

LA CINÉTIQUE DE LA BIOSYNTHÈSE DE LA β -GALACTOSIDASE CHEZ *E. COLI* CONSIDÉRÉE COMME FONCTION DE LA CROISSANCE*

par

J. MONOD, A. M. PAPPENHEIMER JR.** ET G. COHEN-BAZIRE

Service de physiologie microbienne, Institut Pasteur, Paris (France)

INTRODUCTION

Nous présentons dans ce mémoire des observations sur la cinétique de la synthèse induite (adaptative) d'un enzyme, et une conception théorique qui envisage cette synthèse comme une partie intégrante de la croissance. Nous montrerons que ce traitement fait apparaître une relation très simple entre la synthèse induite de l'enzyme et la croissance des cellules qui le produisent.

Avant d'en venir aux données proprement cinétiques, nous exposerons brièvement des résultats concernant l'effet de carences spécifiques en acides aminés sur la biosynthèse de la galactosidase. Ces diverses observations sont liées en ce qu'elles ont directement trait à la question de l'existence de précurseurs des enzymes inductibles. Il est nécessaire de rappeler ici comment cette question s'est trouvée posée concrètement dans le cas de la β -galactosidase d'*E.coli*, grâce aux travaux récents de COHN ET TORRIANI^{1,2,3} qui ont montré:

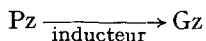
1. que la biosynthèse induite de la β -galactosidase (Gz) correspond à l'apparition d'une espèce moléculaire protéinique identifiable comme antigène, et "nouvelle" en ce sens qu'elle est absente chez les cellules non induites;

2. que cependant les cellules non induites contiennent une autre protéine (Pz) extrêmement proche par sa spécificité immunologique comme par ses caractères de solubilité de la protéine de l'enzyme (Gz);

3. que l'induction de la synthèse de la β -galactosidase s'accompagne d'une diminution du taux global de synthèse de la protéine Pz;

4. que parmi diverses espèces d'Enterobacteriaceae seules celles qui possèdent la protéine Pz sont capables de synthétiser, en présence d'un inducteur, la protéine Gz.

Ces résultats permettent de conclure à une relation de parenté étroite entre les deux protéines. L'hypothèse la plus simple serait que Pz représente, au moins en partie, le précurseur de Gz:



* Travail effectué avec l'aide d'une subvention du National Cancer Institute of the National Institutes of Health des Etats-Unis d'Amérique.

** En congé de New York University, College of Medicine, avec une mission du Commonwealth Fund.

Ce schéma suppose que l'intervention de l'inducteur se traduit non pas par une synthèse de protéine *de novo*, mais seulement par la réorganisation d'un précurseur protéinique préexistant. Ce sont ces faits, et cette hypothèse, qui nous ont servi de point de départ.

MATÉRIELS ET TECHNIQUES

Milieux

Nous avons employé le milieu minéral 56⁴ additionné d'un aliment carboné, et, dans le cas des souches exigeantes, de l'acide aminé nécessaire, ainsi qu'il est précisé séparément pour chaque expérience. Dans certaines expériences, les proportions d'azote (NH_4^+) ou de soufre (SO_4^{-2}) du milieu 56 ont été modifiées pour qu'ils deviennent aliments limitants.

Souches

Pour les essais de carence en acides aminés, nous avons utilisé une série de mutants de la souche ATCC 9637. Ces mutants ont été isolés et nous ont été envoyés par le Dr B. DAVIS que nous remercions de son obligeance. Pour les expériences de cinétique nous avons utilisé différents clones dérivés de la souche ML d'*E. coli*. En vue des expériences, ces souches étaient entretenues régulièrement sur milieu 56 avec du maltose ou du succinate comme aliment carboné.

Conditions d'expérience

Les cultures d'expérience étaient faites dans des fioles coniques munies d'un dispositif de prélèvement⁵, agitées au sein d'un thermostat à eau réglé à 37°. Elles étaient ensemencées à partir d'une culture préparée la veille dans des conditions analogues, sur le même milieu, et dont la croissance s'était arrêtée depuis quelques heures au plus, par épuisement de l'aliment limitant. Les conditions d'induction sont précisées pour chaque expérience.

Mesure de la croissance

La croissance des cultures était suivie par mesure de la densité optique dans l'électrophotomètre de Meunier, en lumière jaune. La validité de ces mesures de densité optique, en tant que correspondant à la quantité de substance bactérienne, présentait en l'occurrence une importance toute particulière. Nous avons donc suivi la croissance d'une culture à la fois par dosage de l'azote bactérien au micro-kjeldahl, et par détermination de la densité optique. Le résultat a montré qu'à moins de 2 % près la correspondance entre les lectures de densité optique et les dosages d'azote ne se démentait pas, dans ces conditions, et entre les limites de nos expériences. Pour la présentation des résultats, les unités de densité optique ont été partout converties en μg d'N bactérien par ml.

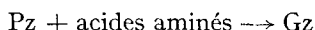
Titration de l'activité β -galactosidase

On prélevait des échantillons, de 5 ml environ, que l'on additionnait d'une goutte de toluène, et que l'on agitait 15 minutes à 37°. Ces suspensions étaient diluées en proportions convenables (suivant leur activité) de milieu 56 neuf, puis additionnées d'*orthonitrophényl- β -D-galactoside* (concentration finale $M/450$) et de NaCl (concentration finale $M/20$). La libération de l'*o*-nitrophénol était déterminée de minute en minute par mesure de l'absorption à 420 $m\mu$ dans le spectrophotomètre Beckman. Immédiatement avant l'emploi les solutions étaient amenées à 28° C et la chambre de mesures du spectrophotomètre était maintenue à 28° C. Les unités d'activité galactosidasique sont exprimées en $m\mu M$ d'*orthonitrophényl- β -D-galactoside* hydrolysé par minute, dans les conditions précisées ci-dessus.

