

SUR LA BIOSYNTHESE DE LA
 β -GALACTOSIDASE (LACTASE) CHEZ *ESCHERICHIA COLI*.
LA SPECIFICITE DE L'INDUCTION*

par

JACQUES MONOD, GERMAINE COHEN-BAZIRE
ET MELVIN COHN**

Service de Physiologie Microbienne, Institut Pasteur, Paris (France)

I. INTRODUCTION

Réduites à l'essentiel les hypothèses envisagées pour expliquer le phénomène d'induction spécifique qui caractérise l'adaptation enzymatique se ramènent à trois:

a. *Hypothèse "fonctionnelle"*. La synthèse de l'enzyme est liée à son activité. L'inducteur agit donc en tant que substrat. Cette hypothèse a été envisagée par DUBOS¹ et forme le point de départ des spéculations de HINSHELWOOD². Le fait qu'elle ait été exprimée parfois sous une forme naïvement finaliste^{3,4} ne saurait, en soi, la discréder.

b. *Hypothèse de l'équilibre*. La synthèse de l'enzyme est limitée par un équilibre dynamique. Celui-ci est rompu lorsque l'enzyme se trouve engagé dans un complexe spécifique. Cette idée a été formulée d'abord par YUDKIN⁵, puis sous une autre forme par SPIEGELMAN⁶ et par MONOD^{7,8}.

c. *Hypothèse "formatrice"*. L'inducteur a un rôle organisateur ou formateur dans la synthèse de l'enzyme. Il intervient donc par une combinaison (transitoire ou non) avec un précurseur de l'enzyme. Cette hypothèse a été considérée par MONOD^{9,10} et par EMERSON¹¹ entre autres.

Chacune de ces trois hypothèses conduit à des conclusions différentes concernant les relations entre les propriétés inductrices d'une substance donnée et ses propriétés à l'égard de l'enzyme. Si la première hypothèse était exacte, seuls les substrats de l'enzyme pourraient en induire la formation. Dans la seconde hypothèse, l'activité inductrice serait liée à l'affinité de l'inducteur pour l'enzyme mais elle serait indépendante de l'activité enzymatique. Les inhibiteurs compétitifs de l'enzyme aussi bien que les substrats devraient en induire la formation. Enfin, dans la troisième hypothèse, ni l'affinité spécifique ni la propriété de substrat ne serait nécessaire ou suffisante pour qu'un corps soit doué d'inductivité. Mais on devrait s'attendre à ce que l'inductivité soit liée à la possession d'une certaine configuration chimique "minimum".

Aucune de ces hypothèses n'ayant pu jusqu'à présent être exclue par des expériences rigoureuses^{7,13,14}, nous nous sommes proposés d'utiliser les propriétés particulièrement favorables de la β -galactosidase (lactase) d'*E. coli* pour réunir les données nécessaires

* Ce travail a bénéficié d'une subvention du National Institute of Health, Bethesda, Maryland, U.S.A.

** Boursier du National Research Council des Etats-Unis (Fondation Merck).

Bibliographie p. 599.

à un choix. Cet enzyme typiquement adaptatif^{15,8} a été isolé par MONOD, TORRIANI ET GRIBETZ¹⁶. Ses propriétés biochimiques ont été décrites par LEDERBERG¹⁷, COHN ET MONOD¹⁸, COHEN-BAZIRE ET MONOD¹⁹. Il s'agit d'une hydrolase spécifique de la configuration β -D-galactosidique, activée par les cations monovalents. L'enzyme a été obtenu à l'état purifié permettant l'analyse de ses propriétés physiques¹⁸. COHN *et al.*^{20,21} ont étudié en détail ses propriétés immunologiques. Ils ont démontré ainsi d'une façon rigoureuse qu'une protéine nouvelle était synthétisée au cours de l'adaptation et ils ont identifié une autre protéine qui semble être un précurseur de l'enzyme.

On trouvera ici des données sur une série de dérivés du galactose en tant qu'inducteurs de la β -galactosidase chez *E. coli*, ainsi que sur les propriétés de ces mêmes substances (affinité, hydrolyse) en présence d'une préparation purifiée de l'enzyme. Nous nous sommes attachés plus particulièrement à analyser quelques cas où il y avait dissociation entre affinité, activité et inductivité. Les résultats les plus probants ont été obtenus grâce à un analogue stérique qui s'est révélé un puissant inhibiteur spécifique de la β -galactosidase: le phényl- β -D-thiogalactoside.

Indiquons dès maintenant que les observations faites sont incompatibles avec l'hypothèse d'équilibre aussi bien qu'avec l'hypothèse fonctionnelle.

II. MATERIELS ET TECHNIQUES

Produits commerciaux

Le maltose, le lactose, le raffinose, le mélibiose, le cellobiose, et le D-galactose étaient des produits Pfanstiehl C.P. Le D-galactose, quoiqu'il fut étiqueté "glucose free" contenait environ 1.5% de glucose; après trois recristallisations à partir de l'alcool à 80°, il n'en contenait plus en quantité décelable par la technique à la notatine²². Le D-mannose, le D-xylose, et le L-arabinose étaient des produits Roche. Les sels minéraux étaient des produits Poulenc "pour analyses".

Produits de synthèse

Les produits suivants nous ont été envoyés par M. STACEY (Birmingham): 2-désoxygalactose, 1-2-désoxygalactose, méthyl- β -L-arabinoside, méthyl- β -D-glucoside, mannose- β -D-galactoside.

Les produits suivants ont été mis à notre disposition par M. D. J. BELL (Cambridge): galactose purifié, méthyl- α -D-galactoside, 2-méthyl- β -D-galactose, 2-6-diméthyl- β -méthyl-D-galactoside, 3-4-diméthyl- β -méthyl-D-galactoside, 2-4-6-triméthyl- β -méthyl-D-galactoside, β -galactosane, D-tagatose.

M. J. LEDERBERG (Madison) nous a envoyé l'*o*-nitrophényl- α -L-arabinoside.

Nous avons synthétisé les produits suivants par les techniques données en référence à chacun: méthyl- β -D-galactoside²³; butyl- β -D-galactoside²³; phényl- β -D-galactoside²⁵; naphtyl- β -D-galactoside²⁶; *p*-amino-phényl- β -lactoside²⁶; D-fucose²⁷; acide galacturonique et galacturonate de méthyle²⁸. L'*o*-nitrophényl- β -D-galactoside a été synthétisé par une technique très semblable à celle qu'ont récemment publiée SEIDMANN ET LINK²⁹. Nous pouvons confirmer les valeurs des constantes données par ces auteurs.

Le phényl- β -D-thiogalactoside (P.F. 112-113° C) a été obtenu par la technique inaugurée par FISHER³¹ pour la synthèse du phényl- β -D-thioglucoside.

