulaire et l'extrait cellulaire de <i>M. leprae</i> réduit avec le dithionite.	57
FIGURE 3.	Spectre différentiel de la suspension cellulaire et l'extrait cellulaire de <i>M. leprae</i> réduit avec le succinate.	60
FIGURE 4.	Spectre différentiel de la suspension cellulaire et l'extrait cellulaire de <i>M. leprae</i> réduit avec le NADH.	62
FIGURE 5.	Spectre différentiel de l'extrait cellulaire de <i>M. leprae</i> réduit avec l'ascorbate.	65

FIGURE 6.	Spectre différentiel de la pyridine hémochromogène de <i>M. leprae</i> .	67
FIGURE 7.	Spectre différentiel du cytochrome <u>o</u> avec le monoxyde de carbone chez <i>M. leprae</i> .	69
FIGURE 8.	Localisation des pigments respiratoires dans les différentes fractions cellulaires de <i>M. leprae</i> .	76
FIGURE 9.	Effet du roténone et du TFA sur la réduction des pigments respiratoires dans l'extrait cellulaire de <i>M. leprae</i> en présence du NADH comme donneur d'électrons.	80
FIGURE 10.	Effet de l'amytal et du TFA sur la réduction des pigments respiratoires dans l'extrait cellulaire de <i>M. leprae</i> en présence du succinate comme donneur d'électrons.	82
FIGURE 11.	Effet de l'antimycine A sur la réduction des pigments respiratoires dans l'extrait cellulaire de <i>M. leprae</i> en présence du NADH comme donneur d'électrons.	84
FIGURE 12.	Effet de l'antimycine A sur la réduction des pigments respiratoires dans l'extrait cellulaire de <i>M. leprae</i> en présence du succinate comme donneur d'électrons.	86

FIGURE 13.	Effet du cyanure et du dicumarol sur la réduction des pigments respiratoires dans l'extrait cellulaire de <i>M. leprae</i> en présence du NADH comme donneur d'électrons.	89
FIGURE 14.	Effet du cyanure et du dicumarol sur la réduction des pigments respiratoires dans l'extrait cellulaire de <i>M. leprae</i> en présence du succinate comme donneur d'électrons.	91
FIGURE 15.	Réprésentation schématique de la chaîne respiratoire de <i>M. leprae</i> .	98
FIGURE 16.	Oxydation du NADH par différentes préparations de <i>M. leprae</i> .	122
FIGURE 17.	Oxydation du succinate par différentes préparations de <i>M. leprae</i> .	128
FIGURE 18.	Effet de l'acide malonique sur l'oxydation du succinate par <i>M. leprae</i> .	131
FIGURE 19.	Oxydation du palmitate soluble et insoluble par <i>M. leprae</i> isolé des coussinets plantaires de souris nues	134
FIGURE 20.	Oxydation du palmitate soluble et insoluble par <i>M. phlei</i> .	137
FIGURE 21.	Spectre différentiel des suspensions cellulaires de <i>M. leprae</i> préincubées avec du palmitate.	141

- FIGURE 22. Oxydation des sphingolipides
solubles par *M. leprae* isolés
des coussinets plantaires de
souris nues 149
- FIGURE 23. Oxydation des sphingolipides
insolubles par *M. leprae* isolés
des coussinets plantaires de
souris nues 151

SOMMAIRE

La recherche sur la lèpre a presque atteint une impasse à cause de l'incapacité de cultiver le bacille de la lèpre (*Mycobacterium leprae*) *in vitro*. Après plusieurs essais de culture sur différents milieux, sans succès, il est évident que la culture du bacille *in vitro* ne dépend pas des combinaisons empiriques des exigences nutritionnelles, mais plutôt de la compréhension du métabolisme et le mécanisme de génération d'énergie. Dans tous les organismes vivants, la chaîne respiratoire est responsable de la production d'énergie.

Les résultats de nos études spectrophotométriques ont montré que les extraits cellulaires préparés à partir de suspensions cellulaires de *M. leprae* isolé des coussinets plantaires de souris nues et purifiées par centrifugation différentielle, contiennent les cytochromes a + a₃, b et c ainsi que les pigments liés au monoxyde de carbone et les flavoprotéines. La réduction des pigments respiratoires par les donneurs d'électrons tels que le NADH, le succinate ou le dithionite a été complètement inhibée par le dicumarol (un inhibiteur compétitif de la vitamine K) indiquant la présence de vitamine K ou de ses analogues dans la chaîne respiratoire de *M. leprae*.

Pour la culture *in vitro* du microorganisme, le milieu de culture doit contenir au moins un substrat qui peut servir de source d'énergie nécessaire à la croissance, à la multiplication et aux autres réactions de biosynthèses cellulaires.

Le métabolisme respiratoire de *M. leprae* isolé de coussinets plantaires de souris nues, a été étudié à l'aide de plusieurs substrats. Parmi les intermédiaires du cycle de l'acide tricarboxylique seul le succinate est oxydé par les suspensions cellulaires purifiées de *M. leprae*. L'oxydation de plusieurs composés sulfhydryls tels que la cystéine, le dithiothréitol, la pénicillamine a été confirmée aussi bien que l'oxydation de la dihydroxyphénylalanine (DOPA). Cependant, c'est surtout l'étude du métabolisme respiratoire au moyen des acides gras qui a retenu notre attention. Cela à cause de la grande richesse du bacille en lipides et surtout de la provenance des acides gras (constituant naturels des tissus pour lesquels le bacille a un tropisme). Nos résultats expérimentaux ont montré que le palmitate soluble est oxydé par les suspensions cellulaires de *M. leprae* après une période de latence de 8 heures. L'extrait cellulaire de *M. leprae* par contre catalyse une intense oxydation du palmitate soluble après 3-4 heures.

Les sphingolipides notamment la sphingosine, la sphingomyéline et cérébroside insolubles ont été inactifs. Cependant, les mêmes substrats solubles ont été oxydés mais à un taux moindre comparativement au palmitate. L'extrait cellulaire de *M. leprae* catalyse une oxydation active des trois sphingolipides après 3-4 heures.

L'oxydation de ces substrats a été inhibée par la roténone, l'amytal, l'antimycine A, le 2-N-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-Oxyde (HQNO) et le cyanure. Ces résultats indiquent que l'oxydation de ces acides gras par *M. leprae* cultivé *in vivo* se fait à travers la chaîne respiratoire et utilise l'oxygène comme accepteur final d'électrons. L'usage de ces acides gras dans le milieu de culture peut être utile pour les essais de culture *in vitro* de *M. leprae*.

INTRODUCTION

Le succès du traitement et du contrôle des infections microbiennes communes a été possible grâce aux études faites sur l'agent causal qui a été cultivé *in vitro*. Mais ce succès n'a pas encore été réalisé dans le cas de la lèpre malgré l'identification de l'agent étiologique (*Mycobacterium leprae*) par Gerhard Armauer Hansen en 1874.

Après plus d'un siècle de recherche, et malgré de multiples efforts, *M. leprae* n'a jamais été cultivé sur milieu artificiel. L'impossibilité de faire croître les bacilles dans des milieux bactériologiques impose de sévères limitations au progrès de la gestion médicale et épidémiologique. Ainsi comme conséquence de cet échec, il n'y a pas de vaccin préventif contre la maladie, il n'y a pas de test pour le diagnostic précoce, il n'y a pas de moyens d'étudier le mode de transmission et l'épidémiologie de la maladie. La lèpre reste de nos jours une grande énigme dans l'histoire de la médecine. Cette énigme ne pourrait être dénouée que lorsque le bacille de la lèpre sera cultivé *in vitro*.

L'échec des nombreux essais de culture sur divers milieux artificiels met en évidence que la culture *in vitro* du bacille ne doit pas dépendre de combinaisons empiriques des exigences nutritionnelles, mais plutôt de la compréhension et de la clarification des propriétés métaboliques fondamentales du

bacille (Pattyn 1973). C'est seulement l'étude du métabolisme qui peut donner des informations sur la source de carbone et le mécanisme de l'énergie couplée qui sont essentiels pour la vie et la multiplication de l'organisme *in vitro*.

Autrefois, l'étude du métabolisme a été beaucoup ralentie par le manque de matériel bacillaire. À cause des quantités limitées de *M. leprae* isolé (et souvent contaminé) des patients non traités, le *Mycobacterium lepraemurium* (Stenfansky 1903) responsable de la lèpre chez les rats a été généralement utilisé comme modèle expérimental pour la recherche de la lèpre humaine. Cette mycobactérie qui a été longtemps considérée comme non cultivable, a pu être cultivée *in vitro* sur un milieu à base de jaune d'oeuf. Mais *M. leprae* n'a pas pu croître sur le même milieu à la grande surprise des chercheurs.

Présentement le problème de matériel bacillaire est résolu par la croissance (*in vivo*) des bacilles dans les coussinets plantaires de souris nues athymiques (Shepard 1960) et dans les tissus de tatou à neuf bandes infectés expérimentalement avec *M. leprae* (Kirchheimer et Storrs., 1971). Malheureusement, la présence d'autres mycobactéries (mycobactéries dérivées du tatou MDT) dans les différents organes du tatou, a amené les experts à déconseiller l'utilisation des bacilles isolés des tissus de tatou dans les essais de culture *in vitro*.

La croissance des bacilles *in vivo* demande 9-12 mois d'attente; les souris doivent en plus être maintenues dans des conditions stériles, ce qui est très difficile et très dispendieux. D'autre part l'extraction des bacilles des tissus de l'hôte est compliquée et très exigeante sans oublier que les résidus des tissus de l'hôte peuvent souvent entacher les résultats des expériences. D'où l'importance de la culture *in vitro* du bacille qui permettra non seulement d'avoir du matériel d'étude à peu de frais, mais aussi en permanence et accélérera du coup la recherche, et l'atteinte de l'objectif de l'OMS qui est l'éradication de la maladie.

Un substrat qui peut servir de source de carbone ou d'énergie, ou les deux à la fois, est nécessaire pour la culture *in vitro* de *M. leprae*. Pour obtenir de l'énergie (ATP), la présence d'une chaîne respiratoire fonctionnelle est fondamentale. Au cours de ce travail, des recherches ont été effectuées pour déterminer l'existence de la chaîne respiratoire. Le métabolisme respiratoire a également été étudié afin de trouver des substrats convenables qui pourraient être utilisés dans les essais de culture *in vitro* de *M. leprae*.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

1. SUBSTRATS OXYDABLES

Une revue critique de littérature fait état d'une gamme variée d'informations concernant les composés qui peuvent servir de sources de carbone et d'azote pour la croissance des mycobactéries.

Edson et Hunter (1943) ont déterminé les exigences nutritionnelles de plusieurs espèces de mycobactéries en évaluant leur capacité à croître sur divers substrats. Ils ont observé que chaque espèce se distingue selon son patron d'oxydation des composés organiques. Le taux de croissance d'une espèce sur un milieu synthétique contenant un substrat donné comme seule source de carbone dépend du taux d'oxydation de ce substrat par la bactérie. Au cours de leurs expériences de respiration, Edson et Hunter (1943) ont évalué les taux d'oxydation de divers substrats (glucose, lactate, pyruvate, acétate, succinate, glycérol, citrate) par différentes espèces de mycobactéries (*Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium ranae*, *Mycobacterium butyricum*, *Mycobacterium. sp karlinski*). Parmi tous les substrats qu'ils ont testés seul le citrate n'était pas oxydé par les mycobactéries. Edson (1951) a rapporté que les mycobactéries peuvent oxyder un nombre extrêmement varié de composés; et peuvent croître sur plusieurs d'entre eux (Long,

1958).

De toutes les sources de carbone, le glycérol est le plus largement utilisé, et semble être la source de carbone préférée pour la croissance de mycobactéries en laboratoire. Merrill (1931a,b) a cultivé un certain nombre de mycobactéries pathogènes et saprophytes sur un milieu synthétique contenant du glycérol comme source de carbone.

Edson et Hunter (1943) ont réussi à faire croître *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium stercoris*, et *M. sp Karlinski* sur un milieu synthétique qui contenait du glycérol comme seule source de carbone. Dans une étude sur les acides produits par *M. butyricum*, Hunter (1953a) a utilisé le glycérol. *M. bovis* espèce BCG est largement cultivé sur milieu à base de glycérol. Tepper (1971) a rapporté que le glycérol, l'acétate et l'asparagine sont incorporés dans les cellules de *M. lepraemurium*. Ishaque et Kato (1977a) n'ont constaté aucune oxydation du glycérol par *M. leprae* isolé des tissus de tatou et *M. lepraemurium* isolé des tissus de souris C3H.

Selon Dixon et Cuthbert (1967) le pyruvate est utilisé par plusieurs espèces de mycobactéries; et dans certaines

circonstances peut être la source de carbone préférée. Lukins et Foster (1963) ont rapporté que certaines mycobactéries atypiques peuvent croître sur des alcanes de C2 à C16; et d'autres, sur des alcanes à courtes chaînes carbonées comme C3 ou C4. Ces mêmes chercheurs en 1963 ont confirmé l'utilisation des hydrocarbures gazeux comme le propane, butane et pentane par *M. smegmatis*. Vestal et Perry (1971) ont rapporté l'oxydation de l'éthane par *M. vaccae*. Hallas et Vestal (1978) ont trouvé que *M. convolutum* pouvait croître sur les alcanes à longue chaîne carbonée C19, C20, C22, C23, C24, C26 et C28 comme seule source de carbone. Ainsi, tous les alcanes, excepté le méthane qui nécessite un mécanisme particulier d'assimilation, peuvent être utilisés par les mycobactéries, mais pas nécessairement par la même souche.

De plus, parmi les composés oxydables qui sont utilisés comme source de carbone pour la croissance des mycobactéries, figurent les sucres: le glucose (Ramakrishnan et al., 1962), le mannose et le fructose (Hey-Ferguson et Elbein, 1970). L'utilisation de l'alcool éthylique, de l'acide lactique et acétique comme substrats oxydables a été rapporté par Merrill (1931a,b).

Bien qu'il y ait un nombre illimité de substrats oxydables

par les mycobactéries, très peu de ces substrats sont utilisés par *M. leprae*. Le substrat convenable pour la culture *in vitro* de *M. leprae* reste à découvrir.

En fait, Hanks (1951b) et Gray (1952) ont été les premiers à chercher systématiquement les substrats oxydables comme sources d'énergie pour *M. leprae* et *M. lepraemurium*. Ils ont conclu que *M. leprae* est incapable d'oxyder les substrats que les autres mycobactéries cultivables peuvent oxyder, pour produire de l'énergie nécessaire à sa croissance et à sa multiplication.

M. lepraemurium depuis sa découverte en 1903 par Stefansky a servi de modèle intérimaire dans l'étude du bacille de la lèpre, parce que les cellules de *M. lepraemurium* étaient facilement disponibles en quantité suffisante et a donc fait l'objet de beaucoup de recherche.

Adapoe (1976) a testé tous les intermédiaires du cycle de Krebs et a rapporté que parmi tous les intermédiaires seul le succinate est oxydé par les suspensions cellulaires de *M. lepraemurium*. Tepper et Varma (1972) ont étudié l'activité métabolique de *M. lepraemurium* et rapporté que les cellules intactes de ce microorganisme produisent du CO₂ à partir de

l'acide α -cétoglutarique.

Ishaque et Kato (1977a,b) ont démontré que *M. leprae* et *M. lepraemurium* sont capables d'oxyder certains substrats exogènes sans addition de cofacteur et ne sont donc pas dépendants des cellules de leur hôte pour respirer. Ishaque et Kato (1977a) ont étudié l'oxydation de divers composés par les suspensions bacillaires de *M. leprae* et *M. lepraemurium*. Ils ont constaté que la suspension cellulaire de ces bacilles purifiée oxydait certains composés sulfhydryles tels L-cystéine, le dithioérythritol et la DL-pénicillamine.

Ces chercheurs ont observé au cours de leurs expériences que l'extrait de levure stimulait un peu la respiration des deux mycobactéries et que le succinate était oxydé par les cellules intactes de *M. leprae*. Ishaque et Kato (1977a) dans leur conclusion ont rapporté que contrairement à la conclusion de Hanks (1951b) et Gray (1952) *M. leprae* et *M. lepraemurium*, considérés jusqu'alors comme des mycobactéries non cultivables, étaient néanmoins capables du point de vue métabolique d'oxyder divers substrats, et pourraient croître sur milieu de culture synthétique si les substrats appropriés y étaient fournis.

La richesse du bacille de la lèpre en lipide (environ 40% du poids sec) a fait penser à une éventuelle implication de source exogène d'acide gras dans la nutrition (Wheeler et al., 1990). Mais déjà les acides gras avaient été reconnus toxiques pour *M. tuberculosis* (Davis et Dubos 1946, 1947). Contrairement à cette révélation, McCarthy (1974) a constaté une augmentation de la croissance de *M. avium* incubé en présence de l'acide palmitique. Il a donc conclu que l'acide palmitique est un facteur de croissance spécifique pour *M. avium*. Plus tard, en 1976, McCarthy notait aussi la stimulation de la croissance de *M. avium* par l'acide oléique. Cependant, Ishaque et Kato (1976) n'ont obtenu aucune oxydation des acides gras qu'ils ont testés avec les cellules de *M. lepraemurium* cultivé *in vitro*.

Wheeler et Ratledge (1988) ont constaté que le palmitate était incorporé par les cellules entières de *M. leprae* isolées à partir des tissus de tatous à neuf bandes et Franzblau et al., (1987) ont rapporté que le carbone marqué du palmitate apparaît dans le glycolipide-I un lipide spécifique à *M. leprae*. D'autre part Franzblau (1988), Wheeler et Ratledge (1988) ont rapporté que le palmitate est rapidement dégradé en CO₂ par les suspensions cellulaires de *M. leprae*.

Ishaque (1989) à la suite d'une série d'expériences regroupant l'étude de l'oxydation du substrat, l'emploi des inhibiteurs de la respiration et les observations spectrophotométriques a démontré l'évidence directe de l'oxydation de l'acide palmitique par *M. leprae* cultivé *in vivo* chez le tatou à neuf bandes. Ishaque (1992b) a testé l'oxydation du palmitate par les suspensions cellulaires de *M. lepraemurium* cultivé *in vitro* et *in vivo*. Il a trouvé que ces deux mycobactéries oxydent le palmitate seulement après une période de latence d'environ 8 heures ; et que cette période diminue de moitié avec l'extrait cellulaire des mêmes bacilles. Ishaque et Sticht-Groh (1993a) ont comparé l'oxydation de l'acide palmitique soluble dans l'eau et insoluble par *M. leprae*. Ils ont observé que les deux formes sont toutes oxydées par les bacilles après une période de latence de 0 à 2 heures respectivement, pour les formes soluble et insoluble.

2. CULTURE IN VITRO

La maîtrise de plusieurs types d'infections s'est réalisée grâce à la culture de l'agent pathogène *in vitro*. Cependant, un tel succès n'a pas encore été obtenu dans le cas de la lèpre,

malgré les multiples tentatives. L'incapacité de multiplier les bacilles dans des milieux bactériologiques impose de sévères limitations au progrès de la gestion médicale et épidémiologique de la lèpre. Quelques chercheurs ont rapporté avoir cultivé *M. leprae* avec succès, mais il n'en demeure pas moins vrai qu'après plus d'un siècle de recherches et malgré de multiples efforts, cette mycobactérie n'a jamais été cultivée sur des milieux artificiels.

Skinsnes et al., (1975) ont rapporté avoir cultivé le bacille de la lèpre sur milieu à base d'acide hyaluronique additionné de divers ingrédients tels l'extrait de levure, l'albumine bovine et la glycérine, avec un tampon phosphate. Cette culture a été reproduite par Ishaque et Kato (1976). Toutefois, ces cultures ont été identifiées par Pattyn (1976) comme étant *M. scrofulaceum*. Ishaque et Kato (1977b) ont cultivé des mycobactéries à partir des tissus lépreux de tatou sur un milieu à base d'acide hyaluronique additionné d'extrait de cordon ombilical, d'extrait de levure, de glycérol et de sérum de mouton. D'autres chercheurs (Nishimura et al., 1964; Mori et al., 1966; Ogawa et al., 1974) ont aussi rapporté des cultures scotochromogènes appartenant à *M. scrofulaceum*. Il a été confirmé (Ishaque, 1981) que les cultures de type *M.*

scrofulaceum ne sont pas les agents étiologiques de la lèpre.

Dhople et al., (1988) ont rapporté la multiplication limitée *in vitro* de *M. leprae* sur le milieu Dhople-Hanks (DH) et le milieu de Mahadevan conditionné. Selon eux ces deux milieux ont pu supporter la croissance de *M. leprae* pendant 12 semaines au bout desquelles les paramètres d'évaluations biochimiques ont été réduits au néant.

Dhople et Lamoureux (1991a,b) en utilisant le milieu DH ont étudié l'influence de certains facteurs sur la croissance *in vitro* de *M. leprae*. Ils ont observé qu'en maintenant un faible potentiel redox dans le milieu, les composés sulfhydryles en l'occurrence le thioglycolate et le dithiothréitol jouaient un rôle actif dans le métabolisme de *M. leprae*. Le rôle de ces composés sulfhydryles serait probablement d'induire un faible potentiel d'oxydo-réduction dans le milieu, fournir du sulfure et aussi des groupes SH qui sont nécessaires pour l'activation des enzymes du système de transport d'électrons. Ces mêmes chercheurs (1991b) ont évalué l'influence de la tension d'oxygène sur la croissance de *M. leprae in vitro*. Ils ont constaté que *M. leprae* adapté *in vitro* est plus tolérant à l'oxygène.

Ishaque (1990) a étudié l'effet de différents mélanges gazeux sur la croissance de *M. leprae in vitro* en utilisant un milieu contenant du glycérol et le thioglycolate de sodium. Il a constaté que les concentrations de 2,5% d'oxygène et 10% de gaz carbonique sont plus favorables à la croissance de cette mycobactérie en milieu artificiel. Au cours de cette même étude Ishaque (1990) a obtenu une augmentation de la quantité d'ATP et d'ADN plus de quatre fois sur le milieu solide et deux fois dans le milieu liquide. Ce qui lui a permis d'avancer l'idée que le milieu solide semble être plus approprié (convenable) pour la culture *in vitro* de *M. leprae*. Récemment Ishaque et Sticht-Groh (1993b) ont constaté que *M. leprae* incubé dans le même milieu en présence d'acide palmitique et d'air poussait de la même manière ou mieux qu'avec n'importe quel mélange gazeux.

Biswas (1989) a rapporté la culture de *M. leprae* sur milieu Dubos-Lowenstein-Jenson additionné de thyroxine de sodium.

Présentement les tatous à neuf bandes infectés expérimentalement avec *M. leprae* (Kirchheimer et Storrs., 1971) sont la source principale pour les études microbiologiques. Malheureusement, la présence d'autres mycobactéries (mycobactéries dérivées de tatous MDT) dans les

différents organes de tatous a été rapportée par Portaels et al., (1982) et cela a été confirmé par plusieurs chercheurs.

Les organismes cultivés ont été généralement reliés au groupe de bactéries *M. avium*, *M. intracellulaire*, *M. scrofulaceum* ou *Corynebacteria* (Wheeler, 1984b). Ainsi quelques caractéristiques communes peuvent être trouvées entre les mycobactéries cultivées *in vivo* (*M. leprae*) et *in vitro* (MDT). Ces dernières sont alors identifiées par mégarde comme étant *M. leprae* (Pattyn et Portaels, 1980).

D'après Lancaster et al., (1983) un grand nombre de bacilles peut être obtenu à partir de coussinets plantaires de souris nues (3×10^{10} bacilles par coussinet plantaire ou 7.4×10^{10} bacilles par gramme de tissus) mais ils sont exempts de contaminants tels MDT, souvent présents dans les tissus de tatous. Il a alors été suggéré d'utiliser plutôt les tissus de souris pour les essais de culture *in vitro* du bacille de la lèpre humaine.

3. LES VOIES MÉTABOLIQUES

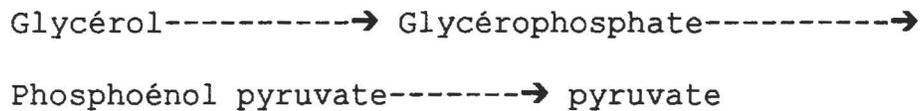
Les voies majeures employées par plusieurs mycobactéries sont la voie de la glycolyse et la voie du cycle de l'acide

tricarboxylique, bien que d'autres voies oxydatives comme la voie des hexoses monophosphates soient utilisées.

3.1 LA VOIE DE LA GLYCOLYSE

L'étude du métabolisme du glycérol chez les mycobactéries (Hunter, 1953a) a montré que la dégradation du glycérol en acide pyruvique s'effectue par la voie de la glycolyse. En effet, quand les extraits cellulaires de *M. smegmatis* et *M. butyricum* étaient incubés avec l'adénosine triphosphate (ATP), il y avait hydrolyse enzymatique de l'ATP avec apparition de phosphate inorganique dans le mélange de la réaction. En présence du glycérol, la quantité de phosphate inorganique était réduite mais le résidu d'ATP était négligeable. Hunter, (1953a) a expliqué que cette observation était due à une estérification du glycérol en glycérophosphate, une étape de la voie de la glycolyse. Hunter (1953a) a aussi étudié la dégradation enzymatique de l'acide D-3-phosphoglycérique chez *M. smegmatis* et a trouvé que la réaction est fortement inhibée par l'ion fluorure mais stimulée par l'ion Mg^{2+} . Ces propriétés sont caractéristiques de l'énolase, un des enzymes de la glycolyse. L'acide D-3-phosphoglycérique est dégradé en acide phosphoénol pyruvique et en phosphate inorganique. A partir de

ces résultats expérimentaux Hunter (1953a) a proposé que la dégradation du glycérol en acide pyruvique chez *M. smegmatis* s'effectuait par la voie de la glycolyse selon le schéma suivant:



Ces résultats de Hunter ont été confirmés par Edson *et al.*, (1959). Ces chercheurs ont étudié le métabolisme du glycérol chez *M. butyricum* en utilisant la technique des marqueurs radioactifs (isotopes) et rapporté que la dégradation de la majorité du glycérol dans cet organisme s'effectue par la voie de la glycolyse. L'existence du système de la glycolyse chez *M. tuberculosis* (souche H37Ra) a été démontrée par Bastarrachea *et al.*, (1961). Ramakrishnan *et al.*, (1962) ont étudié l'oxydation du glucose par la souche virulente (H37Rv) et avirulente (H37Ra) de *M. tuberculosis* et ont rapporté que le métabolisme du glucose chez H37Rv s'effectue équitablement par la voie d'oxydation et par la voie de la glycolyse; par contre ils ont noté la prédominance de la glycolyse chez H37Ra.

Tepper et Varma, (1972) ont rapporté que le glycérol est métabolisé par la voie de la glycolyse via la portion des trioses en pyruvate, acétyl-CoA et le cycle de l'acide tricarboxylique. Selon Adapoe (1976), la présence de l'enzyme

pyruvate déshydrogénase chez le BCG (Bacille Calmette et Guerin) montre que la voie de l'acide tricarboxylique est liée à la voie de la glycolyse chez cette mycobactérie. Le glycérol est d'abord dégradé en pyruvate et le pyruvate ainsi produit est par la suite dégradé par le cycle de l'acide tricarboxylique. Adapoe, (1976) a noté au même moment l'absence de l'enzyme pyruvate déshydrogénase chez *M. lepraemurium* ce qui suggère que ce microorganisme ne peut pas utiliser la voie de la glycolyse pour son métabolisme respiratoire.

3.2 LE CYCLE DE L'ACIDE TRICARBOXYLIQUE (CYCLE DE KREBS)

C'est la voie respiratoire la plus étudiée chez les mycobactéries. La première mise en évidence de ce cycle chez les mycobactéries appartient à Youmans et al., (1956) qui ont démontré que les cellules de *M. tuberculosis* H37Rv traitées avec de l'acétone oxydaient tous les intermédiaires du cycle de l'acide tricarboxylique. Long (1919) avait observé la croissance de *M. tuberculosis* souche H37 en présence du succinate d'ammonium et du malate d'ammonium dans un milieu synthétique, mais n'a pas observé de croissance en présence du pyruvate d'ammonium ou du lactate d'ammonium. Merrill (1931a) a aussi rapporté que lorsque les acides citrique, acétique et

lactique sont utilisés comme seules sources de carbone dans un milieu synthétique, ils sont oxydés par l'ensemble des 14 souches testées exceptée la souche humaine H37. Nakamura (1938) n'a pas observé d'augmentation dans la consommation d'oxygène chez la souche humaine en utilisant l'acide citrique, succinique ou malique. En 1941, Bernheim a rapporté que le citrate, le succinate, le malate et le pyruvate sont sans effet sur la consommation d'oxygène de l'espèce bovine.

Edson et Hunter, (1943) dans l'étude de la respiration chez les mycobactéries ont observé que le lactate et le pyruvate sont oxydés par les cellules entières de suspensions cellulaires de *M. phlei*, *M. smegmatis* et *M. karlinski*. Ces espèces poussent bien au bout de 7 jours d'incubation dans un milieu contenant le lactate et le pyruvate. *M. smegmatis* poussent sur le succinate seulement après 5 semaines d'incubation. Aucune de ces espèces testées n'est capable d'oxyder ou de croître sur le citrate seul. Cependant l'addition d'une petite quantité de citrate (0,01%) au substrat montre un effet stimulateur. Par exemple, *M. phlei* qui peut croître sur le lactate ou le pyruvate comme seule source de carbone, croît encore mieux en présence de citrate. À part le bacille de la tuberculose, des résultats similaires sont obtenus avec toutes les autres

espèces testées. Des substrats dérivés de l'acide citrique ont été testés pour effet de stimulation, mais aucune de ces substances ne stimule la croissance d'aucun organisme. À partir de ces observations, Edson et Hunter, (1943) ont conclu que l'acide citrique n'est pas oxydé par les suspensions cellulaires de mycobactéries et ne peut pas être oxydé par la voie de l'acide tricarboxylique chez ces microorganismes. Ces chercheurs ont aussi évoqué la possibilité que l'acide citrique est utilisé pour la synthèse des acides aminés qui stimulent la croissance.

