

# EFFETS DE L'IRRADIATION ULTRAVIOLETTE SUR LA BIOSYNTHÈSE INDUITE DE LA PÉNICILLINASE DE *BACILLUS CEREUS*\*

par

ANNE-MARIE TORRIANI

*Service de Biochimie Cellulaire, Institut Pasteur, Paris (France)*

## INTRODUCTION

On sait que la synthèse de la pénicillinase peut être induite chez *B. cereus* par un contact très court (de l'ordre d'une minute) entre les cellules en voie de croissance et la pénicilline. La cinétique de la production de pénicillinase qui, dans une culture en voie de croissance, suit cette interaction primaire, permet d'y distinguer deux phases principales: une phase latente d'environ 15 minutes, et une phase de production qui peut se poursuivre pendant plusieurs heures<sup>1,2</sup>. Il est tentant de supposer que ces différentes phases cinétiques correspondent à des réactions ou à des stades successifs du métabolisme d'induction et de synthèse de la pénicillinase. S'il en est ainsi, on doit s'attendre que certains agents aient une action différente sur la synthèse de la pénicillinase, suivant qu'ils sont appliqués à différents moments après l'interaction primaire. L'étude des effets du passage de l'aérobiose à l'anaérobiose a confirmé cette hypothèse, encore que l'interprétation détaillée des résultats fut difficile<sup>3</sup>.

Dans le présent travail, nous avons utilisé le rayonnement U.V. comme agent d'intervention pour essayer de mettre en évidence des stades ou des états successifs du système formateur de la pénicillinase. SWENSON ET GIESE<sup>4</sup> ont observé que le rayonnement U.V. inhibait l'adaptation fermentaire des levures au galactose, et constaté que le spectre d'action de cet effet était semblable au spectre d'absorption des acides nucléiques<sup>5</sup>. De telles observations invitent à spéculer sur le rôle des acides nucléiques dans l'induction enzymatique. Mais ces spéculations sont sans grand intérêt tant que l'on ignore si le rayonnement U.V. a une action élective sur la synthèse induite, ou mieux, sur certains stades de l'induction. Dans le présent travail, nous avons cherché à obtenir des données *différentielles* permettant de comparer l'action des rayons U.V., à différentes doses et à différents moments, sur la synthèse de la pénicillinase d'une part, sur la synthèse globale des protéines d'autre part.

## MATÉRIEL ET TECHNIQUES

### *Souche bactérienne*

La souche employée est le *B. cereus* NRRL 569 provenant des Northern Regional Research Laboratories, Peoria, Missouri.

\* Ce travail a bénéficié de subvention du "Jane Coffin Childs Memorial Fund" et de la "Fondation Rockefeller".

*Milieu de culture*

Notre milieu synthétique, dit A.T.C., contient 5 acides aminés et du tampon citrate. Sa préparation est la suivante:

## Solutions mères:

## I. Sels

(NH <sub>4</sub> ) SO <sub>4</sub>	4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5.44 g
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0.40 g
FeSO <sub>4</sub> 0.5 %	2 ml
Solut. Ia	2 ml
H <sub>2</sub> O à	1,000 ml
KOH pour pH 7	

## II. Acides aminés

L-arginine	336 mg
ac. DL-glutamique	640 mg
L-histidine	256 mg
DL-méthionine	288 mg
L-tyrosine	512 mg
H <sub>2</sub> O à	1,000 ml
KOH pour pH 7	

## Ia. Solutions des éléments oligodynamiques

ZnSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	10 <sup>-4</sup> g
CaCl <sub>2</sub> 6 H <sub>2</sub> O	10 <sup>-4</sup> g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> 4 H <sub>2</sub> O	10 <sup>-4</sup> g
MnCl <sub>2</sub> 4 H <sub>2</sub> O	10 <sup>-4</sup> g
CuSO <sub>4</sub> 5 H <sub>2</sub> O	10 <sup>-5</sup> g
H <sub>2</sub> O à	1,000 ml

## III. Tampon citrate

Acide citrique	0.3 M
KOH pour pH 6.8	

## IV. Glucose 20 %

Les solutions mères sont stérilisées séparément: I et III à 120°; II et IV à 105°.

Le milieu est fait en mélangeant stérilement: 50 vol. de sol. I + 50 vol. de sol. II + 4 vol. de sol. III (tampon citrate = 0.02 M) + 2 vol. de sol. IV (glucose = 0.4 %).

*Conditions de culture*

Toutes les expériences sont effectuées sur des cultures agitées à 37°. Pour obtenir une croissance maxima et régulière dès le début de l'expérience, il faut inoculer 1 vol. d'une culture en *phase exponentielle de croissance* dans 20 vol. de milieu A.T.C. La croissance est suivie par turbidimétrie: électrophotomètre de Meunier, filtre bleu, cuve 1 cm. Dans ces conditions, chaque division de l'échelle du photomètre correspond à 0.08 µg d'azote bactérien total/ml (N Kjeldahl des bactéries lavées). Les valeurs de la densité bactérienne sont données en µg/ml d'après ce rapport.

Le milieu A.T.C. permet une croissance exponentielle de *B. cereus* jusqu'à une densité bactérienne correspondant à 120 µg N bactérien/ml. Le taux de croissance exponentielle des cultures agitées à 37° varie entre 0.8 et 1 doublement par heure.

*Induction*

On induit les cultures en phase exponentielle de croissance (densité bactérienne entre 16 et 40 µg N bactérien/ml), par addition de pénicilline G (sel de sodium) à une concentration finale de  $1.7 \cdot 10^{-6}$  M (= 1 U.O./ml). Soixante secondes après l'addition de l'inducteur, on détruit la pénicilline en excès dans le milieu par addition de 9 U/ml de pénicillinase partiellement purifiée, dialysée et lyophilisée (1 ml d'une solution à 900 U/ml dans 100 ml de culture). Au moment de l'induction, on ajoute aussi du Tween 80 à raison de 0.05 % (5 ml d'une solution stérile à 1 % dans 100 ml de culture).