Souches bactériennes

Nous avons utilisé principalement un mutant dérivé de la souche ML¹⁶ d'*E. coli*. Ce mutant (ML 32.400) était de phénotype M⁺L⁺Gal⁻. Nous avons aussi utilisé un mutant (ML 30) de phénotype M⁺L⁺Gal⁺. Rappelons que ces phénotypes sont définis⁸ comme la capacité (+) ou l'incapacité (-) de former des colonies normales sur milieu solide contenant le glucide en question (M = maltose, L = lactose, Gal = galactose) comme seul aliment carboné.

Milieux et conditions de culture

Nous avons employé le milieu minéral "56" (PO₄KH₂ 13.6 g; SO₄(NH₄)₂ 2 g; SO₄Mg.7H₂O 0.2 g; Cl₄Ca 0.01 g; SO₄Fe.7H₂O 0.0005 g; KOH qsp. PH 7.4, H₂O 1000) additionné de maltose (2 mg/ml) pour les cultures d'entretien. Pour les cultures d'expérience la nature et la concentration des glucides ajoutés sont spécifiées dans chaque cas. Les glucides étaient stérilisés à part, par filtration. Les cultures étaient faites en fioles coniques agitées pendant 15 h à 37°. Elles étaient entretenues sur ce

milieu par repiquages hebdomadaires, et conservées entre temps à 0°. Les cultures ainsi préparées ont une densité bactérienne tout à fait constante, équivalent à 0.7 mg de poids sec par ml environ (*cf.* ci-dessous).

Expérience de croissance

On utilisait des tubes en T inversé, à faces parallèles, de 10 × 10 × 150 mm (dimensions intérieures) contenant 3 ml de milieu,ensemencés par dilution au 1/100e d'une culture de la veille. Les tubes oscillaient de 5° environ autour de l'horizontale, au sein d'un thermostat à eau porté à 37°. Pour les mesures de densité optique les tubes étaient placés verticalement (verticalement s'entend de la barre du T) dans un support spécial adapté à l'électrophotomètre de Meunier. Le taux de croissance était déterminé, lorsqu'il y avait lieu, par interpolation graphique des points expérimentaux correspondant à la phase exponentielle (*cf.* 32). Il est exprimé en nombre de doublements à 'heure (d/h). Le poids sec de substance bactérienne par ml de milieu était calculé à partir de la densité optique à l'aide d'un facteur de conversion déterminé une fois pour toutes.

Expériences d'induction

Une culture de 15 h était diluée au 1/100 dans du milieu neuf à 2 mg de maltose par ml. La suspension était répartie par 9 ml dans des fioles coniques de 50 ml contenant 1 ml d'une solution du corps à essayer à la concentration voulue. Ces fioles étaient agitées à 37° dans un thermostat à eau pendant 5 h. Les fioles étaient alors additionnées de toluène et agitées encore pendant 20 minutes à 37°. Auparavant on avait déterminé la densité optique dans chaque fiole. Elle était du reste la même pour les fioles d'une même série, sauf avec quelques dérivés doués d'une certaine toxicité (aryl-galactosides) et variait peu d'une série à l'autre. Ces suspensions étaient utilisées directement pour les mesures d'activité.

Mesure de l'activité enzymatique induite

Les mesures de l'activité β -galactosidique des suspensions bactériennes étaient faites en présence d'*o*-nitrophényl- β -D-galactoside (niphégal) comme substrat^{17,18}. Dans les cuves à faces parallèles du spectrophotomètre Beckman on mélangeait 0.25 ml de la suspension bactérienne toluénisée et 1 ml d'une solution contenant: niphégal M/300, NaCl M/8, cacodylate de triéthanolamine (*cf.* 18) M/10, pH 7. On suivait ensuite, de minute en minute, l'accroissement d'absorption à 420 m μ résultant de la libération de l'*o*-nitrophénol. La chambre de mesures du spectrophotomètre était maintenue à 28°. Immédiatement avant l'emploi les solutions étaient amenées à 28° dans un thermostat.

On remarquera que les suspensions bactériennes n'étaient pas lavées. Elles contenait donc, outre les composants du milieu 56, les divers inducteurs essayés dont certains, possédant de l'affinité pour l'enzyme, auraient pu agir comme inhibiteurs. Toutefois, leur concentration dans le mélange final ne dépassait jamais $2 \cdot 10^{-4}$ M et leur présence ne pouvait affecter sensiblement les mesures. La concentration d'ion Na⁺ dans le mélange final était suffisante pour saturer l'enzyme, sans possibilité d'interférence sensible par les autres cations monovalents présents (*cf.* 18, 19). Les activités sont exprimées en millimicromol. de niphégal hydrolysé par minute par mg de substance bactérienne sèche, cette dernière valeur étant calculée à partir de la densité optique à l'aide d'un facteur de conversion.

*Mesure d'activité et d'affinité *in vitro**

Pour les mesures d'activité et d'affinité *in vitro* nous avons utilisé la préparation de β -galactosidase purifiée décrite par COHN ET MONOD¹⁸. Les mesures étaient faites dans les mêmes conditions que ci-dessus. Pour les déterminations d'affinité on faisait deux séries de mesures, l'une avec niphégal M/300, l'autre avec niphégal M/1200, d'une part en l'absence puis en présence du corps à essayer à plusieurs concentrations, choisies de façon à obtenir des inhibitions de l'ordre de 50%. L'affinité spécifique du corps en question pour l'enzyme, par rapport à celle du niphégal prise arbitrairement égale à 1000, était calculée à partir de ces données, en appliquant les relations tirées de l'équation de MICHAELIS et en utilisant une méthode de détermination graphique des constantes^{24,33}.

III. OBSERVATIONS EXPERIMENTALES

A. *Pouvoir inducteur, affinité, hydrolyse*

Le Tableau I résume l'ensemble de nos données sur le pouvoir inducteur, l'affinité et l'hydrolyse d'une série de corps comprenant des galactosides des séries α et β , des dérivés du galactose par substitution, oxydation ou réduction, ainsi que quelques autres glucides. La nature et la signification de ces données appellent quelques commentaires.

