

MÉTABOLISME ANAÉROBIQUE DE L'ADÉNOSINE
 TRIPHOSPHATE (ATP) ET DE L'ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE
 (ADN) CHEZ *E. COLI* APRÈS IRRADIATION U.V.

par

D. KANAZIR* ET M. ERRERA

Laboratoire de Morphologie animale, Université libre de Bruxelles (Belgique)

INTRODUCTION

On sait que l'irradiation U.V. bloque immédiatement, mais temporairement seulement, la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN) chez *E. coli*^{10, 13}: la synthèse de l'acide ribonucléique (ARN) et celle des protéines ne subissent au contraire qu'un faible ralentissement, tout comme la vitesse de croissance d'ailleurs⁵.

De plus, dans la souche *E. coli* B, les divisions cytoplasmiques sont bloquées et les bactéries irradiées se transforment en longs filaments multinucléés⁵. Comme on trouve moins de bactéries filamenteuses quand les cellules irradiées sont cultivées en présence d'un excès d'ATP et que l'on suppose que la synthèse de l'ADN est un processus qui dépend des sources d'énergie de la cellule, il nous a paru souhaitable d'examiner si l'irradiation U.V. n'entravait pas les phosphorylations. On sait que, dans le cas des rayons X, les phosphorylations oxydatives sont parfois inhibées peu de temps après l'irradiation (voir références dans 6); dans le cas de *E. coli*, elles paraissent se dérouler normalement après l'irradiation, mais l'ATP produit est perdu dans le milieu de culture³. Dans un travail précédent, nous avons montré que les cellules irradiées à l'U.V. contiennent toujours un peu plus d'ATP que les cellules témoins⁹ quand elles sont cultivées en aérobiose.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Avant l'irradiation, des bactéries des souches *E. coli* B et B/r sont cultivées dans un milieu synthétique identique à celui utilisé précédemment⁵ mais contenant 4 fois plus d'orthophosphate: elles sont agitées vigoureusement à 37°. La croissance des bactéries est suivie au spectrophotomètre Coleman Universel, modèle 14 à 700 mμ (filtre P.C. 5).

Immédiatement avant l'irradiation des suspensions de bactéries en phase de croissance (densité optique ~ 0.4) sont additionnées de milieu frais et la densité optique est ajustée à 0.2. L'irradiation est effectuée à l'aide d'une lampe Mineralight à basse pression de mercure, dont le débit, mesuré au photomètre de LATARJET¹⁵, est de 19 · 10² ergs/mm²/min à 30 cm. Les bactéries sont irradiées dans des boîtes de Pétri ouvertes et elles sont agitées continuellement au moyen d'un dispositif électromagnétique; l'épaisseur des suspensions est d'environ 5 mm. Trente secondes d'irradiation dans ces conditions laissent 20 % des bactéries de la souche *E. coli* B capables de former des colonies sur agar.

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

Bibliographie p. 481.

Immédiatement après l'irradiation, les bactéries sont cultivées à 37° dans des tubes de Thunberg évacués à l'aide d'une pompe à vide ordinaire.

L'ATP est dosé suivant la technique de STREHLER¹⁷: elle consiste à mesurer, à l'aide d'un photomultiplicateur d'électrons, l'intensité de la luminescence d'extraits d'organes lumineux de *Photinus pyralis*. Ceux-ci nous ont été envoyés généreusement par les Drs. Mc ELROY et STREHLER, à qui vont nos plus vifs remerciements. Le procédé utilisé a été décrit dans un travail antérieur⁹. A titre d'indication signalons que 1 mg de *E. coli* séché contient environ 0.05 à 0.1 γ d'ATP à la fin de la croissance. Notons encore que cette méthode ne dose pas seulement l'ATP libre, mais probablement aussi d'autres formes non solubles de liaisons phosphorées riches en énergie.

L'ADN est dosé par la méthode de CERIOTTI⁴.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

On constate tout d'abord que la vitesse de croissance des bactéries, à l'abri de l'air, n'est pas altérée par une irradiation de $9.5 \cdot 10^2$ ergs/mm². Comme en aérobiose, la synthèse de l'ADN est complètement bloquée pendant environ 40 minutes après le traitement à l'U.V. (Fig. 1); on ne note aucune différence importante entre les deux souches de bactéries étudiées, à cet égard. Si on examine la teneur en ATP de la culture totale (Tableau I), on voit qu'elle augmente régulièrement chez les témoins. Dans la culture irradiée, si la quantité d'ATP reste normale pendant la première heure, elle diminue par contre considérablement par la suite. La différence est très nette si les résultats sont exprimés en fonction du poids sec des bactéries. Cette diminution de l'ATP correspond, sans doute, non pas à son utilisation au cours de la croissance des bactéries, mais à son utilisation pendant la période de synthèse de l'ADN.

