

## MÉTABOLISME DES ACIDES NUCLÉIQUES CHEZ *E. COLI* B APRÈS IRRADIATION ULTRAVIOLETTE

par

D. KANAZIR\* ET M. ERRERA

*Laboratoire de Morphologie animale, Faculté des Sciences, Université libre de Bruxelles (Belgique)*

Dans un travail antérieur<sup>2</sup>, nous avons signalé qu'une irradiation ultraviolette de *E. coli*, pendant la phase logarithmique de croissance, ne produit pas l'arrêt, mais un simple ralentissement de la croissance pendant les premières heures qui suivent l'irradiation. Nous avons montré aussi que les processus de synthèse (augmentation du poids sec), de même que la synthèse des nucléotides totaux ne subissent également qu'une légère diminution, du même ordre de grandeur que le retard de la croissance. La plupart des cellules irradiées ne sont plus capables de former des colonies; des mutations ont été induites et il s'agit d'analyser les processus radiochimiques qui déterminent ces phénomènes. C'est pourquoi il importe de rechercher les altérations biochimiques qu'ont subies les bactéries, aussi rapidement que possible après l'irradiation. KELNER<sup>4</sup> a montré que la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN) est bloquée totalement pendant les cinquante minutes qui suivent une irradiation, quand celle-ci laisse environ 10% de survivants. Ces observations nous ont amené à rechercher s'il s'accumule, dans les bactéries irradiées, des constituants de poids moléculaires peu élevés qui pourraient constituer une réserve de précurseurs pour l'ADN. Une pareille étude devrait permettre d'établir si le blocage de la synthèse de l'ADN dépend d'une altération des stades initiaux ou s'il résulte plutôt d'un arrêt de l'intégration de précurseurs dans la macromolécule d'ADN.

### MÉTHODES UTILISÉES

Des cultures de *E. coli* B, en milieu minéral glucosé<sup>2</sup>, contenant 200  $\gamma$  de  $\text{PO}_4\text{HNa}_2$  par ml, sont récoltées au cours de leur croissance logarithmique, après avoir atteint une densité optique de 0.4 (tubes de 18 mm de diamètre), mesurée au spectrophotomètre Coleman Universal, modèle 14, à 700 m $\mu$  (filtre P.C. 5). Une volume égal de milieu frais leur est additionnée et des portions de 40 ml des suspensions bactériennes diluées sont irradiées, sous une épaisseur d'environ 0.5 cm dans des boîtes de Petri ouvertes de 11 cm de diamètre; leur contenu est agité électromagnétiquement. L'irradiation est effectuée à l'aide d'une lampe Mineralight donnant approximativement  $19 \cdot 10^2$  ergs/mm<sup>2</sup>/min à 30 cm (mesuré à l'aide du photomètre U.V. de Latarjet)<sup>5</sup>. Une irradiation de 30 secondes laisse environ 20% de bactéries survivantes, comme le prouvent des comptages sur plaques d'agar.

Immédiatement après l'irradiation, les bactéries sont cultivées à 37° et elles sont constamment agitées dans l'obscurité. Après des temps variables, les bactéries sont centrifugées, lavées 1 fois à l'aide de NaCl 9.0<sup>0</sup>/<sub>100</sub>, délipidées au moyen d'alcool-éther (3:1 en volumes) et ensuite extraites pendant 20 minutes à 0° à l'aide d'acide perchlorique à 1%. La délipidation paraît être indispensable,

\* Institut des Sciences nucléaires "Boris Kidric", Belgrade.

car l'extraction des constituants acidosolubles est beaucoup plus rapide dans les échantillons irradiés, peut-être en raison d'une altération de la membrane cellulaire. Le culot bactérien est ensuite extrait pendant 18 h à 0° dans de l'acide perchlorique à 5 % pour isoler les ribonucléotides selon la technique d'OGUR ET ROSEN<sup>7</sup>. L'acide ribonucléique est dosé dans cet extrait par la méthode à l'orcine<sup>8</sup>; enfin, l'acide désoxyribonucléique des culots bactériens est dosé, après extraction à chaud au moyen d'acide perchlorique à 5 %, par la méthode à l'indol de CERIOTTI<sup>1</sup>. Ces deux méthodes colorimétriques ont également permis d'étudier le ribose et le désoxyribose acidosolubles. Enfin, des dosages du Phosphore acidosoluble, organique et inorganique ont également été effectués. Le phosphore a été dosé par la méthode de KUTTNER<sup>5</sup>.

### RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

**Croissance.** Nous voyons, dans la Fig. 1, une courbe de croissance de bactéries irradiées (30 secondes) et témoins. La croissance a été déterminée soit par néphélométrie, soit par la mesure du poids sec des bactéries contenues dans 40 ml du milieu de culture. Ce sont ces données qui nous ont permis de ramener, dans certains cas, les résultats des dosages à un poids sec unitaire,

en se basant sur les mesures néphélométriques faites systématiquement au cours de chaque expérience.

#### *Synthèse de l'acide désoxyribonucléique.*

Les résultats antérieurs ont été confirmés: à côté d'une inhibition immédiate de la synthèse d'ADN, celle de l'acide ribonucléique (ARN) se poursuit presque normalement, avec un certain ralentissement pour les doses les plus considérables d'ultraviolet que nous ayons utilisées. La durée du blocage de la synthèse de l'ADN est approximativement proportionnelle à celle de l'irradiation. Elle est

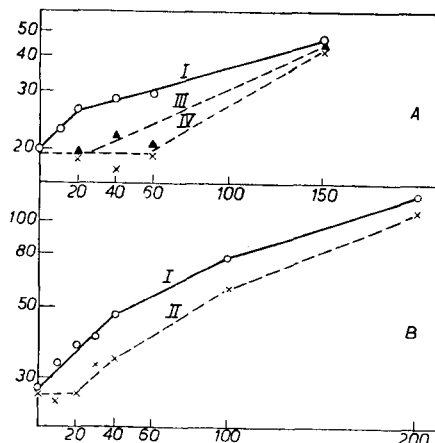
de l'ordre de 15 à 20 minutes pour une irradiation de 20 secondes, de 30 et de 50 minutes environ pour des irradiations de 30 et de 40 secondes (Fig. 2). Cette synthèse n'est cependant pas arrêtée définitivement: même après 40 secondes d'irradiation, la teneur en ADN des cultures peut atteindre, après 150 minutes de croissance, une valeur comparable à celle des témoins. La teneur en ADN, calculée par mgr de poids sec, subit donc

Fig. 2. Synthèse de l'acide désoxyribonucléique dans des cultures irradiées de *E. coli B*.

..... I témoins.  
× --- × --- × II, III, IV irradiées 20, 30 et 40 secondes.  
abscisses: temps après l'irradiation (en minutes).  
ordonnées:  $\mu\text{g}$  ADN,

graphique A: dans 40 ml de suspension bactérienne; (densité optique à 700  $m\mu$  pendant l'irradiation: 0.240)

graphique B: dans 20 ml de suspension bactérienne; (densité optique à 700  $m\mu$  pendant l'irradiation: 0.097).



un appauvrissement initial puisqu'il n'y a pas d'arrêt de la croissance; il se produit ensuite un retour progressif à la normale.

*Synthèse de l'acide ribonucléique.* Après 20 secondes d'irradiation, la synthèse de l'ARN ne subit aucun ralentissement, que l'on suive cette synthèse à l'aide de la réaction à l'orcinol ou qu'on la mesure spectrophotométriquement par la méthode d'OGUR ET ROSEN. Après 30 secondes d'irradiation, la vitesse de synthèse de l'ARN est ralentie, mais seulement d'une valeur de l'ordre de 10%. Après 40 secondes, le ralentissement est à peine plus marqué; il n'atteint que 30% après une irradiation de 60 secondes qui, cependant, entraîne un arrêt total de la croissance pendant environ 60 minutes. A aucun moment il n'y a donc d'appauvrissement des bactéries en ARN.