TABLEAU I

ESSAIS DE GLUCIDES COMME INDUCTEURS DE LA β -GALACTOSIDASE

Glucides	Induction Activité induite: ($m\mu M \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$)			Propriétés à l'égard de l'enzyme <i>in vitro</i>		Utilisation comme source de C	
	conc. mol inducteur			affinité relative	hydrolyse		
	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}				
Galactose	420	84	0	30	+	o	
β -D-galactosides							
méthyl-	2.800	420	140	10	+	o	
n-butyl-	2.800	1.200		400	+	o	
phényl-	560	420		600	+	o	
o-nitrophényl- (niphégal)	1.060			1.000	+	o	
naphtyl-	42			200	+	o	
4-glucose- (lactose)	2.500	840	210	100	+	+	
mannose-	2.500	700		10	+		
4(<i>p</i> -aminophényl- β -glucosido)-	2.200			100	+		
β -D-thiogalactoside							
phényl-	0	0	0	700	o	o	
α -D-galactosides							
méthyl-	140	20	8		o	o	
6-glucose- (mélibose)	2.400	1.960	18	o	o	o	
6-sucrose- (raffinose)	0	0	0	o	o	o	
Substitutions en 2, 3, 4 et 6:							
2-méthyl- β -méthyl-D-galactoside	20			o	o		
2-6-diméthyl- β -méthyl-D-galactoside	0	0	0	o	o		
3-4-diméthyl- β -méthyl-D-galactoside	0			o	o		
2-4-6-triméthyl- β -méthyl-D-galactoside	0			o	o		
Dérivés par réduction							
2-désoxygalactose	0			10		o	
1-2-désoxygalactose	0			>0		o	
6-désoxygalactose (D-fucose)	0			o		o	
Oxydation en 6:							
acide D-galacturonique	0			o		+	
D-galacturonate de méthyle	0			o		o	
Suppression du carbone 6							
L-arabinose	0			>0	o	+	
méthyl- β -L-arabinoside	0			o			
o-nitrophényl- α -L-arabinoside	0			50	+		
Glucides ne présentant pas le cycle galactosidique							
D-xylose	0			o		+	
D-tagatose	0			o		o	
D-mannose	0			o		+	
D-glucose	0			o		+	
méthyl- β -D-glucoside	0			o		o	
maltoze	0			o	o	+	
cellobiose	0			o	o	o	

Technique des mesures d'induction: v.p. 587. "L'affinité relative" était déterminée par mesure de l'inhibition compétitive de l'hydrolyse du niphégal à 28° par la β -galactosidase purifiée en présence de NaCl M/24. L'affinité du niphégal est prise arbitrairement égale à 1.000. Les essais d'hydrolyse étaient faits à 28° avec une solution concentrée d'enzyme (cent fois la concentration utilisée pour les mesures d'activité en niphégal) et poursuivis pendant 12 heures, après quoi on déterminait le pouvoir réducteur par la méthode de SOMOGYI. "L'utilisation comme source de carbone" se réfère aux résultats de cultures en milieu 56 (37° pendant 48 heures) avec 2 à 5% du corps considéré comme seul aliment carboné.

Il faut d'abord remarquer que les chiffres de la colonne "Induction" représentent simplement le niveau d'activité induite après 5 heures de culture en présence du dérivé correspondant. Ils ne peuvent pas être considérés comme donnant à proprement parler une mesure du pouvoir inducteur. La définition d'une telle grandeur n'est pas aisée et nous aurons à revenir sur ce sujet. De plus, en ce qui concerne les galactosides hydrolysables, leur concentration pouvait diminuer sensiblement pendant les 5 heures de la culture. La comparaison des activités obtenues à plusieurs concentrations des inducteurs montre cependant que cette cause d'erreur n'entre pas en ligne de compte du moment que ces données sont considérées simplement comme établissant une classification. Notons que même en l'absence d'inducteur les suspensions bactériennes présentent toujours une trace d'activité β -galactosidasique^{17, 18} correspondant à environ 3 unités. Cette faible activité "de base" est notée "o" dans le Tableau I.

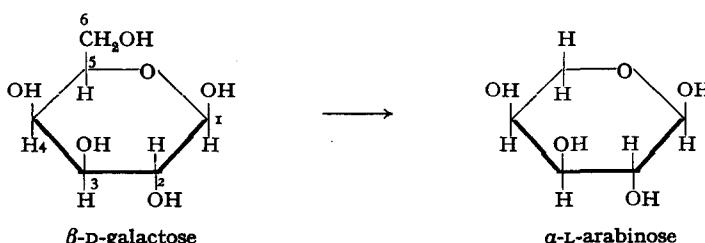
Les affinités sont définies en valeurs relatives par rapport à l'*o*-nitrophényl- β -D-galactoside (niphégal) pris comme substrat de référence. La technique consistait à mesurer la compétition entre le niphégal et le corps considéré en présence de galactosidase purifiée. Les affinités relatives ainsi définies sont remarquablement constantes, alors que l'affinité absolue varie beaucoup suivant les préparations¹⁹. D'autre part, non seulement l'affinité absolue pour le niphégal¹⁷ mais aussi les affinités relatives varient avec la nature et la concentration des cations monovalents¹⁹. Les résultats donnés sont donc valables seulement dans les conditions données, c'est à dire en présence de $\text{Na}^+ M/24$. Dans la colonne "hydrolyse" nous n'avons noté que des données qualitatives. Indiquons cependant que d'une façon générale l'activité hydrolytique et l'affinité vont grossièrement de pair (exception faite naturellement pour le phényl- β -thiogalactoside).

Compte tenu de ces remarques, nous pouvons maintenant considérer les résultats dans leur ensemble. Les propositions suivantes en résument les conclusions essentielles.

1. *L'inductivité d'un composé n'est pas liée à son utilisation métabolique.* Le galactose lui-même, les aryl et alkyl- β -galactosides, ainsi que le mélibiose et le méthyl- α -galactoside en donnent des exemples: ce sont des inducteurs efficaces, encore qu'ils ne soient pas utilisés pour la croissance.

2. *L'inductivité n'est pas liée à la propriété de substrat de l'enzyme.* Les exemples du méthyl- α -galactoside et surtout du mélibiose indiquent que la qualité de substrat de l'enzyme n'est pas une condition nécessaire de l'inductivité. Le cas de l'*o*-nitrophényl- α -L-arabinoside indique que ce n'est pas non plus une condition suffisante.

3. *L'inductivité est associée à la présence d'un radical galactosidique intact, en liaison β ou α .* Cette condition paraît certainement nécessaire et pourrait même être considérée comme suffisante, n'était le cas du raffinose. On voit, en effet, que tous les dérivés substitués, oxydés ou réduits en 2, 3, 4 et 6 sont non inducteurs. Il en est de même du L-arabinose et des L-arabinosides qui dérivent du D-galactose par suppression du carbone 6:



Le 2-méthyl- β -méthyl-D-galactoside peut sembler faire exception à cette règle. Nous pensons cependant que la faible inductivité montrée par ce produit doit être attribuée à une impureté: il suffirait de 1% de méthyl- β -galactoside pour en rendre compte. La quantité dont nous disposions était trop faible pour nous permettre les vérifications nécessaires.

