

## RECHERCHES SUR LA CINÉTIQUE DES TRANSFORMATIONS BACTÉRIENNES

par

RENÉ THOMAS\*

*Laboratoire de Génétique, Institut de Biologie Physico-chimique, Paris (France)*

### INTRODUCTION

Le mécanisme de la transformation d'une bactérie par l'acide désoxyribonucléique (ADN) d'une autre souche est encore très obscur. Peu d'étapes ont été clairement mises en évidence, encore leur signification même échappe-t-elle en grande partie. Cet état de choses peut être attribué principalement au fait que les premiers systèmes de transformation connus se prêtaient mal à des recherches quantitatives. Le transfert, chez le Pneumocoque, de la résistance à un antibiotique par l'ADN purifié à partir d'un mutant résistant (HOTCHKISS<sup>1, 2, 3</sup>) répond à ce besoin ; nous avons appliqué ici l'un de ces systèmes (HOTCHKISS<sup>3</sup>) à l'étude cinétique de différents points du processus de transformation.

#### *Compétence*

On sait qu'un milieu, même parfaitement approprié à la croissance des Pneumocoques, n'est pas nécessairement propre à leur transformation : c'est ainsi qu'il doit contenir une petite quantité d'albumine (HOTCHKISS ET EPHRUSSI-TAYLOR<sup>4</sup>). D'autre part, une culture de Pneumocoques dans un milieu favorable ne contient pas à tout moment des bactéries (bactéries "compétentes") capables de produire, sous l'action d'un ADN étranger, des colonies transformées. La compétence apparaît au cours de la phase de multiplication exponentielle et retombe avant la fin de la croissance (McCARTY, TAYLOR ET AVERY<sup>5</sup>; HOTCHKISS<sup>3</sup>). La signification de cette propriété est loin d'être élucidée. HOTCHKISS<sup>3</sup> a montré que certains facteurs qui induisent une synchronisation des divisions cellulaires entraînent des variations cycliques de la compétence ; il en a déduit que l'état de compétence pourrait être lié à un stade de la division cellulaire.

Notons que, si l'état de compétence ne peut, jusqu'ici, être mis en évidence que par la transformation, il n'en est pas moins indépendant de la présence de l'ADN transformant.

#### *Réactions entre les bactéries compétentes et l'ADN transformant*

De ce qui précède résulte un obstacle majeur à l'étude cinétique des interactions entre les bactéries compétentes et l'ADN transformant : la concentration de l'un des

\* Aspirant du Fonds National de la Recherche Scientifique. Adresse permanente : Laboratoire de Morphologie animale, Université de Bruxelles.

*Bibliographie p. 481.*

“réactifs” — les bactéries compétentes — varie de manière complexe au cours de la culture, indépendamment de la réaction proprement dite. Cette difficulté mise à part, une étape de la transformation paraît très accessible à l’expérimentation: la formation, à partir du mélange des bactéries compétentes et de l’ADN transformant, d’un “complexe” ADN-bactéries, réfractaire à l’action de la désoxyribonucléase (DNase). En fait, nous verrons plus loin la réelle complexité d’interprétation de telles expériences. Une chose est certaine, cependant: peu de temps (30 sec à 1 min: STOCKER, KRAUSS ET MC LEOD<sup>6</sup>; HOTCHKISS<sup>3</sup>) après l’addition de l’ADN transformant à une culture contenant des bactéries compétentes, une partie de ces bactéries ont déjà mis l’ADN nécessaire à leur transformation à l’abri de la DNase.

### *Expression phénotypique et multiplication du gène nouveau*

A partir du moment où les bactéries compétentes ont été mises en contact avec l’ADN transformant, on peut, à intervalles, transférer des aliquotes de la suspension dans un milieu solide contenant de la streptomycine. On observe ainsi (HOTCHKISS<sup>3</sup>) que le nombre des “unités” capables de donner naissance à une colonie résistante atteint, après 1 h à 1 h 30 min, un palier, puis augmente de nouveau. Il est assez normal de considérer que le premier accroissement représente l’expression phénotypique du caractère nouveau; le palier indique que, pendant un certain temps, le gène nouveau ne s’est pas multiplié. La signification précise des deux périodes de latence — délai de l’expression phénotypique, délai de la multiplication du caractère nouveau — est loin d’être claire.

Remarquons en terminant cette introduction que les données actuelles ne fournissent aucune indication sur le moment où se fait l’intégration de l’ADN transformant dans le génome de la bactérie réceptrice.

### PARTIE EXPERIMENTALE

#### *Matériel et méthodes*

Nous avons utilisé une souche de Pneumocoques non encapsulée (R 36 A) dérivée d’une souche (D 39) de type II. Les milieux pour le maintien des souches et la réalisation des transformations sont ceux utilisés par H. EPHRUSSI-TAYLOR<sup>7</sup>, milieu 3) légèrement modifiés (H. EPHRUSSI-TAYLOR, communication personnelle) de la sorte: pour 2,5 l d’eau distillée, on emploie 100 mg CaCl<sub>2</sub> et pas de MgCl<sub>2</sub>.

L’agent transformant est préparé selon<sup>7</sup> à partir d’un mutant résistant à plus de 2,000 µg/ml de streptomycine (HOTCHKISS<sup>3</sup>). Il est conservé à la chambre froide en solution à 1 mg/ml dans NaCl 0,14 M.

Une culture fraîchement arrivée au maximum de sa croissance est diluée 10 fois dans du milieu 3 sans albumine et incubée à 37° (“préculture”) jusqu’au peu après la croissance maximum (2 h 15 min; environ 3 · 10<sup>8</sup> bactéries/ml). C’est à partir de cette préculture que sont faites les dilutions qui servent de point de départ aux expériences de transformation.

HOTCHKISS<sup>3</sup> a souligné l’influence de facteurs tels que agitation ou variations de la température sur la compétence des cultures. Sans doute une culture en phase stationnaire, comme celle dont nous partons, est-elle moins sensible à ces facteurs. Cependant, dans le souci d’uniformiser autant que possible les effets secondaires de la mise en marche de la culture, nous avons laissé en général la préculture pendant 15 min à la température du laboratoire avant de la diluer dans le milieu de transformation.

La préculture est laissée 15 min à la température du laboratoire, puis repiquée à la dilution

voulue (en général  $10^{-1}$  ou  $10^{-2}$ , soit  $3 \cdot 10^7$  ou  $3 \cdot 10^6$  bactéries/ml, respectivement) dans du milieu à  $37^\circ$  contenant de l'albumine.

Le principe transformant est, en général, mis au contact des bactéries par l'addition à la culture d'un vingtième de son volume de la dilution voulue d'ADN transformant. L'addition, s'il y a lieu, de DNase, est basée sur la technique de McCARTY, TAYLOR ET AVERY<sup>5</sup>.

La durée d'incubation à  $37^\circ$  entre l'addition de l'ADN transformant et la mise en contact des bactéries avec la streptomycine est basée sur les résultats exprimés par la Fig. 1. Les cultures éventuellement après une dilution appropriée, sont versées dans des boîtes de Pétri, où l'on coule aussitôt du milieu gélosé (EPHRUSSI-TAYLOR<sup>7</sup>, milieu 2) additionné de  $50 \mu\text{g}$  dihydrostreptomycine/ml.