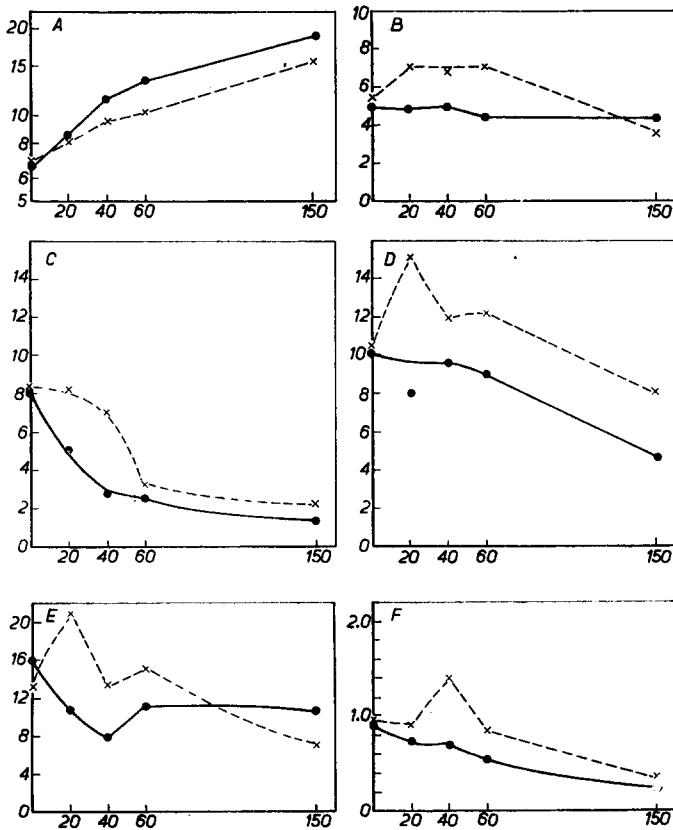


Fig. 3. Constituants acidosolubles des cellules de *E. coli* B irradiés.

témoins ——— Témoins.

30 secondes d'irradiation × --- × Irradiés.

ordonnées: temps après l'irradiation, en minutes.

abscisses: A: mg de bactéries dans 40 ml de culture (courbe de croissance)

B:  $\mu M \cdot 10^3$ , par mg de bactéries, de constituants absorbant à 260 mμ, calculés comme étant des ribonucléotides.

C:  $\mu M \cdot 10^3$  orthophosphate par mg de bactéries.

D:  $\mu M \cdot 10^3$  phosphate organique acidosoluble par mg de bactéries.

E:  $\mu M \cdot 10^3$  de ribose acidosoluble par mg de bactéries.

F:  $\mu M \cdot 10^3$  de désoxyribose acidosoluble par mg de bactéries.

*Fraction acidosoluble.* Les résultats concernant cette fraction ont été consignés sous la forme de graphiques (Fig. 3): il apparaît, par quantité unitaire de bactéries, un net excès des constituants acidosolubles présentant un maximum d'absorption à 260 m $\mu$  (courbe B). Ceux-ci s'accumulent pendant une durée comparable au temps de latence qu'on observe pour la synthèse de l'ADN. A cette accumulation de groupements absorbant dans l'U.V., vraisemblablement de nature purique ou pyrimidique, correspond également une accumulation du P organique acidosoluble (courbe D); la teneur en orthophosphate (courbe C) diminue au contraire, mais moins rapidement que chez les témoins. Par contre, les teneurs en ribose et en désoxyribose acidosoluble, par mgr de bactéries, augmentent aussi au début de la croissance. Les cellules irradiées sont donc plus riches en constituants organiques phosphorés acidosolubles, dont certains contiennent vraisemblablement du ribose et du désoxyribose. Remarquons toutefois que la teneur en pentoses de l'extrait excède celle des constituants puriques ou pyrimidiques, et même celle du P organique. Mais on sait que les pentoses phosphates sont généralement très instables et on peut donc supposer qu'une partie de l'orthophosphate est en réalité d'origine organique. Cependant cette manière d'exprimer les résultats ne montre pas clairement s'il y a ou non, en valeur absolue, une diminution de la quantité totale de ces divers constituants.

Un tel déficit pourrait, si le constituants en question est en concentration limitante, être à l'origine du ralentissement de la croissance. Nous avons observé, au contraire, que même pour des doses considérables (60 secondes d'irradiation), il y a toujours un excès de constituants acidosolubles dans les suspensions bactériennes pendant les 100 premières minutes de la croissance; par la suite, les valeurs mesurées dans le cas des cultures irradiées deviennent voisines de celles des témoins.

#### DISCUSSION

Deux phénomènes nets peuvent être dégagés du présent travail. Le premier est le blocage de la synthèse de l'ADN, immédiatement après irradiation de *E. coli* B en phase logarithmique de croissance. Ce blocage n'est pas définitif: la synthèse de l'ADN reprend après un temps de latence d'autant plus considérable que l'irradiation a été prolongée. Il n'y a cependant aucun arrêt dans la synthèse cytoplasmique (poids sec), ni dans celle de l'ARN. Cette constatation s'accorde bien avec le fait que les bactéries de la souche utilisée se transforment en "bactéries filamenteuses" au sein desquelles les noyaux se multiplient avec une vitesse apparemment très voisine de la normale<sup>2</sup>, mais vraisemblablement avec un certain retard.