4. *L'inductivité est indépendante de l'affinité.* D'une manière générale, il n'y a aucun parallélisme entre les valeurs de l'activité induite et celles de l'affinité. Mais surtout l'affinité n'est pas, comme l'inductivité, associée exclusivement au radical galactosidique intact. Les dérivés réduits en 2 et 3, ainsi que l'arabinose et l'*o*-nitrophényl- α -L-arabinoside conservent une affinité notable. (Encore que très faibles les affinités de l'arabinose et du 1-2-désoxygalactose sont presque certainement authentiques). Enfin et surtout le phényl- β -D-thiogalactoside est dépourvu de toute inductivité, alors qu'il est doué d'une haute affinité.

Il faut souligner que certains résultats récemment obtenus par SPIEGELMAN³⁷ (et communication personnelle) et concernant l'induction de la formation de maltase chez la levure, en présence de méthyl- α -D-glucoside, sont en accord avec la proposition 4 ainsi qu'avec la proposition 1. D'autre part, des observations de J. LEDERBERG (communication personnelle) sur le pouvoir inducteur d'un certain nombre de galactosides dans la souche K 12 d'*E. coli* paraissent être en accord avec ces conclusions, et plus particulièrement avec la proposition 2.

Il est clair que la proposition 1 et plus rigoureusement la proposition 2 sont incompatibles avec l'hypothèse fonctionnelle. La proposition 4 est incompatible avec l'hypothèse d'équilibre. Mais on ne pourrait adopter ces conclusions que dans la mesure où d'autres interprétations possibles des principaux faits se trouveraient éliminées. Nous allons maintenant examiner de plus près les cas cruciaux, à savoir ceux du galactose, du mélibiose et du phényl- β -D-thiogalactoside.

B. *Le galactose et le mélibiose comme inducteurs*

Nous nous arrêterons brièvement au cas du galactose qui n'est pas le plus probant. A l'interprétation directe des données du Tableau I concernant le galactose on peut opposer trois objections principales.

1. L'activité inductrice pourrait être due à une impureté. Cette objection est sérieuse en raison de l'inductivité assez faible du galactose et du fait que certains inducteurs agissent au contraire à concentrations très faibles ($M 10^{-5}$ ou moins). Cependant, la recristallisation du galactose commercial ne modifie pas son activité inductrice qui est sensiblement égale à celle d'un échantillon de galactose spécialement préparé (par M. D. J. BELL) à partir de pentacétylgalactose plusieurs fois recristallisé. Il est donc très peu vraisemblable que l'activité inductrice du galactose soit due à une impureté.

2. Si le galactose n'est pas utilisable par cette souche comme seul aliment carboné, n'est-il pas cependant métabolisable dans une certaine mesure? Mentionnons à ce propos les résultats suivants: a. la croissance totale³² de notre souche en fonction de la concentration d'un aliment carboné tel que le glucose ou le maltose est quantitativement la même en présence ou en absence de galactose ajouté au milieu; b. la croissance totale avec du lactose comme aliment limitant est exactement la moitié de celle de la souche galactose-positive; c. le pouvoir réducteur du milieu en fin de croissance correspond à la quantité théorique de galactose libérable à partir du lactose; d. la consommation d'oxygène de ces bactéries en présence de galactose ne diffère pas de celle d'un témoin

sans aliment carboné, et cela même si l'on emploie une souche précédemment cultivée en présence de galactose.

Le galactose n'est donc pas utilisable par cette souche, même partiellement. En outre, il n'est évidemment pas hydrolysé par l'enzyme. Mais, étant donné la réversibilité de l'action des glucosidases³⁴ on ne peut pas considérer que le galactose ne soit pas un substrat de l'enzyme. En présence de galactose libre la galactosidase pourrait donc avoir une certaine activité qui cependant ne se traduirait par aucune conséquence métabolique.

L'exemple du galactose démontre donc la proposition 1 mais non pas la proposition 2.

Le mélibiose est un inducteur très actif, ce qui rend peu vraisemblable l'hypothèse que son inductivité soit due à une impureté. L'activité enzymatique induite en fonction de la concentration du mélibiose est donnée par la Fig. 1. On voit que cette courbe n'est

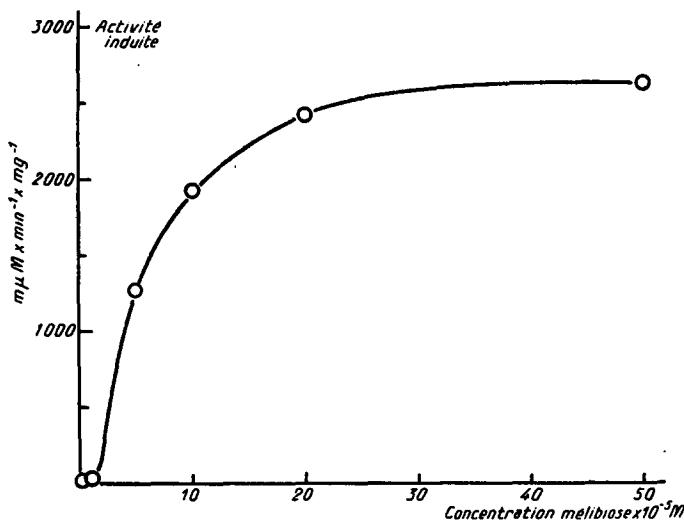


Fig. 1. Induction en fonction de la concentration de mélibiose. Technique voir p. 587

pas strictement hyperbolique, mais présente un point d'inflexion assez net. Nous avons obtenu des courbes analogues avec d'autres inducteurs tels que le lactose, et le galactose. Avec d'autres comme le β -méthyl-galactoside, on obtient des hyperboles s'extrapolant à l'origine des coordonnées. Nous reviendrons ailleurs sur la signification de ces relations. En tout cas, la courbe en S ne signifie pas que l'induction soit due à une impureté. Le traitement préalable du mélibiose par une solution concentrée de galactosidase pendant plusieurs heures ne modifie pas son activité inductrice (Tableau II). Celle-ci ne pourrait donc pas être attribuée à un β -galactoside particulièrement actif qui serait présent à l'état de trace dans le mélibiose puisqu'un tel traitement détruirait ce galactoside avec libération de galactose dont l'inductivité serait trop faible pour se manifester à de telles concentrations (*cf.* Tableau I).