Geronimus (1949) a observé la consommation d'oxygène par les extraits cellulaires de plusieurs mycobactéries incubées avec les intermédiaires du cycle de l'acide tricarboxylique. Les extraits cellulaires ont été supplémentés avec le bleu de méthylène comme accepteur d'électrons. Selon Geronimus (1949) l'incapacité d'obtenir l'oxydation des intermédiaires avec les suspensions de cellules entières est probablement due à l'imperméabilité de la membrane cellulaire des mycobactéries aux intermédiaires. Ces observations de Geronimus ont été confirmées par Faine *et al.*, (1951). D'autre part, Sasakawa et Fuji, (1952) ont rapporté que les cellules du bacille de la tuberculose aviaire cultivé dans un milieu contenant du glycérol sont capables d'oxyder le citrate, seulement après une

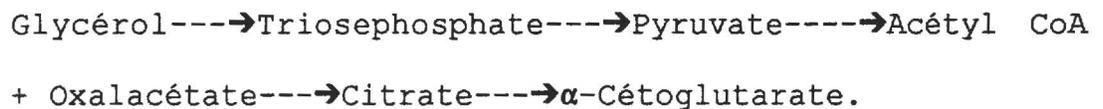
longue période d'incubation; tandis que les cellules séchées après lavage sont capables d'oxyder le citrate rapidement sans période de latence. Ces cellules oxydent aussi le cis-aconitate et l' α -cétoglutarate. L'existence de la période de latence peut être due à la perméabilité. L'extrait cellulaire obtenu à partir des cellules séchées et traitées avec de l'acétone est capable de déshydrogéner le citrate lorsque le bleu de méthylène est employé comme accepteur d'électrons dans les conditions aérobiques et l' α -cétoglutarate est formé pendant la réaction. La réaction est stimulée par les ions Mn^{2+} et Mg^{2+} . Cet extrait cellulaire est capable d'oxyder aussi l'acide oxalosuccinique. À partir de ces observations, Sasakawa et Fuji, (1952) ont conclu que l'oxydation du citrate en α -cétoglutarate s'effectue par le cycle de l'acide tricarboxylique.

Youmans et Youmans (1953) ont étudié l'effet des composés relatifs au cycle de l'acide tricarboxylique sur la croissance de *M. tuberculosis* var *hominis*. Ces chercheurs ont rapporté que cette mycobactérie est capable de croître en présence d'une certaines concentrations de glycérol, et des acides lactique, pyruvique, oxalosuccinique, α -cétoglutarique, et oxalacétique. Cependant, les acides citrique, cis-aconitique, isocitrique,

succinique, fumarique et malique, qui sont les intermédiaires du cycle de Krebs, sont incapables de supporter la croissance du microorganisme. Ils ont suggéré que cette incapacité à croître sur ces intermédiaires est probablement due à l'imperméabilité de la membrane cellulaire du bacille aux substrats respectifs. Ils ont aussi suggéré l'implication des hydrates de carbone dans le cycle de Krebs. Cette suggestion concorde avec les observations de Geronimus (1949) qui a rapporté que l'extrait cellulaire du H37 de *M. tuberculosis* oxydait les intermédiaires du cycle lorsque le bleu de méthylène était employé comme accepteur d'électrons.

Hunter (1953b) a étudié la formation d'acide par *M. butyricum* qui est cultivé sur milieu contenant du glycérol comme seule source de carbone. L'acide α -cétoglutarique a été l'acide prédominant isolé et identifié. De plus, le pyruvate et le succinate sont aussi produits. Hunter (1953b) a aussi examiné l'oxydation de l'acide α -cétoglutarique par les suspensions de cellules entières de *M. butyricum*, mais il a remarqué que l'acide cétonique ne stimulait pas la consommation endogène d'oxygène d'une manière significative. Les extraits cellulaires de *M. butyricum* possèdent cependant une faible activité d' α -cétoglutarate déshydrogénase qui est stimulée par l'addition de

cocarboxylase, d'ions Mg^{2+} et de nucléotides diphosphopyridines. L'acide α -cétoglutarique est formé seulement lorsque *M. butyricum* est cultivé sur milieu à base de glycérol. Il n'y a pas de formation de α -cétoglutarate lorsque le glycérol est remplacé par le glucose. En se basant sur ces observations Hunter (1953b) a proposé que la formation de l'acide α -cétoglutarique à partir du glycérol peut être attribuée à une série de réactions incluant le cycle de l'acide tricarboxylique suivant le schéma:



Hunter (1953b) a expliqué que l'accumulation de l'acide α -cétoglutarique dans le milieu de culture de *M. butyricum* était dûe au blocage du cycle de l'acide tricarboxylique au niveau de l' α -cétoglutarate chez cette espèce. Il a aussi souligné que puisque *M. butyricum* peut croître mieux sur le glycérol en présence de sulfate d'ammonium comme source d'azote, sans accumulation d'acide α -cétoglutarique, l'accumulation d'acide doit être liée au métabolisme de l'azote. Hunter (1953b) a ainsi conclu que les réactions du cycle de Krebs jouent un rôle important dans le métabolisme des mycobactéries.

Holmgren et al., (1954) ont étudié le métabolisme du bacille de la tuberculose. Ces chercheurs ont rapporté que parmi les intermédiaires et précurseurs du cycle de l'acide tricarboxylique testés, les acides citrique et succinique ne sont pas oxydés par les suspensions de cellules entières de la souche H37Ra de *M. tuberculosis* var *hominis*. Puisque ces composés sont des constituants clés dans le cycle de Krebs, leur incapacité à être oxydés par les microorganismes a amené Millman et Youmans (1954) à effectuer une série d'investigations sur le mécanisme respiratoire terminal en utilisant l'extrait cellulaire. Des taux élevés de consommation d'oxygène par l'extrait cellulaire ont été obtenu lorsque les acides malique, lactique et fumarique ont été utilisés comme substrats. Les acides pyruvique, succinique, citrique, α -cétoglutarique et oxalacétique sont aussi oxydés par l'extrait cellulaire, mais la consommation d'oxygène se stabilise après une période de 10 à 30 minutes.

Des études chromatographiques ont montré que l'acide citrique est synthétisé à partir de l'oxydation de l'acide malique et fumarique. L'addition de cofacteurs ATP, nicotinamide adénine dinucléotide (NAD^+) et coenzyme A, stimulait la consommation d'oxygène avec tous les substrats traités, exceptés le pyruvate

et le lactate. À partir de cette évidence expérimentale, Millman et Youmans (1954) ont conclu que *M. tuberculosis* var *hominis* H37Ra utilise le cycle de l'acide tricarboxylique pour l'oxydation des hydrates de carbone.

Ces résultats suggèrent que les mycobactéries cultivables, incluant le bacille de la tuberculose, possèdent un cycle d'acide tricarboxylique fonctionnel pour le métabolisme des hydrates de carbone. Cette suggestion est confirmée par les études de Yamamura et al., (1954) qui ont démontré la présence des enzymes spécifiques du cycle de Krebs chez les mycobactéries.

Youmans et al., (1956) ont rapporté aussi que des cellules entières de la souche virulente H37Rv de *M. tuberculosis* qui étaient incapables d'oxyder certains intermédiaires du cycle de Krebs, montrent une augmentation notable de la consommation d'oxygène en présence des mêmes substrats lorsque les cellules sont traitées avec de l'acétone. Ces chercheurs ont marqué la souche H37Rv au carbone 14 en faisant croître les cellules en présence d'acétate de sodium comme substrat (avec le deuxième atome de carbone marqué avec du C¹⁴). L'extrait de cellule a été ensuite analysé pour la présence de carbone radioactif dans les

intermédiaires du cycle de Krebs par chromatographie à échangeuse d'anions. Tous les intermédiaires du cycle de l'acide tricarboxylique: citrate, isocitrate, cis-aconitate, α -cétoglutarate, succinate, fumarate, et malate ainsi que les composés comme le pyruvate, glutamate, aspartate, et lactate ont été identifiés marqués au carbone ^{14}C . À partir de ces observations Youmans *et al.*, (1956) ont conclu que l'acétate est oxydé par la voie de l'acide tricarboxylique chez les mycobactéries.

Edson *et al.*, (1959) ont rapporté une autre étude semblable à celle effectuée par Youmans *et al.*, (1956). Ces chercheurs ont étudié la consommation et le métabolisme des substrats marqués radioactivement, à savoir le glycérol, l'acétate, et le bicarbonate, par *M. butyricum*. Cette mycobactérie excréta une quantité considérable d'acide α -cétoglutarique dans le milieu en présence d'acétate radioactif. Le carbone total obtenu après la dégradation des composés organiques fournit un modèle qui était comparable avec l'oxydation de l'acétate à travers le cycle de Krebs. La dégradation de α -cétoglutarate formé en présence de l'acétate de sodium marqué donne un modèle compatible avec la fixation du dioxyde de carbone dans le groupe β -carboxylique des précurseurs de l'oxalacétate. La

distribution du modèle de ^{14}C obtenue à partir de α -cétoglutarate formé en présence du glycérol marqué au ^{14}C est compatible avec le schéma que le glycérol est premièrement phosphorylé, et ensuite converti en pyruvate selon la voie d'Embden-Meyerhof. Le pyruvate formé est converti en oxalacétate et acétate qui sont dégradés par la voie de Krebs. On peut donc conclure que le cycle de l'acide tricarboxylique fournit et joue un rôle important dans le métabolisme des hydrates de carbone des mycobactéries.

Mori *et al.*, (1971) en utilisant la chromatographie sur papier ont identifié les réactions produites chez *M. lepraemurium* cultivé *in vivo*, et rapporté la présence des enzymes du cycle de l'acide tricarboxylique chez le microorganisme. Cependant, ils ont été incapables de démontrer l'existence de l' α -cétoglutarate déshydrogénase et proposent que le cycle de Krebs est bloqué au niveau de l' α -cétoglutarate chez *M. lepraemurium*.

Adapoe (1976) en utilisant le critère de Conn et Stumpf (1963) basé sur l'inhibition de l'oxydation du succinate par l'acide malonique comme critère de l'existence, en l'occurrence du cycle de l'acide tricarboxylique, chez plusieurs organismes, a obtenu l'inhibition complète de l'oxydation du succinate par

M. lepraemurium cultivé *in vivo*, avec 0.002M d'acide malonique. L'analyse chromatographique du produit de la réaction d'oxydation du succinate par *M. lepraemurium* a montré que le fumarate est le produit principal de l'oxydation du succinate chez cette mycobactérie. Parmi les intermédiaires du cycle seul le succinate est oxydé par les cellules entières de *M. lepraemurium*. Adapoe (1976) a rapporté l'existence de tous les enzymes du cycle de l'acide tricarboxylique chez *M. lepraemurium* cultivé *in vivo* et l'absence de pyruvate déshydrogénase, ce qui indique que cette mycobactérie n'utilise pas la voie de la glycolyse pour son métabolisme respiratoire.

4. TRANSPORT D'ÉLECTRON

4.1 COMPOSANTS DE LA RESPIRATION

La présence des cytochromes, les composants majeurs de la chaîne de transport d'électrons, a été démontrée chez *M. phlei* par Todd (1949). En fractionnant les extraits cellulaires de *M. phlei*, Brodie et Gray (1957) ont rapporté que les cytochromes de type a, b, et c chez ce microorganisme sont localisés dans la fraction particulaire obtenue après une courte période de traitement aux ultrasons. Cependant, après une longue

période de sonication, seuls les cytochromes a , et b restent liés à la fraction particulaire. Le cytochrome c est graduellement libéré dans le surnageant (fraction surnageante) lorsque la sonication est continuée pendant longtemps. La mise en évidence de la participation des cytochromes à la phase terminale de la respiration chez *M. phlei* a été rapportée par Asano et Brodie (1964). Lorsque le succinate est utilisé comme donneur d'électrons le spectre différentiel de la fraction particulaire de *M. phlei* montre des bandes d'absorption à 598 , 562 et 550 nm. Ces bandes correspondent aux bandes α des cytochromes a et b respectivement. Le pic de Soret du cytochrome b apparaît à 430 nm, tandis que ceux des cytochromes c et a + a₃ apparaissent à 420 et 445 nm respectivement. Tous les cytochromes sont localisés dans la fraction particulaire, cependant leur réduction complète par le succinate est stimulée par l'addition de la fraction surnageante. Cette observation suppose que d'autres facteurs, en plus des cytochromes, participent à la chaîne de transport des électrons.

Asano et Brodie (1964) et Revsin et Brodie (1969) ont noté la présence de monoxyde de carbone lié aux particules de *M. phlei*. Lorsque le courant de monoxyde de carbone est passé soigneusement à travers l'échantillon réduit, le spectre

d'absorption du monoxyde de carbone révèle une dépression (creux) à 445 nm et un pic à 430 nm. Le creux 445 nm se rapporte au cytochrome a_3 réduit dans la cuvette de référence et le pic à 430 nm est caractéristique du complexe a_3 -CO .

En plus des cytochromes, d'autres composants de la chaîne respiratoire comme flavoprotéines, vitamine K et la pyridine dinucléotide (NAD^+) ont été découvertes. La présence de flavoprotéine a été démontrée dans les particules de *M. phlei* par Asano et Brodie (1964). La réduction des flavoprotéines par le succinate comme donneur d'électrons a été mise en évidence par un creux caractéristique à 460 nm. L'addition de β -hydroxybutyrate à la préparation particulaire nécessite le NAD^+ pour réduire les cytochromes, indiquant que le NAD^+ est nécessaire dans la chaîne de transport d'électrons de *M. phlei*.

L'importance de la vitamine K ou de ses analogues dans le transport d'électrons chez *M. phlei* a été démontrée par Webber et Rosso (1963). Ils ont observé que les particules de *M. phlei* qui oxydaient le NADH, perdent l'activité oxydase après traitement avec l'isooctane. L'ajout de vitamine K aux particules traitées, entraîne une restauration à 100% de l'activité oxydase du NADH. Cette remarque a conduit ces

chercheurs à reconnaître la vitamine K comme une composante de la chaîne de transport d'électrons de *M. phlei*. En plus de la vitamine K, un facteur non identifié qui est sensible à la lumière à 360 nm a été rapporté actif dans l'oxydation du NADH. Webber et Rosso (1963) ont testé l'effet de plusieurs composés sensibles à la lumière sur l'oxydation du NADH par exposition des particules à la lumière. Parmi les composés testés, seule la vitamine K restaure l'oxydation à près de 62%. L'addition du facteur seul aux particules exposées à la lumière est incapable de restaurer l'oxydation. Mais la combinaison du facteur et de la vitamine K rétablit l'oxydation presque à sa valeur originale.

L'existence des cytochromes chez d'autres mycobactéries a été démontrée par Todd (1949) et par Andrejew et al., (1957). Ces chercheurs ont montré que *M. tuberculosis* H37Ra, BCG, et *M. avium* contiennent tous les types de cytochromes a, b, et c, aussi bien que l'activité oxydase des cytochromes.

Shug et Goldman (1960) ont étudié l'activité oxydase du NADH de *M. tuberculosis* H37Ra et ont rapporté que les particules montrent des pics de réduction à 595, 564, 560, et 550 nm correspondant aux bandes des cytochromes a₁, b, b et c,

respectivement. Les cytochromes ont été reconnus comme participant au transfert d'électrons de NADH à l'oxygène. Le cytochrome a a été le seul pigment en liaison avec le monoxyde de carbone (Shug et Goldman, 1960).

Kusaka et al., (1964) ont rapporté une étude comparative des modèles de cytochromes chez les mycobactéries cultivées *in vitro* et *in vivo*. Ces chercheurs ont démontré que les mycobactéries cultivées *in vitro* telles que *M. smegmatis*, BCG, *M. avium*, et *M. tuberculosis* contiennent toutes les cytochromes de type a, b, et c. Cependant seul *M. smegmatis* contient un pigment lié au monoxyde de carbone, similaire au cytochrome o. Bien que toutes les souches cultivées *in vitro* contiennent les mêmes types de cytochromes a et c, le cytochrome type b chez le BCG et *M. avium* est remplacé par le cytochrome type b₁ chez *M. smegmatis* et *M. paratuberculosis*. L'existence du cytochrome type o chez *M. smegmatis* semble être en rapport avec la facilité de croître *in vitro*. *M. paratuberculosis* montre une plus faible activité oxydase du NADH, en comparaison avec les autres espèces cultivées *in vitro*, ce qui peut avoir un lien avec la difficulté de le cultiver *in vitro*.

En examinant le BCG et *M. lepraemurium* cultivés *in vivo*, Kusaka

et al., (1964) ont rapporté une absence complète des cytochromes chez ces deux mycobactéries. À partir de ces observations, Kusaka et al., (1964) ont proposé que le BCG et *M. lepraemurium* sont incapables de faire la synthèse de leurs propres pigments respiratoires *in vivo*.

Les observations faites jusqu'à présent indiquent que les mycobactéries saprophytes qui croissent *in vitro*, à savoir *M. smegmatis*, BCG, *M. tuberculosis* souche H37Ra et *M. paratuberculosis*, contiennent le cytochrome a , b , et c (Kusaka et al., 1964; Brodie et Adelson, 1965; Kearney et Goldman, 1970); tandis que les espèces qui poussent *in vivo* telles que BCG, et *M. lepraemurium* manquent de cytochrome (Kusaka et al., 1964).

Mori et al., (1971) ont rapporté que les extraits cellulaires de *M. lepraemurium* cultivé *in vivo* contiennent les cytochromes a₂ et b. Ces deux cytochromes sont liés à la fraction particulaire. Les préparations obtenues par Mori et al., (1971) manquent de cytochrome c et montrent une très faible activité oxydase du NADH.

4.2 SÉQUENCE DES COMPOSANTS DE LA RESPIRATION DE *M. LEPRAE*

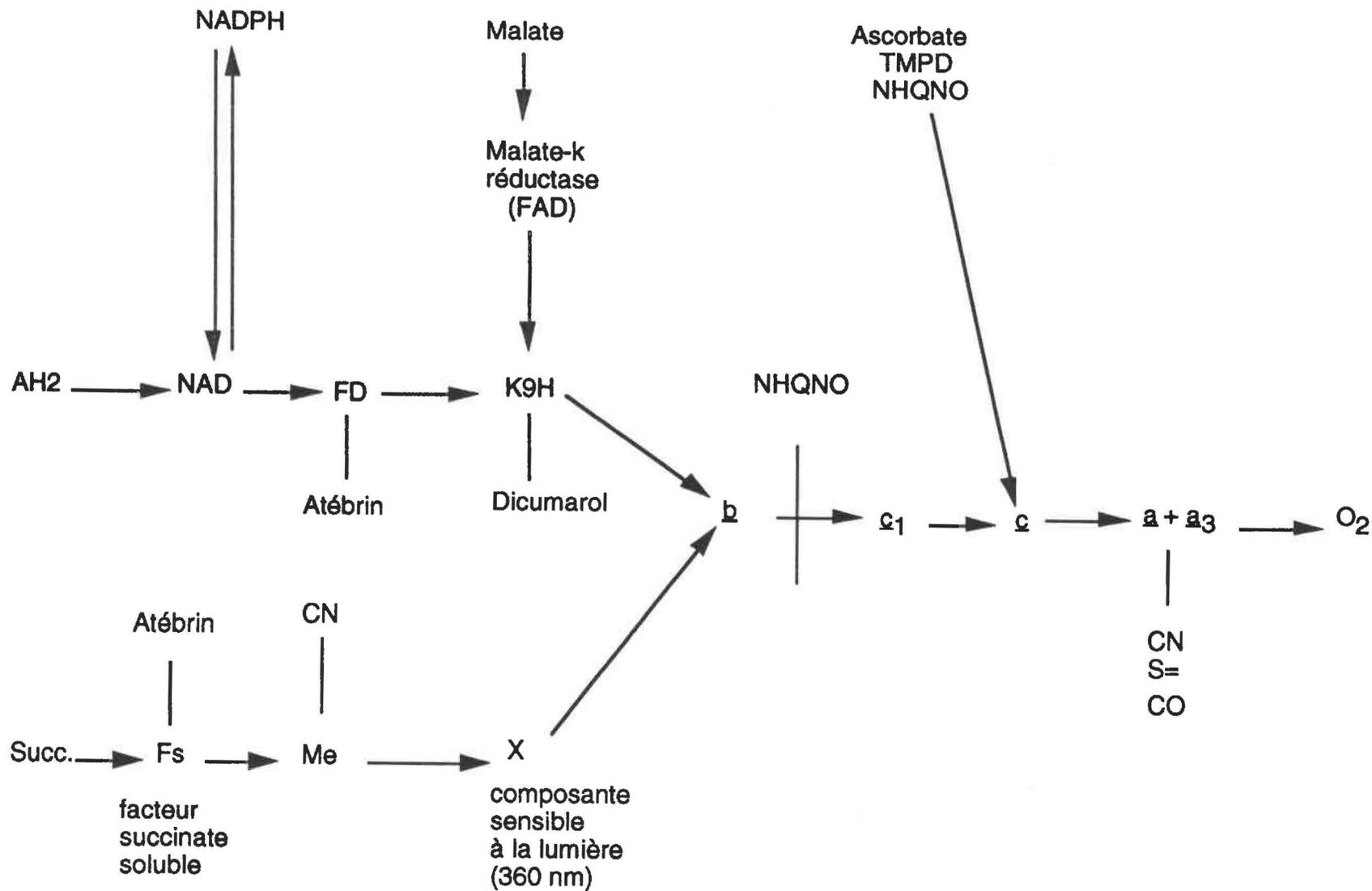
La séquence des composants de la respiration chez les mycobactéries a été étudiée en détail par Brodie et ses collaborateurs en utilisant *M. phlei* comme modèle (1965). Ces chercheurs ont pu démontrer qu'il y a trois voies majeures de respiration: celles du succinate, du malate et du NADH chez *M. phlei* (Asano et Brodie, 1964). Lorsque le succinate est utilisé comme donneur d'électrons dans le système contenant les préparations particulières et surnagées de *M. phlei*, tous les cytochromes $\underline{a} + \underline{a}_3$, \underline{b} , \underline{c} , et \underline{o} sont réduits. Des résultats similaires sont obtenus lorsque malate et NADH (avec un substrat lié au NAD^+ comme l'acide β -hydroxybutyrique) sont utilisés comme donneurs d'électrons (Asano et Brodie, 1964). La réduction des cytochromes par ces substrats indique que les électrons sont transportés de ces substrats à travers le système de cytochromes jusqu'à l'oxygène qui agit comme accepteur final d'électrons. La différence dans les voies d'oxydation de ces substrats a été démontrée par l'exigence de différents cofacteurs pour l'oxydation de chaque substrat. Bien que la fraction particulière de *M. phlei* montre une oxydation du succinate, cette dernière est grandement stimulée par l'addition de la fraction surnagée (Brodie 1959; Asano et

Brodie, 1963). La fraction du surnageant peut être remplacée par le FAD et non le NAD^+ pour l'oxydation du succinate. Cette constatation démontre que le FAD est nécessaire dans le transfert des électrons du succinate à l'oxygène. De plus l'oxydation du succinate est inhibée par l'atébrin, un inhibiteur des flavoprotéines. À la différence du succinate, le substrat lié au NAD^+ , le β -hydroxybutyrate, a nécessité l'addition du NAD^+ pour l'oxydation. L'oxydation du malate montre cependant deux voies différentes. Dans une voie, les particules de *M. phlei* nécessitent l'addition du FAD à la fraction du surnageant pour l'oxydation du malate. Dans ce système, le FAD ne peut pas être remplacé par le NAD^+ , mais en absence de particules, la fraction de surnageant nécessite le FAD, la vitamine K et les phospholipides pour l'oxydation du malate. Une seconde fraction du surnageant a exigé le NAD^+ pour l'oxydation du malate (Asano et Brodie, 1963). L'oxydation du malate a été inhibée aussi par l'atébrin indiquant l'exigence des flavoprotéines dans la voie oxydative. L'oxydation des substrats succinate, malate et celui lié au NAD^+ a été inhibé par le 2-N-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxyde (HQNO) et le cyanure. Ces observations indiquent que les trois substrats utilisent les pigments respiratoires constitués de cytochromes b, c, o, et a + a₃ pour l'oxydation et convergent au niveau du

cytochrome b. L'oxydation des trois substrats est inhibée par le dicumarol indiquant la nécessité de la vitamine K dans les trois voies. Seule l'oxydation du succinate est inhibée par le thénoltrifluoroacétone (TTFA), un inhibiteur spécifique de succinoxidase. Le pentachlorophénol inhibe seulement l'oxydation du malate. Ces observations indiquent que les électrons, à partir de ces substrats, suivent une voie distincte avant de converger au niveau du cytochrome b. Le facteur inconnu sensible à la lumière n'a pas été remplacé par la vitamine K et a été montré nécessaire dans la voie du succinate par Asano et Brodie (1964). À partir de ces résultats Asano et Brodie (1964, 1965) ont représenté la chaîne respiratoire de *M. phlei* tel que montré dans la Figure 1.

Ishaque et Kato, (1976) ont rapporté que les cellules intactes de *M. leprae* isolées des tissus de tatou catalysent l'oxydation du succinate. Ils ont observé que l'oxydation du succinate par les bacilles n'était pas affectée par la roténone, mais fortement inhibée par les agents de découplage comme l'antimycine A et le cyanure. Ce qui implique que la respiration des cellules de *M. leprae* cultivées *in vivo* se fait par la chaîne des cytochromes, avec l'oxygène comme accepteur final des électrons.

FIGURE 1: Représentation schématique de la chaîne de transport d'électron chez *M. phlei*.



Mori et al., (1985) ont pu observer le pic d'absorption du cytochrome b_1 et son pic de Soret à des longueurs d'ondes respectives de 560 nm et 426 nm chez *M. leprae*. Cependant, ils n'ont pas pu voir les pics des cytochromes a_2 , c , et a .

Ishaque et Kato (1974a) ont constaté chez les bacilles de la lèpre isolés du tatou, la présence des cytochromes types $a + a_3$, b et c qui sont présents principalement sous la forme réduite dans les suspensions cellulaires et sous la forme oxydée dans les extraits cellulaires. Ils ont également rapporté l'existence de pigments liés au monoxyde de carbone (a_3 -CO).

En effet, cet unique rapport laisse planer des doutes quant à l'origine réelle des cytochromes, qui peuvent provenir de l'organisme hôte d'une part; et le tatou étant d'autre part un animal dont les tissus sont fréquemment infectés par des mycobactéries autres que *M. leprae*. Enfin dans la littérature, il n'y a pas de rapport mentionnant les séquences du transport d'électrons chez *M. leprae*.

Toutes les recherches ayant été faites avec des bacilles obtenus à partir de tissus de tatou et certains résultats pour le transport de l'oxygène étant contradictoires, il nous a

semblé utile de reprendre l'étude des cytochromes de *M. leprae* cultivé dans les coussinets plantaires de souris nues athymiques élevées aseptiquement et d'étudier en même temps les séquences des composants de la respiration de *M. leprae* cultivé *in vivo*. Il est important de souligner que les coussinets plantaires de souris nues sont exempts de contamination par d'autres mycobactéries.

CHAPITRE I

TRANSPORT DES ÉLECTRONS

1. INTRODUCTION

Chez les microorganismes aérobies, la respiration s'effectue par l'entremise de la chaîne de transport des électrons. Les réactions de phosphorylation oxydative qui conduisent à la formation de composés très riche en énergie (ATP), sont généralement liées à la chaîne de transport des électrons. Puisque *M. leprae* est un microorganisme aérobie, on doit s'attendre à ce que le mécanisme de génération de l'énergie soit couplé à la chaîne de transport des électrons. Par conséquent avant de faire quoique se soit, l'existence des pigments respiratoires et leur rôle dans le métabolisme de *M. leprae* a été étudié.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 MICROORGANISMES

Au cours de cette étude, les microorganismes suivants ont été utilisés:

La souche de *Mycobacterium leprae*, l'agent étiologique de la

lèpre humaine a été obtenue du Dr Hastings (Louisiana State University, Baton Rouge, LA, U.S.A).

La souche Hawaïenne de *Mycobacterium lepraemurium* a été obtenue du Dr P.Greenburg (Laroche Research Laboratory, Nutley, NJ, U.S.A).

La souche de *Mycobacterium phlei* a été obtenue du Dr L. Kato du Centre Hospitalier Catherine Booth, Montréal, Canada.

La souche de *Mycobacterium tuberculosis BCG* a été obtenue de Biovac, Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada.

2.2 CROISSANCE ET PRÉPARATION DE LA SUSPENSION CELLULAIRE DE

M. LEPRAE

Les coussinets plantaires de souris nues sont infectés au départ avec 20 μ l de suspension cellulaire de *M. leprae* contenant 1×10^8 bacilles par ml. Les souris sont gardées aseptiquement dans les isolateurs pendant 12 à 16 mois. Durant cette période, elles sont entretenues selon les normes approuvées par le NIH en 1985. L'air, la nourriture et l'eau stériles leurs sont fournis. Les souris avec des lèpromes bien

développés au niveau du site d'infection après 12-16 mois sont transportées dans des contenants stériles au laboratoire, où elles étaient sacrifiées avec quelques gouttes de chloroforme. Les coussinets plantaires, après lavage à la proviodine et l'éthanol 70%, sont coupés en petits morceaux et broyés dans un mortier en ajoutant de l'eau distillée stérile. La suspension est filtrée à travers un filtre en nylon stérile pour enlever les débris de tissus.

Au cours des expériences préliminaires, les méthodes suivantes ont été utilisées pour purifier les bacilles:

2.2.1. Traitement au NaOH. Les bacilles sont purifiés par centrifugation différentielle (Kato and Ishaque, 1975). Le filtrat obtenu après filtration de la suspension sur nylon, est centrifugé à 1,500 RPM (Bekman J-21B centrifuge) pendant 10 min. Le culot contenant *M. leprae* est suspendu dans 2% de NaOH dilué 5 fois avec de l'eau distillée stérile. Après 20 minutes d'incubation la suspension est centrifugée à 8,000 X g pendant 10 minutes. Le culot est ensuite lavé deux fois avec du tampon phosphate 0,05M , PH 6,5 et resuspendu dans un volume approprié du même tampon, pour utilisation ultérieure.

2.2.2. Traitement au Zephiran.

Pour cela, après la centrifugation différentielle, on suspend le culot dans 20 ml de tampon ou d'eau et on y ajoute 30 ml de zephiran (0.1%) que l'on fait agiter pendant 30 minutes. Le reste de l'opération se déroule comme dans le cas du traitement au NaOH.

