

OBSERVATIONS RELATIVES AU ROLE DES PROTÉINES DU MILIEU DANS LES PHÉNOMÈNES DE TRANSFORMATIONS BACTÉRIENNES

RENÉ THOMAS*

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

(Reçu le 15 juillet, 1959)

SUMMARY

Observations on the role of proteins contained in the medium in bacterial transformations

Ribonuclease interferes with bacterial transformations in at least three ways:

1. inhibition, attributed to its complexing with DNA;
2. appreciable delay in the establishment of bacterial absorptiveness for DNA molecules in the medium;
3. under conditions which exclude these two effects, the yield of transformed bacteria can be increased 2- or 3-fold in the presence of RNase.

Albumin has a role in bringing about bacterial absorptiveness, and besides it is assumed to prolong the duration of that condition.

INTRODUCTION

Lorsque nous avons entrepris ce travail nous nous sommes posé la question suivante: est-il possible, par l'addition de RNase d'interférer avec l'expression phénotypique d'un gène nouvellement acquis par transformation? Un résultat positif aurait pu fournir un système favorable à l'analyse du mécanisme par lequel l'acide ribonucléique intervient dans la synthèse des protéines (pour une revue récente, voir BRACHET¹).

Notre but n'a pas été atteint. Nous avons, en revanche, observé que la ribonucléase —ainsi d'ailleurs que d'autres protéines— interfère avec les transformations du Pneumocoque à différents niveaux, clairement dissociables les uns des autres. L'intérêt de ces observations ne nous a pas paru justifier une étude approfondie, et nous les livrons ici telles qu'elles sont, c'est à dire très incomplètes. Incomplètes en particulier en ce sens que le degré de spécificité de l'action des protéines n'a pas été approfondi. Incomplètes aussi en ce sens que certaines expériences, pourtant évidentes n'ont pas été tentées: aussi certaines observations ont-elles dû être présentées de manière essentiellement descriptive, sans tentative d'interprétation quelque peu détaillée.

Les phénomènes observés, qui ont fait l'objet de deux notes préliminaires^{2, 3} peuvent être groupés comme suit: (a) Interaction de la ribonucléase avec l'ADN transformant: il s'agit vraisemblablement d'une complexion. (b) Effets de l'albumine

Abréviations: ADN = acide désoxyribonucléique; RNase = ribonucléase.

* Chercheur qualifié du Fonds National de la Recherche Scientifique (Belgique).

et de la ribonucléase sur l'établissement de la compétence*. (c) Effet favorable de protéines du milieu sur le rendement de la réaction entre les bactéries compétentes et l'ADN transformant. Cet effet peut être attribué soit à une prolongation de l'état de compétence des bactéries, soit à une augmentation de la réactivité des bactéries compétentes avec l'ADN. Le premier facteur pourrait être prédominant dans le cas de l'albumine et le second dans le cas de la ribonucléase.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches bactériennes

Le système de transformation utilisé dans ce travail est le transfert d'une haute résistance à la streptomycine à une souche de Pneumocoque sensible, par l'ADN d'une souche résistante*. La souche réceptrice utilisée, sensible à la streptomycine, est la souche R36A⁵. La souche donneuse, S^r-T55-1, a été obtenue par la transformation de R36A par l'ADN de la souche résistante RStr⁴. Les souches R36A et RStr nous ont été données par Madame H. EPHRUSSI-TAYLOR.

ADN transformant

L'ADN transformant a été isolé de la souche S^r-T55-1, essentiellement selon EPHRUSSI-TAYLOR⁶. La déprotéinisation a cependant été opérée par l'emploi de Duponol C⁷, et le fractionnement au MgSO₄-alcool (qui élimine une fraction de l'acide ribonucléique) a été omis.

L'ADN transformant conserve parfaitement son activité en solution saline (NaCl 0.14 M) concentrée (environ 1 mg ADN/ml) à basse température (congelée ou non). Les dilutions sont stables dans l'extrait de levure à 1% (EPHRUSSI-TAYLOR, communication personnelle) à basse température (congelées ou non).

Entretien des souches

Milieu NEL (EPHRUSSI-TAYLOR, communication personnelle) modifié par addition d'ions Ca⁺⁺: Bacto Neopeptone (Difco), 10 g; Extrait de levure (Difco) 2 g; NaCl 4,25 g; eau bidistillée 500 ml.