Le fait que le raffinose, trisaccharide qui contient un radical mélibiose, soit totalement inactif comme inducteur, permet de démontrer d'une manière particulièrement satisfaisante que l'activité du mélibiose est réelle. En effet, si l'activité inductrice du mélibiose est due à une impureté, celle-ci est absente de notre échantillon de raffinose. Or, par hydrolyse acide ménagée, il est facile de rompre la liaison fructofuranosidique

TABLEAU II
INDUCTION DE LA GALACTOSIDASE PAR LE MÉLIBIOSE
(EXPÉRIENCES DE CONTRÔLE)

Conc. moléculaire	Activités ($m\mu M \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$) après induction en présence de :			
	mélibiose	mélibiose traité par la galactosidase	raffinose	raffinose hydrolysé
10^{-5}	18	16	4	20
10^{-4}	1980	1800	4	2300
10^{-3}	2300	2500	4	2100

Témoin sans inducteur: 3

Technique d'expérience, v. p. 587. Le "mélibiose traité par la galactosidase" avait été, avant l'essai, traité pendant 10 heures à 28° par une solution concentrée de β -galactosidase purifiée, puis porté à l'ébullition pendant 5 minutes. Le "raffinose hydrolysé" avait été, avant l'essai, traité par HCl N/200, pendant 5 heures à l'ébullition avec reflux. Après ce traitement la valeur réductrice de la solution était sensiblement égale à celle d'un mélange équimoléculaire de fructose et de mélibiose.

du raffinose sans toucher sensiblement à la liaison galactosidique du mélibiose, qui est ainsi libéré. Les résultats consignés dans le Tableau II montrent qu'une solution de

raffinose hydrolysée de cette façon possède une activité inductrice aussi élevée qu'une solution équivalente de mélibiose, alors qu'avant l'hydrolyse son activité inductrice est nulle.

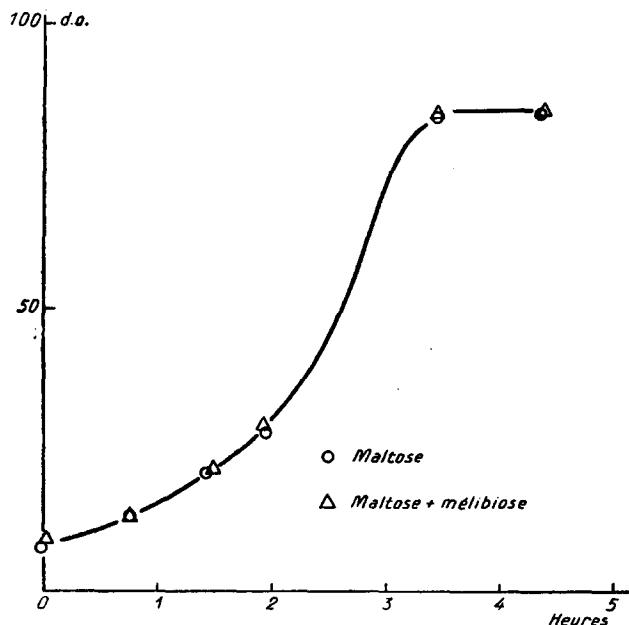


Fig. 2. Croissance en présence de maltose (conc. finale 0.1%) comme aliment limitant, avec ou sans addition de mélibiose (conc. finale 0.34%). La présence du mélibiose ne se traduit par aucun effet sur la courbe de croissance.

Le mélibiose doit donc être considéré comme un inducteur authentique. D'autre part, il nous a été impossible de déceler le moindre métabolisme du mélibiose. L'expérience résumée par la Fig. 2 montre qu'il n'est strictement pas utilisé pour la croissance. Dans d'autres expériences, après 15 heures d'incubation à 37°, en présence d'une suspension bactérienne épaisse, le mélibiose ajouté se retrouvait intact, d'après le dosage du sucre réducteur. Il n'y a pas de consommation d'oxygène en présence de mélibiose,

même après "adaptation". Nous n'avons jamais pu isoler de mutants qui l'utilisent. Enfin, il est certain que le mélibiose n'est à aucun degré hydrolysé par la β -galactosidase, ce qui ne saurait surprendre puisqu'on sait depuis longtemps que la configuration α - β est l'un des principaux éléments de la spécificité des glucosidases⁸⁵.

L'exemple du mélibiose démontre donc la proposition 2 aussi bien que la proposition 1. Il semble que cet exemple démontre aussi que l'affinité n'est pas une condition nécessaire de l'inductivité, puisque, d'après le résultat noté au Tableau I l'affinité du mélibiose pour l'enzyme est nulle. Si l'on se reporte aux résultats du Tableau III on verra que cette question est en réalité fort complexe. L'inhibition non compétitive de la galactosidase par le mélibiose est extrêmement marquée; une légère inhibition compétitive semble se manifester en présence de K^+ , mais non pas en présence de Na^+ ; de plus, ces inhibitions ne satisfont aucune relation simple. On ne peut donc pas affirmer que le mélibiose soit dépourvu d'affinité spécifique pour la galactosidase.

TABLEAU III

INHIBITION DE LA β -GALACTOSIDASE PAR LE MÉLIBIOSE EN PRÉSENCE DE Na^+ OU K^+

Mélibiose conc. mol $\times 10^{-3}$	Niphégal conc. mol $\times 10^{-3}$	Mesures effectuées en présence de:										
		$Na^+ (M/24)$						$K^+ (M/24)$				
		0	12.5	25	0	12.5	25	Activité	Inhibition %	Activité	Inhibition %	
		Activité	Inhibition %	Activité	Inhibition %	Activité	Inhibition %	Activité	Inhibition %	Activité	Inhibition %	
3.33	90	0	50	44	28	69	54	0	39	28	33	39
1.33	89	0	59	34	41	54	51	0	29	43	15	70
0.83	83	0	55	34	42	50	39	0	21	46	15	62

Technique d'expérience: v. p. 587. Activités = lectures directes exprimées en $m\mu M$ de niphégal hydrolysé par minute. L'inhibition pour cent (%) est calculée par rapport à l'activité à même concentration de niphégal et sans mélibiose.

C. Le phényl- β -D-thiogalactoside comme inhibiteur de la galactosidase

Le cas du phényl- β -D-thiogalactoside est important, en premier lieu parce qu'il démontre qu'une inductivité nulle peut être associée à une haute affinité spécifique. Les résultats exprimés par la Fig. 3 montrent que l'inhibition de la β -galactosidase par ce thiogalactoside est typiquement compétitive. Son affinité par rapport à celle du niphégal prise arbitrairement égale à 1000 est de 700 en sodium, de 250 en potassium. Nous avons vérifié par dosage des sucres réducteurs ainsi que par le test au nitroprussiate qu'il n'était pas hydrolysé par les préparations purifiées de galactosidase. Il n'est pas utilisé pour la croissance (par les bactéries galactose-positives) ce qui démontre qu'il n'est pas non plus hydrolysé *in vivo*.

Il importe de vérifier que le thiogalactoside se combine *in vivo* avec la galactosidase. L'expérience résumée par la Fig. 4 montre que le thiogalactoside inhibe compétitivement *in vivo* l'hydrolyse du niphégal. L'affinité relative apparente est dans ce cas de l'ordre de 500. De plus, le thiogalactoside inhibe compétitivement la croissance des bactéries lorsque celle-ci a lieu aux dépens d'un glucide métabolisé par l'intermédiaire de la

β -galactosidase, lactose ou β -méthyl-galactoside. Son influence est négligeable lorsque la source carbonée n'est pas un β -galactoside (Tableaux IV et V).