On observe que la perte d'ATP par rapport aux témoins est plus considérable dans le cas de *E. coli* B que dans celui de *E. coli* B/r: après 2 ou 3 heures de culture anaérobique, la quantité totale d'ATP n'atteint plus, chez *E. coli* B, qu'environ 30% de la valeur

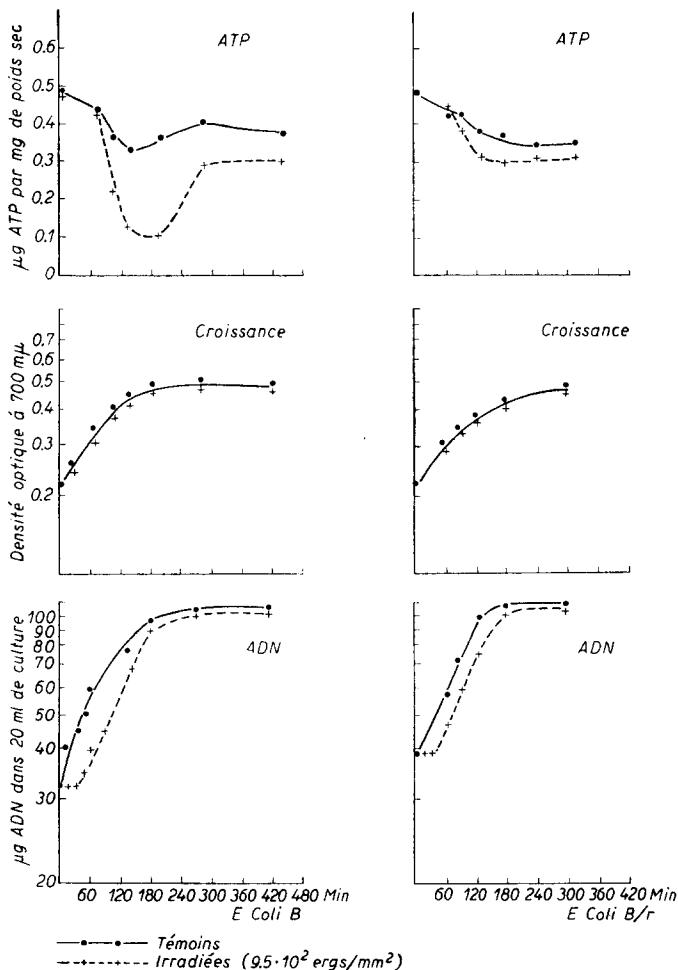


Fig. 1.

des témoins, alors que chez *E. coli* B/r elle ne descend jamais de beaucoup en dessous de 60% de cette valeur.

TABLEAU I
EFFET DES RAYONS U.V. SUR LE MÉTABOLISME DE L'ATP AU COURS
DE LA CROISSANCE ANAÉROBIQUE

Heures après l'irradiation	<i>E. coli</i> B						<i>E. coli</i> B/r					
	Exp. II		Exp. III		Exp. I		Exp. II		Exp. III			
	T	I	T	I	T	I	T	I	T	I	T	I
0	1.24	1.24	1.17	1.16	1.0	1.34	0.65	0.57	1.24	1.45		
1	1.8	1.8	—	—	1.84	1.7	1.13	1.13	1.65	1.7		
1.5	—	—	1.46	1.04	—	—	1.35	1.2	2.0	1.76		
2	1.98	0.73	—	—	2.55	1.45	1.58	1.44	1.78	1.74		
3	2.75	0.82	2.8	1.1	3.55	2.2	2.2	1.52	2.6	1.8		
4	—	—	—	—	3.7	2.0	—	—	2.2	1.8		
4.5	3.5	1.39	2.8	2.0	—	—	—	—	—	—		
7	—	—	2.3	2.0	—	—	—	—	—	—		

γ d'ATP pour 20 ml de suspension bactérienne.

T: témoins; I: irradiés ($9.5 \cdot 10^2$ ergs/mm²).

DISCUSSION

Comme nous n'avions fait aucune tentative pour interpréter les résultats dans la note où nous décrivions le métabolisme aérobie de l'ATP après irradiation⁹, nous croyons qu'il pourrait être utile de le faire à présent.