*Irradiation*

Nous avons utilisé une lampe à vapeur de mercure à haute tension et basse pression donnant 90 % de son énergie dans la bande des radiations de 2,537 Å. La quantité d'énergie émise par seconde, mesurée à 50 cm de distance de la lampe à l'aide de l'appareil de LATARJET<sup>6</sup>, est de 44 ergs·min<sup>-2</sup>. Les cultures sont irradiées à une densité bactérienne de 40 µg N bactérien/ml, après avoir été refroidies à 0° pendant 5 minutes.

25 ml de culture, contenus dans une boîte de Pétri de 17 cm de diamètre, sont maintenus en agitation à la distance de 50 cm de la lampe pendant des temps différents (entre 30 et 180 secondes), suivant la dose voulue. Après irradiation, on rétablit les conditions initiales de croissance en diluant les cultures 2.5 fois dans du milieu neuf.

La croissance se poursuit à l'abri de la lumière pour éviter la photoréactivation.

*Dosage de la pénicillinase*

L'activité enzymatique est mesurée dans un appareil de Warburg par dosage du CO<sub>2</sub> dégagé au cours de la formation d'acide pénicilloïque<sup>7</sup>. Des échantillons de 2.5 ml de culture sont prélevés, additionnés de 8-hydroxyquinoléine (concentration finale de  $8.33 \cdot 10^{-4}$  M) et maintenus à 0° jusqu'au moment du dosage<sup>1</sup>. On opère de façon à éviter que la solution enzymatique ne soit

portée temporairement (par la suite d'addition de bicarbonate non équilibré) à un pH trop alcalin. La concentration finale en tampon bicarbonate est de  $0.0066 M$  et le pH du mélange est 7.

On ajoute de la pénicilline G pour une concentration finale de  $0.033 M$ .

Les activités sont exprimées en unités de pénicillinase, une unité étant définie comme la quantité d'enzyme qui hydrolyse  $1 \mu g$  de pénicilline en une heure à  $30^\circ$  et à pH 7<sup>8</sup>. Pour le calcul de ces valeurs, on tient compte de la rétention de  $CO_2$  due au milieu (49 %). La sensibilité de la méthode permet d'évaluer la quantité d'enzyme contenue dans les cellules non induites: or les cellules induites produisent jusqu'à 200 fois cette quantité minimum.

#### Relation entre la valeur de la densité optique et l'azote bactérien total

Dans ce travail, nous employons le terme "croissance" pour indiquer l'accroissement de la masse protoplasmique des cellules sans préjuger de leur division. En effet, l'irradiation U.V. aux doses employées stérilise la grande majorité des cellules, c'est-à-dire les rend incapables de former des colonies. Cependant ces suspensions irradiées restent capables, pendant assez longtemps, de synthétiser les constituants cellulaires. Comme la croissance des suspensions est suivie par mesure de la densité optique, il est important de s'assurer que les accroissements de densité optique des suspensions irradiées ou non correspondent sensiblement à un même accroissement de matériel cellulaire.

Nous avons réalisé l'expérience préliminaire suivante: une culture contenant  $40 \mu g$  N bactérien/ml est divisée en deux lots dont l'un est irradié par une dose d'U.V. de  $5.280 \text{ ergs/mm}^2$ , diminuant de moitié la vitesse de croissance (voir Fig. 5). L'accroissement des deux cultures est alors suivi pendant deux heures. La Fig. 1 donne, au cours de la croissance, l'azote total bactérien ( $\mu g/ml$ ) en fonction de la densité optique. On voit que l'augmentation de la densité optique correspond toujours, soit dans le témoin, soit dans la culture irradiée, à la même augmentation de N bactérien et ceci pour toute la durée de l'expérience. Dans toutes les expériences qui vont suivre, la croissance est exprimée en  $\mu g$  N bactérien.

#### Stabilité de la pénicillinase dans les cultures en milieu synthétique

Dans les milieux peptonés ou à l'hydrolysate de caséine utilisés jusqu'ici pour l'expérimentation sur la pénicillinase de *B. cereus*, la pénicillinase semble protégée par les gros peptides du milieu et par de la gélatine ajoutée (à la concentration finale de 0.1 %) au moment de l'induction<sup>2</sup>. Mais, dans ces milieux, *B. cereus* produit une protéase capable d'hydrolyser rapidement les substances protectrices.

Dans le milieu A.T.C. ne contenant pas de peptides, le problème de la stabilité de la pénicillinase a dû être résolu par d'autres moyens. Nous avons, en premier lieu, constaté qu'en présence de citrate de potassium ( $2 \cdot 10^{-2} M$ ), l'activité d'une solution de pénicillinase ( $200 U/ml$ ) en milieu A.T.C., reste pratiquement inchangée après 5 heures à  $37^\circ$ , tandis qu'en l'absence de ce sel, l'activité se trouve réduite, après ce traitement, à 60 % de sa valeur initiale. Comme le citrate n'est pas métabolisé par *B. cereus*, son action protectrice reste constante au cours de la croissance.

Nous avons, d'autre part, trouvé que les dosages de pénicillinase en présence de Tween 80 donnent des résultats reproductibles et proportionnels à la concentration enzymatique, même lorsque cette dernière est très petite; ceci n'est pas le cas en absence de Tween, comme il a été déjà constaté pour d'autres enzymes<sup>9</sup>. Nous ajoutons donc à la culture, avant l'inducteur, du Tween 80 (concentration finale: 0.05 %). Cette addition n'a d'influence ni sur la croissance ni sur la production de l'enzyme.

Enfin, nous nous sommes assuré qu'aucune activité protéolytique n'est décelable dans les cultures en milieu A.T.C.; c'est à l'absence d'ions  $Ca^{++}$  dans le milieu qu'il faut, semble-t-il, attribuer cette situation<sup>10</sup>.

On voit qu'il est possible, dans les conditions décrites qui évitent toute inactivation, de suivre avec précision la formation de la pénicillinase dès le début de l'induction.

Bibliographie p. 235.