D'après ces données, l'affinité apparente *in vivo* du thiogalactoside serait supérieure à celle du β -méthyl-galactoside, mais inférieure à celle du lactose. Les relations d'affinité sont donc bien différentes *in vivo* et *in vitro*. On ne saurait en être surpris. Ces observations démontrent en tout cas que le thiogalactoside se combine fortement *in vivo* avec la β -galactosidase et confirment ainsi la proposition 4.

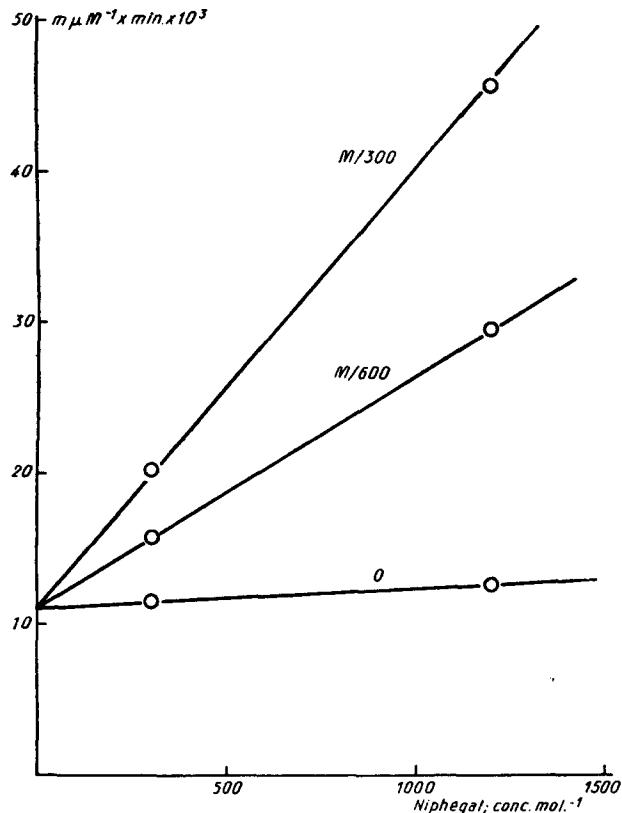


Fig. 3. Inhibition de la β -galactosidase *in vitro* par le phényl- β -D-thiogalactoside. Inverse de l'activité en fonction de l'inverse de la concentration de substrat (niphégal) avec o, M/600 et M/300 de phényl- β -D-thiogalactoside. On employait une dilution de la préparation de β -galactosidase purifiée. La concurrence des droites d'interpolation en un même point sur l'ordonnée démontre que l'inhibition est strictement compétitive (*cf.* Fig. 4). Technique de mesures v.p. 587

Grâce à cette propriété, le thiogalactoside peut être employé pour vérifier également la proposition 2, ou plus exactement son corollaire, à savoir que la biosynthèse de l'enzyme ne dépend pas de l'activité de l'enzyme préexistant. En effet, si la proposition inverse (c'est à dire l'hypothèse "fonctionnelle") était exacte, tout inhibiteur compétitif de l'activité enzymatique devrait également inhiber compétitivement l'adaptation. Les expériences données dans les Tableaux VI et VII montrent que si le thiogalactoside inhibe effectivement l'adaptation, cette inhibition n'est strictement pas compétitive. Au contraire, pourrait-on dire, puisque le pourcentage d'inhibition à une concentration

donnée de thiogalactoside s'accroît avec la concentration de l'inducteur, qu'il s'agisse du méthyl- β -D-galactoside ou du mélibiose.

Ces résultats sont évidemment incompatibles avec l'hypothèse "fonctionnelle" comme d'ailleurs avec toute hypothèse selon quoi l'induction serait liée à la formation d'un complexe enzyme-inducteur.

Encore voudrait-on comprendre ce que signifie l'inhibition non compétitive observée avec le thiogalactoside. Les données présentées ici ne permettent pas de spéculer utilement sur cette question sur laquelle nous reviendrons ultérieurement.

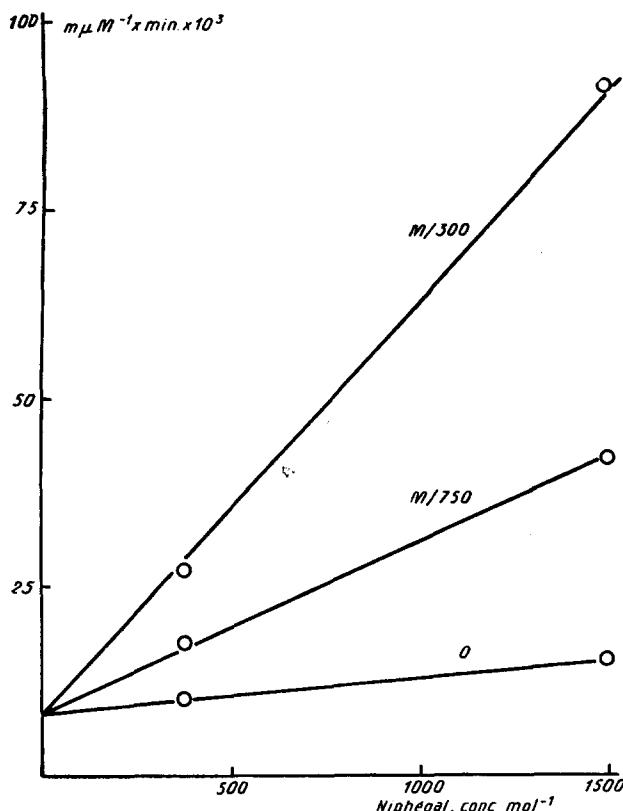


Fig. 4. Inhibition de la β -galactosidase *in vivo* par le phényl- β -D-thiogalactoside. Inverse de l'activité en fonction de l'inverse de la concentration de substrat (niphégal) avec 0, M/750 et M/300 de phényl- β -thiogalactoside. On employait une suspension bactérienne vivante, c'est à dire non traitée par le toluène. Ici encore l'inhibition est strictement compétitive (*cf.* Fig. 3)

IV. CONCLUSIONS

Indépendamment de toute hypothèse proprement dite sur le mécanisme de l'adaptation enzymatique, on doit admettre que, pour exercer son action, l'inducteur spécifique se combine (transitoirement ou non) avec un constituant cellulaire que nous appellerons Z. Le problème de l'identité du constituant Z se pose donc d'emblée. Le fait que dans la très grande majorité des cas reconnus d'adaptation enzymatique, l'inducteur

TABLEAU IV

ACTION DU PHÉNYL- β -THIOGALACTOSIDE SUR LA CROISSANCE EN LACTOSE ET EN MALTOSE

Lactose conc. mol $\times 10^{-3}$	Phényl- β - thiogalactoside conc. mol $\times 10^{-3}$	Taux de croissance d/h	Inhibition pour cent
10 10	0	1.1	—
	4	1.08	2
2 2	0	1.1	—
	4	0.9	18
1 1	0	1.0	—
	4	0.29	61
0.5 0.5	0	1.0	—
	4	0.1	90
Maltose conc. mol $\times 10^{-3}$			
10 10	0	1.0	—
	4	1.0	0
0.5 0.5	0	0.9	—
	4	0.9	0

Technique: voir p. 587.