En fait, ces deux substances ont le même effet, c'est-à-dire qu'elles précipitent les bacilles, tuent les autres microorganismes, éliminent l'activité enzymatique qui pourrait exister dans la suspension de bacilles en provenance des tissus de l'hôte.

2.2.3. Vérification de l'authenticité des bacilles comme

M. leprae

Pour les études spectrophotométriques, respiratoires et métaboliques de *M. Leprae* cultivé *in vivo*, il est nécessaire que les suspensions cellulaires purifiées soient libres des tissus de l'hôte, ainsi que d'autres microorganismes incluant les mycobactéries cultivables. Pendant ces études, nous avons utilisé des suspensions cellulaires traitées avec l'hydroxyde

de sodium (NaOH). Le traitement au NaOH est capable d'éliminer les tissus de l'hôte (Wheeler, 1984a). Il a aussi été montré (Ishaque, 1989) que le traitement avec 1% de NaOH de suspensions cellulaires de *M. leprae* isolé des tissus de tatou, détruit les tissus de l'hôte sans affecter l'activité respiratoire des bacilles. Afin de s'assurer que les préparations ne contenaient purement que *M. leprae* sans aucune autre mycobactérie, les tests suivants ont été effectués:

i). Les observations microscopiques.

L'examen microscopique des préparations traitées avec le NaOH, après la coloration selon la méthode de Ziehl-Neelson (Shepard and McRae, 1968) a montré que les bacilles étaient acido-alcool-résistants et les suspensions étaient pratiquement débarrassées des tissus de l'hôte.

ii). Activité de l'adénosine monophosphatase (AMP-ase).

Les préparations de *M. leprae* traitées avec du NaOH ont été trouvées déficientes en activité AMP-ase. Cette activité était présente dans les préparations des tissus de l'hôte. L'activité AMP-ase est décrite en détail au chapitre II, pages 107.

iii). Inoculation sur des milieux conventionnels.

Après le traitement au NaOH, 0.1 ml de suspensions de *M. leprae* a été inoculé sur les milieux Lowenstein-Jensen, Sauton, Dubos et sur le milieu à base de jaunes d'oeufs. Il est connu que les mycobactéries cultivables poussent sur ces milieux. Après cinq semaines d'incubation à 32°C et 37°C, aucune croissance n'a été observée. Ces résultats indiquent que les préparations ne contenaient pas de mycobactéries cultivables.

iv). L'oxydation de la dihydroxyphénylalanine (DOPA).

La DOPA est oxydée seulement par *M. leprae* et non pas par d'autres mycobactérie. Parmi les critères d'identification de *M. leprae*, l'oxydation de la DOPA est aussi utilisée pour établir l'authenticité de *M. leprae* (Prabhakaran, 1967). Les préparations utilisées dans ces études ont montré l'activité oxydase de la DOPA. L'oxydation de la DOPA par *M. leprae* est décrite en détail au chapitre II, page 126

En se basant sur ces résultats, on peut conclure que les préparations de *M. leprae* traitées avec du NaOH, utilisées dans ces études contenaient en effet *M. leprae* et étaient libres des tissus de l'hôte et d'autres microorganismes incluant les mycobactéries cultivables.

2.3. CROISSANCE ET PRÉPARATION DE LA SUSPENSION CELLULAIRE DE M. LEPRAEMURIUM.

Les souris C3H reçoivent une inoculation sous-cutanée d'une suspension de *M. lepraemurium* (souche Hawaïenne) au niveau du thorax. Les souris qui ont des lépromes développés après 4 à 5 mois d'infection sont transportées au laboratoire. Les souris sont sacrifiées avec quelques gouttes de chloroforme. Après une désinfection de la peau avec de l'éthanol à 70 %, les souris sont fixées sur des planches stériles en position dorsale et on procède à l'autopsie. Les lépromes qui sont localisés dans la région du thorax sont enlevés aseptiquement, coupés en petits morceaux et broyés en ajoutant de l'eau distillée stérile. Le reste de l'opération est identique à la préparation de la suspension de *M. leprae*.

2.4. CROISSANCE ET LA PRÉPARATION DE LA SUSPENSION CELLULAIRE DE M. PHLEI

M. phlei est cultivé sur milieu Lowenstéin-Jensen à 32°C pendant 7-10 jours. Les cellules sont enlevées soigneusement de la surface et suspendues dans du tampon phosphate 0,05M, pH 6,5. La suspension est centrifugée à 8,000 X g pendant 10 minutes;

le culot est ensuite lavé deux fois avec le même tampon avant d'être resuspendu dans un volume 10 ml.

2.5. PRÉPARATION DE LA SUSPENSION CELLULAIRE DU BCG

La suspension cellulaire du *Bacille Calmette et Guerin (BCG)* est préparée en lavant les cellules de BCG qui poussent à la surface du milieu dans les boîtes de Petri, avec de l'eau distillée stérile. La suspension ainsi obtenue est centrifugée à 8,000 X g pendant 10 minutes et le culot est lavé deux fois avec le tampon phosphate avant d'être suspendu dans un volume de 10 ml.

2.6. PRÉPARATION DES DIFFÉRENTES FRACTIONS (EXTRAIT) CELLULAIRES

Pour préparer l'extrait cellulaire, on suspend une préparation de cellules bien concentrée dans un milieu de sonification contenant 50 mM de tampon Tris-HCl (pH 6,2), 250 mM de sucrose, 1 mM d'EDTA, et 1 mM de glutathion réduit. La suspension est sonifiée pendant 10 minutes. Pendant la sonication, la

température de la suspension est maintenue à 0°C dans un bain de glace. L'extrait cellulaire brut est obtenu en centrifugeant le sonicat à 10,000 X g pendant 20 minutes pour enlever les cellules brisées. L'extrait brut est centrifugé à 50,000 X g pendant 60 minutes pour obtenir la fraction particulaire large. Le surnageant de cette dernière opération est centrifugé à 150,000 X g pendant 120 minutes pour avoir la fraction soluble et particulaire.

2.7. EXTRACTION DES CYTOCHROMES

Les solutions suivantes ont été préparées pour l'extraction des cytochromes:

-la solution de sulfate ferrique a été préparée en dissolvant 5 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans 3 000 ml d'eau distillée contenant 15 ml de H_2SO_4 concentré.

-La solution d'acétone acide a été préparée en mélangeant 20 parties d'acétone, 4 parties d'eau distillée et 1 partie de HCl concentré (20:4:1) et a été gardée au froid jusqu'à son emploi.

-Un volume connu d'éther est lavé trois fois avec un volume égal de sulfate de fer et la couche aqueuse au fond est drainée au moyen d'un entonnoir. L'extrait d'éther est gardé dans un récipient clos à la température de la pièce et est utilisé dans

les 24 heures qui suivent sa préparation. Après le lavage, 5 g de cellules (poids humide) sont mis dans un tube à centrifuger et 20 ml de la solution d'acétone-eau-HCl concentré (20:4:1) sont ajoutés. Les cellules sont soigneusement mélangées avec un homogénéisateur en verre et centrifugées à 7,000 X g pendant 5 minutes. Le culot est lavé trois fois avant d'être suspendu dans l'eau distillée, gardé dans un bain de glace jusqu'à l'examen du cytochrome. Les surnageants du lavage du culot sont recoltés et lavés aussi trois fois avec un volume égal d'éther contenant 5 ml de 1% HCl. La couche d'éther est collectée dans un flacon (évaporateur à 20°C). Le matériel sec est dissout dans de l'eau distillée et examiné pour la présence de cytochrome a et b. Les cytochromes sont examinés en préparant la pyridine hémochromogène telque décrit par Falk (1964). À 1 ml de culot de cellules, on ajoute 1 ml de pyridine, 4.5 ml d'eau et 0.5 ml de 1 M de NaOH. Le mélange est bien agité et 2 ml est mis dans la cuvette pour examen spectrophotométrique. La même procédure est adoptée pour examiner les cytochromes dans l'extrait d'éther, mais au lieu de 0.5 ml de 1 M de NaOH on utilise 0.05 ml.

2.8. MESURE DU SPECTRE DIFFÉRENTIEL

Les spectres d'absorption des suspensions, des extraits et autres préparations cellulaires ont été mesurés à la température de la pièce, en utilisant le spectrophotomètre Carry modèle 118. Le mélange total de la réaction était de 2 ml et contenait du tampon phosphate 0.05M, pH 6.2. Le poids sec des suspensions cellulaires variait entre 10 à 15 mg, tandis que les extraits contenaient 10 à 15 mg de protéine. Après avoir tracé la ligne de base, une petite quantité de dithionite (ou un substrat connu) est ajouté dans la cuvette d'échantillon. Le spectre différentiel est ensuite déterminé en comparant l'échantillon réduit avec le dithionite ou le substrat dans les conditions anaérobies contre la référence aérobie sans substrat.

Afin d'obtenir le spectre d'absorption des pigments liés au monoxyde de carbone, le contenu des deux cuvettes est d'abord réduit avec le dithionite ou le substrat. Après détermination de la ligne de base, le monoxyde de carbone est soigneusement barbotté dans l'échantillon pendant 3 minutes à l'obscurité et le spectre d'absorption est mesuré contre celui de la cuvette de référence.

Pour étudier l'effet des inhibiteurs sur les différents spectres d'absorption, une concentration appropriée de chaque inhibiteur est ajoutée dans les deux cuvettes 5 minutes avant l'addition du substrat.

2.9. LE POIDS SEC

Pour chaque suspension, le poids sec a été déterminé en duplicata en faisant sécher 1.0 ml de la suspension cellulaire et 1.0 ml du tampon dans des nacelles placées au four Pasteur pendant toute la nuit à 80-100°C. Le poids sec de la suspension est obtenu en comparant les mesures avant et après dessiccation.

2.10. DÉTERMINATION DES PROTÉINES.

La détermination des protéines dans les extraits cellulaires a été effectuée selon la méthode de Lowry et al., 1951.

2.11. COLORATION ET COMPTAGE DES CELLULES

Selon le besoin, nous avons effectué le comptage des bacilles par ml, afin d'avoir une estimation de la concentration. Pour

cela, nous avons procédé à la coloration caractéristique des bacilles acido-alcool-résistants selon la méthode de Ziehl-Neelson (Shepard et McRae, 1968). Le nombre de bacilles dans 4 ou 5 champs microscopiques est compté et la moyenne est multipliée par la constante 1.48×10^5 et la dilution pour avoir la concentration en bactéries.

2.12. RÉACTIFS

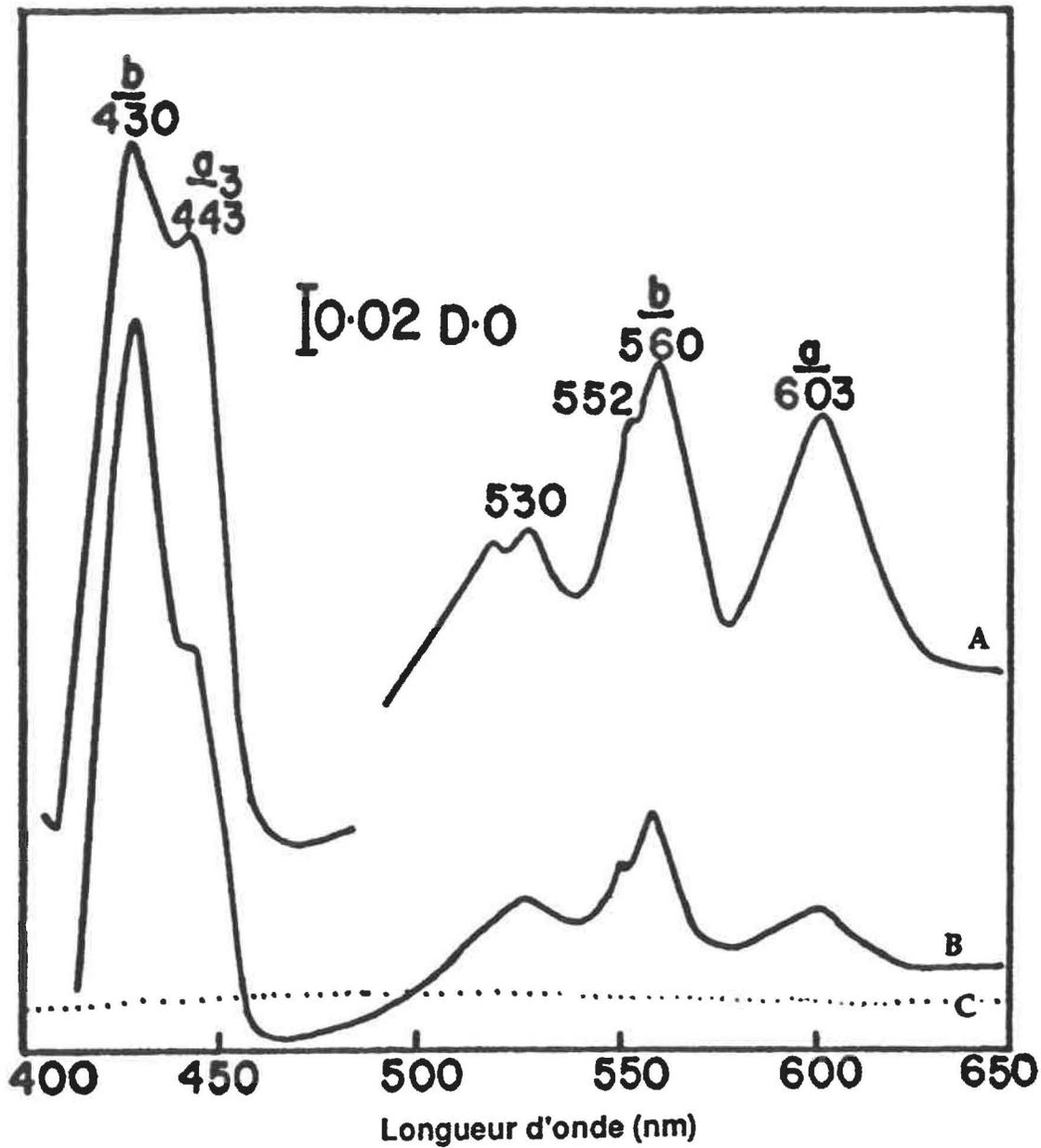
L'acide ascorbique, le sodium dithionite, le ferrocyanure de potassium, l'antimycine A, la roténone, l'atébrine, le dicumarol, l'amytal, l'oligomycine, le cyanure et le 2-N-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxyde (HQNO) ont été obtenus de la compagnie de produits chimiques Sigma, St Louis, Missouri, U.S.A.

3. RÉSULTATS

3.1 COMPOSANTS DE LA CHAÎNE RESPIRATOIRE DANS LES SUSPENSIONS CELLULAIRES ET LES EXTRAITS CELLULAIRES DE M. LEPRAE.

La Figure 2 montre le spectre différentiel de la suspension cellulaire (A) et de l'extrait cellulaire (B) de *M. leprae* réduit avec le dithionite. Les suspensions de cellules entières (A) révèlent des pics d'absorption distincts à 603 nm, 560 nm, 530 nm, une épaule à 443 nm et un autre pic à 430 nm. Dans la région visible, le pic d'absorption à 603 nm représente la bande α du cytochrome $\underline{a} + \underline{a}_3$, tandis que les pics à 560 et 530 nm sont caractéristiques des bandes α et β respectivement du cytochrome \underline{b} . La réduction des flavoprotéines est montrée par le creux (la dépression) à 465 nm (Chance et Williams, 1955). Les pics d'absorption apparus à 443 et 430 nm dans la région de Soret sont caractéristiques des bandes α du cytochrome $\underline{a} + \underline{a}_3$ (Asano et Brodie, 1964) et du cytochrome \underline{b} respectivement. De la même manière, le spectre différentiel de l'extrait cellulaire (Figure 2) réduit avec le dithionite (B) révèle des bandes d'absorption du cytochrome \underline{b} (430, 530 et 560 nm) aussi bien que des cytochromes $\underline{a} + \underline{a}_3$ (443 et 603 nm). Cependant, il

FIGURE 2: Spectre différentiel (A) Suspension cellulaire et (B) Extrait cellulaire de *M. leprae* réduit avec le dithionite. (C) Ligne de base.



est intéressant de noter que la suspension cellulaire aussi bien que l'extrait cellulaire traités avec le dithionite ne donnent aucune indication sur l'existence des pics du cytochrome c.

L'addition du succinate à la suspension (A) aussi bien qu'à l'extrait cellulaire (B) provoque une réduction du cytochrome c (pics α à 552 nm et β à 523 nm), accompagné par les bandes d'absorption des cytochromes a + a₃ et b (Figure 3). Il a été observé que l'ajout de dithionite à la suspension ou à l'extrait cellulaire, réduit au préalable avec le succinate, entraîne aussitôt une réduction plus grande de tous les cytochromes et l'extension de la réduction est égale à celle obtenue avec le dithionite seul. Il est donc probable que la réduction du cytochrome b avec le dithionite est si grande que les pics du cytochrome c à 552, 523 et 420 nm sont complètement masqués par les larges pics du cytochrome b.

La réduction des pigments respiratoires dans la suspension cellulaire (A) et dans l'extrait cellulaire (B) de *M. leprae* en présence du NADH est similaire à celle obtenue avec le succinate (Figure 4).

FIGURE 3: Spectre différentiel (A) Suspension cellulaire et (B) Extrait cellulaire de *M. leprae* réduit avec le succinate. (C) Ligne de base.

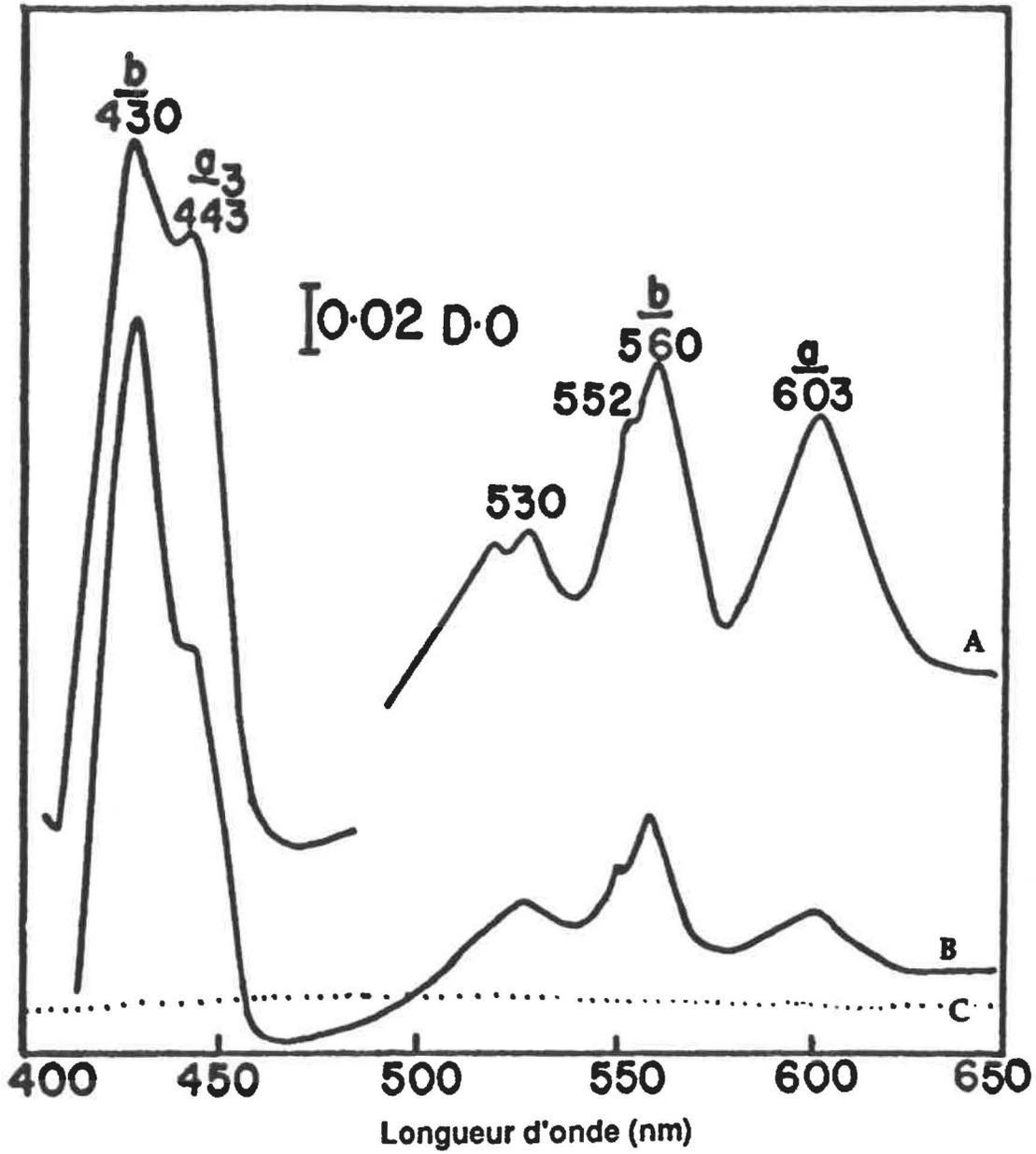
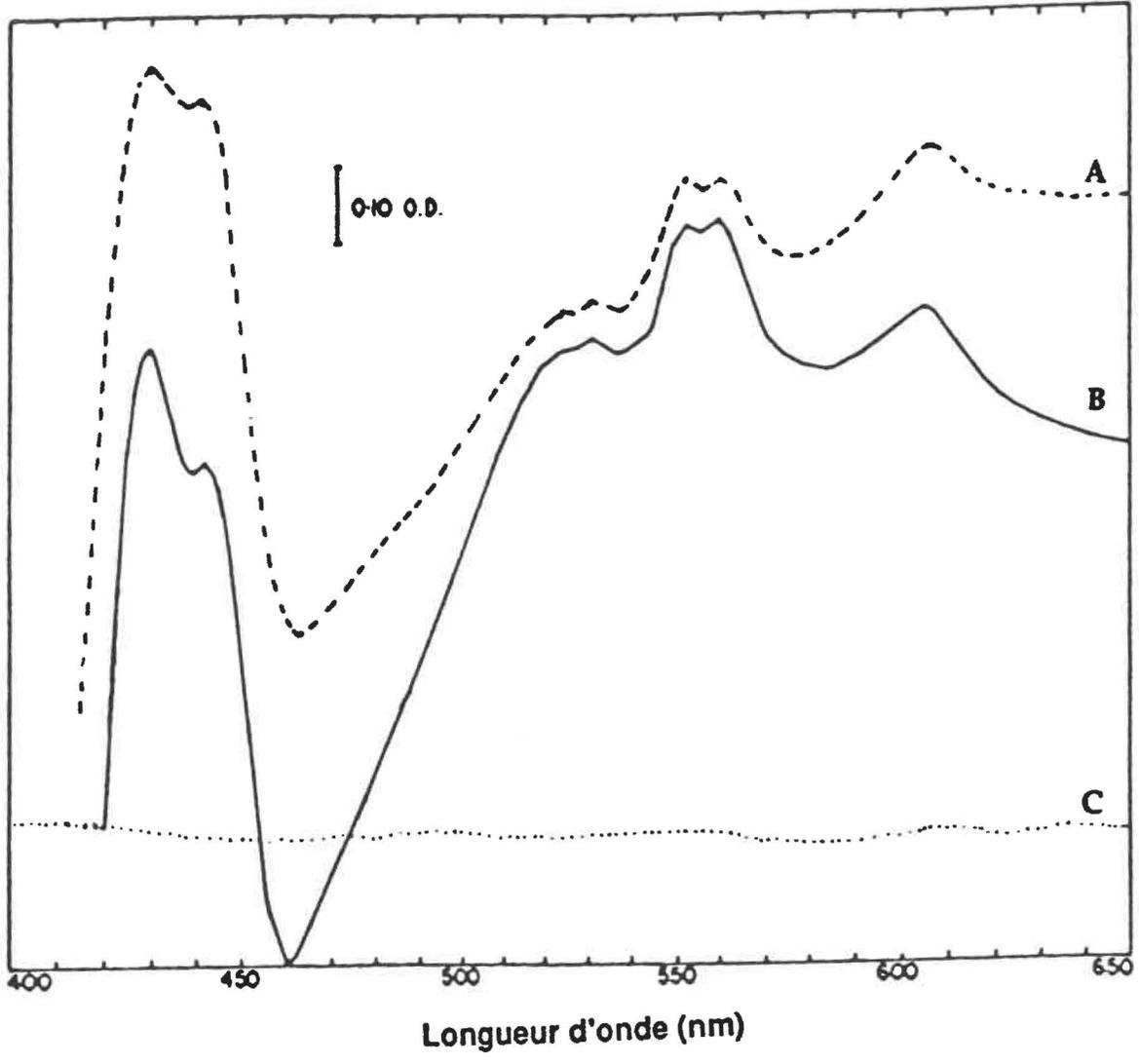


FIGURE 4: Spectre différentiel (A) Suspension cellulaire et (B) Extrait cellulaire de *M. leprae* réduit avec le NADH. (C) Ligne de base



La Figure 5 représente le spectre différentiel de l'extrait cellulaire de *M. leprae* réduit avec l'ascorbate comme donneur d'électrons. On peut observer sur cette figure qu'il n'y a aucune réduction des flavoprotéines et du cytochrome b. Seuls les cytochromes c (552, 523 et 420 nm) et a + a₃ (605, 445 nm) sont réduits. Ce spectre met en évidence la présence du cytochrome c chez *M. leprae*. En outre, pour confirmer la présence du cytochrome c chez *M. leprae*, la pyridine hémochromogène a été préparée et le spectre différentiel réduit avec le dithionite est comparé au spectre de l'extrait (A) et de la suspension (B) cellulaires (Figure 6). Le spectre de la pyridine hémochromogène de *M. leprae* (C) montre des pics du cytochrome c à 552, 523 et 418 nm, similaires à ceux observés dans la suspension cellulaire et l'extrait cellulaire réduit avec le succinate ou le NADH (Figures 3 et 4) et l'extrait cellulaire réduit avec l'ascorbate (Figure 5). Ainsi ces résultats indiquent clairement que le cytochrome c est aussi un composant de la chaîne respiratoire de *M. leprae*.

Les cellules intactes de certaines mycobactéries ont révélé le cytochrome a₃ et le cytochrome o comme les pigments liés au monoxyde de carbone. Il nous a paru intéressant de déterminer si les cytochromes de *M. leprae* forment un tel complexe avec le monoxyde de carbone. La Figure 7, montre que *M. leprae*

FIGURE 5: Spectre différentiel de l'extrait cellulaire de *M. leprae* réduit avec l'ascorbate. (A) Ascorbate et (B) Ligne de base.

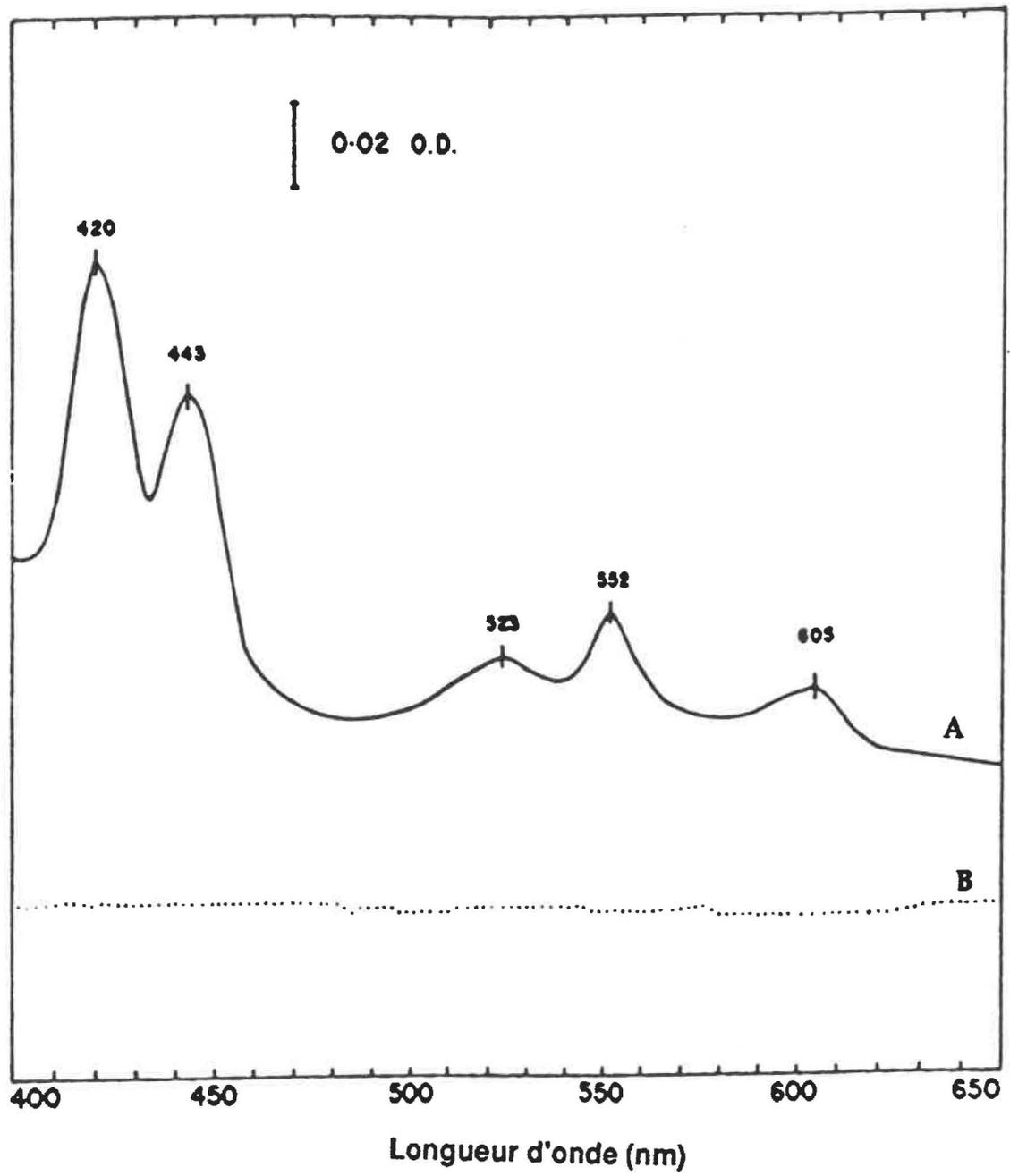


FIGURE 6: Spectre différentiel de la pyridine hémochromogène de *M. leprae*. (A) Extrait cellulaire, (B) Suspension cellulaire, (C) Pyridine hémochromogène et (D) Ligne de base.