Ce milieu est amené à pH 8 par l'addition de NaOH; il est complété, au moment où le flacon est entamé, par l'addition de 0.001 volume de glucose à 25%, 0.01 volume de CaCl₂ 0.1 M.

Les tubes de culture, utilisés pour l'entretien des souches (tubes à sang) contiennent 2.5 ml de milieu NEL complété et 0.05 ml de sang de cheval defibriné, et sont bouchés au coton cardé.

La conservation à long terme des souches est assurée par repiquage tous les mois et demi (homogénéisation de la culture précédente, dilution de cette culture dans un tube de milieu frais, croissance à 37° jusqu'à la phase stationnaire, qui correspond à la concentration d'environ 3·10⁸ bactéries par ml. Ces tubes sont conservés à la glacière.

L'entretien à court terme des cultures est assuré par repiquage journalier (croissance de 3.5 h à 37°, prélèvement, sans homogénéisation préalable, de 0.1 ml pour ensemercer la culture suivante, qui est conservée à la glacière et incubée le lendemain).

* Ce terme désigne l'état physiologique qui permet aux bactéries d'absorber des molécules d'ADN du milieu.

Dans ce milieu les Pneumocoques ont tendance à former des chaînes parfois extrêmement longues, alors que dans le milieu C (voir ci-dessus) on trouve surtout des diplocoques et des courts chapelets.

*Conditions d'établissement de la compétence**

Milieu C (EPHRUSSI-TAYLOR, communication personnelle) modifié par l'addition d'ions Ca^{++} : Casamino acids (pure ou certified) Difco, 10 g; NaCl, 8.5 g; eau bidistillée 1 l; NaOH 1 N, 5 ml.

Ce milieu est complété, chaque fois qu'un nouveau flacon est entamé, par l'addition de: 0.04 volume d'extrait de levure à 10 %, préalablement traité au charbon actif à pH 3 et stérilisé sur bougie⁶, 0.01 volume de glucose 2.5 %, 0.01 volume de CaCl_2 , 0.1 M.

Au moment de l'emploi, ce milieu complété est additionné de 0.05 volume de serumalbumine de boeuf (fraction V de Armour) à 40 mg/ml.

La culture journalière en tubes à sang est diluée, en général 10 fois, dans du milieu C (complété, y compris l'albumine) et incubée à 37° (culture de compétence).

Conditions de la transformation

La compétence atteint son maximum vers 60 min si la culture en tubes à sang a été diluée 10 fois dans le milieu C ("culture de compétence"). Les bactéries sont en général mises en présence de l'ADN transformant par dilution de la culture compétente dans du milieu frais** contenant l'ADN. Les conditions précises seront détaillées au fur et à mesure de l'exposé des expériences.

L'incubation est arrêtée, en principe, 75 à 90 min après la mise en contact des bactéries et de l'ADN. Ce temps suffit à assurer l'essentiel de l'expression phénotypique de la transformation, sans cependant que le nombre des bactéries transformées ait commencé à augmenter du fait de la multiplication cellulaire^{4, 8, 9}.

A ce moment une dilution appropriée de la culture est incorporée sur boîte de Pétri, dans du milieu gélosé à sang de cheval (TAYLOR¹⁰) contenant 50 mg/ml de streptomycine.

La technique qui vient d'être décrite (caractérisée par le fait que l'établissement de la compétence et la réaction des bactéries compétentes avec l'ADN sont dissociés) sera désignée pour des raisons de commodité sous le nom de "système dissocié". Dans certains cas nous avons aussi utilisé la technique qui était anciennement la plus employée. Dans ce système "non dissocié" l'ADN est présent dès l'ensemencement de la culture. Celle-ci est incubée suffisamment longtemps (généralement 4 à 5 h) pour

* Ces milieux (sans addition de CaCl_2) ont été utilisés avec de bons résultats par EPHRUSSI-TAYLOR au cours d'un séjour aux Etats-Unis. Ils nous ont fourni, à Bruxelles, pendant près de deux ans, des taux de transformation élevés (1 à 10 % de la population) de manière reproduicible, à condition cependant d'ajouter des ions Ca^{++} , qui à la concentration optima (ajoutée) de 10^{-3} M améliorent le taux de transformation d'un facteur de l'ordre de 500 (La même amélioration a été obtenue en triplant la concentration d'extrait de levure.)