L'EFFET DE CARENCES SPÉCIFIQUES EN ACIDES AMINÉS SUR LA BIOSYNTHESE DE LA β -GALACTOSIDASE

Si chez *E. coli* la β -galactosidase était formée à partir de la protéine Pz, préexistante en quantité très notable dans les cellules non induites, cette synthèse serait, en principe, possible en l'absence d'une source d'azote exogène. COHN ET TORRIANI³ ont constaté que des suspensions de cellules carencées spécifiquement en azote (c'est à dire ayant consommé tout l'azote disponible dans leur milieu, en présence d'un excès d'aliment énergétique) étaient incapables de synthétiser la galactosidase. Cependant, ces cellules carencées en azote contenaient une quantité normale de protéine Pz. L'interprétation de ce résultat est incertaine parce que la carence totale en azote représente sans doute une condition excessivement sévère dont il est difficile d'apprécier les effets. On ne saurait en

particulier affirmer que cette condition ne se traduise pas par des troubles du métabolisme énergétique, indispensable, comme on le sait, à la biosynthèse induite des enzymes^{6,7}. D'autre part, on doit envisager l'hypothèse que la synthèse de la galactosidase ne se fasse pas aux dépens du seul "précurseur" Pz, mais exige, en outre, certains acides aminés ou peptides non préexistants chez les bactéries carencées en azote:



Pour mettre ces interprétations à l'épreuve, nous avons étudié l'effet de carences spécifiques, en un seul acide aminé à la fois, sur la biosynthèse induite de la galactosidase.

Nous avons employé pour cela une série de mutants de la souche ATCC 9637, chacun exigeant un acide aminé différent. La technique employée pour obtenir une carence effective, mais strictement élective, consistait à laisser croître chaque souche dans un milieu contenant une quantité limitée de l'acide aminé qui lui était nécessaire, et un grand excès des autres éléments nutritifs. L'arrêt de la croissance était donc dû exclusivement à l'épuisement de l'acide aminé en question. Quelques minutes après l'arrêt on ajoutait l'inducteur. Vingt minutes plus tard, après avoir fait un prélèvement pour détermination de l'activité enzymatique, on procédait à la contre-épreuve en ajoutant à la suspension une petite quantité de l'acide aminé manquant. La croissance reprenait aussitôt, puis s'arrêtait à nouveau par épuisement. On prélevait alors à nouveau un échantillon. On déterminait ainsi la quantité d'enzyme synthétisée pendant la phase de carence et pendant la phase de croissance respectivement. La carence était effective puisqu'elle se traduisait par l'arrêt de la croissance, et tout à fait élective puisque l'addition du facteur manquant provoquait la reprise immédiate (à une minute près) de la croissance.

Les résultats obtenus sont groupés dans le Tableau I; ils sont sans ambiguïté: en aucun cas il n'y a de synthèse significative de β -galactosidase pendant la phase de carence (0 à 20'). On notera cependant qu'une trace d'enzyme apparaît au cours des 20 premières minutes dans deux expériences (carences en valine et en méthionine, Nos 3 et 11) mais un léger accroissement de la densité optique s'était produit dans ces deux cas pendant cette période. On doit donc penser que la carence n'était pas absolue. On notera aussi que la durée de la phase d'induction en carence (20 minutes, était largement suffisante pour permettre éventuellement une synthèse significative, puisque dans la suspension non carencée (expérience No 13) une quantité très notable d'enzyme est synthétisée en 10 minutes. Enfin la contre-épreuve, c'est à dire l'addition du facteur manquant se traduit dans chaque cas par une synthèse rapide d'enzyme, corrélative de l'accroissement de la masse bactérienne.

Il n'est pas vraisemblable que chacune de ces carences, spécifiques et de courte durée, se traduise également par un trouble fonctionnel du métabolisme qui interdise la conversion ou la réorganisation de Pz en Gz. Il faut donc admettre que chacun de ces acides aminés intervient en tant qu'entrant dans la composition des protéines nouvelles. La liste des acides aminés essayés est incomplète, il est vrai, mais elle est assez représentative pour que l'on doive dire que la formation de la molécule Gz ne se produit que dans des conditions permettant la synthèse *de novo* d'une protéine complète, et non pas seulement l'adjonction, à une protéine préexistante, de quelques acides aminés.

Ces conclusions sont entièrement parallèles à celles auxquelles SPIEGELMAN ET HALVORSON⁸ sont parvenus tout récemment, de façon indépendante, en étudiant l'effet de certains analogues d'acides aminés sur la composition et l'évolution de la réserve d'acides aminés libres chez la levure, au cours de la synthèse induite de la "maltozymase". Ces auteurs ont vu en effet que les analogues efficaces comme inhibiteurs de la synthèse bloquaient simultanément l'utilisation (la disparition) de *tous* les acides aminés de la réserve.