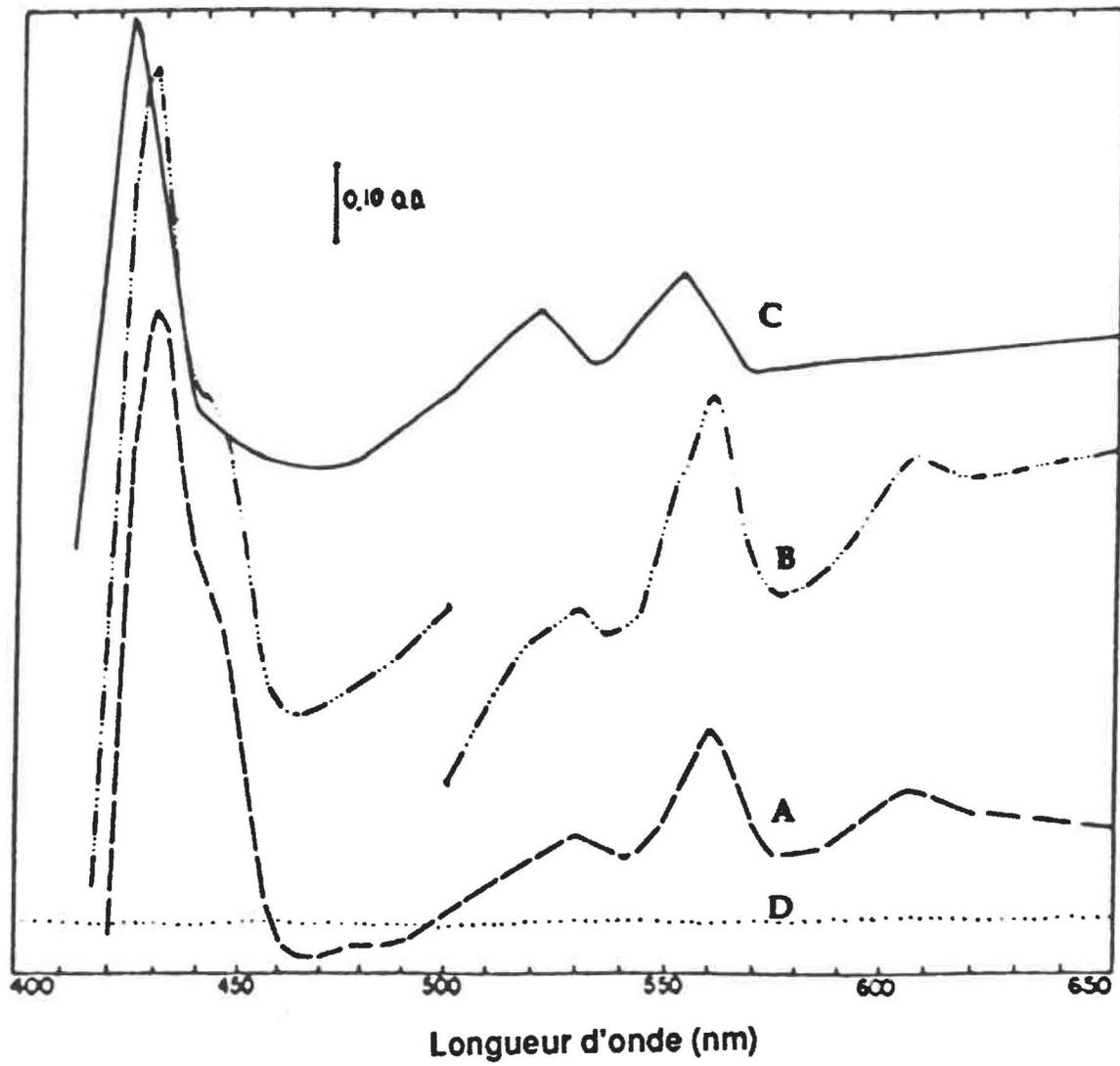
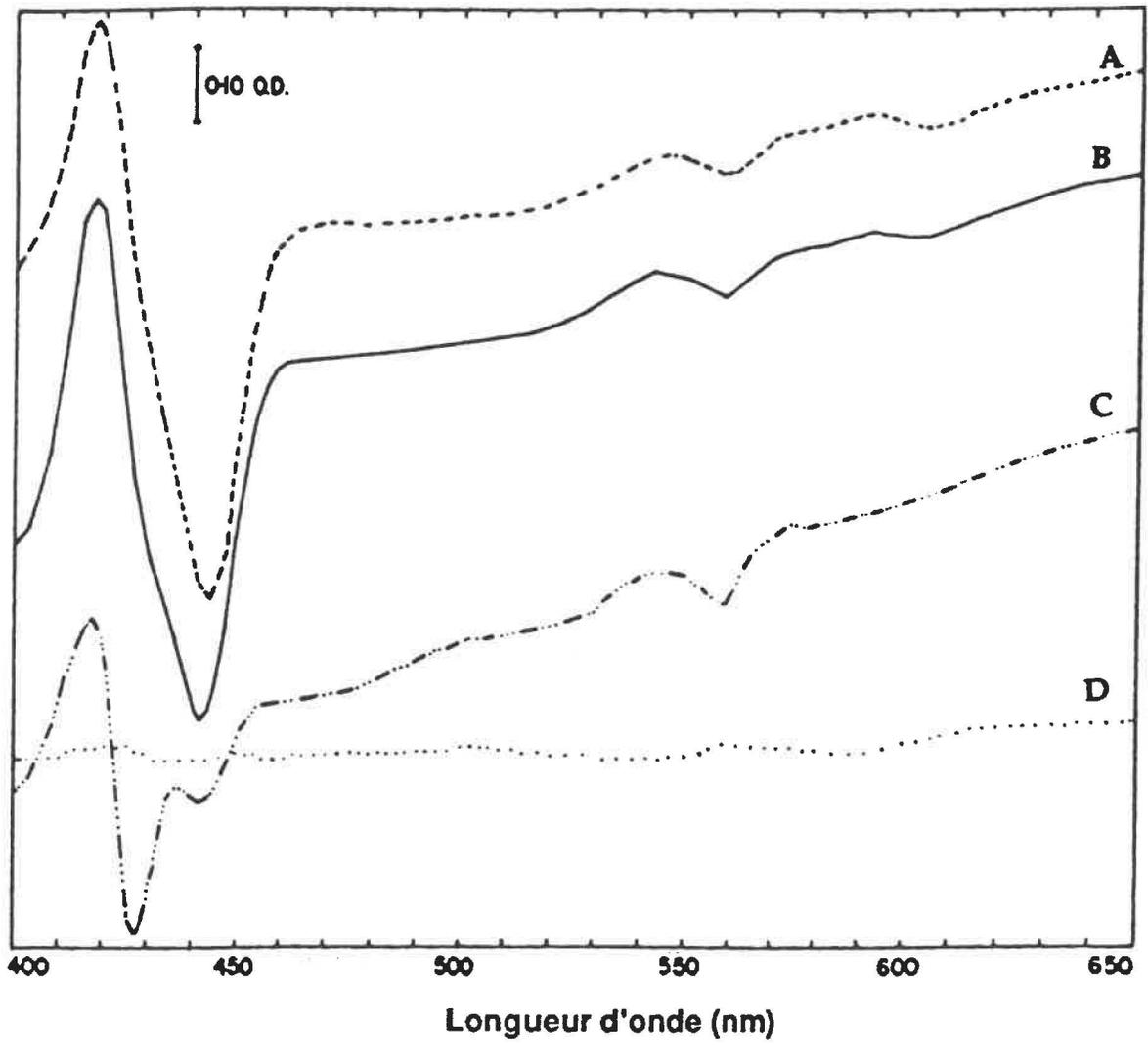


FIGURE 7: Spectre différentiel du cytochrome o avec le monoxyde de carbone chez *M. leprae*. (A) Succinate plus CO, (B) NADH plus CO, (C) Dithionite plus CO et (D) Ligne de base.



contient aussi des pigments liés au monoxyde de carbone. Pour révéler la présence de ces pigments, l'extrait cellulaire a été réduit avec le dithionite, le succinate ou le NADH et un courant de monoxyde de carbone a circulé dans l'échantillon. Dans les régions visibles des échantillons réduits avec le dithionite (A), le succinate (B) ou le NADH (C) une bande d'absorption indicative du complexe cytochrome a_3 -CO apparaît à 590 nm (Revsin et Brodie, 1969). Dans tous les échantillons, des pics correspondant au complexe cytochrome o -CO sont révélés à 570 nm et 540 nm. Dans la région de Soret, le creux à 445 nm est dû à la réduction du cytochrome a_3 dans la cuvette de référence; tandis que les pics à 430 et 419 nm correspondent au complexe monoxyde de carbone avec cytochrome a_3 (cyt a_3 -CO) et monoxyde de carbone avec cytochrome o (cyt o -CO), respectivement. Le complexe cyt o -CO à 419 nm est similaire à celui rapporté chez plusieurs microorganismes par Broberg et Smith (1967) et Smith (1965). Dans cette étude, le modèle de cytochrome chez *M. leprae* cultivé *in vivo* a été comparé avec celui du BCG cultivé *in vitro* et *M. lepraemurium* cultivé *in vivo* (Tableau 1).

Le spectre différentiel de l'extrait cellulaire de *M. leprae*, réduit avec le dithionite montre les bandes α et Soret du

TABLEAU I. Tableau comparatif des pigments
respiratoires dans l'extrait Cellulaire
de *M. leprae*, *M. lepraemurium* et BCG.

Microorganismes	Spectre différentiel					Spectre du CO							
	Cyt. <u>a</u> + <u>a</u> ₃		Cyt. <u>b</u>			Cyt. <u>c</u>		Flavines	Cyt. <u>a</u> ₃ -CO	Cyt. <u>o</u> -CO			
	α	Soret	α	β	Soret	α	β	creux	creux	pics			
<i>M. leprae</i>	603	443	562	530	430	552	523	465	445	435	570	543	419
<i>M. lepraemurium</i>	607	445	562	530	430	552	520	465	445	435	574	545	418
<i>BCG</i>	-	-	560	530	430	-	-	458	-	-	572	540	417

* unité de mesure: nm

cytochrome \underline{a} + \underline{a}_3 qui sont visibles à 603 et 443 nm respectivement chez *M. leprae*. Les mêmes bandes apparaissent également chez *M. lepraemurium* à 605 et 445 nm, mais n'existent pas chez le BCG. Le pic α à 552 nm et β à 523 nm des cytochromes \underline{c} chez *M. leprae* sont aussi absents chez cette espèce de BCG. La préparation de BCG montre cependant des pics distincts à 560, 530 et 430 nm représentant les pics α , β et Soret caractéristiques du cytochrome \underline{b} seulement.

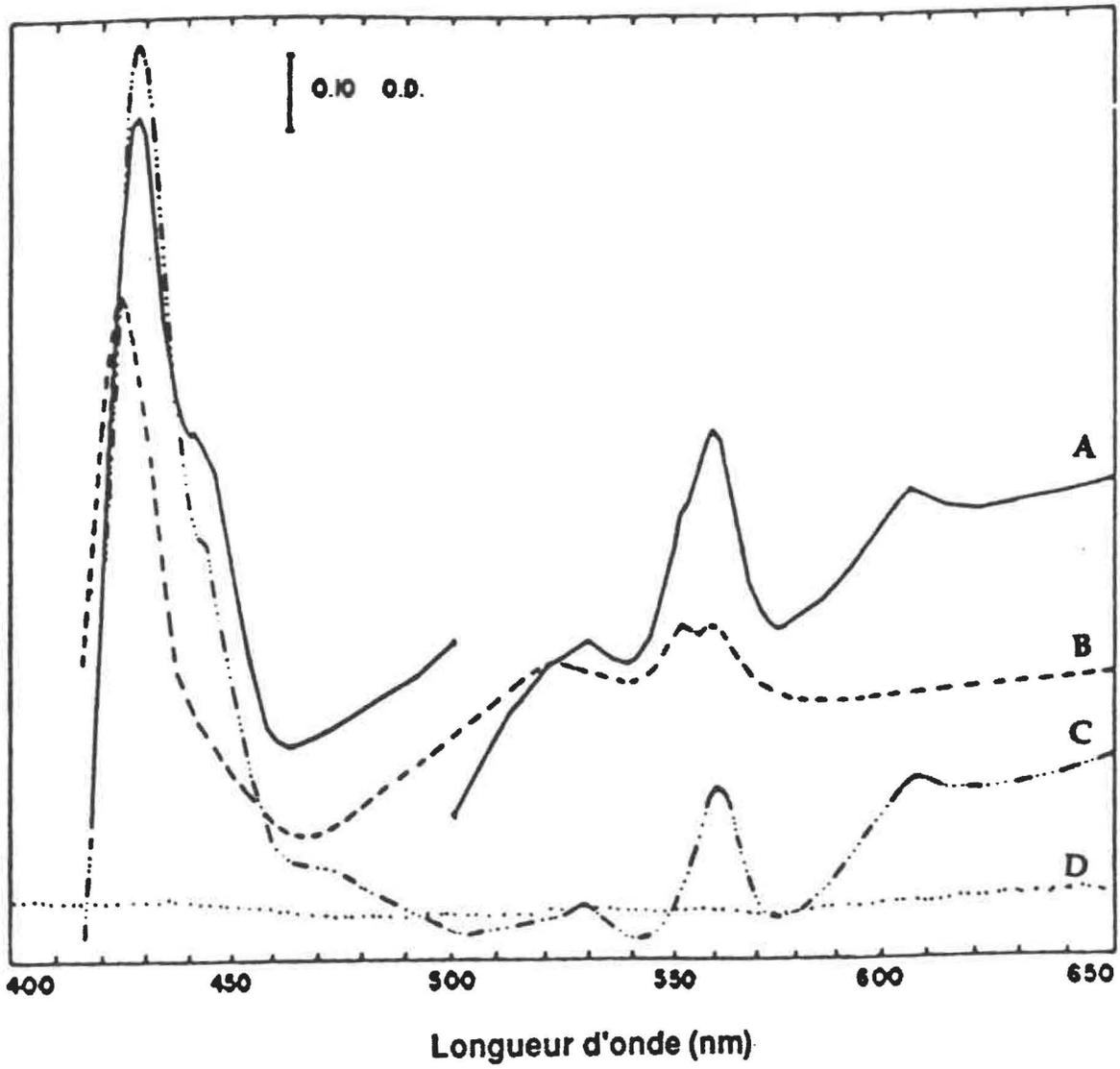
La Figure 7 montre le spectre différentiel de l'extrait cellulaire de *M. leprae* réduit avec différents substrats plus le monoxyde de carbone. Le complexe cytochrome \underline{o} -monoxyde de carbone (cyt \underline{o} -CO) est présent chez les trois espèces à 572, 540 et 417 nm pour le BCG, à 574, 545 et 418 nm pour *M. lepraemurium* et 570, 543 et 419 nm pour *M. leprae*. Le pic caractéristique du complexe cytochrome \underline{a}_3 -monoxyde de carbone (cyt \underline{a}_3 -CO) qui apparaît à 435 nm chez *M. leprae* et *M. lepraemurium* mais est absent chez le BCG.

3.2 LOCALISATION DES Composants RESPIRATOIRES CHEZ *M*

LEPRAE.

Afin d'étudier la distribution et la localisation des pigments respiratoires chez *M. leprae*, les fractions particulaire et soluble obtenues à grande vitesse (150,000 X g) ont été réduites avec le dithionite et les cytochromes ont été examinés. Tous les cytochromes a + a₃, b et c sont présents dans l'extrait cellulaire brut (A) (Figure 8); ils sont distribués différemment dans la fraction soluble (B) et particulaire (C). La fraction particulaire (C) montre seulement la présence de cytochrome a + a₃ et b. Les pics qui apparaissent à 603 et 443 nm, respectivement, correspondent aux pics α et β des cytochromes a + a₃. Les pics qui apparaissent à 560, 530 et 430 nm représentent, respectivement, les pics α , β et γ du cytochrome b. Il n'y a aucun pic dans le spectre différentiel de la fraction particulaire qui correspond au cytochrome c. D'autre part, les flavoprotéines réduites dans l'extrait cellulaire brut (A) (creux à 465 nm), ne sont pas visibles dans la préparation particulaire également. Le spectre différentiel de la fraction soluble (Figure 8 B) montre principalement le cytochrome c. Les pics α , β et γ de ce dernier apparaissent à 552, 523 et 423 nm, respectivement. De plus, le surnageant (B)

FIGURE 8: Localisation des pigments respiratoires dans les différentes fractions cellulaires de *M. leprae*. (A) Extrait cellulaire brut, (B) Surnageant, (C) Fraction particulaire et (D) Ligne de base.



contient les flavoprotéines qui sont indiquées par le creux à 465 nm. Il a été observé que les pigments liés au monoxyde de carbone sont aussi localisés dans la fraction particulaire (C).

3.3 LA CHAÎNE RESPIRATOIRE CHEZ *M. LEPRAE*.

Nos résultats indiquent que l'oxydation du succinate, du NADH et de l'ascorbate par *M. leprae* s'effectue à travers le système de cytochromes. Ainsi, parmi tous les substrats testés, la réduction des pigments respiratoires a été obtenue seulement avec le succinate, le NADH et l'ascorbate. Les Figures 3 et 4 montrent que lorsque le succinate et le NADH sont ajoutés dans les extraits cellulaires de *M. leprae*, les flavoprotéines ainsi que tous les cytochromes a + a₃, b et c sont réduits. Toutefois, la Figure 5 (A) montre que lorsque l'ascorbate est utilisé comme substrat, il n'y a aucune réduction des flavoprotéines et du cytochrome b. Seuls les cytochromes c (552, 523 et 420 nm) et a + a₃ (605, 445 nm) sont réduits par l'ascorbate indiquant que l'ascorbate entre dans la chaîne de transport au niveau du cytochrome c. Afin de trouver le point d'entrée du succinate et du NADH dans la chaîne de transport, l'effet de divers inhibiteurs sur la réduction des pigments respiratoires par le

NADH et le succinate comme donneurs d'électrons a été étudié. Les résultats de la Figure 9 (C) montrent qu'en présence de 0.02 mM de roténone ou 0.2 mM d'amytal, la réduction des pigments respiratoires par le NADH a été complètement inhibée, tandis qu'il n'y a aucun effet avec 0.1 mM de TTFA (B). Toutefois, il est intéressant de noter que lorsque le succinate a été utilisé comme donneur d'électrons (Figure 10 B), la réduction des pigments respiratoires a été complètement inhibée par 0.1 mM de TTFA; alors qu'aucune inhibition n'a été obtenue avec l'amytal ou la roténone (Figure 10 A). Ces observations indiquent que deux différentes flavoprotéines sont impliquées dans le transport des électrons lors de l'oxydation du NADH et du succinate. Les Figures 11 (A) et 12 (A) montrent qu'en présence de 0.002 mM d'antimycine A, la réduction des cytochromes a + a₃ et c par le NADH et le succinate est complètement supprimée. Cependant, l'antimycine A est sans effet sur la réduction des flavoprotéines et le cytochrome b lorsque le NADH ou le succinate sont utilisés comme donneurs d'électrons (Figures 11 B et 12 B). Des résultats similaires ont été obtenus lorsque l'antimycine A a été remplacée par le HQNO. Ces résultats indiquent que l'antimycine A ou le HQNO inhibent la chaîne respiratoire entre le cytochrome b et c. Lorsque la partie terminale de la chaîne de transport des

FIGURE 9: Effet du roténone et du TFA sur la réduction des pigments respiratoires dans l'extrait cellulaire de *M. leprae* en présence du NADH comme donneur d'électrons. (A) NADH, (B) NADH plus TFA, (C) NADH plus Roténone et (D) Ligne de base.

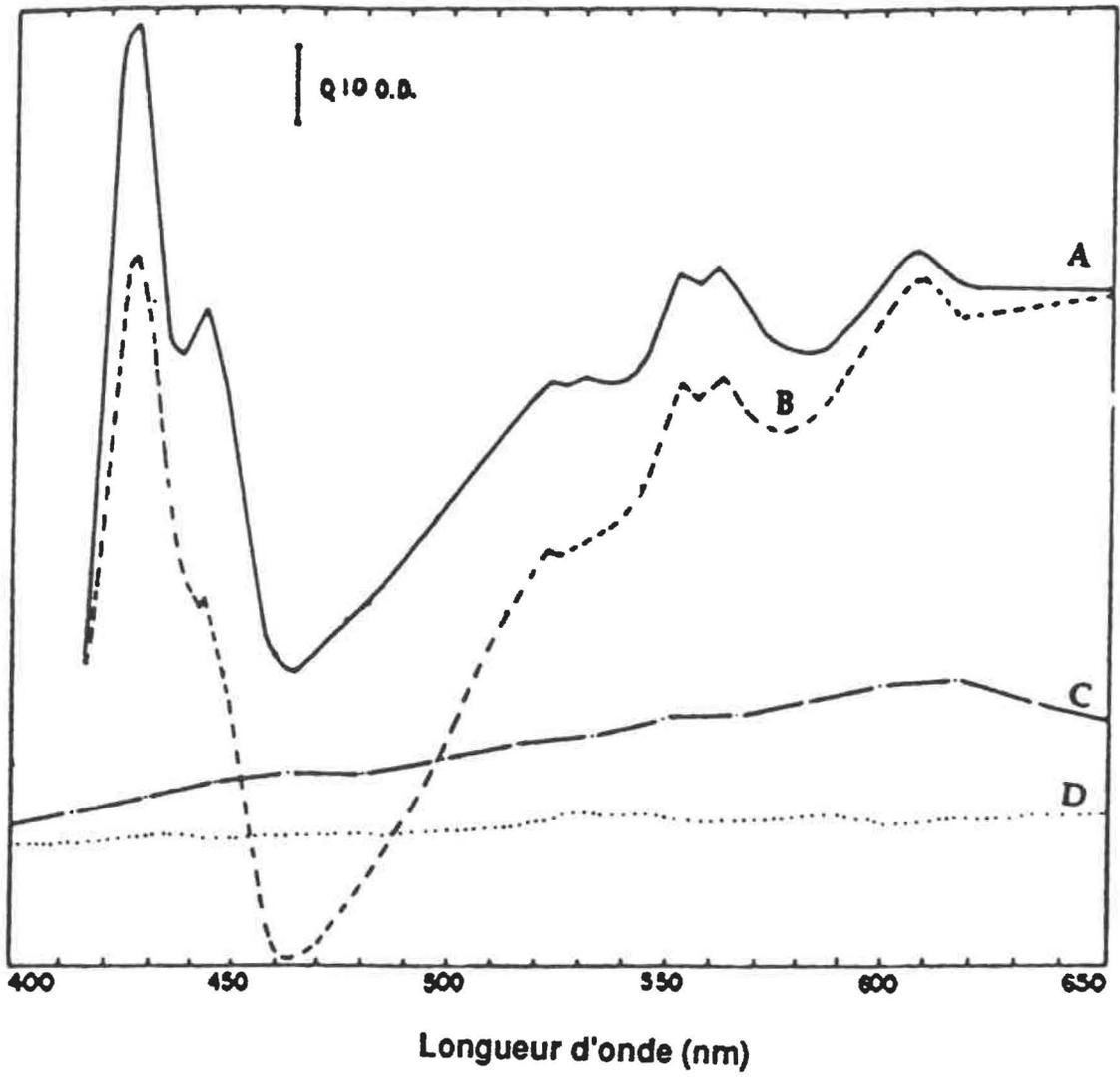


FIGURE 10 : Effet de l'amytal et du TFA sur la réduction des pigments respiratoires dans l'extrait cellulaire de *M. leprae* en présence du succinate comme donneur d'électrons. (A) Succinate plus Amytal, (B) Succinate plus TFA, (C) Succinate et (D) Ligne de base.

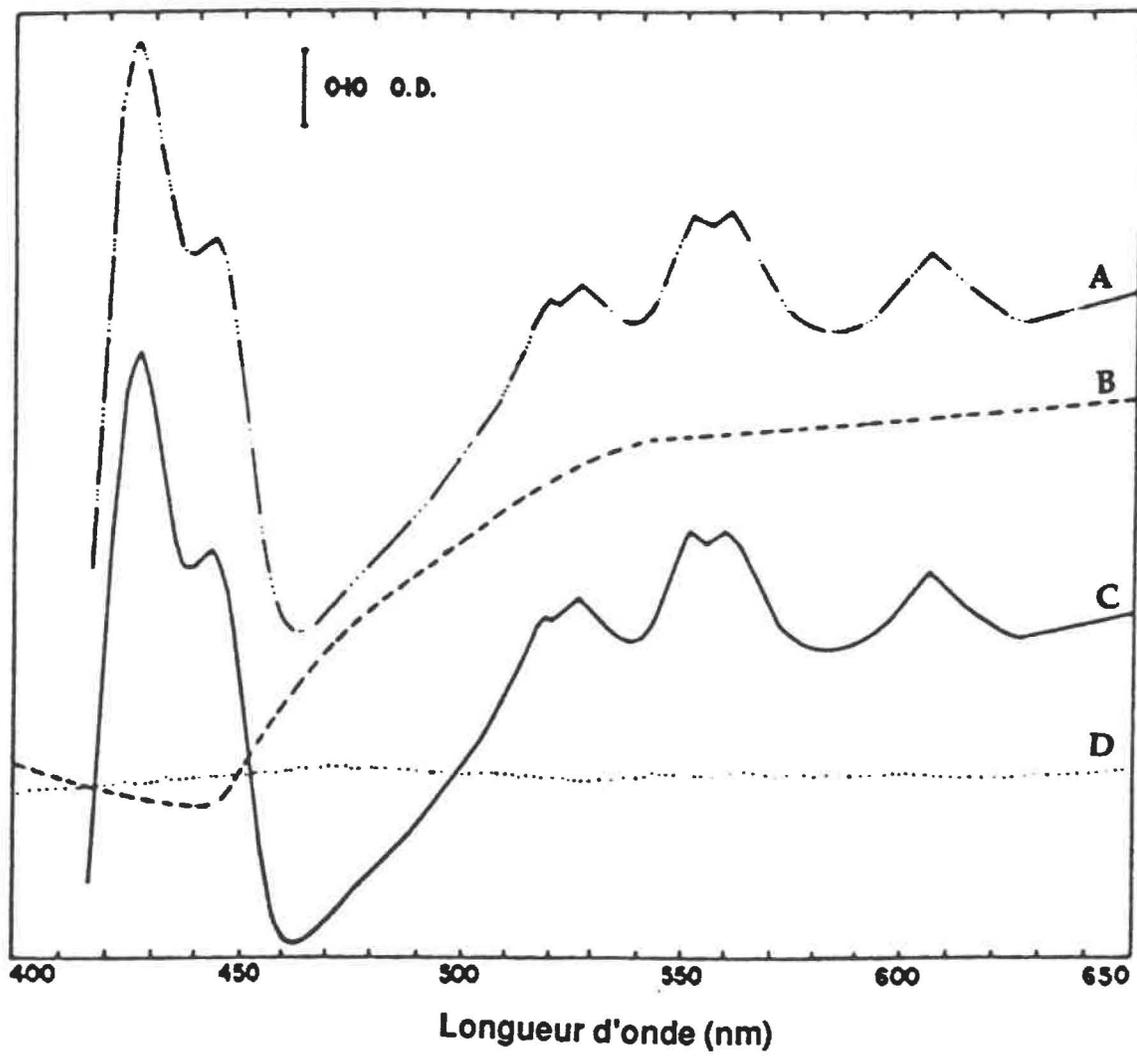


FIGURE 11 : Effet de l'antimycine A sur la réduction des pigments respiratoires dans l'extrait cellulaire de *M. leprae* en présence du NADH comme donneur d'électrons. (A) NADH plus Antimycine A, (B) NADH et (C) Ligne de base.