### Expression phénotypique

Nous commencerons par l'exposé des résultats concernant cette étape, dont la connaissance descriptive est indispensable à l'étude des autres points.

Une culture contenant des bactéries compétentes est additionnée d'ADN transformant; après 5 min, on ajoute de la DNase selon McCARTY, TAYLOR ET AVERY<sup>5</sup>. A intervalles, des aliquotes de la culture sont prélevées et coulées aussitôt dans le milieu gélosé contenant de la streptomycine ( $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ).

Le résultat d'une telle expérience est exprimé par la Fig. 1 (courbe *a*). En accord avec des données de HOTCHKISS<sup>8</sup>, le phénotype nouveau est exprimé pleinement entre 1 h et 1 h 30 min après l'addition de l'ADN transformant. Le palier de la courbe *a* ne résulte pas de l'épuisement du milieu: la courbe de croissance (*b*) montre qu'au moment où l'on atteint le palier de la courbe de transformation (*a*), il reste, dans cette expérience, le temps nécessaire à deux divisions.

### Etude de la compétence en fonction du temps

Dans cette partie du travail, nous utiliserons toujours une concentration d'ADN ("excès" d'ADN) telle ( $0.5$  à  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) qu'un accroissement de cette concentration n'entraîne plus d'accroissement sensible du nombre de transformations observées. Deux remarques s'imposent ici.

(1) Le terme d'excès, utilisé ici faute de mieux, pourrait laisser supposer que les bactéries compétentes peuvent être en quelque sorte titrées par l'ADN transformant, une quantité donnée d'ADN dans le milieu permettant la transformation d'un nombre donné de bactéries. Nous verrons plus loin (page 475) qu'il n'en est rien et qu'une concentration donnée d'ADN (même "limitante") peut transformer d'autant plus de bactéries que la concentration des bactéries compétentes est elle-même plus élevée. Ceci suggère l'intervention d'un facteur de probabilité de rencontre: une concentration "limitante" d'ADN n'est pas telle par épuisement, mais

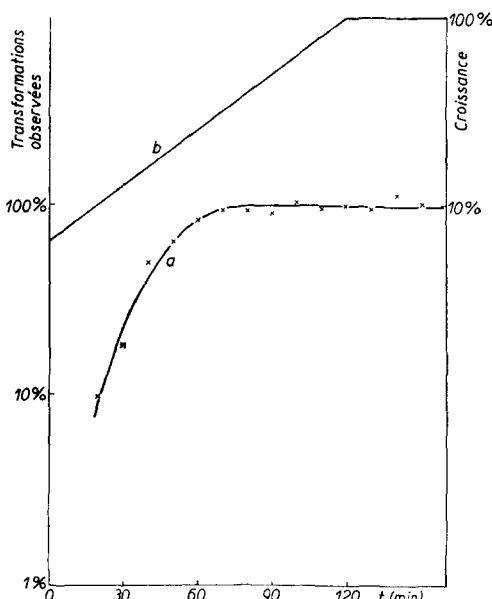


Fig. 1. Courbe *a*. En abscisses, le temps d'incubation, à  $37^\circ$ , entre l'addition de l'ADN et la mise au contact de la streptomycine. En ordonnées, les transformations observées, exprimées en % de la valeur de palier. Courbe *b*. Courbe de croissance théorique de la culture (période de division, 30 min) exprimée en % de la croissance maximum. (Coordonnées semi-logarithmiques).

parce que toutes les bactéries compétentes n'ont pas le temps d'y rencontrer, en temps voulu, la particule voulue.

(2) Si la compétence détermine la possibilité de franchir l'une des étapes de la transformation, il se peut que le nombre des transformations observées soit limité, en outre, au cours d'étapes ultérieures. C'est pourquoi l'on ne peut affirmer que le nombre de transformations observées à la suite de l'action d'un "excès" d'ADN transformant représente réellement le nombre de bactéries qui ont été compétentes durant la présence de l'ADN dans le milieu. Ainsi, si l'intégration de l'ADN dans le génome peut être comparé à un crossing-over à l'échelle moléculaire (voir EPHRUSSI-TAYLOR<sup>7</sup>) on peut s'attendre, même dans les meilleures conditions — celles d'une

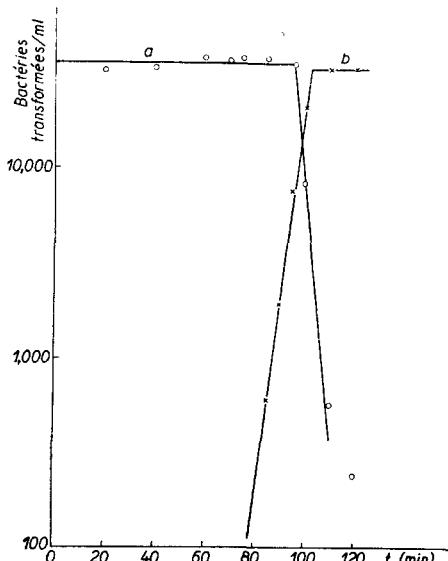


Fig. 2. Courbes cumulatives de compétence, obtenues par les techniques (a) et (b). (inoculum:  $3 \cdot 10^6$  bactéries/ml). En ordonnées, le nombre de transformations observées (par ml de culture non diluée). En abscisses: courbe a, le temps d'addition de l'ADN transformant; courbe b, le temps d'addition de la DNase (l'ADN étant présent dès l'origine de la culture). (Coordonnées semi-logarithmiques).

durées de croissance. On obtient ainsi décroissante. Cette courbe donne le nombre de bactéries qui sont compétentes à l'instant  $t$  ou qui le seront ultérieurement; en d'autres termes, elle renseigne sur la disparition de la compétence dans la culture, mais non sur son apparition.

(b) On peut mettre les bactéries en contact avec l'ADN dès le début des cultures et ajouter, dans les différents tubes, de la DNase après diverses durées de croissance. On obtient ainsi le nombre de bactéries qui, au temps  $t$ , ont déjà réagi avec l'ADN au moins jusqu'au point où ce dernier est protégé de la DNase. La courbe, également ascendante cette fois (Fig. 2, courbe b) devrait, à première vue, renseigner sur l'apparition de la compétence dans la culture, avec sans doute un retard correspondant à la durée nécessaire pour qu'une bactérie compétente mette

bactérie compétente en présence d'un "excès" d'ADN transformant — à ce que la fréquence de la transformation soit limitée par celle des recombinaisons où l'unité transformante de l'ADN est réellement utilisée. D'autres facteurs pourraient conduire à la même situation: par exemple une compétition entre molécules différentes d'ADN du facteur transformant, molécules qui ne sont pas nécessairement toutes des vecteurs du caractère que l'on veut induire. Il serait intéressant de comparer les fréquences maxima de diverses transformations, en utilisant des aliquotes d'une même suspension de bactéries compétentes. Sans perdre de vue cette remarque, nous parlerons fréquemment, par simplification, du nombre de bactéries compétentes pour désigner le nombre maximum de bactéries qui, dans ces conditions, peuvent réagir avec l'ADN (compétence) et pousser la transformation jusqu'à son stade final.