TABLEAU I

L'EFFET DE CARENCES SPÉCIFIQUES EN ACIDES AMINÉS SUR LA SYNTHÈSE
DE LA β -GALACTOSIDASE CHEZ *Escherichia coli*

Exp. No.	Souche	Acide aminé limitant	Temps en min.	Additions	Densité bactérienne (x) $\mu\text{gN} \times \text{cm}^{-3}$	Accroissement de densité (Δx)	Activité galactosi- dasique (z) unités cm^{-3}	$\frac{z}{\Delta x}$
1	83-8	L-Tyrosine	0	β -CH ₃ -galactoside M/1000	6.60	0.0	0.0	9.7
			20	tyrosine M/9050	6.60	0.0	0.0	
			93	—	12.7	6.1	59	
2	83-5	φ -Alanine	0	β -CH ₃ -galactoside M/100	6.80	0.0	0.0	7.7
			21	φ -alanine M/71,000	6.65	0.0	0.0	
			76	—	13.10	6.30	48.5	
3	45-62	DL-Valine	0	β -CH ₃ -galactoside M/1000	8.85	0.0	0.0	13.0
			20	valine M/23,400	9.00	0.15	0.5	
			86	—	15.00	6.15	80	
4	43-5	DL-Leucine	0	β -CH ₃ -galactoside M/1000	12.1	0.0	0.0	7.1
			20	leucine M/52,500	12.1	0.0	0.0	
			60	—	17.4	5.3	38.5	
5	19-2	DL-Tryptophane	0	β -CH ₃ -galactoside M/1000	6.8	0.0	0.0	11.6
			20	tryptophane M/408,000	6.8	0.0	0.0	
			73	—	13.1	6.3	73	
6	26-5	L-Histidine	0	β -CH ₃ -galactoside M/1000	4.65	0.0	0.0	8.85
			20	histidine M/248,000	4.65	0.0	0.0	
			76	—	10.05	5.4	47.3	
7	55-1	L-Proline	0	β -CH ₃ -galactoside M/1000	4.5	0.0	0.0	11.5
			20	proline M/11,500	4.5	0.0	0.0	
			88	—	7.8	3.3	38	
8	45-25	L-Arginine	0	β -CH ₃ -galactoside M/1000	3.9	0.0	0.0	13.3
			20	arginine M/57,700	3.9	0.0	0.0	
			86	—	7.5	3.6	48.0	
9	43-6	DL-Thréonine	0	β -CH ₃ -galactoside M/1000	3.4	0.0	0.0	9.4
			20	thréonine M/23,800	3.4	0.0	0.0	
			75	—	6.2	2.8	26.3	
10	26-96	DL-Lysine	0	β -CH ₃ -galactoside M/1000	2.55	0.0	0.0	9.3
			20	lysine M/83,000	2.55	0.0	0.0	
			100	—	4.70	2.15	20	
11	113-3	DL-Méthionine	0	β -CH ₃ -galactoside M/1000	3.9	0.0	0.0	7.8
			20	méthionine M/238,000	4.1	0.2	1.0	
			94	—	5.8	1.9	14.8	
12	63-86	Uracile	0	β -CH ₃ -galactoside M/1000	4.7	0.0	0	9.25
			20	uracile M/186,000	4.8	0.1	1.6	
			110	—	9.35	4.6	43	
13	normale	(non exigeante)	0	β -CH ₃ -galactoside M/1000	5.0	0.0	0.0	13.4
			10	—	5.7	0.7	9.4	
			20	—	6.46	1.46	20.0	
			40	—	8.40	3.4	46.9	

Les conclusions que nous nous trouvons amenés à adopter n'excluent pas nécessairement l'hypothèse qu'une partie de la molécule Gz soit constituée aux dépens de Pz, mais semblent exclure l'idée que l'induction de la synthèse de la galactosidase se traduise uniquement ou principalement par une réorganisation de Pz préexistant. Si l'on examine les chiffres donnés par la dernière colonne du Tableau I, on verra que le rapport de la quantité d'enzyme formé à l'accroissement concomitant de la masse bactérienne varie en somme fort peu, compte tenu de ce que les résultats se rapportent à une série de clones distincts, issus il est vrai d'une même souche, mais séparés depuis longtemps. Autrement dit, la synthèse de l'enzyme pendant la phase de croissance semble *indépendante* de la nature du facteur précédemment limitant. Ceci s'applique également à l'uracile, (expérience N° 12) facteur limitant, dont le rôle dans la synthèse des protéines ne peut être qu'indirect et radicalement différent de celui des acides aminés. La quantité d'enzyme formée paraît dépendre en revanche directement de l'accroissement de la masse bactérienne. Les expériences décrites dans le paragraphe qui suit mettront en évidence l'aspect quantitatif de cette relation.

LA SYNTHÈSE DE LA GALACTOSIDASE COMME FONCTION DE LA CROISSANCE

Considérations théoriques

Considérons une population de cellules en train de croître. Soient $z, z', z'',$ etc., la masse des constituants cellulaires individuels; x la somme de ces constituants, c'est à dire la masse cellulaire totale; $p, p', p'',$ etc. les coefficients correspondant, à un moment donné, aux vitesses de synthèse des différents constituants cellulaires. Ecrivons que la vitesse de synthèse de chaque constituant est une fraction de la vitesse de synthèse globale:

$$\frac{1}{p} \frac{dz}{dt} = \frac{1}{p'}, \frac{dz'}{dt} = \frac{1}{p''} \frac{dz''}{dt} = \dots \dots \text{etc.} = \frac{dx}{dt} \quad (1)$$

Si l'on considère le rapport de l'accroissement d'un constituant donné à l'accroissement de l'ensemble, on peut écrire:

$$\frac{dz}{dx} = p$$

Nous appellerons ce rapport d'accroissement le "taux différentiel de synthèse" du constituant cellulaire considéré. (Notons que la somme des taux différentiels de synthèse est égale à 1). Lorsqu'une population cellulaire homogène s'accroît à taux constant dans un milieu constant, les cellules qui la composent doivent apparemment tendre vers un état stable, tel que leurs divers constituants soient synthétisés en proportions constantes. Autrement dit, les taux différentiels de synthèse ($p, p', p'',$ etc.) tendent nécessairement vers des valeurs stables. Ceci est vrai pour tout constituant cellulaire, y compris un enzyme inductible, pourvu que les conditions d'induction demeurent constantes. Mais considérons maintenant une population cellulaire se développant en l'absence d'un inducteur spécifique. L'enzyme inductible correspondant (z) n'est pas synthétisé, le taux différentiel de synthèse est nul ($p = 0$). Ajoutons maintenant un inducteur. L'enzyme z va être synthétisé, la composition des cellules va changer, tendre vers un nouvel état constant, caractéristique du système et des conditions d'induction choisies. Le taux différentiel de synthèse prendra finalement une valeur constante: P.

La question que nous posons est de savoir *comment*, à la suite de l'addition de l'inducteur, le taux différentiel de synthèse évolue de la valeur 0 à la valeur P. Ce qui revient, si on généralise le problème, à se demander comment se trouve assurée la stabilité de composition de cellules en voie de croissance. On admet généralement que cette stabilité correspond à un état d'équilibre dynamique entre les divers constituants cellulaires, équilibre de conversion ou d'échange, dans lequel la vitesse de synthèse de chaque constituant serait une fonction de son propre niveau dans les cellules, ainsi que du niveau de son ou de ses précurseurs.