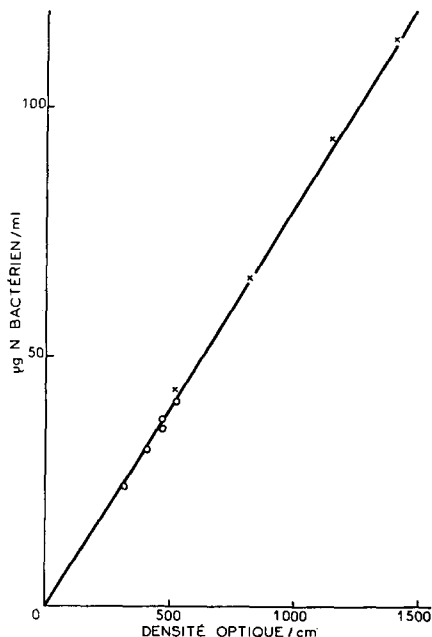


Fig. 1. Relation entre la densité optique de la culture et l'azote bactérien (Kjeldahl).  $\times$  = culture non irradiée;  $O$  = culture irradiée ( $5.280 \text{ ergs/mm}^2$ .)

## RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

## A. Observations préliminaires sur la cinétique de la synthèse de la pénicillinase

Avant d'étudier l'effet du rayonnement U.V. sur la synthèse de la pénicillinase, il faut préciser la cinétique de cette synthèse en milieu A.T.C. Celle-ci se présente avec des caractéristiques différentes de ce que l'on observe en milieux complexes. On sait que, dans ces milieux, après une phase latente d'environ 15 minutes, la synthèse de pénicillinase a lieu à *vitesse constante* (phase linéaire). Entre cette phase linéaire et la phase latente, s'insère une courte phase d'accélération. En milieu A.T.C., on observe également une phase latente de 15 minutes et une phase linéaire, mais celle-ci ne s'établit que plus de deux heures après l'induction. La phase d'accélération, très

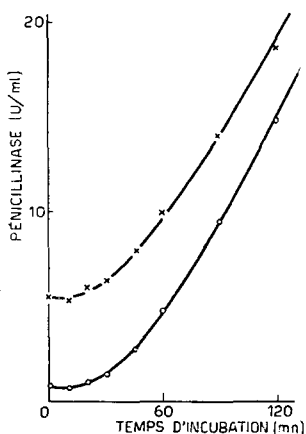


Fig. 2. Induction en milieu A.T.C. Formation de la pénicillinase en fonction du temps d'incubation. Deux lots d'une même culture sont induits avec  $3.4 \cdot 10^{-8} M$  (x) et  $1.7 \cdot 10^{-5}$  (o) de pénicilline. Densité bactérienne au moment de l'induction:  $17 \mu g N$  bactérien/ml. o = Facteur de l'échelle des ordonnées = 10; x = Facteur de l'échelle des ordonnées = 1.

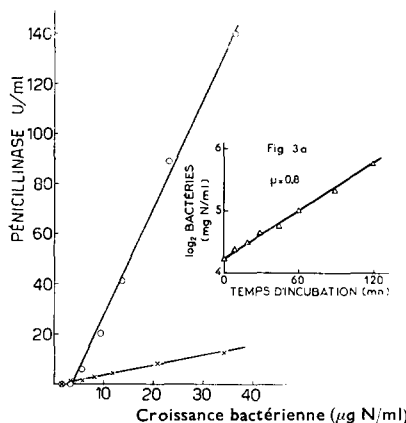


Fig. 3. Induction de cultures en milieu A.T.C. Formation de la pénicillinase en fonction de l'accroissement bactérien. Même expérience que pour la Fig. 2. Les déterminations sont faites au cours des deux premières heures après l'induction. x = Pénicilline  $3.4 \cdot 10^{-8} M$ ; o = Pénicilline  $1.7 \cdot 10^{-5} M$ . Fig. 3a. Croissance bactérienne. Même expérience que pour les Fig. 2 et 3. Après deux heures de croissance, la densité bactérienne atteint  $55 \mu g N/ml$ .

prolongée, dure en moyenne au moins une centaine de minutes (Fig. 2). La signification de cette cinétique apparaît quand l'accumulation de l'enzyme est exprimée non plus en fonction du temps, mais en fonction de l'accroissement concomitant de la masse bactérienne (Fig. 3). On voit alors que pendant la plus grande partie de l'expérience, la formation de l'enzyme est simplement *proportionnelle à l'accroissement de la masse microbienne*.

Les points expérimentaux, déterminent des droites qui s'extrapolent en un point, sur l'axe des abscisses, qui correspond à la 12ème minute environ qui suit l'interaction primaire, ce qui définit la "phase latente". La droite elle-même définit ce que nous appellerons la *phase proportionnelle* pour laquelle on peut écrire, en posant:

$z$  = enzyme par unité de volume

$x$  = masse microbienne par unité de volume

$$\Delta z = p \Delta x$$

(1)

Le coefficient  $p$  est alors le "taux différentiel de synthèse" (T.d.S.), dont la valeur, comme mesure de la synthèse induite a été établie dans le cas de la  $\beta$ -galactosidase d'*E. coli*<sup>11\*</sup>. Le taux différentiel de synthèse présente l'avantage de mesurer l'effet d'un agent donné sur la synthèse induite ( $\Delta z$ ), en valeur relative, par comparaison avec l'effet global ( $\Delta x$ ). Il mesure donc l'effet spécifique ou électif qui nous intéresse principalement. Il a le désavantage de masquer l'effet absolu qu'il nous faudra également considérer.

Nous avons vérifié que la durée de la phase latente et celle de la phase proportionnelle sont indépendantes de la concentration de pénicilline employée pour l'induction. Le T.d.S. pendant la phase proportionnelle est fonction de la concentration de pénicilline employée pour l'induction jusqu'à une valeur saturante ( $10^{-6}$  M environ) (Fig. 4) (cf. POLLOCK<sup>1,2</sup>). Nous avons employé, pour toutes les expériences qui suivent, une dose inductrice de  $1.7 \cdot 10^{-6}$  M.