L'étude de la compétence peut être abordée de diverses manières.

(a) On peut, dans une série de cultures parallèles, ajouter l'ADN après différentes durées de croissance. On obtient ainsi (Fig. 2, courbe a) une courbe cumulative qui renseigne sur la disparition de la compétence dans la culture, mais non sur son apparition.

à l'abri de la DNase l'ADN transformant qu'elle a absorbé. Nous reviendrons, au cours de la discussion, sur l'interprétation de ce type d'expériences.

(c) L'addition de l'ADN à l'instant  $t$  et de la DNase à l'instant  $t'$  permet d'évaluer la compétence entre ces deux instants. Les courbes ainsi obtenues, qui ne sont pas cumulatives, ne renseignent cependant pas sur la compétence à un instant donné mais entre deux instants.

(d) Il semble que la détermination directe de la compétence à un instant donné soit rendue possible par l'observation suivante. Au lieu d'ajouter l'ADN sous un faible volume liquide, on peut diluer, au temps  $t$ , des aliquotes de la culture (ou de cultures parallèles) dans du milieu frais contenant l'ADN. On obtient alors, si l'on porte le nombre des transformations observées en fonction du temps où la dilution est réalisée, une courbe *non cumulative* (voir, par exemple, les courbes de la Fig. 3). Tout se passe comme si la dilution dans du milieu frais, tout en permettant la réaction des bactéries compétentes avec l'ADN, bloquait momentanément\* l'apparition de nouvelles bactéries compétentes. Ce point apparaîtra plus clairement lors de l'examen des courbes donnant la variation de la compétence après dilution (voir page 473). Nous admettrons que la compétence peut être déterminée à un instant donné par la technique suivante:

D'une culture (ou de cultures parallèles) des aliquotes sont prélevées au temps  $t$ , et transférées aussitôt dans 10 volumes de milieu frais contenant un "excès" d'ADN transformant. De la DNase est généralement ajoutée après 20 à 30 minutes\*, et les suspensions sont incubées pendant une même durée (1 h à 1 h 30 min) entre le contact avec l'ADN et la mise en présence de streptomycine.

Cette technique a été utilisée pour l'étude de la compétence de cultures issues d'inocula variés. On constate que la compétence décrit, au cours de la culture, des pics abrupts comparables à ceux que HOTCHKISS<sup>3</sup> a obtenus en utilisant des cultures synchronisées. La Fig. 3 montre l'apparition d'une première (et unique pour la dilution  $10^{-1}$ ) vague de compétence pour différents inocula. Comme le montrent les Figs. 3 et 4 et le Tableau I, la compétence apparaît d'autant plus rapidement que l'inoculum est plus élevé, sans cependant que le moment du premier maximum de compétence corresponde à une densité de population donnée; la droite de la Fig. 4 n'a évidemment aucune prétention explicative.

Dans la série précédente d'expériences, la mise en contact des bactéries avec

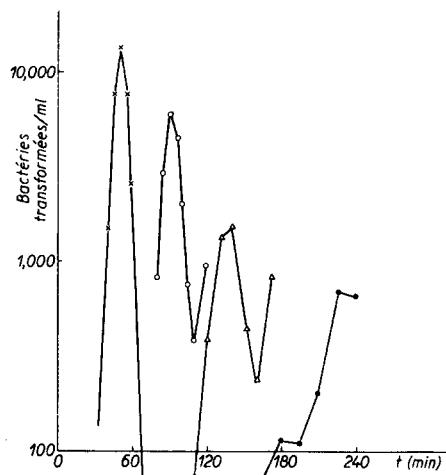


Fig. 3. Courbes de compétence de cultures issues d'inocula variés.  $\times$  dilution  $10^{-1}$  (inoculum  $3 \cdot 10^7$  bactéries/ml);  $\circ$  dilution  $10^{-2}$  (inoculum  $3 \cdot 10^6$  bactéries/ml);  $\triangle$  dilution  $10^{-3}$  (inoculum  $3 \cdot 10^5$  bactéries/ml);  $\bullet$  dilution  $10^{-4}$  (inoculum  $3 \cdot 10^4$  bactéries/ml). En abscisses, le temps (âge de la culture); en ordonnées, le nombre de transformations observées par ml de la culture dont on étudie la compétence. (Coordonnées semi-logarithmiques).

\* On déclenche, par le fait même de la dilution, une culture nouvelle qui, elle aussi, aura sa période de compétence. Il est possible d'éviter l'obscurcissement des résultats par cette compétence secondaire; le moyen le plus simple est d'ajouter de la DNase avant qu'elle ne survienne.

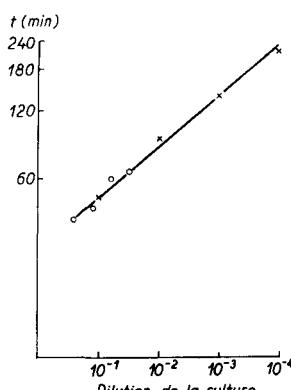


TABLEAU I

Dilution de la culture	Inoculum (bactéries/ml)	Temps écoulé entre le début de la culture et le premier maximum de compétence
1/4	$7.5 \cdot 10^7$	40 min
1/8	$3.7 \cdot 10^7$	45 min
1/10	$3.0 \cdot 10^7$	50 min
1/16	$1.9 \cdot 10^7$	60 min
1/32	$9.4 \cdot 10^6$	65 min
1/100	$3.0 \cdot 10^6$	90 min
1/1000	$3.0 \cdot 10^5$	140 min
1/10,000	$3.0 \cdot 10^4$	220 min

Fig. 4. Position du premier pic de compétence en fonction de l'inoculum. En abscisses, l'inoculum (exprimé en dilution). En ordonnées, le temps entre le début de la culture et le premier maximum de compétence. (Coordonnées logarithmiques).

l'albumine coïncide avec le début de la culture (dilution d'une culture stationnaire dans du milieu contenant de l'albumine). Aussi ne permettent-elles pas de voir si le facteur essentiel qui détermine le moment de l'apparition de la compétence est la concentration bactérienne au départ de la culture ou la concentration bactérienne au moment de l'addition de l'albumine. Quelques expériences préliminaires sur l'effet d'un retard à l'addition de l'albumine ont été réalisées. L'expérience dont les résultats sont représentés par la Fig. 5, consiste à mettre en route une série de cultures parallèles dans un milieu sans albumine et à ajouter l'albumine, dans les différents tubes, avec des retards croissants. On voit que la compétence n'apparaît qu'après une certaine durée de croissance en présence d'albumine; cette durée est d'autant moindre que la concentration bactérienne au moment de l'addition de l'albumine est plus élevée.