On verrait aisément que ce principe, exprimé ici à dessein sous une forme aussi générale que possible, se retrouve, sous des formes particulières différentes, dans les hypothèses pourtant fort diverses envisagées par YUDKIN⁹, SPIEGELMAN^{10,11}, HINSHELWOOD¹², MONOD^{13,14} et d'autres encore, pour interpréter la biosynthèse induite des enzymes. Dans son acception la plus générale, ce "principe d'équilibre" impose seulement que la vitesse de synthèse soit une fonction de la teneur des cellules en enzyme. On aurait alors, d'après (1):

$$\frac{dz}{dt} = \frac{dx}{dt} f\left(\frac{z}{x}\right)$$

Ou en éliminant le temps pour ne considérer que le taux différentiel de synthèse:

$$\frac{dz}{dx} = f\left(\frac{z}{x}\right)$$

Comme entre le moment où l'inducteur est ajouté et celui où la stabilité de composition est réalisée, la teneur des cellules en enzyme (z/x) s'accroît, il résulte du "principe d'équilibre" que le taux différentiel ne saurait atteindre d'emblée une valeur stable, mais devrait, auparavant, prendre d'autres valeurs et se stabiliser seulement graduellement.

Par exemple, l'hypothèse d'un précurseur se transformant en enzyme selon un processus directement ou indirectement réversible^{9,10,13} prévoit que le taux différentiel de synthèse serait, au début, plus élevé que la valeur stable (P) vers laquelle il s'abaisserait peu à peu. La courbe figurative de z en fonction de x aurait l'allure décrite par la

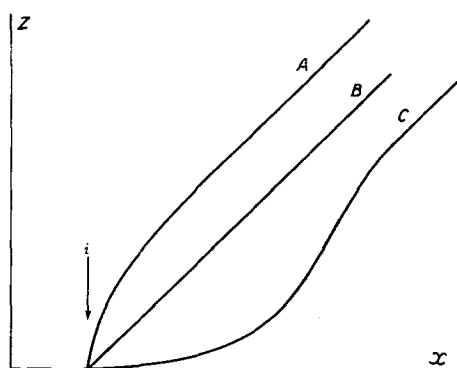


Fig. 1. Synthèse d'un enzyme (z) en fonction de la croissance d'une population de cellules (x), en présence d'un inducteur (i) supposé ajouté au point indiqué par la flèche. Courbes théoriques.

courbe (a) de la figure (1). Si, outre une condition d'équilibre, telle que la précédente, on supposait le système doué de propriétés plus complexes, par exemple de propriétés autocatalytiques^{10,12,14}, l'allure de la courbe serait également plus complexe. Le taux différentiel de synthèse aurait au début des valeurs faibles, et passerait par un maximum avant de se stabiliser (Fig. 1, courbe c).

C'est seulement au cas où le taux différentiel de synthèse serait pratiquement *indépendant* de la teneur des cellules en enzyme qu'il pourrait prendre d'emblée une valeur constante. Une relation d'emblée linéaire (courbe b, Fig. 1) entre z et x n'est donc pas à prévoir, selon le principe d'équilibre.

Ceci mis à part, bien entendu, des hypothèses *ad hoc*, que l'on pourrait sans doute formuler, mais qui ne présenteraient pas d'intérêt pour la présente discussion.

Observations expérimentales

Voyons maintenant les résultats obtenus lorsqu'on étudie la synthèse de la galactosidase chez *E. coli* en fonction de la croissance. Les techniques générales employées sont décrites plus haut (p. 649). Les détails de chaque expérience sont rapportés dans la figure correspondante.

Il faut attirer l'attention sur certaines caractéristiques importantes de ces expériences. 1) D'abord les *conditions de gratuité* (au sens de MONOD ET COHN 1952) de l'induction: le milieu synthétique utilisé contenait, comme source d'énergie, soit du

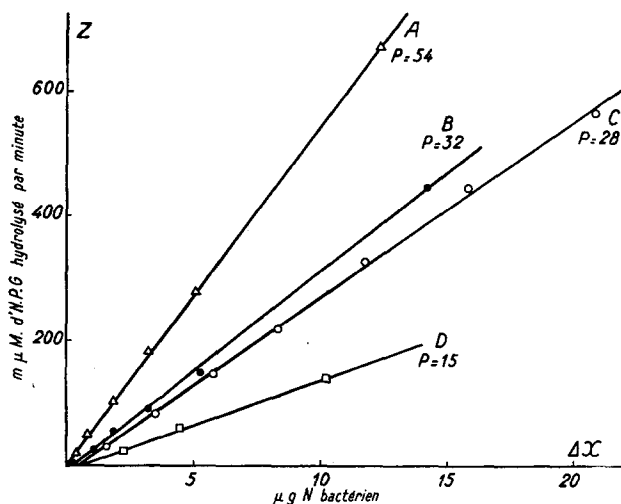


Fig. 2. Synthèse de la β -galactosidase (Z) en fonction de l'accroissement des cultures (ΔX) à partir du moment de l'induction.

Courbe A: *E. coli* ML 32.400. Culture en milieu 56 + succinate de potassium à 20/100, ensemencée à partir d'une culture sur le même milieu. Inducteur (β -éthyl-D-galactoside $M \cdot 10^{-3}$) ajouté en cours de croissance exponentielle, au moment où la densité de la culture atteignait $4.8 \mu g N \times ml^{-1}$.

Courbe B: *E. coli* K₁₂. Culture en milieu 56 + maltose $2 mg \times ml^{-1}$. Inducteur (lactose M/360) ajouté en cours de croissance lorsque la densité optique atteignait $10 \mu g N \times ml^{-1}$.

Courbe C: *E. coli* ML 32.400. Culture en milieu 56 avec $28 \mu g \times ml^{-1}$ de $SO_4(NH_4)_2$ comme source d'azote limitante et maltose ($2 mg \times ml^{-1}$) comme source de carbone. La croissance dans cette culture s'est arrêtée à la densité de $5 \mu g N \times ml^{-1}$ par

épuisement de l'azote. 20 minutes après l'arrêt de la croissance, on a ajouté l'inducteur (β -méthyl-galactoside M/1000). Après encore 20 minutes on a ajouté du $SO_4(NH_4)_2$ ($2 mg \times ml^{-1}$) pour permettre la reprise de la croissance.