La cinétique observée pendant la phase proportionnelle, quoique fort simple en soi, offre un problème d'interprétation. On sait que la synthèse de pénicillinase se poursuivant après l'élimination de l'inducteur, a pu être attribuée à la pénicilline fixée par les cellules au cours de l'interaction primaire et ultérieurement répartie entre les cellules-filles<sup>1,2</sup>. La quantité de pénicilline par cellule diminue alors en proportion de l'accroissement de la culture. A priori, le taux différentiel de synthèse devrait, semble-t-il, diminuer parallèlement. Dans une culture en voie de croissance exponentielle, la vitesse absolue de synthèse de l'enzyme serait donc constante<sup>13</sup>. Mais si, comme on le constate en milieu A.T.C., la vitesse de synthèse continue d'augmenter pendant plusieurs heures après l'interaction primaire, parallèlement à la croissance, il faut supposer que la quantité totale d'inducteur intracellulaire *actif* augmente également. On peut se représenter ce mécanisme de la façon suivante: la pénicilline serait fixée d'abord sous forme inactive. Elle ne serait transformée en inducteur actif que graduellement et proportionnellement à la quantité initialement fixée et à l'accroissement de la culture. Le taux différentiel de synthèse pourrait alors demeurer sensiblement constant tant que la réserve d'inducteur fixé en situation inactive ne serait pas épuisée.

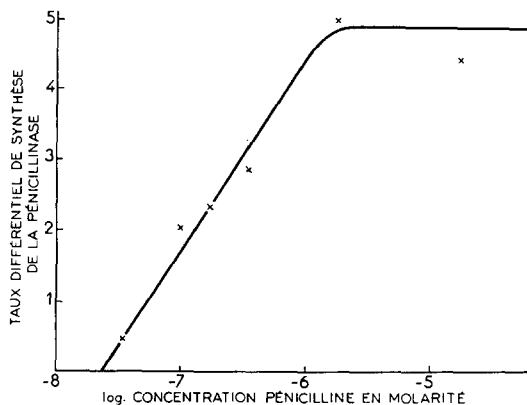


Fig. 4. Taux différentiel de synthèse de la pénicillinase en fonction de la concentration de l'inducteur. Chaque point représente la moyenne des T.d.S. obtenus dans une série d'expériences analogues à celle concernant les Fig. 2 et 3. Le taux différentiel de synthèse de l'enzyme,  $\Delta z/\Delta x$ , est exprimé en U pénicillinase/ $\mu$ g N bactérien.

### B. Effets de l'irradiation sur la croissance

L'irradiation U.V. d'une culture de *B. cereus* en milieu A.T.C. se traduit, dans la

\* Il n'est pas indifférent de remarquer que dans le cas de la pénicillinase, la valeur du coefficient peut être déterminée en valeur absolue<sup>12</sup>. Dans le système d'unités adopté, une unité de pente équivaut à 0.5  $\mu$ g d'azote de la pénicillinase par mg d'azote bactérien.

croissance, par un effet immédiat et des effets retardés. Immédiatement après

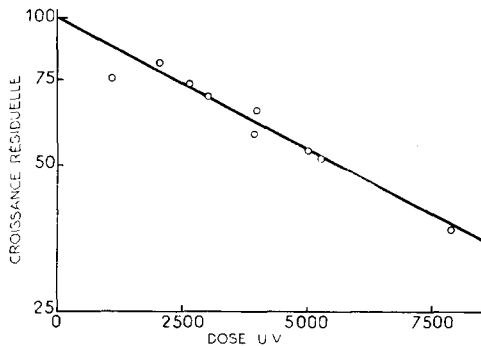


Fig. 5. Diminution du taux de croissance en fonction de la dose U.V. Taux de croissance exponentielle ( $\mu_i$ ) de lots identiques d'une même culture irradiée par des doses d'U.V. différentes, exprimé en % du taux de croissance du témoin ( $\mu_o$ ) non irradié. Dose U.V. = ergs/mm<sup>2</sup>.

l'irradiation, la croissance exponentielle continue, à taux constant, mais réduit. Après une ou deux heures, le taux diminue fortement à nouveau et la croissance s'arrête enfin. Le taux de croissance, pendant la phase exponentielle résiduelle qui suit l'irradiation, peut donc être pris comme mesure de l'effet immédiat sur la croissance, c'est-à-dire de l'effet sur la synthèse globale des constituants cellulaires. Il est intéressant de souligner que ce "taux résiduel de croissance" est une fonction exponentielle simple de la dose (Fig. 5), de la forme:

$$\log \frac{\mu_i}{\mu_o} = -KD$$

$\mu_i$  étant le taux de croissance après irradiation par une dose  $D$ ;  $\mu_o$  le taux de croissance du témoin;  $K$  une constante.

### C. Influence de l'irradiation U.V. sur la synthèse de la pénicillinase

#### a. Effet en fonction du temps

Dans une première série d'expériences, nous avons irradié les cultures avec une même dose d'U.V. appliquée à temps variables après l'induction. La dose d'U.V. choisie pour ces expériences provoquait un abaissement du taux de croissance de 50%.

La Fig. 6 et la Fig. 8a montrent les effets de ce traitement sur la vitesse de synthèse absolue de la pénicillinase, c'est-à-dire sur l'accumulation de l'enzyme en fonction du temps dans les cultures irradiées à différents moments. Les courbes obtenues ne sont pas facilement comparables entre elles puisque la