Nous avions constaté que, chez des bactéries irradiées à l'état de repos et mises en culture *aérobie* immédiatement après, la teneur en ATP augmente considérablement pendant la phase de latence pour diminuer peu après le début de la croissance. Même pour de fortes irradiations ($38 \cdot 10^2$ ergs/mm²), la teneur en ATP des bactéries irradiées est toujours un peu supérieure à celle des témoins: pourtant, la croissance bactérienne est considérablement retardée dans ces conditions. Quand les bactéries sont irradiées en phase de croissance, les témoins s'appauvrisent continuellement en ATP; les bactéries irradiées conservent au contraire une forte teneur en ATP pendant une quarantaine de minutes et ce n'est qu'à partir de ce moment que la quantité d'ATP diminue. C'est aussi à ce moment que reprend la synthèse de l'ADN qui avait été bloquée immédiatement après l'irradiation.

En *anaérobiose*, nous voyons maintenant que la teneur en ATP des bactéries reste d'abord normale, tandis que la croissance n'est même pas retardée par l'irradiation; elle ne commence à diminuer qu'une heure après le traitement à l'U.V., c'est-à-dire au moment où la synthèse de l'ADN recommence.

Une relation étroite semble donc exister, aussi bien en aérobiose qu'en anaérobiose, entre le métabolisme de l'ATP et celui de l'ADN. Si, comme le suppose LIPMANN¹⁴ les nucléotides doivent être phosphorylés avant de s'unir pour former l'acide nucléique définitif, tout blocage de la synthèse de celui-ci sera accompagné d'une accumulation de ses précurseurs; il en ira de même pour les réserves énergétiques nécessaires à leur organisation en macromolécules.

Nous avons précédemment mis en évidence que de l'ATP s'accumule *en aérobiose* dans les bactéries irradiées; dans un travail encore inédit, l'un de nous a montré que,

dans les mêmes conditions, il y a également une accumulation d'uridine diphosphate¹². Enfin, il est actuellement presque certain que des désoxynucléosides ou nucléotides correspondant aux quatre bases azotées de l'ADN s'accumulent aussi pendant la période où est bloquée la synthèse de l'ADN^{11, 12}. Ces diverses altérations biochimiques pourraient résulter soit d'une modification de la structure de l'ADN lui-même, ce qui entraînerait un blocage des processus d'autoduplication, soit d'une inhibition des mécanismes de transfert de l'énergie de l'ATP vers les désoxynucléotides.

La perte d'ATP qui se produit en anaérobiose une heure après l'irradiation indique vraisemblablement que les processus de phosphorylation accompagnant la glycolyse sont inhibés. Il n'est pas impossible que cet effet dépende d'une lésion du noyau bactérien, provoquée par les U.V. On sait, en effet, que des organismes énucléés ou pourvus d'un noyau anormal se comportent exactement comme les bactéries irradiées : on y a observé, en effet, une accumulation aérobie d'ATP et une perte excessive d'ATP en anaérobiose (BRACHET^{1, 2}). Il serait dès lors tentant d'établir une relation entre le blocage de la synthèse de l'ADN et la diminution des phosphorylations anaérobiques : on sait, en effet, que le noyau cellulaire ne possède qu'un équipement enzymatique limité ne permettant que des phosphorylations anaérobiques (STERN ET MIRSKY¹⁶). Il n'est donc pas impossible qu'une altération nucléaire commune se trouve à la base des troubles du métabolisme de l'ATP qui ont été décrits.

A l'appui de cette idée vient s'ajouter le fait que la concentration de l'ATP diminue beaucoup moins considérablement dans les bactéries de la souche B/r que dans celle de la souche B. Or cette dernière souche est précisément plus sensible à l'effet létal des radiations¹⁸, qui s'exerce vraisemblablement sur les noyaux bactériens.

Le fait que la perte d'ATP ne se manifeste, en anaérobiose, qu'une heure après l'irradiation pourrait évidemment résulter de ce que les cellules ont été préalablement cultivées à l'air : leurs réserves d'oxygène resteraient suffisantes pendant cette période. Il se pourrait aussi que pendant cette même période d'une heure, certains facteurs, dont la synthèse dépendrait du noyau bactérien intact, s'épuisent lentement. Il pourrait notamment s'agir de co-enzymes dont la synthèse dépendrait de l'intégrité nucléaire, comme l'a suggéré BRACHET^{1, 2}. HOGEBOOM ET SCHNEIDER ont en effet montré que certaines étapes importantes de la synthèse du coenzyme I avaient lieu dans le noyau⁷.