#### Durée moyenne de la compétence individuelle des bactéries

On peut se demander si la durée de compétence individuelle est suffisante pour que les bactéries les plus tardives d'une vague de compétence acquièrent la propriété avant qu'une fraction appréciable des premières bactéries de la vague ne l'aient déjà perdue. Si en était ainsi, l'intervalle de temps séparant les instants où, sur les branches ascendantes et descendantes du pic, la compétence atteint la moitié de sa valeur maximum, serait une mesure de la durée de compétence individuelle des bactéries:

Bibliographie p. 481.

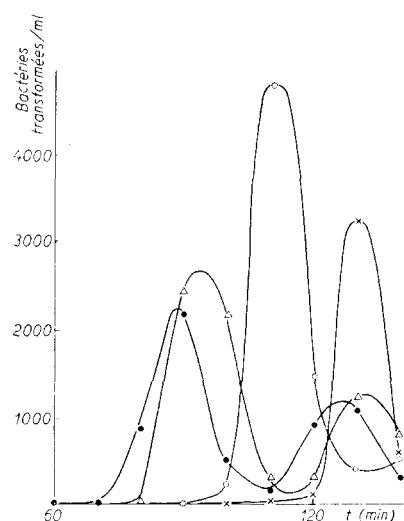


Fig. 5. Courbes de compétence de cultures parallèles (dilution  $10^{-2}$ ) où l'albumine a été ajoutée avec des retards croissants par rapport à l'origine de la culture: ● 0 min; ○ 60 min; △ 30 min; × 90 min. En abscisses, le temps compté à partir de l'origine de la culture. En ordonnées, le nombre de transformations observées par ml de la suspension dont on étudie la compétence.

ces instants seraient, en effet, ceux où la moitié des bactéries de la vague ont, respectivement, acquis et perdu la compétence. Le fait que la valeur maximum de la courbe de compétence\* soit voisine de la valeur de palier des courbes cumulatives\*\* (Fig. 6) indique que la condition n'est pas loin d'être remplie. Il semble donc que, dans nos conditions d'expérience, la durée moyenne de la compétence individuelle des bactéries soit au maximum égale, et probablement de peu inférieure, à l'intervalle de temps entre les deux points du pic de compétence qui correspondent à la moitié de la valeur maximum. L'intervalle est, dans les conditions où nous avons opéré, voisin de 15 minutes. Cette valeur maximum concorde avec l'estimation de HOTCHKISS<sup>3</sup> obtenue par des moyens différents.

#### *Etude de la compétence après dilution dans du milieu frais*

Nous avons vu que la dilution d'une culture dans du milieu frais paraît bloquer momentanément l'apparition de nouvelles bactéries compétentes. La compétence après dilution a été suivie, généralement selon la technique suivante.

Une partie d'une culture contenant des bactéries compétentes est diluée dans du milieu frais à la température voulue, et l'ensemble est aussitôt réparti dans une série de tubes maintenus à cette température. Après la durée voulue, on ajoute l'ADN à des tubes, qui sont aussitôt, s'il y a lieu, transférés à 37°.

Aux températures suffisamment basses, il n'y a apparemment pas de réaction entre les bactéries et l'ADN, et on obtient alors les mêmes résultats, que l'ADN soit ajouté à la fin du refroidissement ou au début. Il n'en est pas de même aux températures plus élevées.

Les cultures utilisées pour ces expériences partaient d'incuba 10<sup>-1</sup> ou 10<sup>-2</sup>, avec des durées variables d'incubation; ces variations des conditions paraissent avoir peu d'influence sur les courbes donnant la décroissance de la compétence.

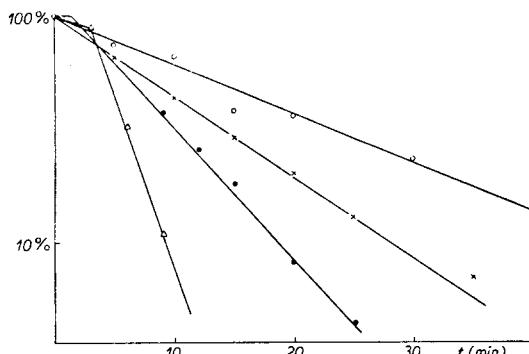


Fig. 7. Chute de la compétence après dilution dans du milieu frais  $\Delta$  à 37°;  $\bullet$  à 25°;  $\times$  à 11°;  $\circ$  à 2°. En abscisses, le temps, compté à partir de la dilution. En ordonnées, les bactéries compétentes, exprimées en % de la valeur initiale. (Coordonnées semi-logarithmiques).

La Fig. 7 montre la chute de la compétence en fonction du temps après la dilution, à quatre températures différentes (37°, 25°, 11° et 2° C). Deux à trois minutes après la dilution (37°, 25°) ou même dès le moment de la dilution (11°, 2°), la décroissance de la compétence est exponentielle. On peut la représenter, *formellement*, comme une

\* obtenue par la technique (d) (p. 471).

\*\* obtenues par les techniques (a) ou (b) (page 470) ou encore, comme c'est le cas pour l'expérience représentée par la Fig. 6, en mettant l'ADN dès le début de la culture et en interrompant au temps  $t$  l'apparition de nouvelles bactéries compétentes par la dilution d'une aliquote de la culture dans du milieu frais (contenant également un excès d'ADN pour que la concentration finale de l'ADN soit la même que dans l'expérience menée parallèlement par la technique (d)).

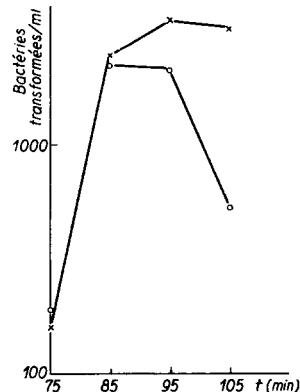


Fig. 6. Courbes de compétence (x) cumulative et (o) non cumulative (voir texte p. 470-471). En abscisses, le temps compté à partir de l'origine de la culture. En ordonnées, le nombre de transformations observées par ml de la culture dont on étudie la compétence. (Coordonnées semi-logarithmiques).

réaction monomoléculaire (bactéries compétentes, BC  $\longrightarrow$  bactéries ayant perdu la compétence):

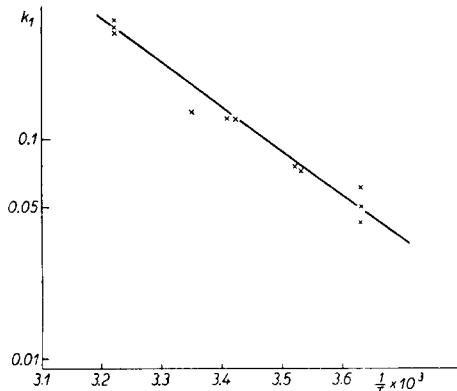


Fig. 8. Constantes  $k_1$  (déduites de la partie linéaire des courbes de la Fig. 7 et d'autres expériences de ce type) en fonction de l'inverse de la température absolue. (Coordonnées semi-logarithmiques).

Quelle que soit la signification de cette forme, nous pensons qu'il est utile, dans une étude cinétique des réactions entre bactéries compétentes et ADN transformant, de posséder un système où le nombre des bactéries compétentes varie de manière simple en fonction du temps.