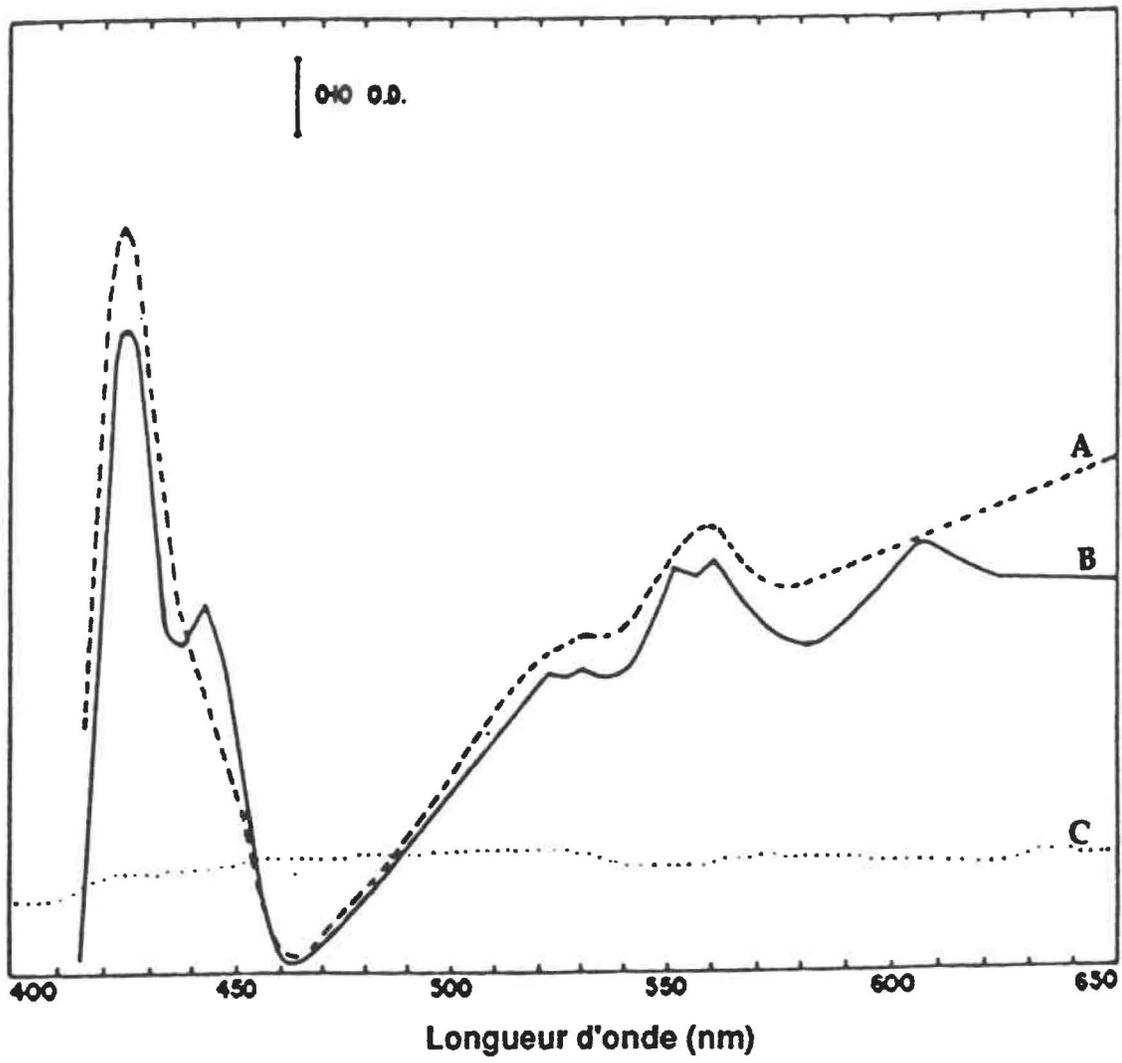
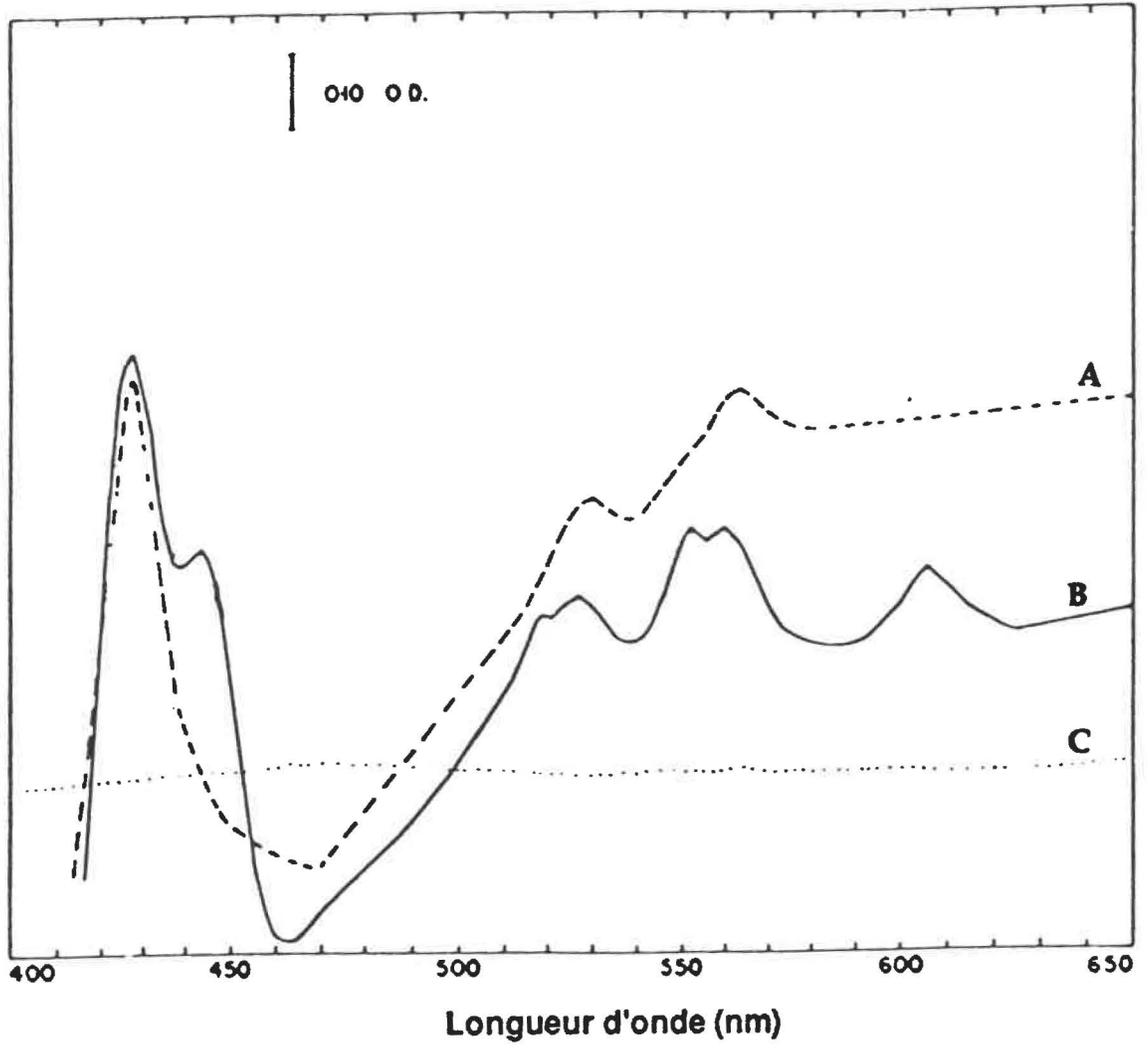


FIGURE 12 : Effet de l'antimycine A sur la réduction des pigments respiratoires dans l'extrait cellulaire de *M. leprae* en présence du succinate comme donneur d'électrons. (A) Succinate plus Antimycine A, (B) Succinate et (C) Ligne de base



électrons est bloquée par le cyanure (Figures 13 B et 14 B), tous les cytochromes sont réduits par le NADH et le succinate. Ces dernières figures montrent que la réduction de tous les pigments respiratoires, incluant les flavoprotéines, est complètement inhibée en présence du dicumarol lorsque le NADH et le succinate sont utilisés comme donneurs d'électrons. Ces observations suggèrent que la vitamine K ou une autre vitamine analogue est impliquée dans le transfert d'électrons du NADH ou du succinate aux flavoprotéines et aux cytochromes.

CHAPITRE II

FIGURE 13 : Effet du cyanure et du dicumarol sur la réduction des pigments respiratoires dans l'extrait cellulaire de *M. leprae* en présence du NADH comme donneur d'électrons. (A) NADH plus dicumarol, (B) NADH plus cyanure, (C) NADH et (D) Ligne de base.

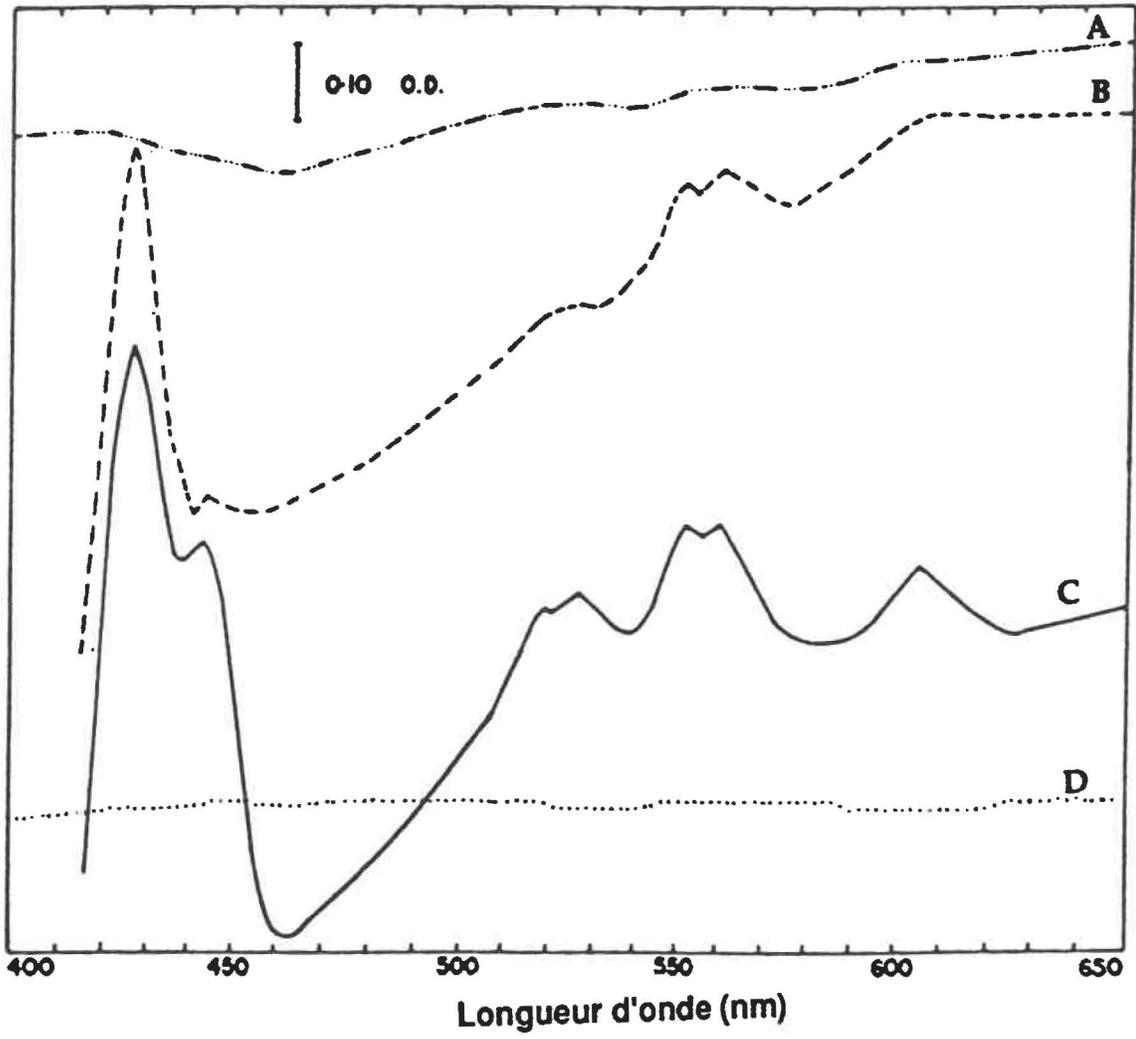
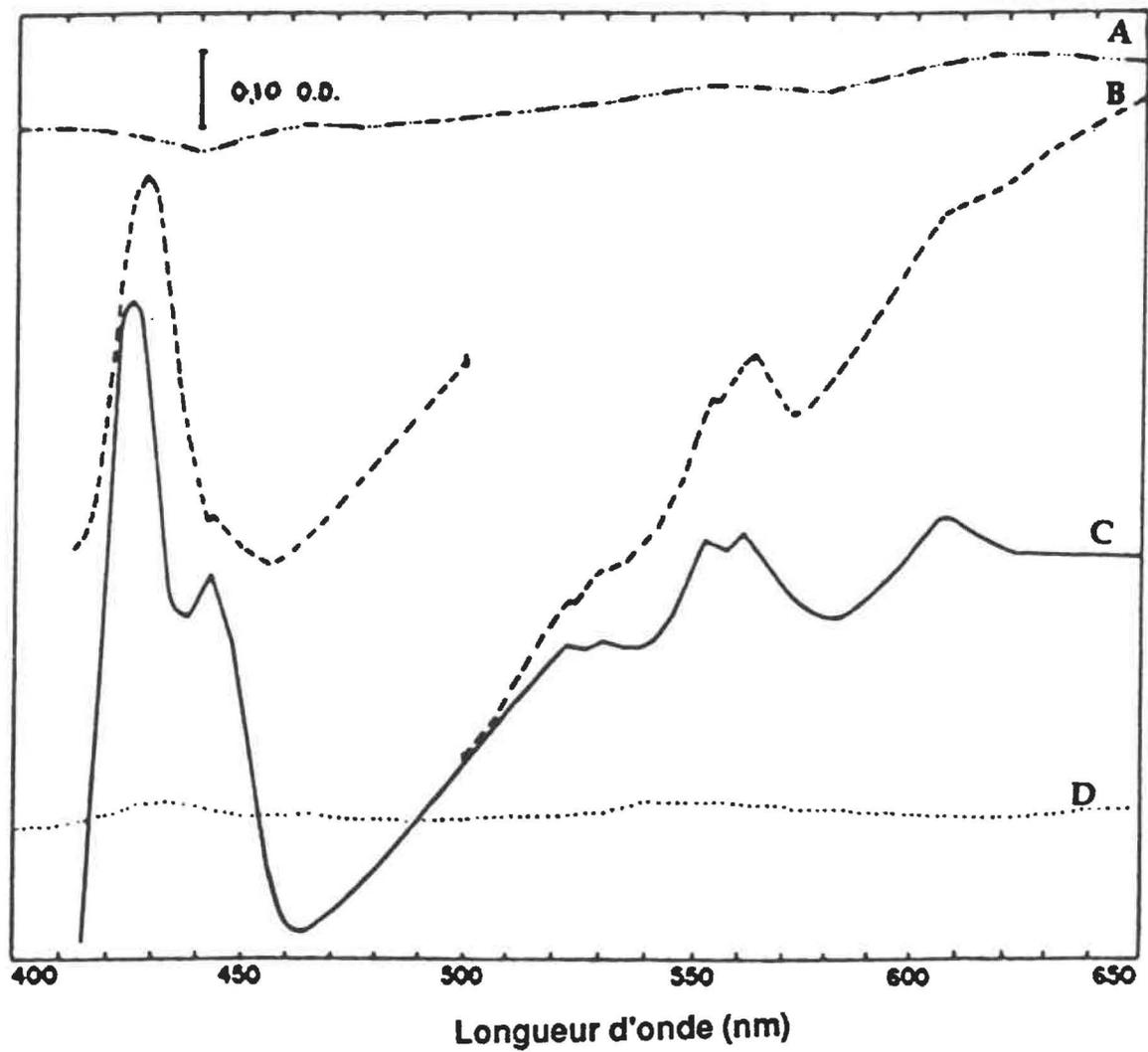


FIGURE 14 : Effet du cyanure et du dicumarol sur la réduction des pigments respiratoires dans l'extrait cellulaire de *M. leprae* en présence du succinate comme donneur d'électrons. (A) Succinate plus dicumarol, (B) Succinate plus cyanure, (C) Succinate et (D) Ligne de base.



4. DISCUSSION

Tous les microorganismes aérobies sont connus comme respirant à travers la chaîne de transport d'électrons qui nécessite les cytochromes comme transporteurs d'électrons. Les données expérimentales présentées dans ce travail montrent que les préparations de *M. leprae* isolées de coussinets plantaires de souris nues contiennent le naphthoquinone, les flavines, les cytochromes b, c, a + a₃, et les pigments liés au monoxyde de carbone. La plupart des pigments sont liés à la membrane excepté le cytochrome c et les flavines qui sont libérés dans la fraction soluble après sonication. Le spectre différentiel de *M. leprae* ressemble à celui rapporté chez *M. lepraemurium* cultivé *in vivo* (Adapoe, 1976). Une caractéristique intéressante observée dans le spectre différentiel de cellules intactes et l'extrait cellulaire de *M. leprae* cultivé *in vivo* est l'absence de cytochrome c (Figure 2). Cependant, l'existence du cytochrome c devient évidente dans le spectre différentiel réduit avec le succinate (Figure 3) ou avec le NADH (Figure 4). Les données spectrales indiquent que l'addition de dithionite cause une réduction intense du cytochrome b (pic à 560 nm) qui masque la présence du cytochrome c (pic à 550-552 nm). Un phénomène similaire a été

observé lorsque les suspensions cellulaires ou l'extrait cellulaire de *M. lepraemurium* cultivé *in vivo* ont été traités avec le dithionite (Ishaque et Kato, 1974a,b). Les cytochromes de *M. leprae* cultivé *in vivo* ressemblent qualitativement à ceux de *M. lepraemurium* et ceux retrouvés dans plusieurs bactéries et dans le système mitochondrial. Cependant, si le coefficient d'extinction molaire des cytochromes de *M. leprae* est le même que celui rapporté chez les autres bactéries, les concentrations en cytochromes a + a₃ et b chez *M. leprae* cultivé *in vivo* sont significativement plus grandes que la concentration en cytochrome c. Il faut souligner que la concentration en cytochrome c chez beaucoup de bactéries est plus grande que celle en cytochrome b. La concentration en cytochromes a + a₃ dans beaucoup de systèmes bactériens est minime. Toutefois, les concentrations en pigments respiratoires chez *M. leprae* sont relativement beaucoup plus faibles que celles rapportées chez *M. phlei* (Asano et Brodie, 1964).

En se basant sur le spectre différentiel du CO, le cytochrome o a été rapporté comme la seule cytochrome oxydase fonctionnelle chez plusieurs bactéries (Caster and Chance, 1959; Jacobs and Conti, 1965; Taber and Morisson, 1964; Taniguchi and Kamen, 1965). Dans cette expérience le spectre

différentiel du CO de *M. leprae* (Figure 7) a révélé deux cytochromes qui sont liés au monoxyde de carbone: le complexe cytochrome a_3 -CO avec les bandes à 430 et 590 nm (Chance, 1953a,b) et le cytochrome o avec les bandes d'absorption à 570, 538 et 419 nm comme rapporté chez d'autres bactéries (Broberg and Smith, 1967; Chance, 1953a; Smith, 1965). Les propriétés spectrales des pigments liés au monoxyde de carbone de *M. leprae* sont similaires à celles rapportées chez *M. lepraemurium* cultivé *in vivo* (Ishaque et Kato, 1974a) et *M. phlei* (Revsin et Brodie, 1969). Revsin et al. (1970) ont démontré que les cytochromes $a + a_3$ et o de *M. phlei* jouent des rôles différents dans le transport d'électrons. Il n'est pas encore évident si les deux cytochromes $a + a_3$ et o de *M. leprae* fonctionnent comme des oxydases terminales. Bien que la présence évidente de ces cytochromes dans les spectres différentiels de *M. leprae* a été obtenue, des études ultérieures sont nécessaires pour définir précisément le rôle de ces cytochromes dans la conservation de l'énergie. Les quinones ou la vitamine K ont été impliquées dans la chaîne de transport d'électrons de *M. phlei* (Asano et Brodie, 1965) et d'autres bactéries (Ishaque et Aleem, 1970; Scholes et Smith, 1968).

L'inhibition de tous les cytochromes aussi bien que les

flavoprotéines par le dicumarol (Figures 13 A et 14 A), un inhibiteur compétitif de la vitamine K, montre que la vitamine K ou son analogue est nécessaire dans la chaîne respiratoire de *M. leprae*. Ce composé semble être localisé entre le NADH et les flavines (FAD) pour la voie du NADH; et entre le succinate et les flavines (FP₃) pour la voie du succinate. La localisation de la vitamine K dans la chaîne respiratoire de *M. leprae* est différente de celle rapportée pour *M. phlei*. Chez *M. phlei*, la vitamine K se trouve entre les flavines et le cytochrome b; et les flavines sont requises pour la réduction de la vitamine K. Chez *M. leprae* la réduction des flavines a été complètement inhibée par le dicumarol (Figures 13 A et 14 A), ce qui suggère que les électrons à partir du NADH ou du succinate sont transférés à la vitamine K avant d'atteindre les flavines respectives. Le reste de la chaîne respiratoire à partir du cytochrome b est similaire à celle rapportée chez *M. phlei* par Asano et Brodie, (1964).

La réduction des pigments respiratoires par le NADH et le succinate comme donneurs d'électrons a été affectée différemment par l'amytal, la roténone, l'atébrine et le TFEA indiquant ainsi que les électrons à partir du NADH et du succinate entrent dans la chaîne de transport à différents

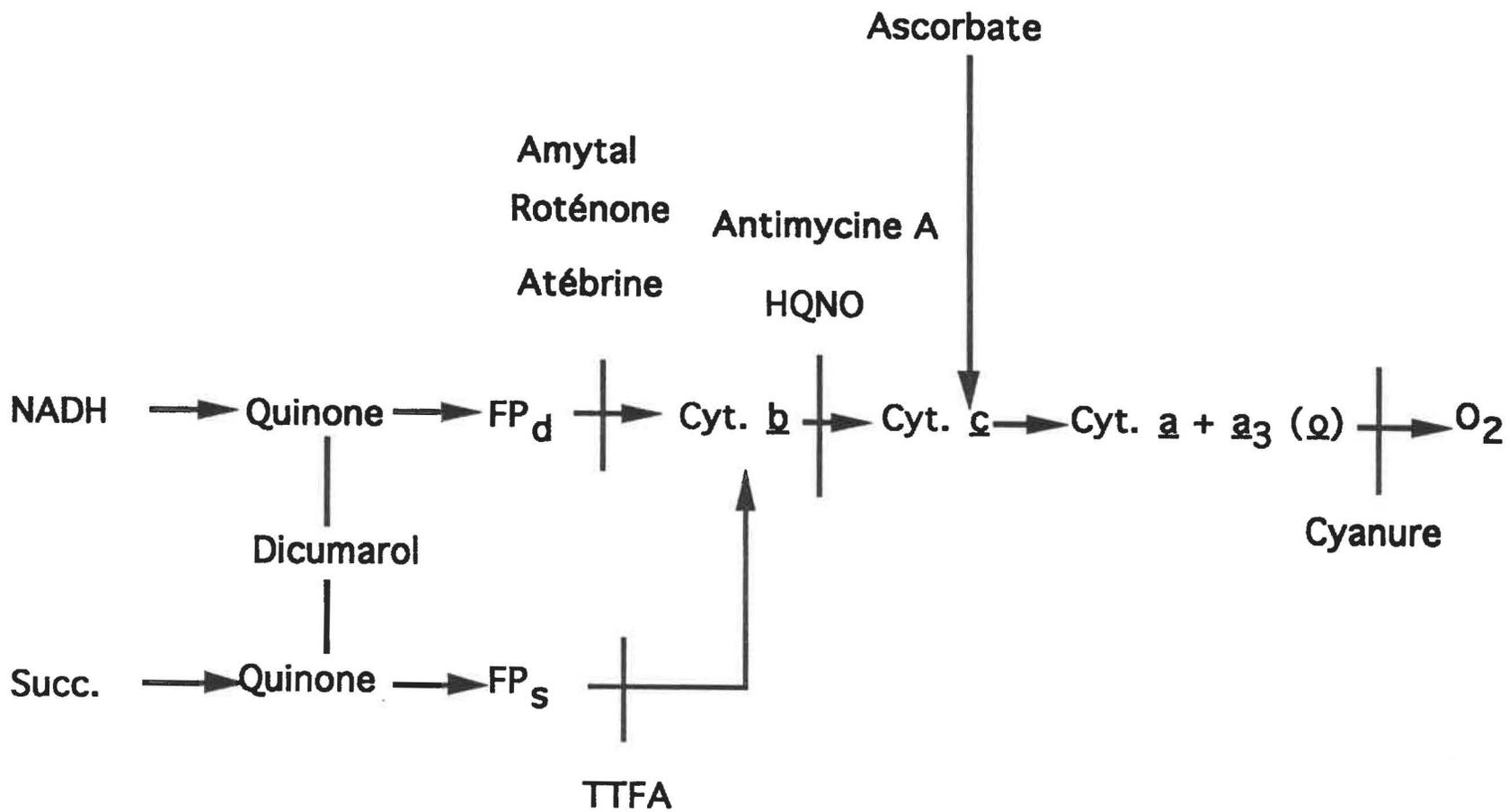
niveaux.

En se basant sur les effets de l'antimycine A, du HQNO et du cyanure, les électrons à partir de la voie du NADH et du succinate convergent au niveau du cytochrome b et sont finalement acheminés à travers les cytochromes c et a + a₃ jusqu'à l'oxygène. Cette conclusion est supportée par le fait qu'en présence d'antimycine A, seuls les cytochromes c et a + a₃ sont réduits mais pas le cytochrome b (Figure 12 A)

L'ascorbate réduit seulement les cytochromes c et a + a₃ (Figure 5 A) ce qui signifie que son point d'entrée dans la chaîne de transport d'électrons est au niveau du cytochrome c.

La démonstration des transporteurs d'électrons comme les cytochromes et les flavines chez *M. leprae* non cultivé est d'importance significative, puisque leur présence et l'effet des inhibiteurs de la respiration indiquent que, comme les autres microorganismes incluant les mycobactéries cultivables, les cytochromes sont la principale voie terminale dans le métabolisme de l'énergie chez cette mycobactérie. Suite aux observations faites dans la présente étude, les composants de la chaîne respiratoire de *M. leprae*, isolés de coussinets plantaires de souris nues sont présentés dans la Figure 15.

FIGURE 15: Représentation schématique de la chaîne respiratoire chez *M. leprae*



RESPIRATION

1. INTRODUCTION

Relativement peu d'activités métaboliques ont été rapportées chez *M. leprae* comparativement aux mycobactéries cultivables. Les bacilles de la lèpre sont supposés obtenir l'énergie et les nutriments nécessaires à leur survie et leur multiplication du milieu intérieur des cellules de leur hôte (Ramasesh et al., 1987).

Des expériences de respiration et de croissance avec les mycobactéries (Edson et Hunter, 1943) ont démontré que les substrats généralement oxydés par une espèce donnée de mycobactérie, sont utilisés par cette espèce pour croître en milieu synthétique. *M. leprae*, comme plusieurs autres mycobactéries, est endommagé par l'anaérobiose, indiquant que ce microorganisme obtient son énergie de croissance à partir du processus respiratoire qui nécessite l'oxygène comme accepteur final d'électrons.

Nous avons déjà démontré la présence de cytochrome chez *M.*

leprae isolés à partir de coussinets plantaires de souris nues/nues (chapitre I). *M. leprae* est une bactérie aérobie. Il est donc logique de penser que cette bactérie est capable d'obtenir l'énergie par le processus oxydatif utilisant l'oxygène comme accepteur final. Dans la tentative de trouver un milieu de culture artificiel pour la multiplication *in vitro* de *M. leprae* plusieurs investigations ont été effectuées. Dans ce milieu la première composante doit être un substrat oxydable par les cellules pour produire de l'énergie. De tels substrats n'ont pas été trouvés et *M. leprae* reste non cultivé, à part la culture dans les tissus d'animaux. Pour trouver le substrat oxydable, la technique manométrique a été utilisée et les résultats obtenus sont présentés ci-dessous.

2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 MICROORGANISMES

M. leprae, *M. lepraemurium*, *M. phlei* et BCG ont été utilisés pour déterminer l'oxydation de divers substrats. Dans le but de confirmer l'oxydation des substrats par *M. leprae*, l'utilisation d'autres mycobactéries a été considérée comme une nécessité.

2.2 CROISSANCE DES MICROORGANISMES ET PRÉPARATION DES SUSPENSIONS CELLULAIRES.

La croissance des microorganismes utilisés pendant ces études ainsi que les préparations des suspensions cellulaires ont été décrites au chapitre I (pages 43-48).

2.3 LES SUBSTRATS ET PRODUITS CHIMIQUES.

Les substrats tels que les hydrates de carbone, les acides gras, les intermédiaires de la glycolyse et du cycle de l'acide tricarboxylique ainsi que les composés sulfureux et sulfhydryles utilisés pendant cette étude ont été obtenus de la compagnie de produits chimiques Sigma (St Louis, Missouri, U.S.A), et sont de qualité ultrapure. Certains substrats utilisés dans cette étude et qui semblent être oxydés sont insolubles dans l'eau, notamment les acides gras comme le palmitate et les sphingolipides. Le palmitate et les sphingolipides ont été solubilisés par la formation de leur complexe d'inclusion hydrosoluble avec le heptakis,2,6-di-o-méthyl-b-cyclodextrine (Szente et al., 1992). Le complexe hydrosoluble du palmitate ainsi que des sphingolipides ont été préparés et fournis gentiment par le Dr L. Kato du Centre

Hospitalier Catherine Booth, Montréal, Canada.

2.4 LES INHIBITEURS DE LA RESPIRATION

Le cyanure, le dicumarol, l'antimycine A, le 2-N-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxyde (HQNO), l'amytal, et l'atébrine ont été obtenus de la compagnie de produits chimiques Sigma (St. Louis, Missouri, U.S.A). Pour étudier l'effet des différents inhibiteurs ou découpleurs sur la consommation d'oxygène ou sur l'activité du NADH oxydase, le cyanure, et l'atébrine ont été utilisés en solution aqueuse. Tous les autres inhibiteurs ont été dissous dans 95% d'éthanol; et une concentration et un volume n'affectant pas l'activité respiratoire ont été utilisés. Les inhibiteurs sont pré-incubés pendant 3 minutes avec le mélange réactionnel avant le début de l'expérience.

2.5 MESURE DE L'OXYDATION DES SUBSTRATS DE LA GLYCOLYSE, DES INTERMÉDIAIRES DU CYCLE DE KREBS, DES HYDRATES DE CARBONE, DES COMPOSÉS Sulfhydryles ET DES ACIDES GRAS etc.

La technique de Warburg comme décrite par Umbreit et al., (1964) avec l'air comme phase gazeuse a été utilisée pour mesurer l'oxydation des substrats. Le principe de la méthode

est basé sur le fait que lorsque la température et le volume sont gardés constants et que le système est fermé (manomètres), le changement dans la composition des gaz s'exprime par un changement de pression. Le dispositif est composé de deux flacons pour mesurer la respiration endogène contenant chacun 1.0 ml de suspension cellulaire dans le compartiment principal et 0.2 ml de 20% d'hydroxyde de potassium (KOH) dans le puits central; puis de deux autres flacons de réaction pour chaque substrat contenant 10 mM de substrat dans le bras du flacon, 0.2 ml de 20% de KOH dans le puits central et 1.0 ml de suspension cellulaire dans le compartiment principal. Le volume final dans chaque flacon est complété à 2.0 ml avec du tampon phosphate 0,05 M, pH 6,2.