Courbe D: *E. coli* ATCC 9637. Culture en milieu 56 + maltose $80 \mu g \times ml^{-1}$. Arrêt de la croissance par épuisement du maltose à une densité de $4 \mu g N \times ml^{-1}$. Addition d'inducteur (β -méthyl-galactoside $M \cdot 10^{-3}$) 20 minutes après l'arrêt. Après encore 20 minutes, addition de maltose ($2 mg \times ml^{-1}$) pour permettre la reprise de la croissance.

maltose, soit du succinate, tandis que l'inducteur était le plus souvent le β -méthyl-galactoside qui n'est pas métabolisé par la souche galactose-négative employée (cf. MONOD, COHEN-BAZIRE ET COHN⁴). Dans quelques essais le lactose, inducteur métabolisable, a été employé mais toujours en présence de maltose comme source carbonée principale. 2) Une autre condition essentielle est le maintien de la concentration de l'inducteur au cours de l'expérience. Pour réduire au minimum l'hydrolyse enzymatique de l'inducteur, comme d'ailleurs pour assurer la stabilité des conditions de croissance, nous avons utilisé des cultures de densités bactériennes faibles (5 à $25 \mu g N$ par ml).

Le résultat-type obtenu est illustré par la Fig. 2 qui groupe des expériences faites dans des conditions différentes, avec des souches et des inducteurs variés. La relation exactement linéaire observée dans tous les cas est remarquable par sa simplicité et sa régularité. On notera que l'extrapolation de la droite figurative ne coupe pas, en général,

l'abscisse au point correspondant à l'addition de l'inducteur, c'est à dire au zéro, mais légèrement au-delà sur l'axe des x . Ce très léger effet est pratiquement insensible dans certains cas. Abstraction faite de cette courte "latence d'induction", sur laquelle nous reviendrons plus loin, la relation d'emblée linéaire entre z et x est assez rigoureuse pour qu'on doive dire que le taux différentiel de synthèse, mesuré par la pente de la droite, est d'emblée constant. Remarquons que ce résultat n'est pas modifié, que le déclenchement de la synthèse d'enzyme soit obtenu par addition d'inducteur à une culture en train de croître, (expérience A Fig. 2), ou qu'il le soit par addition d'une source de carbone (expérience D Fig. 2), d'azote (C Fig. 2), ou de soufre (Fig. 3) à des cultures arrêtées faute de l'aliment correspondant, et contenant déjà l'inducteur. Celui-ci reste donc sans *aucun* effet sur des cellules carencées quelle que soit la carence. L'expérience donnée par la Fig. 3 montre que le taux de synthèse reste encore strictement constant à travers plusieurs arrêts et reprises de la croissance, c'est à dire dans des conditions qui sembleraient devoir favoriser, autant qu'il est possible, une rupture d'équilibre, si équilibre il y avait.

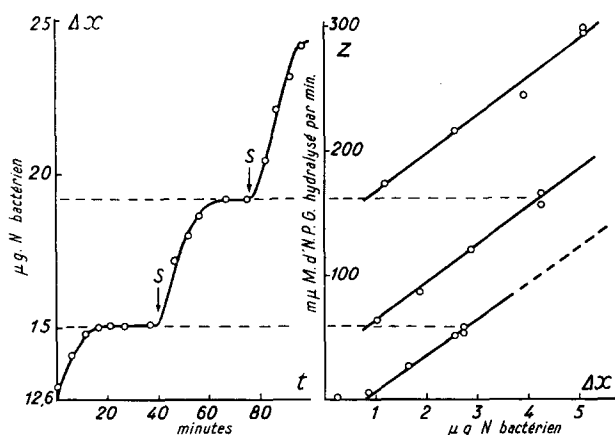


Fig. 3. Synthèse de la β -galactosidase au cours de trois cycles successifs de croissance limités par la source de soufre. *E. coli* ML 32.400. Milieu 56 modifié contenant NH_4Cl au lieu de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ et une concentration limitante de soufre. Arrêt de la croissance par épuisement du soufre à une densité de $12.6 \mu\text{g N} \times \text{ml}^{-1}$. Addition d'inducteur 10 minutes après l'arrêt de la croissance. A temps 0 (graphique de gauche) addition de S ($0.4 \mu\text{g}$ de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ par ml) renouvelée aux moments indiqués par les flèches (0.57 et $0.66 \mu\text{g}$ de $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ par ml pour chaque addition respectivement). Le graphique de droite donne la quantité de galactosidase par $\mu\text{g N}$ bactérien apparu après chaque addition de soufre. On voit que la pente

de la droite (taux différentiel de synthèse) demeure sensiblement la même pour chacun des trois cycles de croissance. On note que la synthèse de l'enzyme reprend chaque fois avec un léger retard sur la croissance (cf. p. 657).

Les résultats que nous venons de passer en revue démentent donc les prévisions fondées sur le principe d'équilibre. Contrairement à ces prévisions, le taux différentiel de synthèse ne se stabilise pas graduellement, mais prend d'emblée une valeur constante. Par conséquent, cette valeur ne semble pas pouvoir être considérée comme représentant un équilibre dynamique dont l'enzyme lui-même et son précurseur éventuel seraient des facteurs. En fait, il semble que la vitesse de synthèse de l'enzyme soit indépendante de la teneur des cellules en enzyme aussi bien que de la masse cellulaire totale, et fonction seulement de l'accroissement de cette masse. Le résultat observé pourrait être exprimé par l'image suivante. Considérons une culture d'*E. coli* à laquelle, à un moment donné pendant la croissance, on ajoute un inducteur; tout se passe comme si les cellules *déjà* présentes à ce moment ne synthétisaient pas d'enzyme, tandis que les cellules *formées à partir de ce moment* acquerraient d'emblée la teneur définitive en galactosidase, c'est à dire l'activité enzymatique spécifique (z/x) vers quoi tendrait la population dans son ensemble si elle s'accroissait indéfiniment dans ces conditions. Bien entendu, la distinc-

tion entre cellules nouvelles et cellules anciennes est purement imaginaire. Mais si, au lieu de parler de cellules nous parlions de *protéines* nouvelles et anciennes, cette image deviendrait acceptable, et mettrait en évidence ce qui est sans doute l'essentiel, à savoir que l'induction ne semble pas avoir pour conséquence une refonte, même partielle, de matériaux préexistants, mais une orientation nouvelle, d'emblée à plein effet, donnée à l'organisation des matériaux assimilés désormais.