TABLEAU II

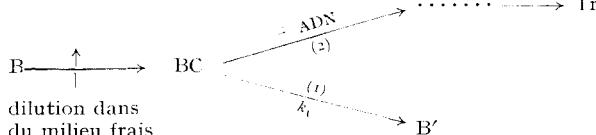
Température ( $T$ °C)	$k_1 / \log_e, \text{min}^{-1}$
2	0.05
14	0.08
25	0.13
37	0.33

Les constantes  $k_1$ , déduites, aux différentes températures, de la partie linéaire des courbes de la Fig. 7, sont reproduites, à titre documentaire, dans le Tableau II. Signalons que ces valeurs satisfont raisonnablement à la relation linéaire usuelle entre le logarithme d'une constante de vitesse et l'inverse de la température absolue (Fig. 8). Le  $Q_{10}$  est voisin de 1.7.

#### Réactions entre les bactéries compétentes et l'ADN transformant

Comme nous l'avons remarqué plus haut, l'une des difficultés d'une telle étude réside dans le fait que la concentration des bactéries compétentes varie, non seulement du fait de la réaction à étudier elle-même, mais aussi indépendamment de la présence de l'ADN transformant (variations de la compétence de la culture). La connaissance des effets de la dilution dans du milieu frais permet de simplifier considérablement les conditions. En effet, nous pouvons ajouter l'ADN à partir de 2 ou 3 minutes après la dilution dans du milieu frais et choisir le moment de l'addition de l'ADN comme instant initial. A ce moment:

- (1) il n'apparaît plus, momentanément, de nouvelles bactéries compétentes.
  - (2) le nombre des bactéries compétentes décroît en fonction du temps selon l'équation (1).
  - (3) les réactions entre les bactéries compétentes et l'ADN sont mises en route.
- On peut formuler le schéma:



(B: bactéries; BC: bactéries compétentes; B': bactéries ayant perdu la compétence avant d'avoir pu réagir avec l'ADN transformant; Tr: bactéries transformées).

Ce schéma exprime que les bactéries compétentes, dès l'addition de l'ADN transformant, suivent deux réactions simultanées — soit la réaction avec l'ADN transformant, soit la perte de la compétence avant d'avoir pu réagir avec l'ADN transformant; une seule de ces réactions peut conduire à la formation de bactéries transformées. On peut penser que la fraction des bactéries compétentes qui se transforment dépend de la vitesse relative de ces deux réactions, et que l'effet de la concentration en ADN sur le pourcentage des bactéries compétentes qui se transforment résulte de la dépendance de la vitesse de la réaction (2) vis à vis de la concentration en ADN. *S'il en est bien ainsi, on peut espérer tirer, de la relation qui lie la concentration des bactéries transformées à la concentration de l'ADN transformant, des renseignements sur la cinétique des premiers stades de la réaction entre les bactéries compétentes et l'ADN.*

Des aliquotes d'une suspension de bactéries dont la compétence est en chute exponentielle sont additionnées de diverses concentrations d'ADN transformant. On ajoute de la DNase après 20 à 30 min (voir la note, page 471). Une incubation de 1 h 15 min à 1 h 30 min à 37° sépare l'addition de l'ADN de la mise en contact avec la streptomycine sur milieu solide.

Dans ces conditions, le nombre des bactéries transformées décrit, en fonction de la concentration de l'ADN, la courbe de la Fig. 9. Linéaire aux faibles concentrations d'ADN, cette courbe se termine en palier aux concentrations élevées. La même forme a été obtenue par STOCKER, KRAUSS ET MCLEOD<sup>6</sup>. Exprimée en % du nombre maximum de transformations, la courbe paraît fixe, c'est à dire que, dans un milieu donné et pour une préparation donnée d'ADN, une concentration donnée d'ADN transforme un pourcentage donné du nombre maximum des bactéries transformables. La concentration qui transforme la moitié du nombre total de bactéries transformables est, dans cette série d'expériences, voisine de 0.05 µg/ml, indépendamment, semble-t-il, de la concentration des bactéries compétentes.

Cette situation peut être interprétée à partir des deux hypothèses suivantes :

(1) La réalisation d'une transformation a pour point de départ une rencontre efficace entre une bactérie compétente et une particule douée d'activité transformante, le terme "rencontre" étant pris ici dans un sens aussi large que possible (adsorption, pénétration, contact avec un récepteur donné?).

Si cette première hypothèse est justifiée, on peut traiter la réaction entre les bactéries compétentes et l'ADN transformant comme une réaction biparticulaire :

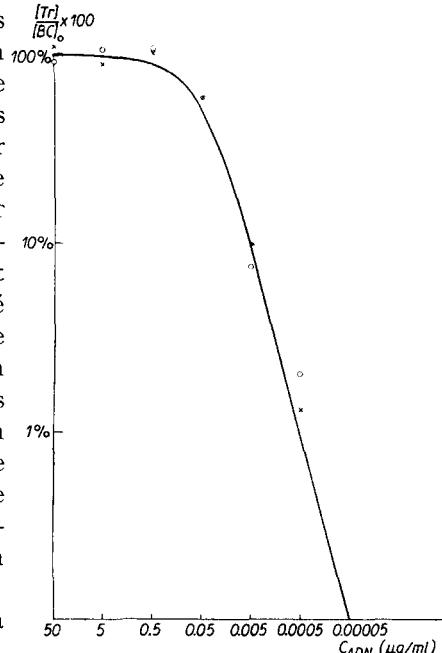
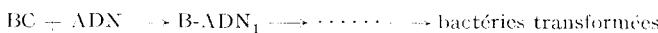


Fig. 9. En abscisses, la concentration de l'ADN transformant. En ordonnées, la fréquence de la transformation, exprimée en % de la valeur maximum. La courbe tracée représent l'équation :

$$[Tr] = [BC]_0 \frac{[ADN]}{k_1/k_2 + [ADN]}.$$

avec  $k_1/k_2 = 0.05 \mu\text{g ADN/ml. (Coordonnées logarithmiques).}$

## B-ADN



(B-ADN<sub>1</sub> représente le premier produit de la réaction; les bactéries qui en sont *au moins* au stade B-ADN<sub>1</sub> seront représentées par B-ADN)

et l'on peut écrire:

$$\frac{d[B-ADN]}{dt} = k_2 [ADN] [BC] \quad (2)$$

(2) Que l'ADN soit ou non "en excès", la concentration des particules transformantes dans le milieu est suffisante, dans nos conditions de travail, pour que l'on puisse la considérer comme constante au cours de la réaction avec les bactéries compétentes. Cette hypothèse a été introduite parce qu'elle simplifie, ainsi que nous le verrons, considérablement les développements. Elle est rendue raisonnable par le fait que le nombre de particules d'ADN dans le milieu est toujours, de très loin, plus élevé que le nombre des bactéries transformées: le rapport est, dans les meilleures conditions, de l'ordre de 10<sup>4</sup> dans nos expériences et de l'ordre de 10<sup>3</sup> dans des expériences de ZAMENHOF, ALEXANDER ET LEIDY<sup>8</sup> sur *Hemophilus*.