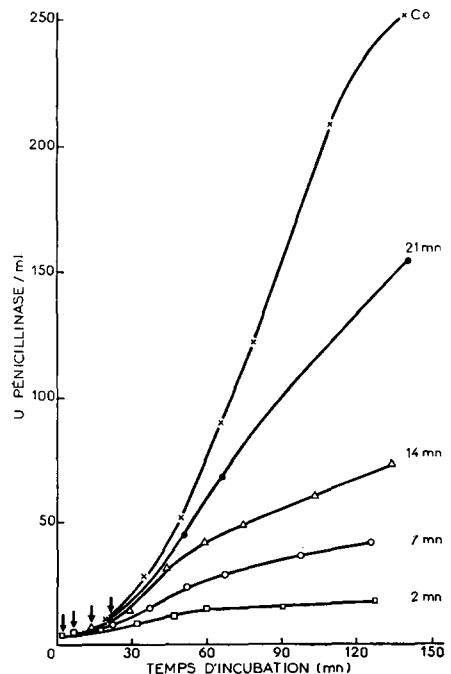


Fig. 6. Irradiation à des temps d'induction différents. Formation de la pénicillinase en fonction du temps d'incubation. Culture en phase exponentielle de croissance contenant 40  $\mu$ g N bactérien/ml. Des lots sont prélevés et irradiés avec une dose U.V. de 5.280 ergs/mm<sup>2</sup> aux temps d'induction de 2, 7, 14 et 21 minutes. Entre 2 et 14 minutes, la densité bactérienne de la culture augmente de 20 % environ. On a négligé cette variation, tandis qu'on a rajusté à 40  $\mu$ g/ml d'N bactérien le lot prélevé à la 21ème minute d'induction.  $\times$  = culture de contrôle non irradiée.  $\square$ ;  $\circ$ ;  $\triangle$ ;  $\bullet$  = cultures irradiées. Les flèches indiquent les moments de l'irradiation.

vitesse de formation de l'enzyme augmente continuellement pendant la première heure d'incubation et que, d'autre part, le taux de croissance (Fig. 7a) du témoin non irradié est différent (le double) de celui des cultures irradiées. Néanmoins, on voit que dans les cultures irradiées (qui ont toutes le même taux de croissance), la vitesse de formation de l'enzyme est d'autant plus faible (par comparaison avec le témoin) que l'irradiation a eu lieu plus tôt après l'induction. La représentation des résultats sous forme différentielle (Fig. 7) permet d'évaluer l'effet spécifique de l'irradiation à différents temps d'induction. Il est remarquable que la proportionnalité entre l'accroissement de la masse bactérienne et l'accroissement de la quantité d'enzyme demeure aussi rigoureusement observée chez les cultures irradiées, dont le taux de croissance se modifie au cours du temps, que dans les témoins non irradiés. Cette constatation justifie l'emploi du taux différentiel de synthèse comme mesure de l'effet spécifique de l'irradiation. On constate que le taux différentiel de synthèse de la pénicilline dans les cultures irradiées ( $P_i$ ) est beaucoup plus

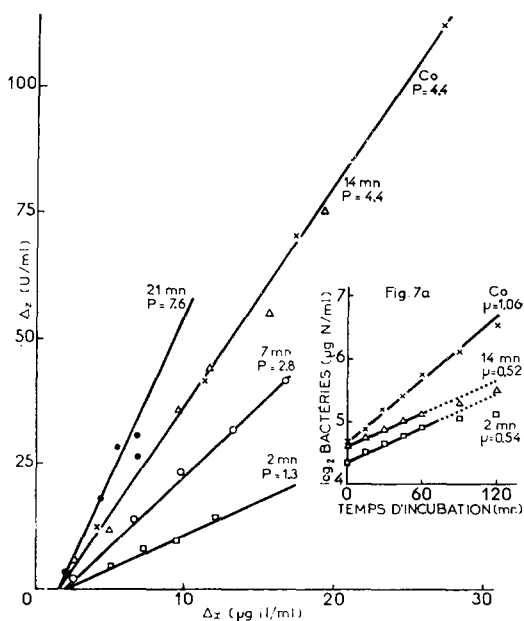


Fig. 7. Irradiation à des temps d'induction différents. Formation de la pénicilline  $\Delta z$  (U/ml) en fonction de l'accroissement bactérien  $\Delta x$  ( $\mu\text{g N/ml}$ ). Même expérience que pour la Fig. 6; les résultats sont représentés sous forme différentielle.  $\times$  = culture de contrôle non irradiée.  $\square$ ;  $\circ$ ;  $\triangle$ ;  $\bullet$  = cultures irradiées (5.280 ergs/mm<sup>2</sup>). Fig. 7a. Taux de croissance. Même expérience que pour la Fig. 6.  $\times$  = culture de contrôle non irradiée.  $\square$ ;  $\circ$  = cultures irradiées (2 mn; 14 mn d'incubation).

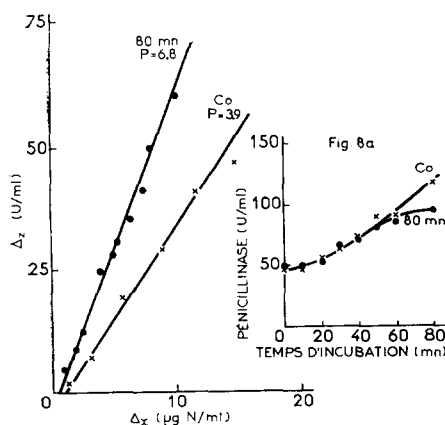


Fig. 8. Irradiation après 80 minutes d'induction. Formation de la pénicilline  $\Delta z$  (U/ml) en fonction de l'accroissement bactérien. L'induction est effectuée sur une culture en phase exponentielle de croissance contenant 16  $\mu\text{g N}$  bactérien/ml; on poursuit l'incubation pendant 80 minutes. Pendant ce temps, la densité bactérienne devient 40  $\mu\text{g N/ml}$  et la pénicilline atteint 140 U/ml. On arrête alors l'incubation et on irradie (5.280 ergs/mm<sup>2</sup>) un lot de la culture, le reste servant de témoin. On suit la production de l'enzyme ( $\Delta x$ ) et l'augmentation de la masse des cellules dans les deux cultures, témoin ( $\times$ ) et irradiée ( $\bullet$ ). L'accroissement de la masse bactérienne à partir du moment de l'irradiation ( $\Delta x$ ) est donné en  $\mu\text{g N/bactérien/ml}$  et l'accumulation de l'enzyme ( $\Delta z$ ) en U pénicilline/ml.  $\times$  = culture de contrôle non irradiée (Co);  $\bullet$  = culture irradiée (5.280 ergs/mm<sup>2</sup>).