Pour mesurer les changements extérieurs, c'est-à-dire les changements de la pression atmosphérique, on introduit toujours un flacon thermobar contenant uniquement du tampon phosphate. Ces valeurs servent à corriger les valeurs obtenues de l'endogène et des substrats. Dans le puits central, on introduit toujours un papier filtre pour augmenter la surface de contact du KOH, facilitant ainsi l'adsorption de tout le CO₂ dégagé. Après une période d'équilibration de 10 minutes à 32°C, les substrats (dans les bras du flacon) sont mélangés avec la suspension cellulaire dans le compartiment principal, et la

consommation d'oxygène est déterminée en notant le niveau du liquide dans les manomètres à des intervalles de temps réguliers.

Lorsque les composés insolubles tels que le palmitate et les sphingolipides ont été utilisés comme substrat, une petite quantité de la forme solide (20 µg/ ml) a été homogénéisée avec la suspension cellulaire et 1.0 ml de cette suspension a été ajouté dans le compartiment principal.

Les expériences préliminaires ont indiqué que la forme soluble est oxydée par *M. leprae* après 2 heures, tandis qu'il faut 6 heures avant que la forme insoluble ne soit activement oxydée. Raison pour laquelle, dans le reste de nos expériences, les flacons ont été agités pendant 6 heures pour ensuite mesurer la consommation d'oxygène.

Tous les contrôles possibles comme suspension de bacilles vivants, suspension de bacilles bouillis avec ou sans substrats et la solution de cyclodextrine seule, ont été utilisés pour être sûr que les substrats ont été oxydés par les cellules vivantes de *M. leprae*, *M. phlei*, *M. lepraemurium* et BCG.

Les expériences ont été répétées au moins deux fois et les résultats sont exprimés comme les valeurs moyennes.

Pour étudier l'effet des inhibiteurs sur l'oxydation du palmitate et des sphingolipides solubles par *M. leprae*, une concentration appropriée d'inhibiteurs a été ajoutée dans le compartiment principal des flacons contenant la suspensions bactérienne et le substrat soluble. Après 2 heures d'incubation, la consommation d'oxygène a été enregistrée. Dans le cas de *M. phlei*, la consommation d'oxygène a été mesurée après 5 minutes d'incubation de l'inhibiteur avec la suspension.

2.6 ACTIVITÉ DE L'ADÉNOSINE MONOPHOSPHATASE.

La détection de l'activité de l'adénosine monophosphatase (AMP-ase) dans les suspensions de *M. leprae* a été rapportée (Mori et al., 1985) comme étant une méthode de mesure de la contamination par les tissus de l'hôte plus correcte et plus sensible que l'examen microscopique des préparations colorées. L'activité AMP-ase dans les préparations bacillaires traitées avec du NaOH et non traitées, aussi bien que les suspensions de coussinets plantaires de souris nues avec ou sans *M. leprae* a

été déterminée.

2.7 PRÉPARATION DE SUSPENSIONS DE TISSUS DE COUSSINETS

PLANTAIRES DE SOURIS NUES SANS *M. LEPRAE*.

Environ 2 g de tissus de coussinet plantaire de souris nues, non inoculées ont été coupés en petits morceaux avec des ciseaux, lavés deux fois avec de l'eau distillée pour enlever l'excès de sang et finalement homogénéisés dans 10 ml de tampon Tris-HCl, 0.05 M, pH 6.2. Cette suspension a été utilisée pour mesurer l'activité de l'AMP-ase.

2.8 PRÉPARATION DE SUSPENSIONS DE *M. LEPRAE* TRAITÉES AVEC DU NaOH ET NON TRAITÉES.

Le traitement au NaOH semble être nécessaire pour purifier *M. leprae* (Mori et al., 1985). Pour mesurer l'oxydation des substrats, les suspensions cellulaires de *M. leprae* ont été préparées par centrifugation différentielle telque décrit dans le Chapitre I. Ces suspensions ont été centrifugées à 10,000 X g pendant 10 minutes. Les culots ont été resuspendus dans 2% de NaOH, dilués quatre fois avec de l'eau distillée et centrifugé à 10,000 X g pendant 10 min. Les culots résultants

ont été lavés deux fois avec 0.05 M de tampon tris-HCl, pH 6,2 et resuspendus dans un petit volume du même tampon. Les suspensions cellulaires non-traitées et traitées avec du NaOH ont été utilisées pour mesurer l'activité de l'adénosine monophosphatase (activité AMP-ase).

2.9 MESURE DE L'OXYDATION DU NADH PAR LES CELLULES DE M.

LEPRAE.

La technique de Warburg telle que décrite par Umbreit et al., (1964) est employée pour mesurer la consommation d'oxygène par les bacilles en présence du NADH. La suspension cellulaire est congelée à -80°C , décongelée et congelée encore avant d'être décongelée une seconde fois pour faire l'expérience. Les flacons de Warburg contiennent 1.0 ml de suspension dans le compartiment principal, 0.2 ml de 20% de KOH et du papier filtre dans le puits central, et le NADH dans le bras du flacon. Le volume final est complété à 2.0 ml avec du tampon phosphate 0.05 M, pH 6,2. Après équilibration thermique à 32°C , le NADH (3 mM) est mélangé avec la suspension cellulaire et la consommation d'oxygène est déterminée.

2.10 MESURE DE L'ACTIVITÉ DU NADH OXYDASE DANS L'EXTRAIT CELLULAIRE.

L'activité de la NADH oxydase dans les extraits cellulaires est mesurée à l'aide du spectrophotomètre à la température de la pièce. L'oxydation du NADH dans les conditions aérobiques a été suivie en utilisant un volume de 2.0 ml à 340 nm dans un spectrophotomètre Cary modèle 118. Dans tous les cas, des taux linéaires ont été obtenus jusqu'à ce que l'une des composantes soit devenue limitante. Le coefficient molaire de 6.22×10^6 cm²/mole (Horecker and Kornberg, 1948) a été utilisé pour calculer la concentration en NADH oxydé.

2.11 EFFET DU PH SUR L'OXYDATION DU PALMITATE

Pour étudier l'influence du pH sur l'oxydation du palmitate un mélange approprié de 0.2 M Na₂HPO₄ et 0.1 M d'acide citrique a été utilisé pour obtenir le pH désiré. Toutes les valeurs de pH données ont été mesurées à la fin des expériences.

3. RÉSULTATS

Un certain nombre de composés métabolisés par les mycobactéries cultivables tel que *M. phlei*, et d'autres reconnus comme des facteurs ou cofacteurs de croissance pour d'autres microorganismes, ont été sélectionnés et testés comme substrats potentiellement oxydables.

Les résultats du Tableau II montrent que les suspensions préparées à partir des tissus de coussinets plantaires de souris nues sans *M. leprae*, non traitées avec le NaOH, exhibent une très forte activité AMP-ase. Cette activité a été significativement réduite dans les préparations traitées avec le NaOH. Cependant, les suspensions de *M. leprae* purifiées par centrifugation différentielle et non traitées avec le NaOH contenaient une certaine activité AMP-ase qui a été complètement abolie lorsque ces préparations ont été traitées avec le NaOH. Ces résultats montrent que les tissus de l'hôte peuvent être complètement éliminés par le traitement au NaOH. Nous avons utilisé de telles suspensions de *M. leprae* durant ces études de la respiration.

Tableau II: Activité AMP-ase des suspensions de *M. leprae* traitées et non traitées avec le NaOH.

Suspension	Pi libéré (mmole/mg poids sec	
	NT	T (NaOH)
Suspension de tissus de coussinet plantaire sans <i>M. leprae</i>	950	60
(i) Suspension de <i>M. leprae</i> traitées avec NaOH (purifiées par centrifugation différentielle)	95	0
(ii) " " "	105	0

3.1 EFFET DU PH ET DE LA TEMPÉRATURE SUR L'OXYDATION DU PALMITATE

L'effet du pH sur l'oxydation du palmitate à 32°C a été étudié et les valeurs de la consommation exogène d'oxygène sont montrées dans le Tableau III. On peut voir qu'à pH 5,0, il y a une faible consommation d'oxygène après 3 heures. L'activité respiratoire augmente à pH 5,5 mais reste en dessous de l'activité respiratoire à pH 6,2. Ce dernier pH 6,2 est trouvé optimal pour l'oxydation du palmitate à 32°C, avec une consommation exogène d'O₂ de 75 µl en 3 heures. Par la suite, la consommation d'O₂ diminue avec l'augmentation du pH de 6,5 à 8,0.

Le Tableau IV montre l'effet de la température sur l'oxydation du palmitate à pH 6,2 (optimal). À 15°C on note une faible consommation d'oxygène. Il y a une augmentation de l'activité respiratoire parallèlement à l'augmentation de la température jusqu'à 32°C. Une différence dans la consommation d'O₂ n'a pas été observée entre 32°C et 33°C dans plusieurs expériences. Cependant, il y a eu une diminution importante de la consommation d'O₂ à 34°C et 37°C comparativement à 32°C (résultats non montrés). Toutes les expériences subséquentes

Tableau III: Effet du pH sur l'oxydation du palmitate soluble
par les suspensions cellulaires de *M. leprae*

pH	Consommation exogène d'O ₂ µl/3h/12 mg de cellules
5.0	40
5.5	68
6.2	75
6.5	70
7.0	65
8.0	50

Tableau IV: Effet de la température sur l'oxydation du
palmitate soluble par les suspensions
cellulaires de *M. leprae*

Température	Consommation exogène d'O ₂ µl/3h/12 mg de cellules
15	16
20	32
25	55
30	68
32	77
33	77

ont été effectuées à la température de 32°C et à pH 6,2.

Les suspensions cellulaires de *M. leprae* montrent une respiration endogène considérable, qui varie avec les différentes préparations (suspensions cellulaires). Cependant, plusieurs substances du cycle de la glycolyse et du cycle de l'acide tricarboxylique, excepté le succinate, de même que certains acides gras et hydrates de carbone cités dans le Tableau V, n'ont pas été oxydés par les suspensions cellulaires de *M. leprae*. Il a été observé que d'autres substances comme le casaminoacide, le peptone, la thyroxine, l'albumine sérique et la suspension bouillie de *M. leprae* n'augmentent pas le taux d'oxydation au-dessus de la valeur de l'activité de l'endogène. De même, l'albumine d'oeuf, l'acide hyaluronique, l'acide D-glucuronique, l'acide para-aminobenzoïque et le N-acétyl-D-glucosamine ont été inactifs. Parmi les composés sulfureux cités dans le tableau V, aucun n'est oxydé par les suspensions de cellules entières de *M. leprae*. Cependant, les composés sulfhydryles tels la D-cystéine et la L-cystéine sont oxydés par les suspensions cellulaires de *M. leprae* (Tableau VI).

Le Tableau VI montre également que les composés thiols tels que le dithiothréitol et la DL-pénicillamine sont activement oxydés

Tableau V. substrats non oxydés par les suspensions cellulaires de *M. leprae* isolé des coussinets plantaires de souris nues.

Intermédiaires de la glycolyse

Glucose	Pyruvate
Hexose diphosphate	Lactate
Glycéraldéhyde-3-phosphate	Glycérol
Ethyl alcool	Acétate
Acide phosphoglycerique	Formate
Phosphoénol pyruvate	

Intermédiaires du cycle de l'acide tricarboxylique

Oxalate	Citrate
α -Cétoglutarate	Malate
DL-Isocitrate	Fumarate

Acides gras

Stéarate

Acétate

Tween 80

Suite Tableau VHydrates de carbone

Mannose	Arabinose
Rhamnose	Mannitol
Galactose	Ribose
Tréhalose	Glucosamine
Sorbitol	D-Xylose
N-acétyl-D-Glucosamine	Maltose
Ribose-1,5-phosphate	Sucrose
Acide hyaluronique	Inositol
6-Phosphogluconate	Fructose
Acide D-Glucuronique	Xylulose

Composés sulfureux

Thiosulfate	Thioacétate
Cystine	Thioacétamide
Thiourée	Thiodiglycol
Mercaptosuccinate	Dithionite
Dimercaptopropanol	
Mercaptoéthanol	
Monothioglycérol	

Suite Tableau VAutres composés (variés)

Acide glyoxylique

 β -hydroxybutarate

Albumine du serum bovin

Albumine d'oeuf

Peptone

Albumine sérique

Salicylate

Benzoate

L-épinéphrine

Casaminoacide

Thyroxine

Tableau VI. Substrats oxydés par les suspensions cellulaires de *M. leprae* isolé des coussinets plantaires de souris nues.

Substrats	Endogène (ul)	Consommation d'O ₂ (ul)	Temps (min)
Acide laurique	66	100	240
L-cystéine	66	85	240
Lécithine	50	78	360
Cholestérol	55	63	300
Ext. de levure	55	74	300
L-cystéine	52	150	360
Dithiothréitol	52	88	360
D-DOPA	41	59	90
L-DOPA	41	52	90
D-cystéine	22	111	120
Dithiothréitol	22	74	120
Pénicillamine	22	65	120
Palmitate	67	185	240
Palmitate	88	130	240
Sphingosine	135	225	360
Sphingomyéline	135	185	360
Cérébroside	135	179	360
NADH	45	97	90
Succinate	120	175	240

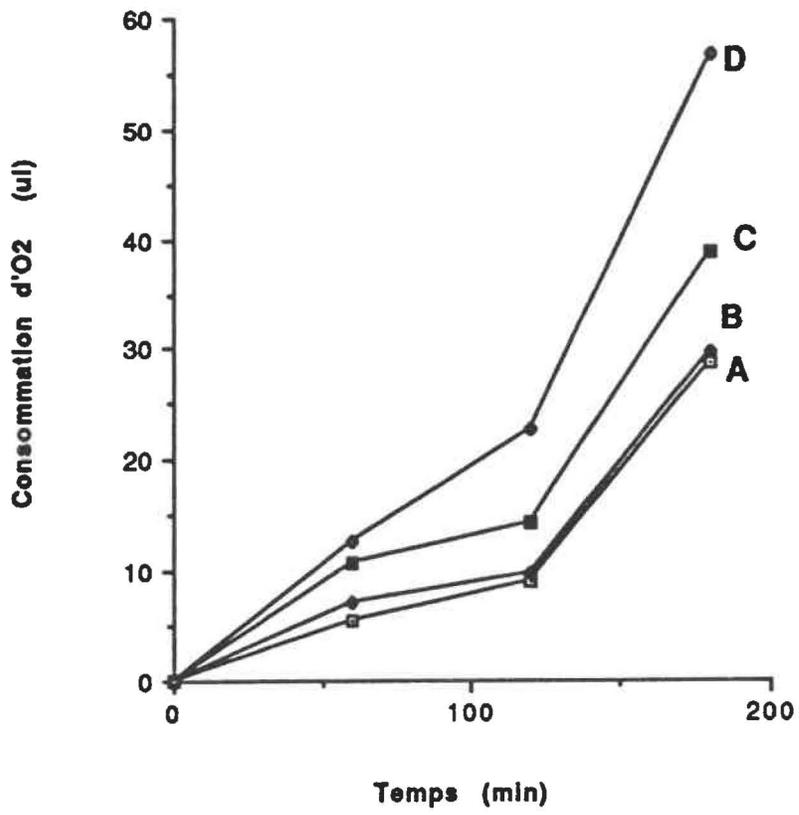
par les suspensions de *M. leprae*. D'autres composés comme le cholestérol, la lécithine, l'acide laurique et l'extrait de levure sont faiblement oxydés, mais le taux de consommation d'oxygène par les cellules en leur présence a toujours été supérieur à la valeur de l'endogène.

Lorsque les substrats oxydés ont été incubés en l'absence de suspension cellulaire ou en présence de suspension cellulaire bouillie dans 0.05 M de tampon phosphate pH 6,2, dans les flacons de Warburg, aucune consommation d'oxygène n'a été obtenue. Cette observation suggère que l'oxydation de ces composés par *M. leprae* est biologique.

3.2 OXYDATION DU NADH PAR DIFFÉRENTES PRÉPARATIONS DE *M. LEPRAE*

L'oxydation du NADH par les suspensions cellulaires de *M. leprae* a été étudiée à cause de son rôle central dans les réactions d'oxydo-réduction. Les résultats présentés dans la Figure 16 montrent que le NADH n'est pas oxydé par les suspensions cellulaires intactes de *M. leprae* (B) et que la consommation d'O₂ est similaire à celle de l'endogène (A). Les suspensions cellulaires congelées et décongelées (C), ainsi que l'extrait cellulaire (D) de *M. leprae* oxydent toutefois le

FIGURE 16: Oxydation du NADH par différentes préparations de *M. leprae*. (A) Endogène, (B) Suspension normale, (C) Suspension congelée et (D) Extrait cellulaire.



NADH. On peut donc dire que c'est probablement à cause de l'imperméabilité de la membrane bactérienne que le NADH n'est pas oxydé par les cellules intactes de *M. leprae*. Par contre, la congélation et la décongélation fragiliserait la membrane et permettrait la pénétration du NADH à l'intérieur des cellules d'où une stimulation de la respiration des suspensions cellulaires congelées et décongelées en présence du NADH. Quant à l'extrait cellulaire, le NADH est directement en contact avec les enzymes ce qui expliquerait l'oxydation rapide du NADH.

La distribution de l'activité NADH oxydase dans les différentes fractions de *M. leprae* a été étudiée dans les conditions aérobiques à un pH optimal de 6,2. Le NADH a été faiblement oxydé par le surnageant obtenu à 150,000 X g (fraction soluble). L'extrait cellulaire brut obtenu après centrifugation à 10,000 X g montre une consommation moyenne d'oxygène en présence du NADH comparativement aux fractions particulières obtenues à 50,000 X g (petite fraction) et à 150,000 X g (fraction large) qui catalysent une activité NADH oxydase intense (Tableau VII). L'activité de la NADH oxydase qui est observée habituellement dans les fractions fraîchement préparées diminue lentement avec le temps. Il n'y a pas

Tableau VII. Distribution de l'activité du NADH oxydase dans les différentes fractions de *M. leprae*

Fractions	Oxydation du NADH nmoles/h/mg de protéine
10,000 X g Surnageant	240
50,000 X g Surnageant	160
50,000 X g Culot	560
150,000 X g Surnageant	80
150,000 X g Culot	240

d'activité avec les enzymes bouillis. Il a été observé que le taux d'oxydation du NADH est directement proportionnel à la quantité d'enzyme utilisée.

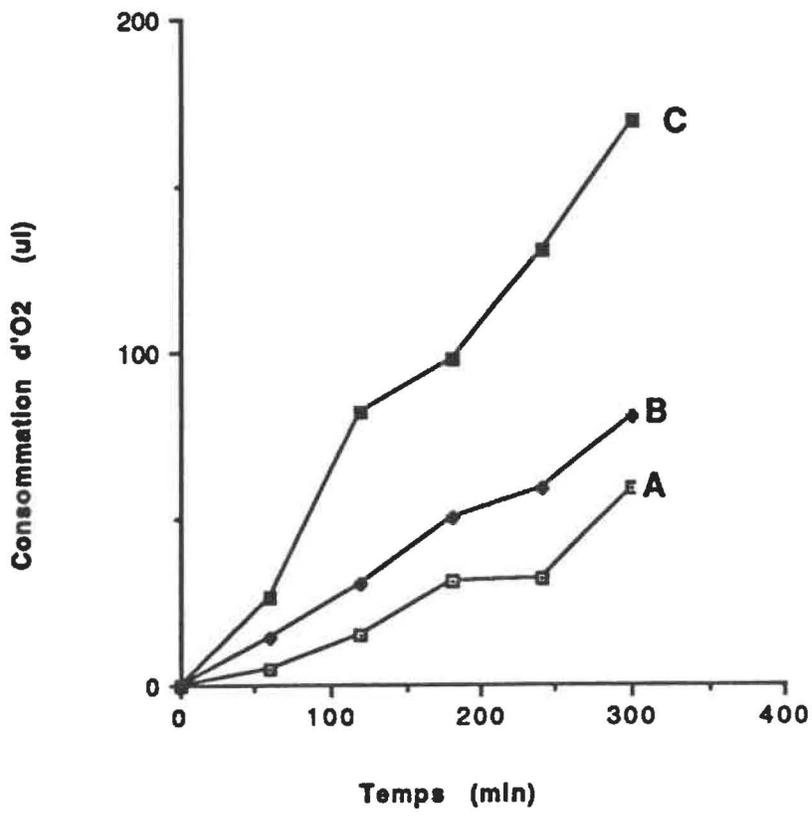
3.3 OXYDATION DE LA DIHYDROXYPHÉNYLALANINE (DOPA)

Il a été montré par Prabhakaran (1967) que la dihydroxyphénylalanine (DOPA) est oxydée par les suspensions cellulaires de *M. leprae* isolé des lépromes de tatous. Depuis lors, l'oxydation de la DOPA par *M. leprae* est un test spécifique pour cette espèce de mycobactérie (Prabhakaran 1967), et c'est pourquoi nous avons jugé utile de mesurer l'oxydation de la DOPA pour confirmer l'identité du microorganisme isolé des coussinets plantaires de souris nues. Nos résultats montrent que la D-DOPA est oxydée aussi bien que L-DOPA par les suspensions cellulaires de *M. leprae* (Tableau VI). La DOPA est connue comme pouvant s'auto-oxyder dans certaines conditions (Hirsh, 1959). Il a été observé que la DOPA seule ou incubée avec la suspension cellulaire bouillie ne montre pas de consommation d'oxygène. Ces résultats indiquent que la DOPA n'est pas auto-oxydée, mais est en fait oxydée par les bacilles viables.

3.4 OXYDATION DES INTERMÉDIAIRES DU CYCLE DE KREBS PAR LA SUSPENSION ET L'EXTRAIT CELLULAIRE DE *M. LEPRAE*

À l'exception du succinate, aucun autre des substrats du cycle de l'acide tricarboxylique n'est oxydé par les suspensions cellulaires de *M. leprae* (Tableau V). Lorsque la suspension est congelée pendant une minute à -80°C , la consommation endogène d'oxygène de la suspension (Figure 17 A) diminue faiblement par comparaison à la suspension normale (Figure 17 B). Nos résultats expérimentaux montrent que la consommation d'oxygène des suspensions normales (non congelées) a été au-dessus de la valeur de l'endogène lorsque le succinate est utilisé comme substrat. Cependant, l'addition de succinate à la suspension congelée pendant une minute stimule considérablement la consommation d'oxygène (Figure 17 C) au-dessus de la valeur de l'endogène. En général, les suspensions cellulaires avec une faible activité endogène exhibent une meilleure oxydation du succinate que les suspensions ayant une forte respiration endogène. Les bacilles isolés à partir de jeunes coussinets plantaires (phase de croissance) montrent une faible respiration endogène et oxydent mieux le succinate en comparaison avec des bacilles isolés de vieux coussinets plantaires (bacilles en décroissance). Aucune consommation

FIGURE 17: Oxydation du succinate par différentes préparations cellulaires de *M. leprae*.
(A) Endogène, (B) Suspension normale et
(C) Suspension congelée.



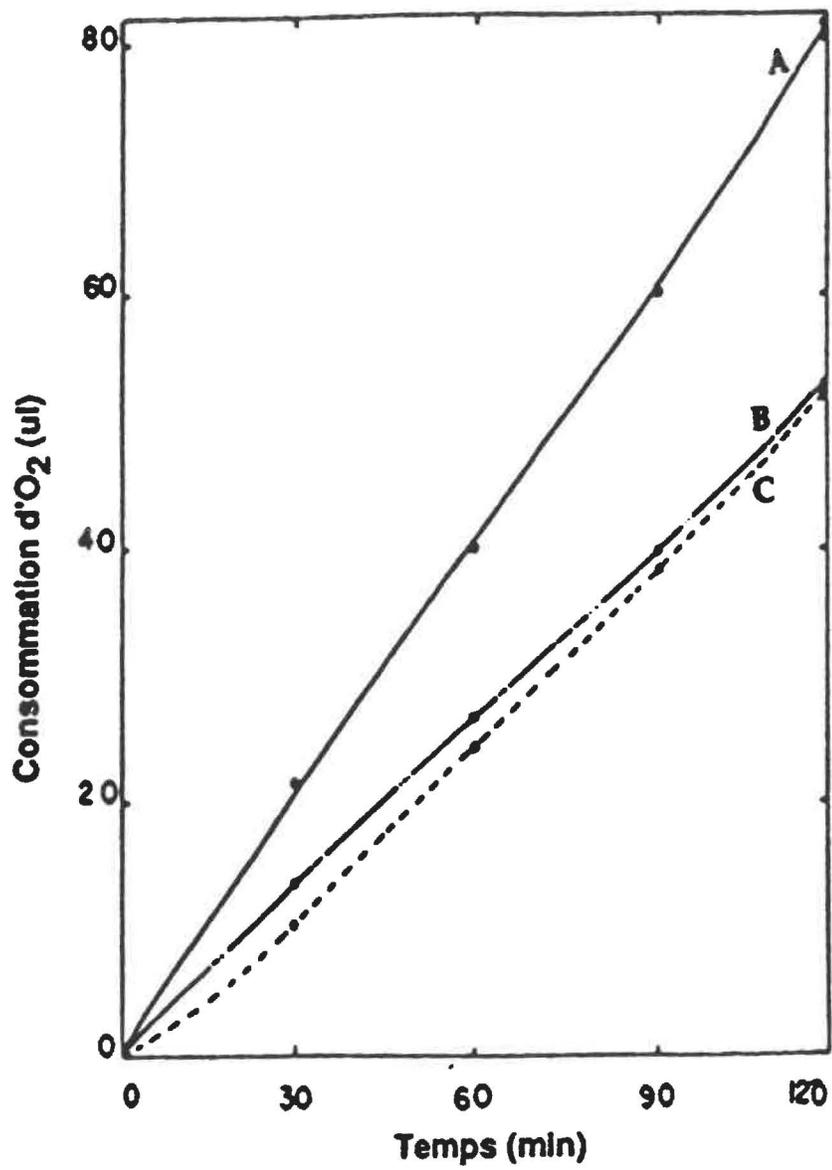
d'oxygène n'a été observée lorsque la suspension bouillie a été incubée en présence ou en absence de succinate.

Puisque les cellules de *M. leprae* oxydent le succinate, nous avons essayé de trouver la voie métabolique par laquelle le succinate est oxydé. L'inhibition de l'oxydation du succinate par l'acide malonique est le critère de l'occurrence du cycle de Krebs chez beaucoup d'organismes (Conn et Stumpf, 1963). Ainsi, l'effet de l'acide malonique sur l'oxydation du succinate par *M. leprae* a été étudié et la Figure 18 montre que 0.002 M d'acide malonique (Figure 18 B) inhibe complètement l'oxydation du succinate par *M. leprae*.

3.5 OXYDATION DU PALMITATE

Le palmitate (16 atomes de carbone) est un important acide gras et est oxydé par plusieurs mycobactéries (McCarthy, 1971), incluant *M. lepraemurium* (Ishaque, 1992b). Franzblau (1988) et Ishaque (1989) ont rapporté que le palmitate est oxydé par *M. leprae* isolé de tissus de tatous. Toutefois, il a été montré que l'oxydation du palmitate est effectuée par les bacilles purs et non pas par les tissus de l'hôte présents en petites quantités dans les suspensions cellulaires purifiées.

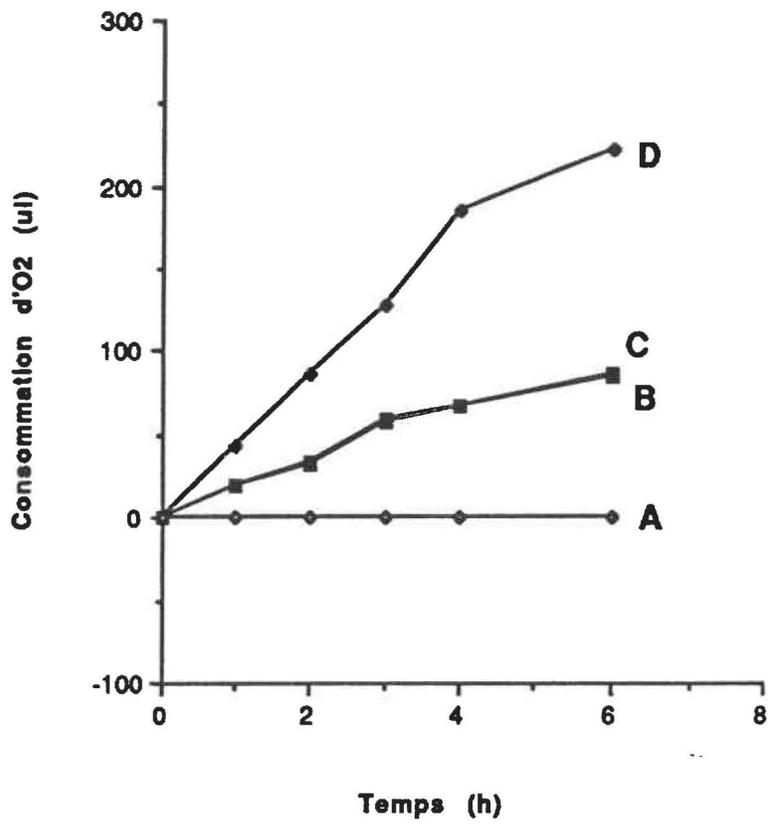
FIGURE 18: Effet de l'acide malonique sur l'oxydation du succinate par *M.leprae* isolé de coussinets plantaires de souris nues. (A) Succinate, (B) Succinate plus acide malonique et (C) Endogène.



Dans cette étude, l'oxydation du palmitate par les suspensions cellulaires de *M. leprae* isolé de coussinets plantaires de souris nues a été testée et les résultats sont montrés dans la Figure 19. Les suspensions cellulaires de *M. leprae* exhibent une respiration endogène considérable (Figure 19 B), et la présence de l'acide palmitique dans les suspensions à 32°C et pH 6,2 n'a pas de stimulation sur la consommation d'O₂ jusqu'à peu près 8 heures. Ainsi, dans les expériences ultérieures, les suspensions cellulaires ont été préincubées pendant 8 heures avec le substrat avant de mesurer la consommation d'O₂.