Si (hypothèse 2) la concentration en ADN dans le milieu peut être considérée comme constante au cours des réactions, on peut écrire *à tout moment*, en tenant compte des équations (1) et (2):

$$\frac{[B-ADN]}{[B']} = \frac{k_2 [ADN] [BC]}{k_1 [BC]} = \frac{k_2 [ADN]}{k_1} \quad \text{ou} \quad \frac{[B-ADN]}{[B'] + [B-ADN]} = \frac{k_2 [ADN]}{k_1 + k_2 [ADN]}$$

Comme [B-ADN] tend vers le nombre de transformations observées/ml, [Tr], et que [B'] + [B-ADN] tend vers la concentration initiale des bactéries compétentes [BC]<sub>0</sub>, ou a, *à l'issu de l'expérience*,

$$[Tr] = [BC]_0 \frac{[ADN]}{k_1/k_2 + [ADN]} \quad (3)$$

Cette relation, liant la concentration des bactéries transformées à la concentration de l'ADN transformant dans le milieu et à la concentration des bactéries compétentes au moment de la dilution dans le milieu frais contenant l'ADN, a les caractéristiques suivantes:

(1) aux faibles concentrations en ADN ( $[ADN] \ll k_1/k_2$ ), le nombre des transformations est proportionnel à la concentration de l'ADN et des bactéries compétentes.

(2) aux fortes concentrations en ADN ( $[ADN] \gg k_1/k_2$ ), le nombre des transformations est sensiblement égal au nombre des bactéries compétentes (voir remarque (2), page 470).

(3) la concentration d'ADN qui transforme un pourcentage donné du nombre maximum de bactéries transformables est une constante; en particulier, la concentration en ADN qui transforme la moitié des bactéries compétentes est numériquement égale au rapport  $k_1/k_2$  des constantes de vitesse des deux réactions simultanées.

On voit que ces caractéristiques rendent compte des résultats expérimentaux exposés plus haut; la courbe tracée à la Fig. 9 représente l'équation (3) avec, pour valeur numérique de  $k_1/k_2$ , la concentration en ADN qui transforme la moitié des bactéries compétentes. Poursuivant les conséquences du raisonnement, nous ad-

mettrons que la détermination expérimentale de la concentration en ADN transformant la moitié des bactéries compétentes fournit effectivement la valeur numérique de  $k_1/k_2$ . Comme les valeurs de  $k_1$  sont connues (Tableau II), on peut calculer les (valeurs de  $k_2^*$  et, de là, construire des courbes de réaction entre les bactéries compétentes et l'ADN transformant. Ces courbes\*\* ont été tracées (Fig. 10) (en utilisant les constantes  $k_1$  et  $k_2$  observées, dans notre milieu, pour une température de  $37^\circ$ ) pour deux concentrations d'ADN:  $[ADN] = 0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$  (courbe *a*) et  $[ADN] \rightarrow 0$  (courbe *b*).

#### Etude des effets de la désoxyribonucléase

Après avoir dilué des bactéries compétentes dans du milieu frais contenant l'ADN transformant, on peut suivre, en fonction du temps, l'effet de l'addition de DNase sur le nombre final des transformations. On obtient, en portant le nombre

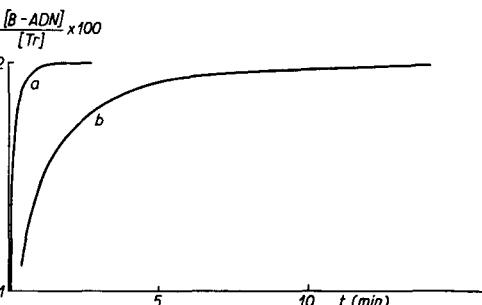


Fig. 10. Courbes calculées pour la vitesse de formation du complexe B-ADN. (a)  $[ADN] = 0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; (b)  $[ADN] \rightarrow 0$ . En abscisses, le temps. En ordonnées, les complexe B-ADN, en % du nombre final.

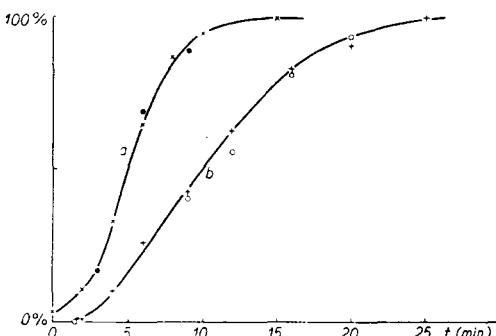


Fig. 11. Comparaison, à  $37^\circ$  (courbe *a*) et à  $25^\circ$  (courbe *b*) de la perte de la compétence et du développement de l'insensibilité à la DNase. En abscisses, le temps compté à partir du repiquage dans du milieu frais contenant ( $\times$ ,  $+$ ) ou non ( $\bullet$ ,  $\circ$ ) du DNA. En ordonnées, les bactéries ayant mis leur ADN transformant à l'abri de la DNase ( $\times$ ,  $+$ ) ou les bactéries ayant perdu la compétence ( $\bullet$ ,  $\circ$ ), en % du nombre maximum de transformations.

de transformations en fonction du temps d'addition de la DNase, des courbes sigmoides. On pourrait, comme STOCKER, KRAUSS ET MC LEOD<sup>6</sup>, expliquer ainsi cette forme: l'une des phases de la transformation serait la formation d'un complexe résistant à la DNase, dont la vitesse de formation serait limitée par deux réactions consécutives. Dans ce cas notre "complexe" B-ADN<sub>1</sub>, encore sensible à la DNase, serait le chaînon intermédiaire.

Les résultats exprimés par la Fig. 11 suggèrent cependant une autre interprétation. Ces données montrent qu'après dilution dans du milieu frais, l'établissement de l'indifférence vis à vis de la DNase se superpose à la disparition de la compétence; en d'autres termes, le pourcentage des futures bactéries transformées qui ont déjà

\*  $k_1$  est exprimé en  $\text{min}^{-1}$ ;  $k_2$ , faute de certitude concernant la concentration réelle des particules transformantes, est exprimé en  $(\mu\text{g d'ADN})^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$ , et  $k_1/k_2$ , en  $\mu\text{g d'ADN}/\text{ml}$ .

À  $37^\circ$  et dans le milieu utilisé,  $k_1 = 0.3_3 (\text{min}^{-1})$  et  $k_1/k_2 = 0.05 (\mu\text{g}/\text{ml})$  d'où  $k_2 = 6.6 (\mu\text{g}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{min}^{-1})$ .

\*\* de la forme:

$$[\text{B-ADN}] = [\text{BC}]_0 \frac{[\text{ADN}]}{k_1/k_2 + [\text{ADN}]} \left\{ 1 - e^{-(k_1 + k_2 [\text{ADN}])t} \right\}$$

$$\text{ou } [\text{B-ADN}] = [\text{Tr}] \left\{ 1 - e^{-(k_1 + k_2 [\text{ADN}])t} \right\}$$

mis à l'abri de la DNase l'ADN nécessaire à leur transformation est, à tout moment, égal au pourcentage des bactéries initialement compétentes qui ont perdu la compétence. Il paraît douteux que la coïncidence, à deux températures (37° et 25°) et dans une série d'expériences, des courbes représentatives des deux phénomènes, soit fortuite. Une interprétation de ces expériences est donnée au cours de la discussion.