Fig. 8a. Formation de la pénicilline en fonction du temps d'incubation après irradiation. Même expérience que pour la Fig. 8. L'accumulation de l'enzyme est donnée en U/ml.  $\times$  = culture de contrôle non irradiée;  $\bullet$  = culture irradiée; Le temps est compté à partir de l'irradiation.

faible que celui du témoin ( $P_0$ ), lorsque l'irradiation est faite tout de suite (2 minutes) après l'induction. Le taux différentiel des cultures irradiées est d'autant plus élevé que l'irradiation est faite plus tardivement après l'induction, et l'on observe même (Fig. 7 et Fig. 8) qu'après la 15<sup>ème</sup> minute environ, le T.d.S. devient plus élevé dans les cultures irradiées que dans le témoin.

En résumé, l'irradiation U.V. à temps variables après l'interaction primaire révèle une modification très marquée du système qui, dans les 20 minutes qui suivent l'induction, passe d'un état d'extrême sensibilité à un état résistant à la dose d'U.V. employée.

#### b. Effet en fonction de la dose

Pour compléter ces observations, nous avons déterminé, en plusieurs séries d'expériences, l'effet de doses croissantes d'U.V. à des temps différents après l'induction. L'ensemble de ces résultats est donné par le Tableau I.

TABLEAU I  
EFFET DE LA DOSE D'IRRADIATION SUR LA CROISSANCE ET SUR LE T.d.S.  
À DES TEMPS DIFFÉRENTS D'INDUCTION

Dose U.V. ergs/mm <sup>2</sup>	$\mu$ i/ $\mu$ o en %	$P_0$	$P_i/P_0$ Moment d'irradiation après induction, en minutes			
			2	7	15	21—114*
1320	72	—	—	—	—	—
2640	70	—	—	—	—	—
	77	—	0.86	—	—	—
	74	4.00	0.80	0.88	1.08	—
	74	4.70	0.83	—	—	1.54
	74	—	—	—	—	1.63
3030	70	—	—	—	—	—
3960	54	—	—	—	—	—
	62	3.50	0.46	0.89	1.17	—
	62	4.85	—	—	—	1.53
5050	55	—	—	—	—	—
5280	50	4.40	0.33	0.63	1.00	1.73
	50	3.90	—	—	—	1.72
	52	—	—	—	—	1.93
	58	—	0.85	0.88	—	—
	52	—	—	—	—	1.52
	50	—	—	1.13	—	—
6300	44	3.90	0.49	0.87	1.15	—
7930	38	3.20	0.38	0.75	0.94	—
	38	3.75	—	—	—	1.42

\* Dans cette colonne sont réunies les valeurs obtenues à 21, 80, 82 et 114 minutes d'induction.

Une première difficulté se présente pour l'évaluation et l'interprétation des résultats: d'une expérience à l'autre, le T.d.S. des cultures témoins peut varier assez notablement. Afin que les résultats obtenus dans les différentes séries d'expériences



soient comparables entre eux, nous avons exprimé le T.d.S. des cultures irradiées en pourcentage du T.d.S. du témoin approprié.

Le fait essentiel qui se dégage de l'examen des chiffres du Tableau I est que, pour toutes les doses d'U.V. employées, le T.d.S., inférieur à l'unité lorsque l'irradiation a eu lieu jusqu'à la 15<sup>ème</sup> minute, devient ensuite supérieur à l'unité. Mais pour analyser et interpréter l'effet de doses croissantes U.V., il importe de ne pas considérer seulement l'effet différentiel, mais aussi l'effet absolu. L'effet *absolu* est mesuré par la valeur du rapport  $\Delta z_i/\Delta z_o$ , exprimant la synthèse d'enzyme chez l'irradié par comparaison avec le témoin.

Une difficulté se présente dans l'évaluation de ce rapport du fait de la complexité des courbes de synthèse d'enzyme, qui reflètent les variations dans le temps de la vitesse de croissance des cultures irradiées. On est donc conduit à évaluer indirectement la valeur de  $\Delta z_i/\Delta z_o$ . Nous pouvons poser, d'après les définitions données plus haut :

$$\frac{P_i}{P_o} = \frac{\frac{\Delta z_i}{\Delta x_i}}{\frac{\Delta z_o}{\Delta x_o}} = a$$

d'où :

$$\frac{\Delta z_i}{\Delta z_o} = a \cdot \frac{\Delta x_i}{\Delta x_o}$$

La valeur de  $a$  est donnée par le Tableau I et les valeurs de  $\Delta x_i/\Delta x_o$  sont aisément calculées à partir des valeurs  $\mu_o$  et  $\mu_i$  des taux de croissance du témoin et de l'irradié respectivement. Le résultat de ce calcul est exprimé par la Fig. 9 donnant le log de la synthèse résiduelle ( $\Delta z_i/\Delta z_o$ ) en fonction de la dose U.V. reçue. Malgré la dispersion des points expérimentaux, dispersion qui ne peut surprendre puisque cette figure réunit les résultats de plusieurs séries d'expériences, la Fig. 9 met particulièrement bien en évidence les changements de propriétés qui interviennent dans le système formateur de la pénicillinase au cours de la synthèse induite. Jusque vers la 7<sup>ème</sup> minute, les courbes de synthèse résiduelle sont assez grossièrement des fonctions simples de la dose. Au delà de la 14<sup>ème</sup> minute, la forme des courbes change et tout se passe comme si la synthèse d'enzyme ne devenait sensible aux U.V. qu'au delà d'une dose seuil.

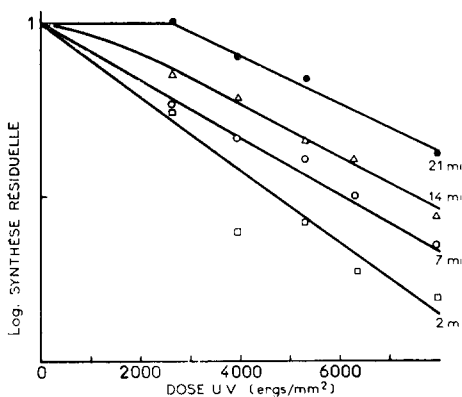


Fig. 9. Effet absolu de la dose U.V. sur la synthèse de l'enzyme. Synthèse résiduelle =  $\log \Delta z_i/\Delta z_o$ . Dose U.V. en ergs/mm<sup>2</sup>.