Nous reviendrons sur la signification générale de ce résultat. Auparavant, nous en considérerons brièvement quelques autres aspects et conséquences.

L'activité spécifique en fonction du temps au cours de l'induction

Le cours de l'"adaptation enzymatique" a été généralement exprimé par la variation de l'activité spécifique (z/x) en fonction du temps. On verra sans peine que si dans une culture exponentielle la synthèse de l'enzyme est proportionnelle à la croissance, l'accroissement de l'activité enzymatique spécifique en fonction du temps suit une loi exponentielle. On a :

$$\frac{z}{x} = P(1 - e^{-\mu t})$$

Dans la Fig. 4 les résultats d'une expérience d'induction ont été représentés sous cette

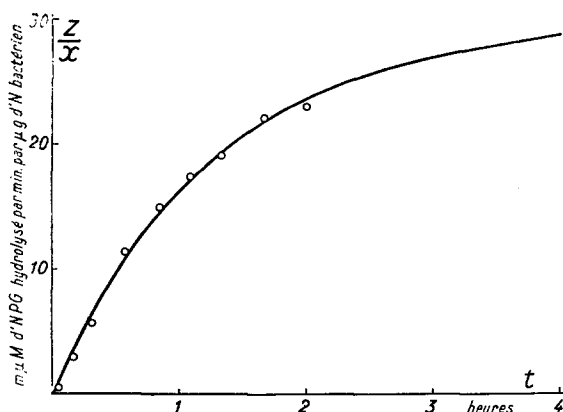


Fig. 4. Accroissement de l'activité β -galactosidasique spécifique en fonction du temps, dans une culture croissant exponentiellement en présence d'inducteur. *E. coli* ML 32.400, milieu 56 + maltose 2 mg \times ml $^{-1}$. Inducteur (β -éthyl-galactoside, $4 \cdot M \cdot 10^{-3}$) ajouté pendant la croissance exponentielle à la densité de 4 μ g N \times ml $^{-1}$. Temps compté à partir de l'addition d'inducteur.

La courbe d'interpolation est tracée selon l'équation :

$$\frac{z}{x} = 30(1 - e^{-0.54t})$$

asymptotique théorique (Fig. 4). Ces limites expérimentales de validité paraissent assez larges pour que l'on puisse considérer la loi linéaire comme valable en principe pour un accroissement indéfini.

Bibliographie p. 660.

forme. Il est évident que la mesure du taux différentiel de synthèse au début de l'induction est *en principe* équivalente à la mesure de l'activité enzymatique spécifique dans une culture pleinement "adaptée". En fait, il n'est pas aisé de maintenir très longtemps des conditions d'induction définies et stables dans une population en train de croître (même dans les conditions de la culture continue). L'hydrolyse de l'inducteur par l'enzyme, ou dans certains cas la formation de produits inhibiteurs, ne peuvent pas être complètement évités, de sorte que la vérification précise de cette conséquence de la relation linéaire est difficile.

Nous avons cependant pu constater que la loi linéaire se vérifiait encore rigoureusement dans des expériences d'étendant sur près de trois générations cellulaires, accroissement au cours duquel l'activité enzymatique spécifique (z/x) atteignait 80% de la valeur

Taux différentiel de synthèse et métabolisme d'induction

Le taux différentiel de synthèse apparaît donc comme le paramètre essentiel qui permet de définir, de mesurer et de comparer les effets d'induction. Les exemples réunis dans la Fig. 2 montrent que le taux différentiel de synthèse (P) varie très notablement suivant la nature de l'inducteur, la nature de la source d'énergie, la souche considérée, etc. . . . L'intérêt théorique, comme les avantages techniques de la mesure de P , sont assez évidents pour qu'il soit inutile d'y insister. Il y a plus. Du moment où la loi linéaire,

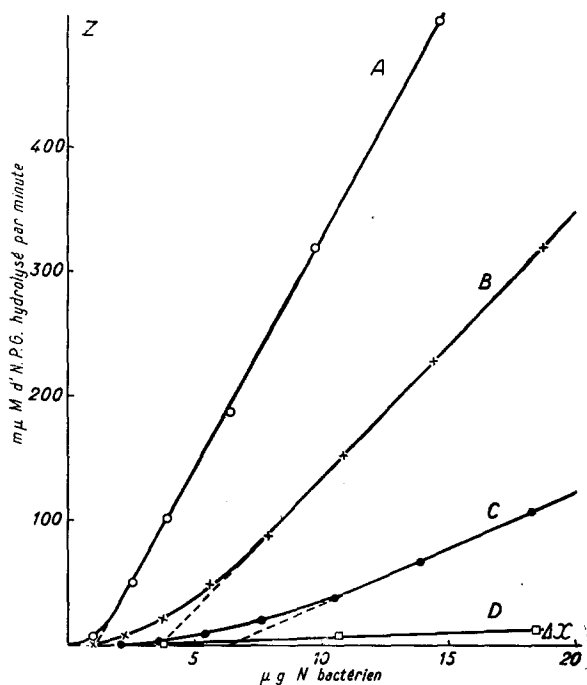


Fig. 5. Synthèse de la β -galactosidase en présence de mélibiose comme inducteur. *E. coli* ML 32.400. Courbe D: milieu 56 + maltose 2 mg \times ml⁻¹, induction par le galactose ($M \cdot 10^{-5}$) seul.

C: mêmes conditions, induction par le mélibiose ($M \cdot 10^{-3}$) seul.

B: mêmes conditions, induction par le mélibiose ($M \cdot 10^{-3}$) en présence de galactose ($M \cdot 10^{-5}$).