#### DISCUSSION

##### *Etude descriptive de la compétence*

Une discussion étendue de ce premier groupe de résultats paraît prématuée. Dans nos conditions de travail, la compétence décrit, selon l'inoculum, une ou plusieurs vagues comparables à celles décrites par HOTCHKISS<sup>3</sup> dans le cas de cultures synchronisées. HOTCHKISS suppose que la compétence est liée à un stade de la division cellulaire, le comportement cyclique de la compétences s'expliquant dès lors par une synchronisation des divisions cellulaires. Cette hypothèse peut fournir une interprétation de certains points du présent travail. Elle paraît, par contre, assez difficilement conciliable avec d'autres observations: c'est ainsi qu'il semble possible de déplacer la position des pics de compétence *de manière continue*, par rapport au début de la culture, en agissant soit sur l'inoculum, soit sur le moment de l'addition de l'albumine.

##### *Compétence et interactions bactéries → ADN transformant*

Peut-être l'interprétation des résultats dont la Fig. 11 donne un exemple est-elle moins prématuée. Deux phénomènes qui, jusqu'ici, ne paraissaient présenter que des rapports lointains, apparaissent comme étroitement liés. Le premier est la chute de la compétence d'une culture après dilution dans du milieu frais; rappelons que ce processus a été étudié en prélevant, à intervalles, des aliquotes de la suspension (qui ne contient pas d'ADN transformant) et en les mettant en contact, à 37°, avec l'ADN "en excès". Le second phénomène est la protection progressive de l'ADN transformant vis à vis de l'action de la DNase, après réaction de cet ADN avec des bactéries compétentes; ce processus a été suivi en diluant une culture dans du milieu frais contenant, cette fois, de l'ADN transformant, et en mettant, à intervalles, des aliquotes en présence de DNase. Si l'on songe que ces deux phénomènes se superposent dans le temps et que l'un d'eux, la perte de la compétence, est indépendant de la présence de l'ADN transformant, il devient douteux que le second concerne directement l'intégration de cet ADN dans une structure de la bactérie. Une interprétation assez plausible serait la suivante. La compétence se manifesterait par une perméabilité particulière de la bactérie; dans cet état, elle pourrait absorber, non seulement l'ADN transformant, mais aussi des molécules — d'ailleurs bien plus petites — comme celles de la DNase. La perte de cette propriété par un nombre croissant de bactéries au cours du temps se manifesterait dans les deux types d'expériences. Dans les premières, un nombre décroissant de bactéries pourrait laisser pénétrer l'ADN (nombre croissant de bactéries ayant perdu la compétence); dans le second groupe d'expériences, où l'ADN transformant est présent dès le moment de la dilution dans le milieu frais, un nombre croissant, des bactéries ayant absorbé l'ADN transformant, deviendrait imperméable à la DNase.

Certaines hypothèses ont été développées plus haut pour rendre compte de la *Bibliographie p. 481.*

relation entre la fréquence de la transformation et la concentration en ADN transformant. L'interprétation de la compétence qui vient d'être proposée permet de concrétiser quelque peu ces hypothèses, et l'on en arrive à l'image suivante.

Au cours de la croissance dans un milieu approprié, des bactéries traversent une période de l'ordre de 15 minutes — période de compétence — au cours de laquelle elles peuvent absorber de grosses molécules, et notamment de l'ADN et de la DNase exogènes. Une transformation peut résulter de la pénétration d'*une* molécule d'ADN transformant dans la bactérie; la fréquence de cet événement résulte de la compétition entre deux "réactions" simultanées: (1) la perte de la compétence, qui empêche la pénétration de l'ADN et (2) la pénétration de l'ADN dans la bactérie, phénomène dont la vitesse est proportionnelle à la concentration des bactéries compétentes et à celle de l'ADN.

Un tel schéma soulève cependant certaines difficultés. Si l'on identifie la réaction primaire ( $BC + ADN \rightarrow B-ADN_1$ ) avec la pénétration de l'ADN dans la bactérie, on peut avoir tendance à se représenter cette pénétration comme un phénomène relativement simple, et peut-être passif de la part de la bactérie. Or cette vue est contredite par le fait qu'à des températures telles que  $11^\circ$  ou  $2^\circ C$ , auxquelles la perte de compétence est ralentie mais reste facilement mesurable, les réactions entre les bactéries compétentes et l'ADN ne progressent nullement. Nous serions tenté de considérer la pénétration de l'ADN transformant dans les bactéries compétentes comme un acte complexe, rendu comparable, *formellement*, à une réaction biparticulaire, par le simple fait que la probabilité de la réussite est proportionnelle à la concentration des bactéries compétentes et, dans certaines limites, à la concentration de l'ADN.

La situation de l'ADN transformant après sa pénétration dans la cellule bactérienne nous apparaît, à l'issue de ce travail, analogue à celle de l'ADN viral après son "injection" dans la bactérie (HERSHEY<sup>11</sup>). Dans les deux cas, l'ADN est, au début du moins, à l'état libre plutôt que sous la forme de l'un ou l'autre complexe. Il peut être attaqué par la DNase, à condition que la bactérie soit perméabilisée; dans l'étude des phages du Coli, ce résultat peut être obtenu en tuant les bactéries par la chaleur; dans le cas de la transformation, cette perméabilité à la DNase paraît liée à la compétence. La transformation a été comparée à la lysogénisation (LWOFF, KAPLAN ET RITZ<sup>9</sup>; LARK ET MAALØE<sup>10</sup>). LARK ET MAALØE pensent cependant que le mécanisme de l'intégration doit être fondamentalement différent, parce que la fréquence de lysogénisation varie apparemment selon le nombre des noyaux par bactérie, indépendamment du stade de la division, alors que, selon HOTCHKISS<sup>3</sup>, la transformation n'est possible qu'à une période définie de la division cellulaire. Il ne nous paraît pas obligatoire d'invoquer une différence profonde dans les mécanismes d'intégration de l'ADN pour expliquer cette divergence; on pourrait l'attribuer plutôt à des différences, très apparentes mais génétiquement parlant moins fondamentales, entre la transformation et la lysogénisation. La première de ces différences est que, contrairement au phage, l'ADN transformant ne comporte pas de mécanisme d'injection du matériel génétique dans la bactérie; la seconde est que, contrairement à la transformation, dont l'échec n'a sans doute pas de conséquences fatales, la lysogénisation doit réussir pour que la bactérie échappe aux processus menant à la lyse. La fréquence de la réussite serait donc limitée, dans les phénomènes de transformation et de lysogénisation, à des niveaux différents; l'étape limitant principalement la

fréquence de lysogénisation serait, selon LARK ET MAALOE, la rencontre entre une particule infectante et un noyau, alors que la fréquence de transformation serait surtout limitée par la pénétration même de l'ADN dans la bactérie. Ceci dit, le mécanisme de l'intégration génétique peut être fondamentalement le même.