TABLEAU V

ACTION DU PHÉNYL- β -THIOGALACTOSIDE SUR LA CROISSANCE EN MÉTHYL- β -GALACTOSIDE

Méthyl- β - galactoside conc. mol $\times 10^{-3}$	Phényl- β - thiogalactoside conc. mol $\times 10^{-3}$	Taux de croissance d/h	Inhibition pour cent
100 100	0	0.83	—
	4	0.76	9
10 10	0	1.05	—
	4	0.25	76
3 3	0	1.08	—
	4	0.15	85

Technique: voir p. 587. La souche utilisée pour cette expérience avait auparavant été entretenue pendant 20 passages sur milieu 56 avec du méthyl- β -galactoside comme seul aliment carboné.

TABLEAU VI

ACTION DU PHÉNYL- β -THIOGALACTOSIDE SUR L'INDUCTION PAR LE MÉLIBIOSE

Phényl- β -thiogalactoside conc. mol $\times 10^{-5}$	Mélibiose, conc. moléculaire $\times 10^{-5}$					
	I			10		
	Activité $m\mu M/min/mg$	Activité %	Inhibition %	Activité $m\mu M/min/mg$	Activité %	Inhibition %
0	28	100	0	1560	100	0
10	17	60	40	448	29	71
100	12	41	59	22	1.4	98.6
300	9	32	68	17	1	99

Technique d'expérience: v. p. 587.

TABLEAU VII

ACTION DU PHÉNYL- β -THIOGALACTOSIDE SUR L'INDUCTION PAR LE MÉTHYL- β -GALACTOSIDE

Phényl- β -thiogalactoside conc. mol $\times 10^{-4}$	Méthyl- β -galactoside (conc. moléculaire $\times 10^{-4}$)					
	I			10		
	Activité $m\mu M/min/mg$	Activité %	Inhibition %	Activité $m\mu M/min/mg$	Activité %	Inhibition %
0	252	100	0	2500	100	0
1	246	98	2	2000	83	17
30	206	82	18	1000	40	60
100	198	70	30	468	19	81
300	146	58	42	338	14	86

Technique d'expérience: v. p. 587.

s'identifiait au substrat (ou à un produit de son hydrolyse, dans le cas des enzymes hydrolytiques) suggérait très fortement que Z n'était autre que l'enzyme lui-même. Mais seul un ensemble coordonné d'observations concernant un enzyme bien identifié, et de propriétés spécifiques bien connues, pouvait permettre de confirmer ou d'infirmier cette identification. Les résultats concernant la β -galactosidase conduisent à rejeter catégoriquement l'identification de Z à la galactosidase elle-même. Du même coup les hypothèses qui supposent implicitement ou non cette identification, c'est à dire l'hypothèse "fonctionnelle" et l'hypothèse "d'équilibre", deviennent insoutenables. En revanche, les observations rapportées ici sont compatibles avec l'hypothèse "formatrice".

Maintenant, si Z n'est pas l'enzyme, quel est-il? Il importe de voir comment se pose désormais cette question. Rappelons d'abord que les belles observations de POLLOCK¹²⁰⁴ sur la pénicillinase l'ont conduit à la conclusion que l'inducteur intracellulaire n'était pas la pénicilline libre mais un composé formé en quantités extrêmement faibles à partir de la pénicilline et apparemment résistant à l'action de la pénicillinase. POLLOCK considère que ce fait est en soi incompatible avec l'hypothèse d'équilibre. Ce raisonnement nous semble faux, mais la conclusion se trouve être juste. Quoi qu'il en soit, le fait capital démontré pour la première fois par POLLOCK c'est que l'inducteur se trouve

engagé dans la cellule, dans une combinaison qui en est la véritable forme active. Si maintenant on remarque que la possession d'un radical galactoside intact est la condition nécessaire (mais non pas suffisante) de l'inductivité, tandis que le galactose lui-même est cependant un inducteur médiocre, on sera tenté de supposer que l'induction pourrait être liée à la formation dans les cellules d'un dérivé du galactose, dérivé qui se formerait plus facilement à partir de certains galactosides qu'à partir du galactose libre. Ceci semblerait impliquer un certain "métabolisme" des inducteurs.

D'autre part, l'exemple du mélibiose indique qu'une substance qui n'est l'objet d'aucun métabolisme appréciable, et qui se montre sans autre action décelable sur les cellules peut cependant être un inducteur très actif. Si donc le mélibiose est "métabolisé" au cours de la biosynthèse induite de la galactosidase, il s'agit d'un métabolisme "millimicromolaire" au sens de Mc ILWAIN³⁸. Peut-être y a-t-il peu d'espoir d'arriver à détecter et à étudier ce "métabolisme d'induction". En revanche, on doit considérer comme une circonstance favorable le fait que l'inducteur, dans ce cas, paraît n'avoir sur les cellules que cette action excessivement élective et spécifique.

REMERCIEMENTS

Nous remercions vivement Mr. D. BELL pour ses sages conseils et Mr. E. F. GALE pour son hospitalité grâce auxquels nous avons pu mener à bien la synthèse de plusieurs dérivés du galactose.

M. MICHAEL DOUDOROFF et Mlle A. M. TORRIANI nous ont apporté une aide précieuse pour certaines de expériences mentionnées ici. Nous les en remercions vivement.

RÉSUMÉ

1. La formation de la β -galactosidase chez *E. coli* est induite exclusivement par des substances possédant un radical galactosidique intact. Diverses inversions ou substitutions en une ou plusieurs positions ainsi que la suppression du carbone 6 se traduisent par la disparition de la propriété inductive.

2. Les substances douées de la propriété inductive ne sont pas nécessairement des substrats de l'enzyme. Ainsi certains α -galactosides (mélibiose) sont inducteurs encore qu'ils ne soient pas hydrolysés par la β -galactosidase.

3. L'inductivité est, d'une manière générale, indépendante de l'affinité pour l'enzyme. Certains corps (phényl- β -thiogalactoside) doués d'une haute affinité pour la β -galactosidase *in vitro* comme *in vivo* sont dépourvus de la propriété inductive.