Les résultats de la Figure 19 montrent que les suspensions cellulaires de *M. leprae* préincubées avec le palmitate soluble pendant 8 heures provoquent une plus grande consommation d'O₂ (Figure 19 D) que les suspensions sans palmitate. Les suspensions cellulaires préincubées avec le palmitate insoluble (Figure 19 C), par contre, ne stimulent presque pas la respiration (pas d'oxydation). La consommation d'O₂ qui s'est produite à cause de l'oxydation du substrat (palmitate) a été linéaire pendant au moins 4 heures, soit le temps de l'expérience. Les suspensions cellulaires bouillies pendant 5 min sans substrat ont été essentiellement dépourvues de toute

FIGURE 19: Oxydation du palmitate soluble et insoluble par *M. leprae* isolé de coussinets plantaires de souris nues. (A) Suspension cellulaire bouillie, (B) Endogène, (C) Palmitate insoluble et (D) Palmitate soluble.



activité. Le taux d'oxydation de l'acide palmitique a été dépendant de la quantité de bacilles utilisées. Ainsi, ces résultats montrent clairement que le palmitate est oxydé par les bacilles vivants sans les débris de tissus hôtes.

L'oxydation du palmitate par *M. phlei* a été étudiée et les résultats obtenus (Figure 20) montrent que le palmitate soluble (Figure 20 D) est oxydé sans période de latence, contrairement à la forme insoluble (Figure 20 C) qui nécessite une période d'adaptation au substrat. Après cette période, le palmitate insoluble est aussi oxydé activement que le palmitate soluble.

Afin d'étudier l'effet des inhibiteurs, le taux d'oxydation du palmitate a été déterminé en présence de certains inhibiteurs classiques de la chaîne de transport d'électrons et les résultats sont montrés dans le Tableau VIII. Le palmitate, en l'absence de tout inhibiteur, a rapidement été oxydé par les suspensions cellulaires de *M. leprae*. Cependant, l'oxydation du palmitate a été très sensible aux inhibiteurs. La consommation d'oxygène due à l'oxydation du palmitate a été inhibée à 88% par 0.1 mM de roténone, tandis que 81% et 88% d'inhibition ont été observés, respectivement, en présence de 0.1 mM d'atébrine

FIGURE 20: Oxydation du palmitate soluble et insoluble par *M. phlei*. (A) Suspension cellulaire bouillie, (B) Endogène, (C) Palmitate insoluble et (D) Palmitate soluble.

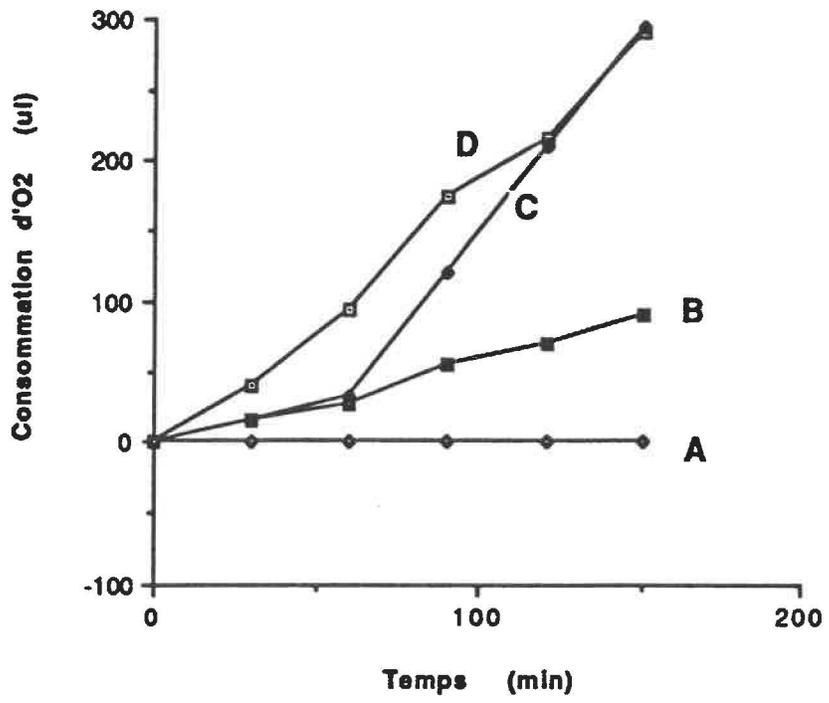


Tableau VIII. Effet des inhibiteurs classiques de la respiration sur l'oxydation du palmitate par *M. leprae*

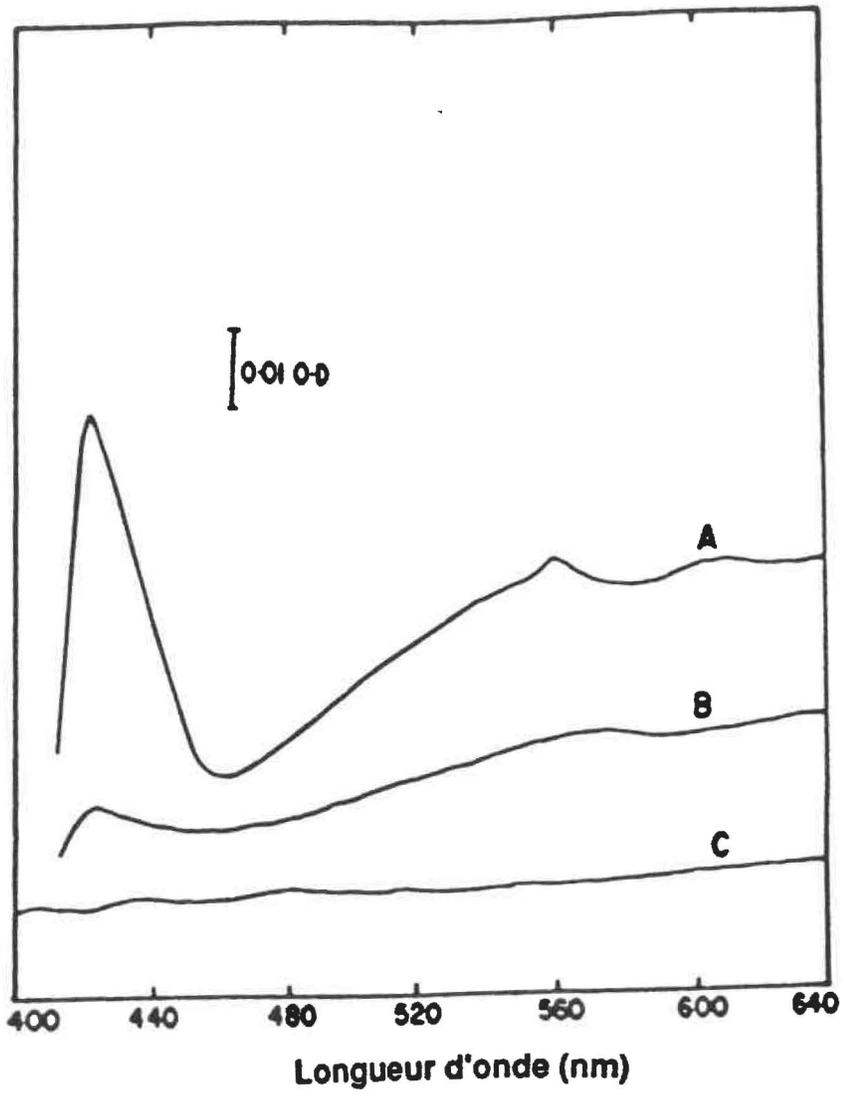
Inhibiteurs	Conc. (mM)	Consommation d'O ₂ (μ l/h/mg cellules)	Inhibition (%)
Contrôle	—	16	0
Roténone	0.1	2	88
Atébrine	0.1	3	81
Amytal	0.5	2	88
Antimycine A	0.1	0	100
Cyanure	1.0	0	100

et de 0.5 mM d'amytal. Le processus a été complètement inhibé par 0.1 mM d'antimycine A et 1 mM de cyanure.

Ces résultats suggèrent fortement que l'oxydation du palmitate est effectuée par les bacilles vivants à travers le système de cytochrome. Pour confirmer cela, le spectre différentiel des suspensions cellulaires préincubées avec du palmitate a été enregistré dans les conditions anaérobies contre le spectre de la suspension sans substrat. On peut voir dans la Figure 21 (A) que la présence du palmitate entraîne la mise en évidence de différents cytochromes, indiquant que le palmitate est capable de donner des électrons au système de cytochromes de *M. leprae*. Après l'enregistrement du spectre différentiel, l'oxygène a été barboté dans la suspension contenant le palmitate pendant 3-5 min et le spectre a été enregistré immédiatement. Comme montré dans la courbe B de la Figure 21, tous les cytochromes ont été complètement oxydés. Basé sur ces résultats, nous avons conclu que l'oxydation du palmitate a eu lieu à travers le système de transport d'électrons en utilisant l'oxygène comme accepteur final d'électrons.

Le palmitate est insoluble dans l'eau ce qui diminue sa biodisponibilité. Le heptakis-2,6-di-o-méthyl- β -cyclodextrine

FIGURE 21: Spectre différentiel des suspensions cellulaires de *M. leprae* préincubées avec du palmitate soluble. (A) Suspension cellulaire plus palmitate en anaérobiose, (B) Spectre obtenu après aération (C) Ligne de base.



(CD) a été utilisé pour solubiliser le palmitate. Dans le but d'affirmer que ce composé seul est sans effet sur la respiration endogène et sur l'oxydation des substrats et aussi pour confirmer que l'oxydation des substrats n'est pas une autooxydation ou une oxydation chimique mais bien un phénomène biologique, un certain nombre de témoins ont été utilisés. Lorsque 20 µg de substrat soluble ont été effectués, le même volume de solution contenant 40 µg de CD a été utilisé dans le test de contrôle.

Le Tableau IX montre que les suspensions de cellules de *M. leprae* présentent 30 µl de consommation endogène d'oxygène en 3 heures. La même quantité a été obtenue lorsque 40 µg de CD ont été ajoutés à la suspension cellulaire (29 µl). Cependant, aucune consommation d'oxygène n'a été observée lorsque 40 µg ou 20 µg de palmitate soluble ont été ajoutés au tampon. Les suspensions de cellules bouillies pendant 5 min en présence du CD ne montrent aucune activité. Les suspensions de cellules viables en présence de substrats solubles exhibent 94 µl d'oxygène consommé en 3 heures. Également, il n'y a pas de consommation d'oxygène mesurable lorsque les substrats solubles sont additionnés à la suspension de cellules tuées par ébullition.

Tableau IX: Oxydation de la cyclodextrine et du palmitate soluble par les suspensions cellulaires de *M. leprae*

Systeme	Consommation d'O ₂ (µl/h)
Susp. cell. 1 ml + Tampon (endogène)	30
Susp. cell. 1 ml + cyclodextrine 40µg	29
Tampon + cyclodextrine 40µg	0
Susp. cell. 1 ml (bouillie) + cyclodextrine	0
Tampon + Palmitate soluble 20µg	0
Susp. cell. 1 ml + palmitate sol. 20µg	94
Susp. cell. (bouillie) 1ml + palmitate sol. 20µg	0

3.6 OXYDATION DES SPHINGOLIPIDES

La richesse de *M. leprae* en lipides (40% du poids sec; Ratledge, 1982) a fait penser à l'utilisation des différentes classes de lipides comme source d'énergie et de carbone pour la culture *in vitro* du mycobactérium. Les sphingolipides qui font partie des phospholipides constituent l'essentiel des lipides membranaires. Bien que ces sphingolipides notamment la sphingosine, la sphingomyéline et les cérébrosides, semblent être importants, rien n'est connu à propos de leur métabolisme par les mycobactéries en général, et par *M. leprae* en particulier. Les sphingolipides se trouvent naturellement dans les membranes des tissus d'origine animale et sont donc probablement utilisés par *M. leprae* pour sa croissance et sa multiplication *in vivo*. La clé de la culture *in vitro* de *M. leprae* étant de trouver un substrat oxydable qui pourrait être incorporé dans le milieu, nous avons jugé utile d'étudier l'oxydation des sphingolipides par certaines mycobactéries à savoir *M. phlei*, le B.C.G, *M. lepraemurium* et *M. leprae*.

Les suspensions cellulaires de différentes espèces de mycobactérie montrent une respiration endogène considérable qui varie avec les différentes préparations.

3.6.1 OXYDATION DES SPHINGOLIPIDES PAR *M. LEPRAE*

Des expériences préliminaires avec les sphingolipides solubles utilisés comme substrat ont montré qu'ils sont oxydés activement après une période de latence d'environ 2 heures, tandis qu'il faut environ 6 heures avant que les sphingolipides insolubles ne soient oxydés activement. La consommation d'oxygène a donc été mesurée dans les expériences subséquentes, après une période de préincubation de 6 heures en utilisant les sphingolipides solubles et insolubles. Les résultats inscrits dans le Tableau X indiquent que différentes préparations de *M. leprae* exhibent différentes respirations endogènes et que la consommation d'oxygène dépend de l'état physiologique des bacilles. Lorsque la respiration endogène est faible, l'activité exogène est également faible, et vice versa. Le Tableau X montre également que lorsque les suspensions de *M. leprae* ont été préincubées avec les sphingolipides solubles tel que sphingosine, sphingomyéline et .cérébroside, ils étaient activement oxydés. Une consommation d'oxygène de 28, 85 et 106 μ l a été obtenue pendant 6 heures en présence de cérébroside de 29, 90 et 115 μ l avec la sphingomyéline et enfin de 35, 100 et 120 μ l avec la sphingosine. Les résultats d'une expérience

Tableau X. Respirations endogène et exogène de différentes préparations de suspensions cellulaires de *M. leprae* isolés de coussinets plantaires de souris nues en présence de sphingolipides.

Ul d'O ₂				
Temps (min)	Endogène	Cérébroside	Sphingomyéline	Sphingosine
360	20	28	29	35
360	60	85	90	100
360	70	106	115	120

typique d'oxydation de la sphingosine, la sphingomyéline et la cérébroside solubles par les suspensions de *M. leprae* sont montrés dans la Figure 22. On peut voir que les suspensions bacillaires préincubées avec les sphingolipides solubles montrent une oxydation des trois substrats qui est visible par la courbe de consommation d'O₂ des substrats au-dessus de la consommation endogène d'O₂. Cependant, en présence de sphingosine, sphingomyéline et cérébroside insolubles, les suspensions cellulaires ne montrent pas une augmentation de la consommation d'oxygène au-dessus de la valeur de l'endogène et pendant 24 heures. L'oxydation de sphingolipides insolubles par *M. leprae* est montrée dans la Figure 23. On peut voir que lorsque les suspensions cellulaires de *M. leprae* sont préincubées avec la sphingosine, la sphingomyéline et la cérébroside insolubles les courbes de consommation d'oxygène restent à peu près au même niveau que la courbe de l'endogène. Des résultats similaires ont été obtenus lorsque le palmitate a été utilisé comme substrat (Figure 19). Ces résultats indiquent clairement que le palmitate et les sphingolipides solubles sont oxydés par *M. leprae* cultivé *in vivo* après une période de latence d'environ 6 à 8 heures.

FIGURE 22: Oxydation des sphingolipides solubles par *M. leprae* isolé de coussinets plantaires de souris nues. (A) Endogène, (B) Sphingomyéline, (C) Cérébroside et (D) Sphingosine.

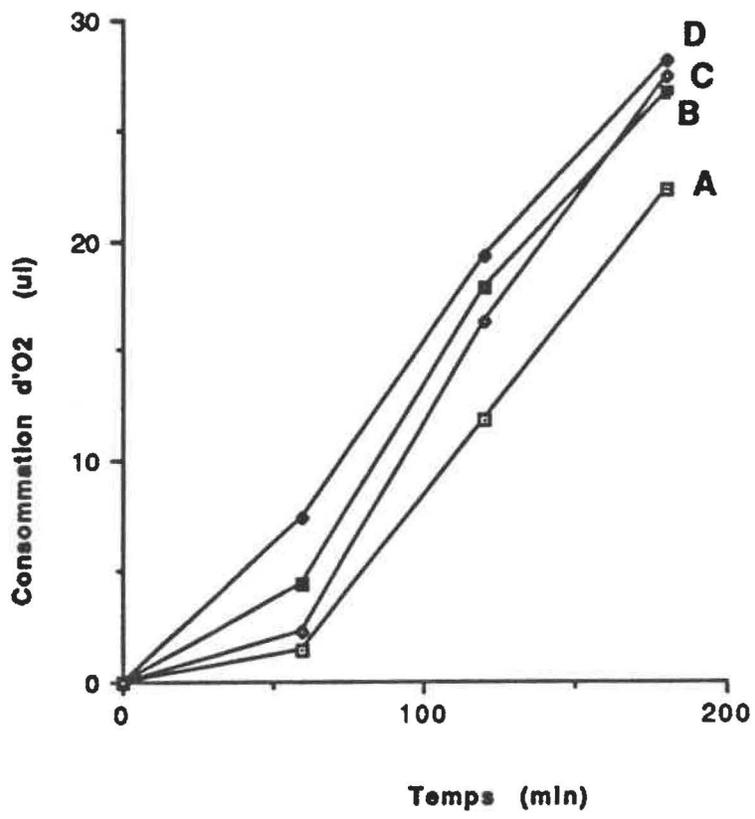
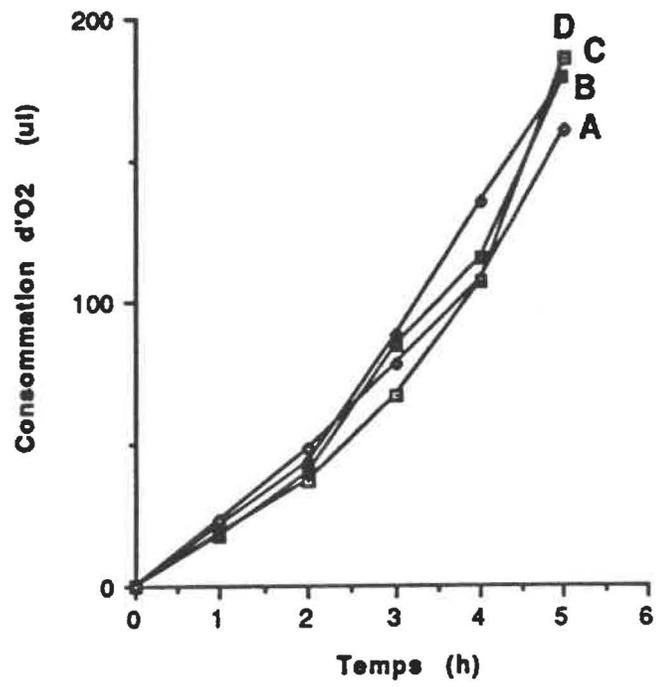


FIGURE 23: Oxydation des sphingolipides insolubles par *M. leprae* isolés de coussinets plantaires de souris nues. (A) Cérébroside, (B) Sphingomyéline, (C) Sphingosine et (D) Endogène.



3.6.2 OXYDATION DES SPHINGOLIPIDES PAR BCG, M. PHLEI, et M. LEPRAEMURIUM

L'oxydation des sphingolipides solubles et insolubles par les suspensions cellulaires de *M. phlei*, *M. lepraemurium* et le BCG a été aussi étudiée et les résultats sont montrés dans le Tableau XI. Ainsi les sphingolipides solubles sont oxydés par les suspensions de cellules viables de *M. phlei* sans période de latence et produisent une consommation de 193 μ l d'oxygène en présence de sphingosine, 105 μ l en présence de sphingomyéline, et 96 μ l en présence de cérébroside, cela après 240 minutes d'incubation. Lorsque les sphingolipides insolubles sont utilisés comme substrat aucune oxydation ne se produit avant 1 heure, après quoi ils sont oxydés assez rapidement et fournissent 150, 116 et 93 μ l d'oxygène consommé, en présence respectivement de sphingosine, sphingomyéline et cérébroside après 240 minutes d'incubation. Nous avons observé que les sphingolipides solubles ne sont pas oxydés par la suspension cellulaire de *M. phlei* bouillie. Quant aux suspensions cellulaires de *M. lepraemurium*, on note pour les substrats solubles dans le même ordre 220, 197 et 185 μ l d'O₂ consommé et 35, 37 et 40 μ l avec les substrats insolubles. Des résultats similaires ont été obtenus en incubant les suspensions

Tableau XI. Oxydation des sphingolipides solubles et insolubles par différentes préparations de *M. phlei*, *M. lepraemurium* et BCG

Substrats	Consommation d'O ₂ (µl/240 min)					
	<i>M. phlei</i>		<i>M. lepraemurium</i>		BCG	
	Endo	Exo	Endo	Exo	Endo	Exo
Sphingosine (s)	52	193	170	220	85	100
Sphingosine (i)	95	150	16	35	85	96
Sphingomyéline (s)	52	105	170	197	43	92
sphingomyéline (i)	95	116	16	37	43	49
Cérébroside (S)	52	96	170	185	35	61
Cérébroside (i)	95	93	16	40	35	40

(s) soluble

(i) insoluble

cellulaires de BCG avec les formes solubles et insolubles des mêmes substrats (Tableau XI)

Les sphingolipides sont insolubles dans l'eau ce qui diminue leur biodisponibilité. C'est pourquoi, lorsque les suspensions cellulaires de *M. phléi* sont incubées en présence des sphingolipides insolubles, la consommation d'oxygène a été faiblement au-dessus de la valeur de l'endogène.

Le heptakis-2,6-di-o-méthyl- β -cyclodextrine (CD) a été utilisé pour solubiliser les sphingolipides. Nous avons observé que la cyclodextrine n'a pas d'effet stimulateur ou inhibiteur sur l'oxydation des sphingolipides solubles comme rapporté dans le cas de l'acide palmitique

3.6.3 EFFET DES INHIBITEURS DE LA RESPIRATION SUR L' OXYDATION DE LA SPHINGOMYÉLINE SOLUBLE PAR *M. LEPRAE*

L'effet des inhibiteurs spécifiques de la chaîne respiratoire sur l'oxydation de la sphingomyéline soluble a été étudié par *M. leprae* et les résultats sont montrés dans le Tableau XII. L'oxydation de la sphingomyéline soluble par *M. leprae* a été presque complètement (79-100%) inhibée par tous les inhibiteurs

Tableau XII. Effet des inhibiteurs sur l'oxydation de sphingomyéline soluble par *M. leprae*

Inhibiteurs	Conc. (mM)	Consommation d'O ₂ (µl/h/mg cellules)	Inhibition (%)
Contrôle	—	14	0
Roténone	0.1	2	86
Atébrine	0.1	2	86
Amytal	0.5	3	79
Antimycine A	0.1	0	100
Cyanure	1.0	0	100

utilisés. Nous avons observé que ces inhibiteurs ont des effets similaires lorsque la sphingosine et la cérébroside ont été utilisées comme substrats.

4. DISCUSSION

Les bacilles de la lèpre utilisés dans les études respiratoires doivent être libres de tissus hôtes. Nos résultats (Tableau II) ont montré que le traitement au NaOH est nécessaire pour obtenir de telles préparations. Le traitement au NaOH a été noté satisfaisant pour les études respiratoires (Mori et al., 1985) et biochimiques (Franzblau 1988; Franzblau et Harris, 1988; Wheeler 1987a,b; Wheeler et al., 1982; Wheeler, 1984a). Pour s'assurer que les suspensions bacillaires sont libres de tissus hôtes, la détermination de l'activité AMP-ase doit être effectuée.

D'autre part, l'inoculation sur des milieux spécifiques de mycobactéries n'a pas donné de croissance. Basé sur ces résultats, il semble que les bacilles acido-alcool-résistants utilisés dans cette étude sont *M. leprae* et que les résultats obtenus sont attribuables à *M. leprae*.

Plusieurs recherches faites antérieurement pour montrer l'oxydation des intermédiaires du cycle de Krebs par les cellules entières de mycobactéries cultivées *in vitro* se sont soldées par un échec (Faine et al., 1951; Geronimus, 1949; Gray, 1952; Holmgren et al., 1954). Cette incapacité des

cellules entières d'oxyder les intermédiaires a été considérée comme étant due à l'imperméabilité de la membrane cellulaire à ces substrats puisque l'extrait cellulaire de plusieurs mycobactéries catalysent l'oxydation de certains intermédiaires du cycle de Krebs (Faine et al., 1951; Geronimus, 1949; Millman et Youmans 1954; Sasakawa et Fuji, 1952; Yamamura et al., 1954). Gray, (1952) a étudié l'oxydation de tous les intermédiaires du cycle de Krebs en utilisant la technique manométrique mais aucun n'a été oxydé par les cellules entières de *M. lepraemurium*. Cependant, Kato et al., (1976) ont montré que le succinate et le NADH n'ont pas été oxydés par les cellules normales de *M. lepraemurium*, mais les mêmes substrats ont été oxydés par les suspensions cellulaires congelées pendant une minute à -80°C . Nos résultats ont aussi montré que lorsque la barrière d'imperméabilité est enlevée par la congélation à -80°C pendant une minute, les suspensions cellulaires de *M. leprae* oxydent le succinate (Figure 17) et le NADH (Figure 16). La stimulation de la respiration endogène de *M. lepraemurium* (Gray, 1952) aussi bien que celle d'autres mycobactéries (Gray, 1949) par l'albumine sérique a été rapportée. Toutefois, malgré de multiples essais, nous n'avons pas été capables de démontrer un tel effet de stimulation de l'albumine bovine fraction V, ou de l'albumine d'oeuf sur la

respiration endogène ou sur l'oxydation d'autres substrats par les suspensions normales ou congelées de *M. leprae*. L'oxydation du succinate semble avoir lieu via le système de cytochrome. La sensibilité de l'oxydation du succinate au TTFA (Figure 10) aussi bien qu'à l'acide malonique (Figure 18) est l'indication claire que les électrons de l'oxydation du succinate sont couplés à la chaîne de transport d'électrons au niveau du cytochrome b. La confirmation de cette conclusion vient de l'observation selon laquelle l'antimycine A qui est connue pour bloquer le transport des électrons entre le cytochrome b et c chez d'autres mycobactéries (Asano et Brodie, 1964; Kearney et Goldman, 1970; Kato et al., 1976) est un inhibiteur très efficace de l'oxydation du succinate par *M. leprae*.

Skinsnes et al., (1975) ont rapporté la culture *in vitro* de *M. leprae* sur un milieu à base d'acide hyaluronique. Similaire aux résultats de Kato et al., (1976) nous n'avons pas été capable d'obtenir l'oxydation de l'acide hyaluronique par *M. leprae*. L'acide hyaluronique servirait probablement comme facteur de croissance. L'oxydation de la DOPA est considérée comme l'un des critères d'identification de *M. leprae*. Nos résultats ont montré que la DOPA est oxydée par les suspensions de *M. leprae* (Tableau VI)

Les mycobactéries cultivables sont connues depuis longtemps comme nécessitant le sulfure pour croître (Braun et Siblingstein, 1941; Dubos et Middlebrook, 1947; Lockeman, 1918; Olitski et al., 1945). Nos résultats ont montré qu'un certain nombre de composés sulfhydryles (Tableau VI) sont oxydés par les suspensions cellulaires de *M. leprae* cultivé *in vitro*. Il est donc possible que l'oxydation de ces composés fournit le soufre ou le groupe SH aux enzymes sulfhydryles impliquées dans le système de transport d'électrons chez *M. leprae*. Il est difficile de préciser le rôle de l'oxydation de ces composés. Olitski (1974) a rapporté que la croissance de *M. leprae* était stimulée lorsque certain composés contenant du soufre comme le dimethyl sulfoxide et la cystéine étaient additionnés au milieu de culture. De la même manière, le thiosulfate de sodium et la thiamine pyrophosphate avaient des effets de croissance marqués. Basé sur ces résultats, Olitski (1974) a conclu que la présence des composés sulfhydryles est essentielle pour la croissance de *M. leprae*. Dhople et Lamoureux (1991a) ont rapporté avoir obtenu une augmentation de la croissance des cellules de *M. leprae* lorsque certains composés sulfhydryles ont été ajoutés dans le milieu de culture.

Nous avons montré que certains composés sulfhydryles étaient activement oxydés par *M. leprae* (tableau VI). L'utilisation de ces composés pendant les essais de culture de *M. leprae* est suggérée.

Dans l'espoir d'obtenir plus d'information sur le métabolisme de *M. lepraemurium* et autres mycobactéries, certaines études métaboliques ont été rapportées (Dhople et Hanks, 1975; Hanks, 1951a; Ishaque, 1983; 1984; Kusaka et al., 1964; McCarthy, 1971; Mori, 1976; Portaels et Pattyn, 1981), mais relativement peu de renseignements sont disponibles sur *M. leprae* cultivé *in vivo* en général et sur *M. leprae* isolé de coussinets plantaires de souris nues athymiques en particulier.

Différents milieux synthétiques liquides et solides ont été utilisés par plusieurs chercheurs pour les essais de culture *in vitro* de *M. leprae* (Dhople et Ortega, 1990; Ishaque et Kato, 1977a; Murohashi, 1980). Aucun substrat n'est connu comme pouvant servir de source d'énergie, de carbone ou les deux à la fois. *M. leprae* contient une grande quantité de lipides (Ratledge, 1982). Les études récentes (Franzblau, 1988; Wheeler et Ratledge, 1988) suggèrent que l'acide palmitique, un lipide neutre, pourrait être un substrat convenable pour la culture *in*

vitro de *M. leprae*. Cependant, l'acide palmitique est insoluble dans l'eau et ainsi, dans les premières études métaboliques (Halvorson et al., 1969) et les essais de culture (Kato, 1988; Kato et al., 1992) il n'était pas directement disponible pour les cellules. Présentement, le palmitate soluble est devenu disponible (Szente et al., 1992). Récemment au Congrès International de Léprologie, Orlando, U.S.A (1993) il a été suggéré par Wheeler que le métabolisme des sphingolipides qui existent naturellement dans les membranes des tissus d'origine animale, doit être étudié. Il existe trois importants sphingolipides notamment la sphingosine, la sphingomyéline et la cérébroside. Comme les autres lipides, ils sont pratiquement insolubles dans l'eau. Cependant, les préparations solubles des trois sphingolipides ont été disponibles. Reconnaisant l'importance de l'acide palmitique et des sphingolipides, nous avons étudié leur métabolisme par *M. leprae* cultivé *in vivo*.