A: milieu 56 + malate de potassium 2 g/100, induction par le mélibiose ($M \cdot 10^{-3}$) seul.

c'est à dire la constance du taux différentiel de synthèse *dans des conditions d'induction donnée* est considérée comme établie, toute apparente infraction à cette loi devient particulièrement intéressante et significative. On peut voir un premier exemple d'une telle infraction dans la très courte "latence d'induction" qui précède souvent le début de la synthèse. Cet effet représente sans doute, en partie, le temps minimum nécessaire pour que l'inducteur ajouté pénètre dans les cellules et y entre éventuellement en combinaison avec d'autres substances pour former le complexe actif, ou "organisateur" dont il semble que l'on doive postuler l'existence (cf. POLLOCK^{15,16,17} MONOD ET COHN⁷). On notera que dans l'expérience donnée par la figure 3 l'effet de latence se reproduit trois fois, alors que le départ de la synthèse était donné par addition de soufre à une culture arrêtée faute de soufre, mais contenant déjà l'inducteur et ayant déjà synthétisé un peu d'enzyme. La présence de l'enzyme ne suffit donc pas à supprimer cet effet.

Un exemple bien plus marqué d'un effet du même ordre est donné par la Fig. 5. On voit que l'emploi du mélibiose comme inducteur en présence de maltose comme source principale d'énergie se traduit par une latence d'induction prolon-

gée; le taux différentiel de synthèse augmente lentement avant de prendre une valeur stable. On pourrait croire que ceci met en défaut la relation linéaire. Mais en présence de malate (au lieu de maltose) comme source d'énergie l'effet disparaît presque complètement. Il disparaît également en partie, si au mélibiose employé en présence de maltose on ajoute une trace de galactose, trace par elle-même trop faible pour provoquer une synthèse notable d'enzyme. Il semble en somme qu'en présence de maltose (mais non de malate), la formation à partir du mélibiose du complexe intracellulaire actif soit inhibée, et que cette inhibition soit partiellement levée par des traces de galactose. Nous n'entendons pas

pour l'instant proposer une interprétation détaillée de ces phénomènes complexes, mais seulement les donner comme exemple de ce que, compte tenu de la relation linéaire admise comme base, il devient possible et nécessaire de distinguer entre le métabolisme d'induction (formation du complexe intracellulaire actif) et le processus de synthèse enzymatique proprement dit.

CONCLUSIONS ET DISCUSSION

I. Tout ce que l'on savait, depuis assez longtemps déjà, sur les conditions physiologiques de l'"adaptation enzymatique" conduisait à admettre qu'il s'agissait d'un processus de synthèse (*cf.* DUBOS¹⁸, MONOD^{19,13}, SPIEGELMAN^{10,11}, STANIER⁶, MONOD ET COHN⁷). Mais le sens exact qu'il fallait attacher à ce mot demeurerait incertain. Deux hypothèses extrêmes étaient à considérer: a) synthèse "complète", c'est à dire formation d'une protéine entièrement nouvelle à partir de ses éléments, b) réorganisation de protéines préexistantes.

Les résultats qualitatifs (effets de carences spécifiques en acides aminés) et quantitatifs (cinétique de la synthèse en fonction de la croissance) que nous venons de passer en revue sont en accord avec la première hypothèse, incompatibles en revanche avec la seconde puisqu'ils montrent que la biosynthèse de la β -galactosidase chez *E. coli* est liée d'une manière constante et rigoureuse à la synthèse *de novo* des protéines. Les observations faites ne seraient pas absolument incompatibles avec une hypothèse intermédiaire, supposant que la molécule de galactosidase dérive *en partie* d'une protéine préexistante qui pourrait être la protéine Pz de COHN ET TORRIANI (*loc. cit.*). On pourrait aussi, sans doute, imaginer un mécanisme tel que la conversion d'une protéine préexistante (Pz) en galactosidase (Gz) n'aurait lieu que pour autant que la protéine Pz serait simultanément resynthétisée. L'emploi d'isotopes radioactifs permettra de mettre ces hypothèses à l'épreuve. Pour l'instant elles ne paraissent pas justifiées, puisqu'il est beaucoup plus simple, et strictement conforme aux résultats, de supposer que l'induction de la β -galactosidase se traduit par la synthèse *complète* d'une protéine *nouvelle*; nouvelle non pas seulement en tant que structure spécifique, mais par l'origine de ses éléments.

Nous avons déjà noté que, tout récemment, Spiegelman et ses collaborateurs sont parvenus à des conclusions semblables à la suite d'expériences faites sur un principe différent, avec un matériel très éloigné du nôtre. La concordance des faits renforce beaucoup ces conclusions, et invite à penser que l'adaptation enzymatique correspond en règle générale à une synthèse complète de protéine nouvelle.

II. Cette conclusion admise n'enlèverait rien, croyons nous, à l'intérêt de la découverte de COHN ET TORRIANI^{1,2,3} qui ont eux-mêmes suggéré que l'analogie de structure des protéines Pz et Gz, ainsi que les interférences physiologiques observées entre elles, pourraient être dues à ce que ces deux protéines seraient synthétisées par les mêmes mécanismes, sous la dépendance des mêmes facteurs génétiques.

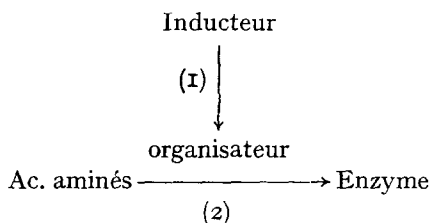
Les rapports des protéines Pz et Gz pourraient à certains égards être comparés à ceux des globulines "normales" et des globulines anticorps du sérum des mammifères. Les globulines anticorps sont encore plus proches des globulines "normales" que Gz ne l'est de Pz. Mais il est peu vraisemblable que les anticorps dérivent de protéines normales préexistantes. Il paraît plus juste de considérer que les globulines-anticorps sont le résultat du processus même de synthèse qui donne naissance aux globulines normales, mais dont le cours aurait été modifié sous l'influence de l'antigène. Dans une telle conception, la formation de la galactosidase correspondrait à une synthèse dont le produit normal serait la protéine Pz, mais dont le cours serait partiellement dévié sous l'influence de l'inducteur.

III. Par sa simplicité même, la relation linéaire trouvée entre la synthèse induite de l'enzyme et la synthèse de substance vivante nouvelle est surprenante.