Le deuxième point mis en évidence est une accumulation extrêmement nette de constituants acidosolubles, contenant du phosphore organique, des bases puriques et pyrimidiques et des pentoses (ribose et désoxyribose). Il ne semble cependant pas que la croissance soit limitée par un déficit en constituants acidosolubles. Cette conclusion confirme les résultats que nous avons obtenus pour l'adénosinetriphosphate<sup>4</sup>. Mais les méthodes utilisées étant peu spécifiques, une analyse chromatographique de ces divers constituants est en cours. Les résultats actuels suggèrent, en tous cas, que le blocage de la synthèse de l'ADN résulte d'un effet sur les stades ultérieurs de cette synthèse.

## RÉSUMÉ

La synthèse de l'acide désoxyribonucléique est immédiatement bloquée après l'irradiation U.V. d'une culture de *E. coli* B en phase logarithmique. Ce blocage n'est pas définitif et la synthèse recommence après des durées d'autant plus longues que l'irradiation a été prolongée. Pendant ce temps, il y a une accumulation, dans les bactéries irradiées, de constituants organiques acidosolubles contenant du phosphore, des bases puriques et pyrimidiques et des pentoses (ribose et désoxyribose). Par contre, la synthèse de cytoplasme (poids sec) et celle de l'acide ribonucléique n'est que ralentie, dans des proportions identiques au ralentissement de la croissance.

Il est vraisemblable que la synthèse de l'ADN n'est pas bloquée à la suite d'un déficit en précurseurs de faible poids moléculaire; ce blocage résulterait plutôt d'un effet de l'irradiation sur les stades ultérieurs de cette synthèse.

## SUMMARY

The synthesis of desoxyribonucleic acid stops immediately after the U.V. irradiation of a culture of *E. coli* B in the logarithmic phase. This effect is not permanent and synthesis is resumed after periods which are approximately proportional to the duration of irradiation. During this time, there is an accumulation of acid-soluble organic constituents containing phosphorus, purines and pyrimidines, as well as pentoses (ribose and desoxyribose). In contrast, synthesis of new cytoplasm (dry weight) and that of ribonucleic acid is no more inhibited than the growth of the bacteria.

It is probable that the inhibition of synthesis of DNA is not due to a lack of acid-soluble precursors, but probably results from an effect of the irradiation on a later stage of the synthesis.

## ZUSAMMENFASSUNG

Die Synthese von Desoxyribonucleinsäure wird nach U.V.-Bestrahlung einer Kultur von *E. coli* B in der logarithmischen Phase sofort eingestellt. Diese Hemmung ist nicht endgültig und die Synthese wird nach einiger Zeit, die der der Bestrahlung gleich ist wieder aufgenommen. Während dieser Zeit tritt eine Anhäufung von organischen, säurelöslichen, Phosphor enthaltenden Bestandteilen, von Purin- und Pyrimidinbasen und Pentosen (Ribose und Desoxyribose) in den bestrahlten Bakterien auf. Im Gegensatz dazu ist die Synthese des Cytoplasmas (Trockengewicht) und der Ribonucleinsäure nicht mehr gehemmt wie auch beim Wachstum der Bakterien.

Es ist wahrscheinlich, dass die Hemmung der DNA-Synthese nicht die Folge eines Mangels säurelöslicher, niedrigmolekularer Bausteine ist, sondern wahrscheinlich von einem Bestrahlungseffekt auf die späteren Stadien der Synthese herrührt.

## BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> G. CERIOTTI, *J. Biol. Chem.*, 198 (1952) 297.
- <sup>2</sup> M. ERRERA, *Brit. J. Radiol.* (sous presse).
- <sup>3</sup> D. KANAZIR ET M. ERRERA, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 451.
- <sup>4</sup> A. KELNER, *J. Bacteriol.*, 65 (1953) 252.
- <sup>5</sup> T. KUTTNER ET L. LIECHTENSTEIN, *J. Biol. Chem.*, 86 (1930) 671.
- <sup>6</sup> T. LATARJET, P. MORENNE ET R. BERGER, *Ann. Institut. Pasteur*, Paris, 85 (1953) 174.
- <sup>7</sup> M. OGUR ET G. ROSEN, *Arch. Biophys. Biochem.*, 25 (1950) 262.
- <sup>8</sup> W. C. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.*, 161 (1945) 293.

Reçu le 1 décembre 1953