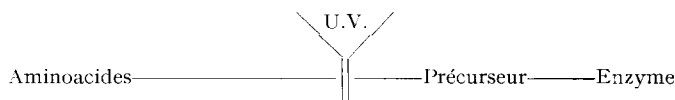
#### DISCUSSION

Grâce aux observations de SWENSON ET GIESE<sup>4</sup>, on savait depuis plusieurs années que la synthèse d'enzymes inductibles pouvait être inhibée partiellement ou totalement par irradiation des cellules induites. Ce résultat ne se prêtait pas à une interprétation précise puisque l'on ignorait, en l'occurrence, si l'inhibition observée était du même ordre ou au contraire plus marquée que l'inhibition des synthèses cellulaires concomitantes. On pouvait supposer qu'il ne s'agissait que d'un effet secondaire résultant des lésions générales reçues par la cellule.

Les expériences que nous venons de rapporter démontrent que la synthèse induite de la pénicillinase est inhibée par le rayonnement ultraviolet, mais que la sensibilité du système formateur d'enzyme se modifie profondément au cours même de la synthèse induite. Pendant les quelques minutes qui suivent la fixation de la pénicilline par les cellules, le système formateur de pénicillinase semble être beaucoup plus sensible que l'ensemble des systèmes synthétisant la somme des protéines cellulaires, systèmes dont l'activité est mesurée par le taux de croissance résiduel après irradiation. Au contraire, passée la vingtième minute environ, le système pénicillinase devient apparemment beaucoup plus résistant aux ultraviolets que la moyenne des autres systèmes.

Il faut souligner que l'effet étudié ici est un effet immédiat, se manifestant dès après l'irradiation. Il est donc permis de penser qu'il est lié à la lésion primaire provoquée par le rayonnement, lésion primaire dont on sait qu'elle a pour siège des substances ayant les propriétés d'absorption des acides nucléiques<sup>5,14</sup>. En outre, la haute sensibilité du système au stade suivant immédiatement l'interaction primaire semble justifier l'hypothèse que l'effet de l'irradiation ultraviolette n'est pas seulement le résultat indirect de lésions générales, mais bien l'expression d'une lésion intéressant directement le système d'induction ou de synthèse de la pénicillinase.

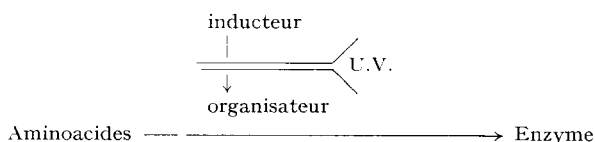
Reste alors à expliquer le fait remarquable que la sensibilité du système, très élevée au début, devienne très faible une demi-heure environ après induction. Plusieurs modèles explicatifs peuvent être envisagés. On peut supposer que la synthèse de la pénicillinase se fait en plusieurs stades, au moins deux, seul le premier étant radiosensible, conformément au schéma ci-dessous.



Un précurseur (*Pr*) de l'enzyme pourrait donc avoir eu le temps de s'accumuler en quantité notable lorsque l'irradiation n'interviendrait que 20 ou 30 minutes après la fixation de la pénicilline.

Des observations sur les effets de l'anaérobiose avaient conduit M. R. POLLOCK<sup>3</sup> à une interprétation de ce type. Cette hypothèse simple est difficile cependant à mettre en accord avec la cinétique de la synthèse d'enzymes après irradiation. Nous avons vu, en effet, que la vitesse de synthèse absolue *augmente encore très notablement pendant assez longtemps après l'irradiation* (cf. Fig. 6), alors qu'il est clair que, selon le modèle que nous discutons, la vitesse de synthèse après irradiation serait limitée par la quantité *décroissante* de précurseur disponible.

Il semble plus facile de rendre compte des faits à l'aide du modèle schématisé ci-dessous :



qui suppose que le stade où la réaction est bloquée par le rayonnement consiste dans l'activation du centre formateur de la pénicillinase (que nous désignerons ci-après sous le nom de "organisateur", pour adopter la terminologie employée par POLLOCK<sup>15</sup>).

La vitesse de synthèse de la pénicillinase serait, dans ces conditions, proportionnelle au nombre de centres organisateurs activés d'une part, à la vitesse avec laquelle les matériaux de la synthèse (aminoacides) seraient mis à la disposition de chaque centre, d'autre part. Cette dernière vitesse serait donc déterminée, ou plus exactement, mesurée par la vitesse de croissance, considérée comme correspondant à la somme totale des protéines synthétisées par unité de temps.

Il faut supposer en outre que l'irradiation ultraviolette ne bloque pas seulement la formation des centres organisateurs de la pénicillinase, mais aussi et approximativement au même degré, la formation de tous les autres centres organisateurs de protéines. Ces hypothèses étant admises, on voit que l'irradiation, intervenant immédiatement après l'interaction primaire, bloquera le système au stade où les centres organisateurs de pénicillinase sont encore en très petit nombre par rapport à la somme des autres organisateurs. Si, au contraire, l'irradiation intervient après 20 ou 30 minutes, elle aura pour effet de bloquer le système à un stade où les centres organisateurs de pénicillinase sont nombreux par rapport à la somme totale des autres organisateurs. L'accroissement de la vitesse absolue de synthèse après irradiation s'explique sans difficulté, puisque cette vitesse de synthèse est proportionnelle à la quantité d'aminoacides disponibles par unité de temps et que cette quantité est elle-même fonction de la masse, qui continue de croître, des protéines-enzymes cellulaires. Il est assez facile de voir<sup>16</sup> que le taux différentiel de synthèse exprime en définitive un "coefficient de partage". Il définit comment les matériaux de la synthèse protéinique sont répartis entre des centres formateurs concurrents. Le rayonnement U.V. bloquant la formation de nouveaux centres, bloquerait le taux différentiel de synthèse au stade atteint au moment même de l'irradiation, mais il ne bloquerait pas nécessairement la vitesse absolue de synthèse, qui pourrait continuer d'augmenter.