4. La formation de la β -galactosidase est inhibée par le phényl- β -D-thiogalactoside, mais cette inhibition est non compétitive alors qu'elle devrait être compétitive si elle était due à l'inhibition de l'enzyme.

5. Ces observations sont incompatibles avec toute hypothèse qui suppose que l'induction est liée soit à l'activité de l'enzyme, soit à la formation d'un complexe spécifique entre l'enzyme et l'inducteur.

SUMMARY

1. The formation of β -galactosidase by *E. coli* is induced exclusively by substances possessing an intact galactosidic radical. Various inversions or substitutions at one or more positions as well as the suppression of the carbon 6 result in the disappearance of the inductive property.

2. The substances which have the inductive property are not necessarily substrates of the enzyme. Thus certain α -galactosides (melibiose) are inductors yet they are not hydrolysed by β -galactosidase.

3. The inductivity is, in general, independent of the affinity for the enzyme. Certain substances (phenyl- β -thiogalactoside) which have a high affinity for β -galactosidase *in vitro* as *in vivo* are deprived of the inductive property.

4. The formation of β -galactosidase is inhibited by phenyl- β -D-thiogalactoside, but the inhibition is not competitive, while it should be if it was due to the inhibition of the enzyme.

5. These observations are incompatible with all hypotheses which imply that the induction is connected, either with the activity of the enzyme, or with the formation of a specific complex between the enzyme and the inductor.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Die Bildung von β -Galactosidase bei *E. coli* wird ausschliesslich durch Substanzen, welche einen intakten Galactosid-Rest besitzen, induziert. Verschiedene Inversionen oder Substitutionen in einer oder mehreren Stellungen, sowie Entfernung des Kohlenstoffes in Stellung 6 äussern sich in dem Verschwinden der Induktionsfähigkeit.

2. Die Substanzen, welche induzierende Eigenschaften besitzen, sind nicht unbedingt Substrate des Enzyms. So wirken gewisse α -Galactoside (Melobiose) induzierend, obwohl sie nicht von β -Galactosidase hydrolysiert werden.

3. Die Induktionsfähigkeit ist im allgemeinen von der Affinität zum Enzym unabhängig. Einige Verbindungen (Phenyl- β -thiogalactosid) welche sowohl *in vitro* wie *in vivo* eine hohe Affinität für β -Galactosidase besitzen, haben keine induzierenden Eigenschaften.

4. Die Bildung der β -Galactosidase wird durch Phenyl- β -D-thiogalactosid gehemmt, aber diese Hemmung ist nicht konkurrierend, während sie konkurrierend sein müsste, wenn sie auf die Hemmung des Enzyms zurückzuführen wäre.

5. Diese Beobachtungen sind unvereinbar mit jeder Hypothese, welche annimmt, dass die Induktion entweder mit der Aktivität des Enzyms oder mit der Bildung eines spezifischen Komplexes Enzym-Induktor zusammenhängt.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ R. DUBOS, *Bact. Rev.*, 4 (1940) 1.
- ² C. HINSHELWOOD, *The chemical kinetics of the bacterial cell*, Oxford, Clarendon press (1946).
- ³ O. RAHN, *Growth*, 2 (1938) 363.
- ⁴ A. T. VIRTANEN ET J. DE LEY, *Arch. Biochem.*, 16 (1948) 169.
- ⁵ J. YUDKIN, *Biol. Rev.*, 13 (1938) 93.
- ⁶ S. SPIEGELMAN, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, 11 (1946) 256.
- ⁷ J. MONOD, *Growth*, 11 (1947) 223.
- ⁸ J. MONOD, *Unités biologiques douées de continuité génétique*, C.N.R.S. éd. Paris (1949) 181.
- ⁹ J. MONOD, *Ann. inst. Pasteur*, 69 (1943) 179.
- ¹⁰ J. MONOD, *Ann. inst. Pasteur*, 71 (1945) 37.
- ¹¹ S. EMERSON, *Ann. Missouri Botan. Garden*, 32 (1945) 243.
- ¹² M. POLLOCK, *Brit. J. Exp. Path.*, 31 (1950) 739.
- ^{12bis} M. POLLOCK, *Brit. J. Exp. Path.*, 1951 (sous presse).
- ¹³ R. Y. STANIER, *Microb. Rev.*, (1951) sous presse.
- ¹⁴ J. MONOD ET M. COHN, *Advances in Enzymol.*, (1952) sous presse.
- ¹⁵ J. MONOD ET A. AUDUREAU, *Ann. inst. Pasteur*, 72 (1946) 868.
- ¹⁶ J. MONOD, A. M. TORRIANI ET J. GRIBETZ, *Compt. rend.*, 227 (1948) 315.
- ¹⁷ J. LEDERBERG, *J. Bact.*, 60 (1950) 381.
- ¹⁸ M. COHN ET J. MONOD, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 153.
- ¹⁹ G. COHEN-BAZIRE ET J. MONOD, *Compt. rend.*, 232 (1951) 1515.
- ²⁰ M. COHN ET A. M. TORRIANI, *Biochim. Biophys. Acta* (sous presse).
- ²¹ M. COHN ET A. M. TORRIANI, *Biochim. Biophys. Acta* (sous presse).
- ²² D. KEILIN ET E. F. HARTREE, *Biochem. J.*, 42 (1948) 230.
- ²³ K. NISIZAWA, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 16 (1941) 155.
- ²⁴ H. LINEWEAVER ET D. BURK, *J. Am. Chem. Soc.*, 56 (1934) 658.
- ²⁵ B. HELFERICH, *Ber.*, 77B (1944) 194.
- ²⁶ W. E. GOEBEL ET O. T. AVERY, *J. Exptl Med.*, 50 (1929) 521.
- ²⁷ H. SCHMID ET P. KARRER, *Helv. Chim. Acta*, 32 (1949) 1371.
- ²⁸ C. NIEMANN ET K. P. LINK, *J. Biol. Chem.*, 104 (1934) 195, 743.
- ²⁹ M. SEIDMAN ET K. P. LINK, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 4324.
- ³⁰ H. RYAN, *J. Chem. Soc.*, 75 (1899) 1057.
- ³¹ E. FISHER ET K. DELBRUCK, *Ber.*, 42 (1909) 1476.
- ³² J. MONOD, *Ann. Rev. Microb.*, 3 (1949) 371.
- ³³ G. COHEN-BAZIRE, A. M. TORRIANI ET J. MONOD, *Biochim. Biophys. Acta*, en préparation.
- ³⁴ E. BOURQUELOT *et al.*, cf. Pigman (35).
- ³⁵ W. W. PIGMAN, *Chemistry of the Carbohydrates*, Academic Press, (1948) chap. VI.
- ³⁶ H. McILWAIN, *Nature*, 158 (1946) 898.

Reçu le 2 Juin 1951