RÉSUMÉ

Nous avons dosé l'ATP et l'ADN de cultures de *E. coli* B et B/r, irradiées en phase de croissance et cultivées immédiatement après, en anaérobiose. Aucune différence ne s'observe au cours de la première heure; tandis que les cellules témoins continuent à s'enrichir en ATP jusqu'à la fin de la croissance, les cellules irradiées s'appauvrissent au contraire au moment où la synthèse de l'ADN, bloquée par l'irradiation, recommence. Quand cette synthèse est terminée le taux d'ATP des cultures irradiées tend à reprendre sa valeur normale.

Nous avons discuté les relations qui semblent exister entre le métabolisme de l'ATP et la synthèse de l'ADN en aérobiose et en anaérobiose.

SUMMARY

We have determined ATP and DNA in cultures of *E. coli* B and B/r, irradiated during the growing phase and cultured in anaerobiosis immediately after. No difference in ATP can be seen during the first hour; the control cells continue to synthesize it until the end of the growth period, but in the irradiated cells on the contrary the ATP concentration begins to drop during the period

when DNA synthesis, immediately blocked by irradiation, is resumed. When DNA synthesis is completed, the ATP content of irradiated cells tends to reach a normal value.

We have discussed the relationship which seems to exist between ATP metabolism and DNA synthesis, both in aerobiosis and in anaerobiosis.

ZUSAMMENFASSUNG

Wir haben in *E. coli*-Kulturen B und B/r, welche in ihrer Wachstumsphase bestrahlt und gleich darauf anaerobisch gezüchtet wurden, ATP- und Desoxyribonucleinsäurebestimmungen durchgeführt. Im Laufe der ersten Stunde zeigte sich keinerlei Unterschied. Während der ATP-Gehalt der Kontrollzellen bis zum Ende der Wachstumsperiode ansteigt, sinkt er aber in den bestrahlten Zellen von dem Augenblick an, wo die durch Bestrahlung gehemmte Desoxyribonucleinsäuresynthese wieder einsetzt. Nach Beendigung dieser Synthese besitzt der ATP-Gehalt der bestrahlten Kulturen die Tendenz, sich wieder seinem Normal-wert zu nähern.

Wir haben die Beziehungen, welche zwischen ATP-Metabolismus und Desoxyribonucleinsäuresynthese, sowohl unter aeroben, als unter anaeroben Bedingungen zu bestehen scheinen, erörtert.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. BRACHET, *Nature*, 173 (1954) 725.
- ² J. BRACHET, *Experientia*, 10 (1954) 492.
- ³ D. BILLEN, B. L. STREHLER, G. E. STAPLETON ET E. BRIGHAM, *Arch. Biochem. Biophys.*, 34 (1953) 1.
- ⁴ G. CERIOTTI, *J. Biol. Chem.*, 198 (1952) 297.
- ⁵ M. ERRERA, *Brit. J. Radiol.*, 27 (1954) 76.
- ⁶ M. ERRERA, *Symposium de Radiobiologie*, Liège, 1954.
- ⁷ G. H. HOGEBOOM ET W. C. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.*, 197 (1952) 611.
- ⁸ R. HURLBERT ET V. R. POTTER, *J. Biol. Chem.*, 209 (1954) 1 et 41.
- ⁹ D. KANAZIR ET M. ERRERA, *Biochim. Biophys. Acta*, 11 (1953) 451.
- ¹⁰ D. KANAZIR ET M. ERRERA, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 62.
- ¹¹ D. KANAZIR, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 589.
- ¹² D. KANAZIR, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 592.
- ¹³ A. KELNER, *J. Bacteriol.*, 65 (1953) 252.
- ¹⁴ M. E. JONES, F. LIPMANN, H. HILZ ET F. LYNEN, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 3285.
- ¹⁵ T. LATARJET, P. MORENNE ET R. BERGER, *Ann. Inst. Pasteur, Paris*, 85 (1953) 174.
- ¹⁶ H. STERN ET A. E. MIRSKY, *J. Gen. Physiol.*, 36 (1952) 181.
- ¹⁷ B. L. STREHLER ET J. R. TOTTER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 40 (1952) 28.
- ¹⁸ E. M. WITKIN, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 32 (1946) 59 et 221.

Reçu le 17 novembre 1954