En ce qui concerne l'intégration de l'ADN étranger dans le génome bactérien, la contribution de ce travail se borne à l'idée que la mise à l'abri de l'ADN transformant vis à vis de la DNase *n'est pas* un stade de cette intégration. S'il apparaît que la transformation, comme les autres transferts génétiques, comporte le remplacement, par l'ADN exogène, d'un élément homologue du génome bactérien (voir EPHRUSSI-TAYLOR<sup>8</sup>), on ne sait rien de précis sur le moment où cette intégration se produit. Des courbes telles que celle de la Fig. 1 posent, à cet égard, plus de problèmes qu'elles n'en résolvent. Le délai de l'expression phénotypique pourrait évidemment, être du à la nécessité de l'accumulation du système enzymatique permettant l'expression du caractère nouveau; mais il se pourrait aussi que des questions de dominances interviennent et qu'une division cellulaire (ou davantage) soit nécessaire. La latence de la multiplication des unités donnant naissance à des colonies transformées paraît moins claire encore: cette latence pourrait provenir d'un réel arrêt momentané de la division des bactéries transformées ou de ce que les premières divisions sont masquées par la formation de chaînes. Il se pourrait aussi, cependant, que les bactéries transformées continuent à se diviser normalement sans que -- au début du moins -- le matériel génétique qui détermine le caractère nouveau soit multiplié. En effet, rien ne permet, à l'heure actuelle, d'affirmer que l'intégration génétique soit une condition préalable à l'expression phénotypique. On peut songer ici au phénomène de transduction "abortive", si élégamment mis en évidence par STOCKER<sup>12</sup>: un caractère transduit s'exprime alors même que le gène correspondant ne paraît pas s'être intégré dans le génome de la bactérie et qu'il ne peut être multiplié. Quoiqu'il en soit, on peut supposer que l'intégration de l'ADN transformant dans le génome d'une bactérie est, en général, postérieure au moment où cette bactérie perd la compétence. En effet, si l'ADN intégré est protégé de la DNase, une intégration antérieure à la perte de la compétence entraînerait un décalage -- qui n'a pas été observé -- entre le développement de l'insensibilité à l'action de la DNase et la perte de la compétence.

#### REMERCIEMENTS

Nous remercions de tout coeur Madame H. EPHRUSSI-TAYLOR, qui nous a guidé dans le domaine de la génétique bactérienne, et Monsieur le Professeur B. EPHRUSSI, qui nous a accueilli dans son laboratoire et nous a grandement aidé par sa critique constructive. Messieurs les Professeurs BRACHET, JEENER ET CHANTRENNE ont bien voulu lire le manuscrit de ce travail et nous leur devons une série d'utiles suggestions.

#### RÉSUMÉ

Nos résultats s'expliquent si l'on admet:

(1) qu'au cours de la croissance dans un milieu approprié des pneumocoques traversent une période d'une durée moyenne de 15 minutes *ou moins* ("compétence") pendant laquelle ils peuvent absorber diverses grosses molécules, dont l'acide désoxyribonucléique (ADN) et la désoxyribonucléase (DNase).

*Bibliographie p. 481.*

(2) que la transformation *peut* résulter de la pénétration dans une bactérie compétente d'*une* particule d'ADN vecteur du caractère nouveau.

(3) que l'ADN transformant reste, momentanément, accessible à la DNase même après sa pénétration dans la bactérie compétente; la protection de l'ADN transformant, absorbé par une bactérie, vis à vis de la DNase exogène, survient lorsque cette bactérie a perdu la compétence (donc la perméabilité aux grosses molécules) et probablement avant l'intégration de l'ADN transformant dans le génome bactérien.

#### SUMMARY

Our results can be explained if the following assumptions are made:

(1) that during their growth in an appropriate medium pneumococci go through a period of about 15 minutes *or less* ("competence") during which they are able to absorb various large molecules such as desoxyribonucleic acid (DNA) and desoxyribonuclease (DNase).

(2) that the transformation *may* be produced by the penetration into a "competent" bacterium of *one* particle of DNA carrying the new character.

(3) that the transforming DNA stays accessible for a time to the DNase even after its entrance into the "competent" bacterium. The transforming DNA absorbed by the bacterium is protected against the action of the exogenous DNase when the bacterium has lost its "competence" (*i.e.* its permeability to large molecules) and probably before the integration of the transforming DNA into the bacterial genome.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Unsere Ergebnisse können durch folgende Annahmen erklärt werden:

(1) Während ihres Wachstumes auf entsprechendem Medium durchlaufen Pneumokokken eine durchschnittlich 15 Minuten oder *weniger* dauernde Periode ("Kompetenz"), während welcher sie verschiedene grosse Moleküle absorbieren können, wie Desoxyribonukleinsäure (DNS) und Desoxyribonuklease (DNase).

2. Die Umwandlung *hann* durch das Eindringen *eines* DNS-Partikels, als Träger der neuen Eigenschaft, in das Innere einer Bakterie verursacht werden.

(3) Die für die Umwandlung verantwortliche DNS bleibt vorläufig, sogar nach ihrem Eindringen ins Innere der kompetenten Bakterie, der DNase zugänglich. Die umwandelnde, durch die Bakterie absorbierte DNS wird erst, wenn diese Bakterie ihrer Kompetenz verlustig gegangene ist, (*d.h.* ihrer Durchlässigkeit gegenüber grosse Moleküle) gegen die Wirkung der exogenen DNase geschützt. Dies geschieht wahrscheinlich vor der Integrierung der für die Umwandlung verantwortlichen DNS in das Genom der Bakterie.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 R. D. HOTCHKISS, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, 16 (1951) 457.
- 2 R. D. HOTCHKISS, *Exptl. Cell Research*, sup. 2, (1952) 383.
- 3 R. D. HOTCHKISS, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 40 (1954) 49.
- 4 R. D. HOTCHKISS ET H. EPHRUSI-TAYLOR, *Federation Proc.*, 10 (1951) 200.
- 5 M. McCARTY, H. E. TAYLOR ET O. T. AVERY, *Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol.*, 11 (1946) 177.
- 6 B. A. D. STOCKER, M. R. KRAUSS ET C. M. MCLEOD, *Proc. 6th Int. Congr. Microbiol.*, Rome, 1953.
- 7 H. EPHRUSI-TAYLOR, *Exptl. Cell Research*, 2 (1951) 589.
- 8 S. ZAMENHOF, H. E. ALEXANDER ET G. LEIDY, *J. Exptl. Med.*, 98 (1953) 373.
- 9 A. LWOFF, A. S. KAPLAN ET E. RITZ, *Ann. Inst. Pasteur*, 86 (1954) 127.
- 10 K. G. LARK ET O. MAALØE, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 345.
- 11 A. D. HERSEY, *Currents in Biochemical Research*, Vol. II, Interscience Publishers, Inc., New York, 1955.
- 12 B. A. D. STOCKER, *Proc. 6th Int. Congress of Microbiology*, Rome, (1953).

Reçu le 28 mai 1955