Nos résultats ont montré que l'acide palmitique, la sphingosine, la sphingomyéline et la cérébroside solubles ont été oxydés par les cellules viables de *M. leprae* libres de tissus hôtes après une période d'induction de deux heures approximativement; alors qu'il fallait 6 à 8 heures avant que l'acide palmitique, la sphingosine, la sphingomyéline et la

cérébroside insolubles soient oxydés par *M. leprae* (Figures 19, 23). Franzblau (1988) a seulement montré l'évolution du CO₂ durant l'oxydation du palmitate par *M. leprae*. La consommation d'oxygène par la suspension de *M. leprae* avec le palmitate et les sphingolipides est la preuve directe de l'oxydation de ces substrats. D'autre part, l'inhibition de l'oxydation du palmitate et des sphingolipides par les inhibiteurs classiques de la respiration suggère que le palmitate et les sphingolipides sont oxydés par le processus de β -oxydation qui nécessite le cycle de l'acide tricarboxylique et la chaîne de transport d'électrons utilisant l'oxygène comme accepteur final. Cette conclusion est aussi confirmée par les observations spectrophotométriques qui montrent clairement que les cytochromes de *M. leprae* sont réduits par le palmitate (Figure 21) et sont complètement oxydés par l'oxygène. Des résultats similaires ont été obtenus lorsque les sphingolipides furent utilisés comme substrats. Les sphingolipides aussi bien que le palmitate ont été oxydés par *M. lepraemurium*, *M. phlei* et le BCG (Tableau XI). Les résultats montrent que tous les substrats utilisés ont été oxydés par les bacilles vivants puisque les suspensions cellulaires de *M. leprae* tués par ébullition n'exhibent aucune oxydation d'aucun composé.

L'unique but de ces études de la respiration est d'avoir l'information qui pourrait être utilisée dans la culture *in vitro* de *M. leprae*. Il est probable que les lipides notamment l'acide palmitique, la sphingosine, la sphingomyéline et la cérébroside pourraient fournir de l'énergie pour la croissance de *M. leprae*. L'utilisation de ces composés dans les milieux de culture sous la forme soluble a plusieurs avantages comparativement à la forme insoluble. Il est convenable d'utiliser l'acide palmitique soluble et les sphingolipides solubles pour éliminer le besoin de dissoudre dans l'éthanol. Le milieu liquide clair aussi bien que le milieu solide sans précipité peut-être préparé facilement en utilisant la forme soluble des lipides qui ainsi deviennent directement disponibles pour les mycobactéries incubées, tandis que ces composés sous la forme insoluble interfèrent pendant les études spectrophotométrique (absorbance); ils ne posent pas de tels problèmes lorsqu'ils sont utilisés sous la forme soluble. La solution stock du palmitate soluble, de la sphingosine, de la sphingomyéline et de la cérébroside peut être préparée, autoclavée, gardée stérile et utilisée selon le besoin.

La présence de cytochromes dans plusieurs mycobactéries

cultivées *in vitro* a été rapportée et toutes ces mycobactéries effectuent leurs réactions de biosynthèse en utilisant l'énergie chimique sous forme d'ATP. Comme n'importe quelle autre cellule, *M. leprae* contient une chaîne de transport d'électrons complète et fonctionnelle (Figure 15). Nos résultats suggèrent fortement que la chaîne respiratoire complète est impliquée dans l'oxydation du palmitate et des sphingolipides. À partir de ces résultats expérimentaux, l'utilisation de ces lipides est recommandée pour la culture *in vitro* de *M. leprae*.

CONCLUSION

M. leprae a longtemps été considéré comme un parasite intracellulaire strict, incapable d'effectuer ses propres réactions de biosynthèses.

Nous avons démontré que *M. leprae* isolé de coussinets plantaires de souris nues possède un système de transport d'électrons fonctionnel dans lequel on retrouve les cytochromes $a + a_3$, b , c et les pigments liés au monoxyde de carbone (a_3 -CO et c -CO). Le fonctionnement du système nécessite la présence de la vitamine K ou un analogue.

L'existence d'une chaîne respiratoire fonctionnelle chez *M. leprae* cultivé *in vivo* est d'une importance capitale, car cela prouve que ce microorganisme peut croître en milieu artificiel, à condition de lui fournir les éléments nécessaires (source d'énergie, de carbone, facteurs de croissance et les conditions physico-chimiques adéquates).

Dans cette étude, l'oxydation de plusieurs substrats a été testée. L'oxydation des acides gras notamment le palmitate et les sphingolipides (sphingosine, sphingomyéline et cérébroside) a été inhibée par les inhibiteurs de la respiration ce qui prouve que ces substrats sont oxydés à travers le système de transport d'électrons, et pourraient donc servir de source d'énergie pour la culture *in vitro* du bacille de la lèpre.

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le Docteur Muhammad Ishaque qui a bien voulu diriger ce travail. Il m'a fourni un enseignement et une assistance technique de tous les instants ce qui l'associe étroitement à la qualité des résultats obtenus. Plus qu'un directeur de recherche, c'est un père avec qui j'espère toujours collaborer. Qu'il trouve ici l'expression de toute ma gratitude pour l'aide financière et morale, l'encouragement et la très grande disponibilité dont il a fait preuve tout au long de ce travail.

Je tiens à remercier Johanne Lemay, Jacinthe Reid et Diane Rouleau pour leurs conseils et leur collaboration technique. J'aimerais aussi remercier le corps professoral du CRMA, tout le personnel de l'édifice 16, de la bibliothèque, du département de l'informatique pour leur constante disponibilité. Merci à l'I.A.F et Nicole Paquette pour l'exemption accordée pour les trois premières sessions. Cependant, je ne saurais terminer sans réitérer ma gratitude, mon amour à ma chère épouse Faskoye Mariam, elle a été pour moi une source constante de motivation pendant la réalisation de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

ADAPOE, C. (1976). Respiration, electron transport and ATP formation in a noncultivated *Mycobacterium lepraemurium*. Ph.D. Dissertation, University of Montreal, Canada.

ANDREJEW, A., GERNEZ-RIEUS, C., et TAGQUET, A. (1957). Cytochromes et activité cytochrome-oxydasique des mycobactéries sensibles et résistantes à l'INH. Ann. Inst. Pasteur (Paris). **93**: 281-288.

ASANO, A., and BRODIE, A.F. (1963). Oxidative phosphorylation in fractionated bacterial system. XI. Separation of soluble factors necessary for oxidative phosphorylation. Biochem. Biophys. Res. Commun. **13** : 416-421.

ASANO, A., and BRODIE, A.F. (1964). Oxidative phosphorylation in fractionated bacterial system. XIV. Respiratory chains of *Mycobacterium phlei*. J. Biol. Chem. **239**: 4280-4291.

ASANO, A., and BRODIE, A.F. (1965). Oxidative phosphorylation in fractionated bacterial system. XVIII. Phosphorylation coupled to different segments of the respiratory chains of *Mycobacterium phlei*. J. Biol. Chem. **240**: 4002-4010.

BASTARRACHEA, F., ANDERSON, D.G., and GOLDMAN, D.S. (1961). Enzyme systems in the mycobacteria. XI. Evidence for a functional glycolytic system. J. Bacteriol. **82**: 94-100.

BERNHEIM, F. (1941). The effect of various substances on the oxygen uptake of the tubercle bacillus. J. Bacteriol. **41**: 387-395.

BISWAS, S.K. (1989). Cultivation of *Mycobacterium leprae* in artificial culture medium. Ind. J. Med. Sci. **43** (1): 5-10.

BRAUN, H., and SILBERSTEIN, W. (1941). Zur Vereinfachung der Diagnostik Pathogener Darmbakterien. Schweiz. Z. Pathol. Bakteriologie. **3**: 189-199.

BROBERG, P.L., and SMITH, L. (1967). The cytochrome systems of *Bacillus megaterium* KM. The presence and some properties of two cobinding cytochromes. Biochim. Biophys. Acta, **131**: 479-489.

BRODIE, A.F. (1959). Oxidative phosphorylation in fractionated bacterial system. I. Role of soluble factors. J. Biol. Chem. **234**: 398-404.

BRODIE, A.F., and ADELSON, J.W. (1965). Respiratory chains and sites of coupled phosphorylation. *Science* **149**: 265-269.

BRODIE, A.F., and GRAY, C.T. (1957). Bacterial particles in oxidative phosphorylation. *Science* **125**: 534-537.

CASTER, L.N., and CHANCE, B. (1959). Photochemical determinations of the oxidases of bacteria. *J. Biol. Chem.* **234**: 1587-1592.

CHANCE, B. (1953a). The carbon monoxide compounds of the cytochrome oxidases. I. Difference spectra. *J. Biol. Chem.* **202**: 383-396.

CHANCE, B. (1953b). The carbon monoxide compounds of the cytochrome oxidases. II. Photodissociation spectra. *J. Biol. Chem.* **202**: 397-416.

CHANCE, B., and WILLIAMS, G.R. (1955). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. II. Difference spectra. *J. Biol. Chem.* **217**: 395-407.

CONN, E.E., and STUMPF, P.K. (1963). *Outlines of Biochemistry*. John Wiley and Sons, Inc. New York and London, p. 210.

DAVIS, B.D., and DUBOS, R.J. (1946). Interaction of serum albumin free and esterified oleic acid and lipase in relation to cultivation of the tubercle bacillus. *Archs. Biochem.* **11**: 201-203.

DAVIS, B.D., and DUBOS, R.J. (1947). The binding of fatty acids by serum albumin, a protective growth factor in bacteriological media. *J. Expt. Med.* **85**: 9-22.

DHOPLE, A.M., GREEN, K.J., and OSBORNE, L.J. (1988). Limited *in vitro* cultivation of *Mycobacterium leprae*. *Ann. Inst. Pasteur. Microbiol.* **139**: 213-223.

DHOPLE, A.M., and HANKS, J.H. (1975). Cultivation of *Mycobacterium lepraemurium*: effect of reducing compounds. *Leprosy Sci. Memoranda Memo. L.* 685/1.

DHOPLE, A.M., and LAMOUREUX, L.C. (1991a). Factors influencing the *in vitro* growth of *Mycobacterium leprae*: effect of sulfhydryl compounds. *Microbiol. Immunol.* **35** (3): 209-213.

- DHOPLE, A.M., and LAMOUREUX, L.C. (1991b). Factors influencing the *in vitro* growth of *Mycobacterium leprae*: effect of oxygen. *Microbiol. Immunol.* **35** (7): 507-514.
- DHOPLE, A.M., and ORTEGA, I. (1990). An *in vitro* culture method for screening new drugs against *Mycobacterium leprae*. *Indian J. Lepr.* **62** (1): 66-75.
- DIXON, J.M.S., and CUTHBERT, E.H. (1967). Isolation of tubercle bacilli from uncentrifuged sputum on pyruvic medium. *Am. Rev. Resp. Dis.* **96**: 119-122.
- DUBOS, R.J., and MIDDLEBROOK, G. (1947). Media for tubercle bacilli. *Am. Rev. Tuberc.* **56**: 334-345.
- EDSON, N.L. (1951). The intermediary metabolism of the *Mycobacteria*. *Bacteriol. Rev.* **15**: 147-182.
- EDSON, N.L., and HUNTER, G.J.E. (1943). Respiration and nutritional requirement of certain members of the genus *mycobacterium*. *Biochem. J.* **37**: 563-571.
- EDSON, N.L., HUNTER, G.J.E., KULKA, R.G., and WRIGHT, D.E. (1959). The metabolism of glycerol in *Mycobacterium butyricum*. *Biochem. J.* **72**: 249-261.
- FAINE, S., WHITESIDE, M., and EDSON N.L. (1951). The carbohydrate metabolism of the *mycobacteria*. *Proc. Univ. Otago Med. Sch.* **29**: 18-19.
- FALK, J.E. (1964). Porphyrins and metalloporphyrins. *J. Biol. Chem.* **66**: 375-400.
- FRANZBLAU, S.G. (1988). Oxidation of palmitic acid by *Mycobacterium leprae* in an axenic medium. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 18-21.
- FRANZBLAU, S.G., and HARRIS, E.B. (1988). Biophysica optima for metabolism of *Mycobacterium leprae*. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 1124-1129.
- FRANZBLAU, S.G., HARRIS, E.B., and HASTINGS, R.C. (1987). Axenic incorporation of [$U-^{14}$] palmitic acid into the phenolic glycolipid-I of *Mycobacterium leprae*. *FEMS Microbiol. Letters.* **48**: 407-411.

GERONIMUS, L.H. (1949). Studies on the oxidative enzyme systems in mycobacteria with special emphasis upon the employment of cell-free extracts. Ph.D. Thesis, Ohio State University.

GRAY, C.T. (1949). The nature of the fatty acid metabolism of tubercle bacilli and other mycobacteria. Ph.D. Thesis, Ohio State University.

GRAY, C.T. (1952). The respiratory metabolism of murine leprosy bacilli. *J. Bacteriol.* **64**: 305-313.

HALLAS, L.E., and VESTAL, J.R. (1978). The growth of *Mycobacterium convolutum* on solid n-alkane substrates: effect on the lipid composition. *Can. J. Microbiol.* **24**: 1197-1203.

HALVORSON, H., ISHAQUE, M., and LEES, H. (1969). Microbiology of domestic waste. II. A comparative study of the seasonal physiological activity of bacteria indigenous to a sewage lagoon. *Can. J. Microbiol.* **15**: 563-569.

HANKS, J.H. (1951a). Measurement of the hydrogen transfer capacity of mycobacteria. *J. Bacteriol.* **62**: 521-528.

HANKS, J.H. (1951b). The biological significance of the hydrogen transfer capacity of murine leprosy bacilli. *J. Bacteriol.* **62**: 529-537.

HEY-FERGUSON, A., and ELBEIN, A.D. (1970). Purification of D-mannose isomerase from *Mycobacterium smegmatis*. *J. Bacteriol.* **101**: 777-780.

HIRSCH, H.M. (1959). In: *Pigment Cell Biology*, Gordon, M., Ed. New York, Academic Press, p. 327.

HOLMGREN, N.B., MILLMAN, I., and YOUMANS, G.P. (1954). Studies on the metabolism of *Mycobacterium tuberculosis*. VI. The effect of Kreb's tricarboxylic acid cycle intermediates and precursors on the growth and respiration of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **68**: 405-410.

HORECKER, B.L., and KORNBURG, A. (1948). The extinction coefficients of the reduced band of pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.* **175**: 385-390.

HUNTER, G.J.E. (1953a). The oxidation of glycerol by

mycobacteria. *Biochem. J.* **55**: 320-328.

HUNTER, G.J.E. (1953b). Acid formation in cultures of *Mycobacterium butyricum*. *J. Bacteriol.* **66**: 676-682.

International Leprosy Congress. Orlando, Florida, August 29-September 4; Abstract No. IM46, pp. 93A.

ISHAQUE, M. (1981). *In vitro* cultivation of *Mycobacterium lepraemurium* and its identification by animal inoculation. *Can. J. Microbiol.* **27**: 788-794.

ISHAQUE, M. (1983). Respiratory activities of *in vitro* grown *Mycobacterium lepraemurium*. *Int. J. Lepr.* **51**: 64-71.

ISHAQUE, M. (1984). Cytochrome system in cultivated *Mycobacterium lepraemurium*. *Cytobios*, **39**: 165-170.

ISHAQUE, M. (1989). Direct evidence for the oxidation of palmitic acid by host-grown *Mycobacterium leprae*. *Res. Microbiol.* **140**: 83-93.

ISHAQUE, M. (1990). Growth of *Mycobacterium leprae* under low oxygen tension. *Microbios*, **64**: 7-17.

ISHAQUE, M. (1992b). Palmitate oxidation by *in vivo* and *in vitro* grown *Mycobacterium lepraemurium*. *Cytobios*, **71**: 19-27.

ISHAQUE, M., and ALEEM, M.I.H. (1970). Energy coupling in *Hydrogenomonas eutropha*. *Biochim. Biophys. Acta*, **223**: 388-397.

ISHAQUE, M., and KATO, L. (1974a). The cytochrome system in *Mycobacterium lepraemurium*. *Can. J. Microbiol.* **20**: 943-947.

ISHAQUE, M., and KATO, L. (1974b). Occurrence of C-type cytochrome in *Mycobacterium lepraemurium*. *Can. J. Biochem.* **52**: 991-996.

ISHAQUE, M., and KATO, L. (1976). Oxidation of various substrates by host-grown *Mycobacterium leprae* and *M. lepraemurium*. *Rev. Can. Biol.* **36**: 277-282.

ISHAQUE, M., and KATO, L. (1977a). *In vitro* cultivation of mycobacter

ISHAQUE, M., and KATO, L. (1977b). Mycobacteria from leprous tissue of armadillo cultivated on hyaluronic acid base medium. *Rev. Can. Biol.* **36** (3): 299-300.

ISHAQUE, M., and STICHT-GROH, V. (1993a). Oxidation of insoluble palmitic acid and water soluble palmitic acid-methylated cyclodextrin complex by *Mycobacterium leprae* and *M. phlei*. *Microbios*, **75**: 107-115.

ISHAQUE, M., and STICHT-GROH, V. (1993b). Investigations into the growth of *Mycobacterium leprae* in a medium with palmitic acid under different gaseous environments. *Microbios*, **75**: 171-179.

JACOBS, N.J., and CONTI, S.F. (1965). Effect of hemin on the formation of cytochrome system of anaerobically grown *Staphylococcus epidermidis*. *J. Bacteriol.* **89**: 675-679.

KATO, L. (1988). Psychrophilic mycobacteria in *M. leprae* infected tissues. *Int. J. Lepr.* **56**: 631-632.

KATO, L., ADAPOE C., and ISHAQUE, M. (1976). The respiratory metabolism of *Mycobacterium lepraemurium*. *Can. J. Microbiol.* **22**: 1293-1299.

KATO, L., and ISHAQUE, M. (1975). Separation of *Mycobacterium lepraemurium* from the subcutaneous tissues of the rat. *Int. J. Lepr.* **43**: 16-20.

KATO, L., SZEJTLI, J., and SZENTE, L. (1992). Water soluble complex of palmitic acid and palmitates for metabolic studies and cultivation trials of *Mycobacterium leprae*. *Int. J. Lepr.* **60**: 105-107.

KEARNEY, E.B., and GOLDMAN, D.S. (1970). Further studies on the NADH oxidase of the cytoplasmic membrane of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **197**: 197-205.

KIRCHHEIMER, W.F., and STORRS, E.E. (1971). Attempts to establish the armadillo (*Dasypus novemcinctus*, Linn) as a model for the study of leprosy: I. Report of lepromatoid leprosy in an experimentally infected armadillo. *Int. J. Lepr.* **39**: 693-702.

KUSAKA, T., SATO, R., and SHOJI, K. (1964). Comparison of cytochromes in mycobacteria grown *in vitro* and *in vivo*. J. Bacteriol. **87**: 1383-1388.

LANCASTER, R.D., HILSON, G.R.F., McDOUGALL, A.C., and COLSTON, M.J. (1983). *Mycobacterium leprae* infection in nude mice: Bacteriological and histological responses to primary infection and large inocula. Infect. Immun. **39**: 865-872.

LOCKEMAN, G. (1918). Beitrage zur biologie der tuberkel bazillen. Berl. Med. Wochenschr. **26**: 712.

LONG, E.R. (1919). A study in fundamentals of the nutrition of the tubercule bacillus: the utilization of some amino acids ammonium salts. Am. Rev. Tuberc. **3**: 86-108.

LONG, E.R. (1958). The Chemistry and Chemotherapy of Tuberculosis. 3rd edition, Baillièrè, Tindall and Cox Ltd., London.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., and RANDALL, R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**: 265-275.

LUKINS, H.B., and FOSTER, J.W. (1963). Utilization of hydrocarbons and hydrogen by mycobacteria. Allg. Mikrobiol. **3**: 251-264.

MCCARTHY, C. (1971). Utilization of palmitic acid by *Mycobacterium avium*. Infect. Immun. **4**: 199-204.

MCCARTHY, C. (1974). Effect of palmitic acid on cell division in *Mycobacterium avium*. Infect. Immun. **9**: 363-372.

MCCARTHY, C. (1976). Synthesis and release of sulfolipid by *Mycobacterium avium* growth and cell division. Infect. Immun. **14**: 1241-1252.

MERRILL, M.H. (1931a). Studies on carbon metabolism of organisms of the genus *Mycobacterium*. II. Utilization of organic compounds in a synthetic medium. J. Bacteriol. **21**: 361-374.

MERRILL, M.H. (1931b). Studies on carbon metabolism of organisms of the genus *Mycobacterium*. III. End products of carbohydrate utilization as determined in synthetic cultures.

J. Bacteriol. **21**: 375-381.

MILLMAN, I., and YOUMANS, G.P. (1954). Studies on the metabolism of *Mycobacterium tuberculosis*. VII. Terminal respiratory activity of an avirulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. J. Bacteriol. **68**: 411-418.

MORI, T. (1976). Biochemical considerations for the cultivation of *Mycobacterium lepraemurium*. Kitasato Arch. Exp. Med. **49**: 141-146.

MORI, T., KOHSAKA, K., and DOHMAE, K. (1971). Terminal electron transport system of *M. lepraemurium*. Int. J. Lepr. **39**: 813-828.

MORI, T., KOHSAKA, K., KISHI, Y., KAMEI, M., and NISHIMURA, S. (1966). Distribution of acid-fast bacilli in the skin extremities and internal organs of various experimental animals. La Lepro. **35**: 27-32.

MORI, T., KOHSAKA, K., and TANAKA, Y. (1971). Tricarboxylic acid cycle in *Mycobacterium lepraemurium*. Int. J. Lepr. **39**: 796-812.

MORI, T., MIYATA, Y., and KOHSAKA, K. (1985). Respiration in *Mycobacterium leprae*. Int. J. Lepr. **53**: 600-609.

MUROHASHI, T. (1980). Cultivation of *Mycobacterium leprae* using semi-synthetic media. Acta Leprologica **80**: 17-34.

NAKAMURA, T. (1938). Ueber die Atmung der Tuberkelbazillen. Tôkoku J. Exptl. Med. **34**: 231-245.

National Institut of Health (NIH). Guide for the care and use of laboratory animals. Publication B6-23. Revised.

NISHIMURA, S., KAWAGUCHI, Y., KOHSAKA, K., and MORI, T. (1964). Contamination of healthy mice with murine leprosy like acid-fast bacillus. La Lepro. **33**: 245-256.

OGAWA, T., UCHIDA, M., and HIRAKI, M. (1974). Studies on murine leprosy bacillus. X. Rapid growing mycobacteria isolated from experimental murine leprosy mice. La Lepro. **43**: 102-107.

OLITZKI, A.L. (1974). Effect of inorganic and organic substances containing sulfur or nitrogen and of vitamins on the

growth rate of *Mycobacterium leprae*. Israel J. Med. Sci. 10: 519-524.

OLITZKI, A.L., OLITZKI, Z., and SHEUBSKY, M. (1945). Types of *Eberthella typhosa* in Palestine. Proc. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 39: 167-174.

PATTYN, S.R. (1973). The problem of cultivation of *Mycobacterium leprae*. A review with criteria for evaluating recent experimental work. Bull. Wld. Hlth. Org. 49: 403-410.

PATTYN, S.R. (1976). A mycobacterium strain isolated by O.K. Skinsnes from leprous tissue identified as *Mycobacterium scrofulaceum*. Lepr. Sci. Memoranda, Memo L-790.

PATTYN, S.R., and PORTAELS, F. (1980). *In vitro* cultivation and characterization of *Mycobacterium lepraemurium*. Int. J. Lepr. 48: 7-14.

PORTAELS, F., FRANCKEN, A., and PATTYN, S.R. (1982). Bacteriological studies of armadillo livers infected with *Mycobacterium leprae*. Ann. Soc. Belg. Med. Trop. 62: 233-245.

PORTAELS, F., and PATTYN, S. R. (1981). Parameters influencing the *in vitro* growth of *Mycobacterium lepraemurium*. Int. J. Lepr. 49: 194-197.

PRABHAKARAN, K. (1967). Oxidation of 3,4-dihydroxyphenylalanine by *M. leprae*. Int. J. Lepr. 35: 42-51.

RAMAKRISHNAN, T., INDIRA, M., and MALLER, R.K. (1962). Evaluation of the route of glucose utilization in virulent and avirulent strains of *Mycobacterium tuberculosis*. Biochim. Biophys. Acta, 59: 529-532.

RAMASESH, N., HASTINGS, R.C., and KRAHENBUHL, J.L. (1987). Metabolism of *Mycobacterium leprae* in macrophages. Infect. Immun. 55: 1203-1206.

RATLEDGE, C. (1982) Lipids: cell composition, fatty acid biosynthesis. In: The Biology of the Mycobacteria. vol.1, 53-93. Edited by C. Ratledge and J. Stanford. Academic Press, London.

REVSIN, B., and BRODIE, A.F. (1969). Carbon monoxide-binding

pigments of *Mycobacterium phlei* and *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **244**: 3101-3104.

REVSIN, B., MARQUEZ, E.D., and BRODIE, A.F. (1970). Cytochromes from *Mycobacterium phlei*. II. Ascorbate reduction of an isolated cytochrome ($a_1 + a_3$) (o) complex. Archs. Biochem. Biophys. **136**: 563-573.

SASAKAWA, T., and FUJI, Y. (1952). TCA cycle of tubercle bacillus. J. Biochem. (Tokyo) **39**: 34-35.

SCHOLES, P.B., and SMITH, L. (1968). Composition and properties of membrane-bound respiratory chain system of *Micrococcus denitrificans*. Biochim. Biophys. Acta, **153**: 363-375.

SHEPARD, C.C. (1960). The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot pads of mice. J. Exp. Med. **112**: 445-454.

SHEPARD, C.C., and McRAE, D.H. (1968). A method for counting acid-fast bacteria. Int. J. Lepr. **36**(1): 78-82.

SHUG, A.L., and GOLDMAN, D.S. (1960). Electron transferring particles from *Mycobacterium tuberculosis*. Fed. Proc. **19**: 26.

SKINSNES, O.K., MATSUO, E., CHANG, P.H.C., and ANDERSON, B. (1975). *In vitro* cultivation of leprosy bacilli on hyaluronic acid based medium. I. Preliminary report. Int. J. Lepr. **43**: 193-203.

SMITH, L. (1965). The Bacteria. Volume II. Metabolism. Academic Press, London, p 365-396.

STEFANSKY, W.K. (1903). Eine lepraahnliche erkrankung der Haut und der lymphdrusen bei wanderratten. Zentralbl. Bakteriол. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1: Orig. **33**: 481-487.

SZENTE, L., SZETLI, J., and KATO, L. (1992). Water soluble palmitic acid-cyclodextrin complex in media for cultivation of leprosy derived psychrophilic mycobacteria. International Cyclodextrin Symposium, 22-25 April, 1992. Chicago, U.S.A.

TABER, H.W., and MORRISON, M. (1964). Electron transport in Staphylococci. Properties of a particle preparation from experimental phase *Staphylococcus aureus*. Arch. Biochem.

Biophys. **105**: 367-379.

TANIGUCHI, S. and KAMEN, M.D. (1965). The oxidase system of heterotrophically grown *Rhodospirillum rubrum*. Biochim. Biophys. Acta, **96**: 395-428.

TEPPER, B.S. (1971). Problems in the cultivation of *Mycobacterium leprae*. Related cultivation and biochemical studies with *Mycobacterium lepraemurium*. Int. J. Lepr. **39**: 323-327.

TEPPER, B.S., and VARMA, K.G. (1972). Metabolic activity of purified suspensions of *Mycobacterium lepraemurium*. J. Gen. Microbiol. **73**: 143-152.

TODD, C.M. (1949). Occurrence of cytochrome and coproporphyrin in mycobacteria. Biochem. J. **45**: 386-390.

UMBREIT, W.W., BURRIS, R.H., and STAUFFER, J.F. (1964). Manometric Techniques. Burgess publishing Co. Minneapolis.

VESTAL, F.R., and PERRY, J.J. (1971). Effect of substrate on the lipids of the hydrocarbon utilizing *Mycobacterium vaccae*. Can. J. Microbiol. **17**: 445-449.

WEBBER, M.M., and ROSSO, G. (1963). Role of an unidentified factor involved in electron transport in *Mycobacterium phlei*. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. **50**: 710-717.

WHEELER, P.R. (1984a). Oxidation of carbon sources through the tricarboxylic acid cycle in *Mycobacterium leprae* grown in armadillo liver. J. Gen. Microbiol. **130**: 381-389.

WHEELER, P.R. (1984b). Metabolism in *Mycobacterium leprae*: Its relation to other research on *M. leprae* and to aspects of metabolism in other mycobacteria and intracellular parasites. Int. J. Lepr. **52**: 208-230.

WHEELER, P.R. (1987a). Biosynthesis and scavenging of purines by pathogenic mycobacteria including *Mycobacterium leprae*. J. Gen. Microbiol. **133**: 2999-3011.

WHEELER, P.R. (1987b). Enzymes for purine synthesis and scavenging in pathogenic mycobacteria and their distribution in *Mycobacterium leprae*. J. Gen. Microbiol. **133**: 3013-3018.

WHEELER, P.R., BHARADWAJ, V.P., and GREGORY, D. (1982). N-acetyl β -glucosamidase, β -glucuronidase and acid phosphatase in *Mycobacterium leprae*. J. Gen. Microbiol. **128**: 1063-1071.

WHEELER, P.R., BLUMER, K., and RATLEDGE, C. (1990) Enzymes for biosynthesis de novo and elongation of fatty acids in mycobacteria grown in host cells: is *Mycobacterium leprae* competent in fatty acid biosynthesis? J. Gen. Microbiol. **136**: 211-217.

WHEELER, P.R., and RATLEDGE, C. (1988). Use of carbon sources for lipid biosynthesis in *Mycobacterium leprae*: a comparison with other pathogenic mycobacteria. J. Clin. Microbiol. **134**: 2111-2121.

YAMAMURA, Y., KUSUNOSE, M., NAGAI, S., and KUSUNOSE, E. (1954). Studies on the tricarboxylic acid cycle in tubercle bacillus. I. Some properties of enzyme systems. J. Biochem. (Tokyo) **41**: 513-528.

YOUMANS, A.S., MILLMAN, I., and YOUMANS, G.P. (1956). The oxidation of compounds related to the tricarboxylic acid cycle by whole cells and enzyme preparations of *Mycobacterium tuberculosis* var hominis. J. Bacteriol. **71**: 565-570.

YOUMANS, A.S., and YOUMANS, G.P. (1953). Studies on the metabolism of *Mycobacterium tuberculosis*. II. The effect of compounds related to the Krebs' tricarboxylic acid cycle in the growth of *Mycobacterium tuberculosis* var hominis. J. Bacteriol. **63**: 96-99.