L'idée que la composition constante de la matière vivante en train de s'accroître est assurée, pour une large part, par le jeu de processus d'équilibre (équilibre d'échange ou de conversion entre constituants cellulaires différents) paraît très raisonnable. Elle est si répandue que souvent même elle est implicitement acceptée, et cette hypothèse, parfois agrémentée d'hypothèses d'autosynthèse, a été, comme on sait, souvent appliquée, avec des spécifications diverses, à la biosynthèse des enzymes (YUDKIN⁹, MONOD^{13,12}, SPIEGELMAN^{10,11}, HINSHELWOOD¹²). Or, la constance du taux différentiel de synthèse suggère que la teneur en enzymes des cellules ne dépend pas de l'établissement d'un équilibre de conversion entre l'enzyme et d'autres constituants cellulaires, mais plutôt de la vitesse d'un processus irréversible. C'est également d'ailleurs ce que suggère la cinétique de la synthèse induite de la pénicillinase chez *B. cereus* d'après les observations de POLLOCK¹⁵.

Dans l'un comme dans l'autre cas, il semble que la molécule d'enzyme joue un rôle strictement passif dans sa propre synthèse, sur laquelle elle n'influe apparemment ni par son activité (MONOD, COHEN-BAZIRE ET COHN⁴), ni même par sa présence. Si ces résultats devaient être généralisés, il faudrait peut-être admettre que la composition en protéines d'une cellule en train de croître exprime plutôt les vitesses relatives d'une série de processus irréversibles parallèles que le résultat d'un équilibre dynamique.

IV. La relation linéaire signifie que la vitesse de synthèse de l'enzyme est indépendante de l'enzyme lui-même; elle ne signifie évidemment pas que les conditions d'induction doivent nécessairement demeurer stables, du moment que la concentration d'inducteur dans le milieu est constante. L'expérience, en particulier les récentes observations de POLLOCK¹⁷, demande qu'une distinction soit établie entre la synthèse induite elle-même et la ou les réactions au cours desquelles l'inducteur pénètre dans les cellules et atteint son état et son lieu d'activité. On peut schématiser cette notion sous la forme suivante:



dans laquelle la flèche 1 symbolise le "métabolisme d'induction"^{4,7} et la flèche 2 la synthèse induite elle-même. La loi linéaire s'applique à la synthèse de l'enzyme (réaction 2), mais non à la formation de l'organisateur (réaction 1). Toutes choses égales d'ailleurs, le taux différentiel de synthèse serait, dans cette conception, une mesure de la quantité ou de l'activité de l'organisateur.

V. Il faut attirer l'attention sur ce que, dans toutes les discussions qui précèdent, nous avons admis que la biosynthèse de la galactosidase était un phénomène continu, et que la cinétique observée sur la population correspondait approximativement à la cinétique au niveau des cellules individuelles (*cf.* MONOD ET COHN⁷). Nous nous sommes autorisés pour cela des récentes observations de BENZER²⁰ effectuées sur le même matériel, et qui, pour la première fois, justifient par l'expérience ces hypothèses, en général admises implicitement.

Bibliographie p. 660.

RÉSUMÉ

La synthèse induite de la β -galactosidase chez *E. coli* semble avoir lieu exclusivement dans des conditions permettant la formation de protéine nouvelle. Le rapport de la quantité d'enzyme synthétisée à la quantité de substance vivante formée dans le même temps (taux différentiel de synthèse) est constant dans des conditions données d'induction.

SUMMARY

The enzyme β -galactosidase appears to be inducible in *E. coli* cells exclusively under conditions allowing the synthesis of new protein. The ratio of the amount of enzyme synthesized to the amount of living matter appearing within the same period of time (differential rate of synthesis) is constant under constant conditions of induction.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Synthese des Enzyms β -Galactosidase in *E. coli*-Zellen scheint nur unter Bedingungen induziert werden zu können, welche die Synthese von neuem Protein gestatten. Das Verhältnis der synthetisierten Enzymmenge zu der in derselben Zeit gebildeten Menge Lebendsubstanz ("Differentialgeschwindigkeit" der Synthese) ist bei konstanten Induktionsbedingungen konstant.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ M. COHN ET A. M. TORRIANI, *Compt. rend.*, 232 (1951) 115.
- ² M. COHN ET A. M. TORRIANI, *J. Immunol.*, (sous presse).
- ³ M. COHN ET A. M. TORRIANI, *Biochim. Biophys. Acta*, (sous presse).
- ⁴ J. MONOD, G. COHEN-BAZIRE ET M. COHN, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 585.
- ⁵ J. MONOD, *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*, Hermann éd. Paris, 1942.
- ⁶ R. Y. STANIER, *Ann. Rev. Microbiol.*, 5 (1951) 35.
- ⁷ J. MONOD ET M. COHN, *Advances in Enzymol.*, 13 (1952) 67.
- ⁸ J. HALVORSON ET S. SPIEGELMAN, *J. Bact.*, 64 (1952) 207.
- ⁹ J. YUDKIN, *Biol. Rev.*, 13 (1938) 93.
- ¹⁰ S. SPIEGELMAN, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, 11 (1946) 256.
- ¹¹ S. SPIEGELMAN, *The Enzymes*, J. B. Sumner and K. Myrbäck, vol. 1, part. 1, p. 267. Academic Press, New York 1950.
- ¹² C. N. HINSHELWOOD, *The chemical kinetics of the bacterial cell*, Oxford Clarendon Press, 1946.
- ¹³ J. MONOD, *Growth*, 11 (1947) 223.
- ¹⁴ J. MONOD, *Unités biologiques douées de continuité génétique*, p. 181, C.N.R.S. éd. Paris, 1949.
- ¹⁵ M. R. POLLOCK, *Brit. J. Exptl. Path.*, 31 (1950) 739.
- ¹⁶ M. R. POLLOCK ET C. J. PERRET, *Brit. J. Exptl. Path.*, 32 (1951) 27.
- ¹⁷ M. R. POLLOCK, *Symposium sur la biogénèse des protéines*. IIème Congrès International de Biochimie, Paris 1952.
- ¹⁸ R. J. DUBOS, *Bact. Rev.*, 4 (1940) 1.
- ¹⁹ J. MONOD, *Ann. Inst. Pasteur*, 70 (1944) 381.
- ²⁰ S. BENZER, *Biochim. Biophys. Acta*, (sous presse).

Reçu le 28 juin 1952