Ce modèle ne rend pas compte cependant de certaines caractéristiques de la synthèse de la pénicillinase chez les bactéries irradiées. Nous avons vu, en effet, que lorsqu'elle intervient assez tard, l'irradiation a pour résultat, non pas de bloquer le taux différentiel de synthèse, mais bien de l'accroître. Ceci peut s'expliquer de façon très plausible si l'irradiation, outre le blocage de la synthèse des centres formateurs, se traduisait également par l'inactivation d'une certaine fraction d'entre eux. Il faudrait alors admettre que le centre formateur de pénicillinase est plus résistant que la moyenne des éléments homologues. Cette supposition correspond d'ailleurs à celle qu'avait avancée POLLOCK<sup>15</sup> pour rendre compte de la cinétique de synthèse de la pénicillinase par comparaison avec celle de la  $\beta$ -galactosidase.

On ne peut manquer de rapprocher ces observations et les commentaires qu'elles suggèrent, des observations de KELNER<sup>14</sup> sur les effets de l'irradiation ultraviolette sur la synthèse des constituants cellulaires. KELNER a montré en effet que chez les bactéries irradiées, les protéines continuaient d'être synthétisées alors que l'accroissement de l'acide désoxyribonucléique était bloqué. Nous ne prétendons pas suggérer que les organisateurs de POLLOCK soient des constituants désoxyribonucléiques, mais il est assez remarquable que le modèle que nous sommes amené à proposer comporte comme hypothèse essentielle le blocage électif d'un constituant cellulaire dont la synthèse (mais non pas l'activité) serait éminemment radiosensible. Il est donc permis de voir, dans les observations de KELNER, au moins un modèle ou un exemple expérimental de la situation que nous devons supposer pour rendre compte de nos observations.

Ce travail doit beaucoup au Dr. M. R. POLLOCK qui a participé aux expériences préliminaires et qui n'a pas cessé depuis de s'y intéresser et de nous prodiguer conseils et critiques. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre reconnaissance.

#### RESUME

La synthèse de Pénicilline induite par la pénicilline chez *Bacillus cereus* est inhibée par le rayonnement ultraviolet. La sensibilité de ce système au rayonnement ultraviolet varie au cours du temps: très marquée pendant les minutes qui suivent immédiatement l'induction, la sensibilité diminue dans une proportion considérable au-delà de la 20<sup>ème</sup> minute.

Ce comportement peut être interprété comme signifiant que le rayonnement ultraviolet bloque la formation de nouveaux centres formateurs de l'enzyme, mais n'inactive pas ceux qui existent au moment de l'irradiation.

#### SUMMARY

The penicillin-induced synthesis of penicillinase by *Bacillus cereus* is inhibited by U.V. radiations. The U.V. sensitivity of this system undergoes profound variations in time: the sensitivity is at its maximum immediately after induction and decreases very markedly after the 20th minute.

This behaviour may be interpreted in terms of a model which assumes that the U.V. radiation blocks the formation of new enzyme-forming centers, while it does not inactivate those centers which exist at the time of irradiation.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Die durch Penizillin induzierte Penizillinasynthese bei *Bacillus cereus* wird durch U.V.-Bestrahlung gehemmt. Die Empfindlichkeit des Systems gegenüber der Bestrahlung ist zeitabhängig: während den auf die Induktion folgenden Minuten ist sie sehr beträchtlich, nach 20 Minuten sinkt sie aber stark ab.

Zur Deutung dieses Verhaltens kann angenommen werden, dass die U.V.-Bestrahlung die Bildung neuer enzymbildender Zentren verhindert, doch die zur Zeit der Bestrahlung bereits bestehenden Zentren nicht inaktivieren kann.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> M. R. POLLOCK, *Brit. J. Exptl. Pathol.*, 31 (1950) 739.
- <sup>2</sup> M. R. POLLOCK, *Brit. J. Exptl. Pathol.*, 33 (1952) 587.
- <sup>3</sup> M. R. POLLOCK, *Brit. J. Exptl. Pathol.*, 34 (1953) 251.
- <sup>4</sup> P. A. SWENSON ET A. C. GIESE, *J. Cellular Comp. Physiol.*, 36 (1950) 369.
- <sup>5</sup> P. A. SWENSON, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 36 (1950) 699.
- <sup>6</sup> R. LATARJET, P. MARENNE ET R. BERGER, *Ann. Inst. Pasteur*, 85 (1953) 174.
- <sup>7</sup> R. D. HAUSEWRIGHT ET R. J. HENRY, *J. Biol. Chem.*, 167 (1947) 553.
- <sup>8</sup> M. R. POLLOCK ET A.-M. TORRIANI, *Compt. rend.*, 237 (1953) 276.
- <sup>9</sup> L. GORINI ET J. LABOUESSE-MERCOUROFF, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 291.
- <sup>10</sup> L. GORINI, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 237.
- <sup>11</sup> J. MONOD, A. M. PAPPENHEIMER JR. ET G. COHEN-BAZIRE, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 648.
- <sup>12</sup> M. R. POLLOCK, A.-M. TORRIANI ET E. J. TRIDGELL, *Biochem. J.* (sous presse).
- <sup>13</sup> J. MONOD, *Symposium Biogen. Prot.*, 11<sup>e</sup> Intern. Congr. Biochim., 1952, 75.
- <sup>14</sup> M. R. POLLOCK, *Symposium Biogen. Prot.*, 11<sup>e</sup> Congr. Intern. Biochim., 1952, 67.
- <sup>15</sup> A. KELNER, *J. Bacteriol.*, 65 (1953) 252.
- <sup>16</sup> M. R. POLLOCK, *3rd Symposium Soc. Gen. Microbiol.* (Adapt. in Microorg.), Cambridge Univ. Press, 1953.
- <sup>17</sup> J. MONOD, *Enzyme Biosynthesis*, Jessup Lectures 1954, Columbia University Press, New York (in preparation).

Reçu le 12 juillet 1955