Ces mêmes milieux n'ont jamais donné de transformations satisfaisantes ni à H. EPHRUSSI-TAYLOR et OPARA (à Paris) ni à R. LATARJET; ils ont cessé brusquement d'être utilisables entre nos mains. Il semble que cette variabilité doive être attribuée à un facteur de la peptone, labile et présent en quantité variable d'une préparation à l'autre.

** L'influence de la présence d'albumine sur le rendement, même après l'établissement de la compétence (voir p. 56-58), n'a été réalisé que tardivement. Aussi, sauf mention du contraire, le milieu frais dans lequel les bactéries compétentes sont diluées est du milieu C complété mais sans albumine.

permettre l'apparition de bactéries compétentes, leur réaction avec l'ADN et l'expression phénotypique de la transformation.

Protéines

Les protéines utilisées sont ajoutées aux milieux de culture sous forme d'un petit volume de solution saline ($\text{NaCl } 0.14 M$) concentrée; un volume égal de la même solution saline, sans protéine, est ajoutée en même temps aux tubes témoins.

Ribonucléase: Armour, cristallisée. Dans d'autres expériences d'autres préparations commerciales (GBI, Worthington) ont été utilisées, ainsi que des fractions isolées par chromatographie (fraction "A") et mises obligeamment à notre disposition par L. LEDOUX. Lysozyme: Armour. Cytochrome *c*: Sigma. Albumine: serumalbumine de boeuf (fraction V de Armour) traitée selon TAYLOR¹⁰.

Mesure de la compétence par la technique de dilution

La compétence d'une culture peut être suivie en fonction du temps par la technique de dilution, déjà utilisée antérieurement⁹ et dont nous rappelons le principe.

Lorsque une culture compétente est diluée dans du milieu frais, l'apparition de nouvelles bactéries compétentes est interrompue; si le milieu de dilution contient de l'ADN, les bactéries qui étaient compétentes au moment de la dilution pourront réagir avec cet ADN. Les nombres de transformations observés en fonction du temps de la dilution sont entre eux dans le même rapport, indépendamment de la concentration de l'ADN. On peut admettre qu'ils donnent une mesure fidèle de l'état de compétence de la culture.

Diluer la culture compétente dans du milieu frais revient à initier une nouvelle culture. Celle-ci développera une compétence "secondaire" au cours de la seconde moitié de sa croissance exponentielle, c'est à dire d'autant plus tard que la dilution est plus forte. Il est essentiel de calculer la dilution de sorte que la compétence "secondaire" soit suffisamment tardive, pour ne pas contribuer à la transformation. Si, pour une raison quelconque il n'est pas possible de diluer suffisamment, le même résultat est atteint par l'addition de DNase 15 à 20 min après la dilution. Les deux procédés concordent parfaitement.

Conformément à ce qui avait été observé précédemment dans d'autres milieux⁹ la compétence apparaît d'autant plus tard que l'inoculum utilisé est plus faible. Elle occupe approximativement la seconde moitié de la phase de croissance exponentielle. La Fig. 2 (×) montre l'évolution de la compétence dans le système utilisé au cours de ce travail.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Interaction de la ribonucléase avec l'ADN transformant

En système "non dissocié" (voir p. 52) la présence de ribonucléase (Armour) entraîne une réduction massive du nombre des bactéries transformées. Une inhibition de 98 % a été observée pour 1000 µg/ml RNase et 2 µg/ml ADN. Ce type d'expérience ne permet pas de localiser l'effet de la ribonucléase. Signalons cependant qu'il ne peut être dû à une action toxique sur les cellules: la concentration de la ribonucléase la plus élevée que nous ayons utilisé (3000 µg/ml) n'a aucun effet défavorable sur la croissance. L'emploi de systèmes "dissociés" (voir p. 52) permet de localiser l'action de l'enzyme.

Dans un premier type d'expérience, tout effet éventuel sur l'établissement de la compétence est mis hors de cause: la culture de compétence ne contient ni ribonucléase, ni ADN, et ces substances n'interviennent qu'après une dilution des bactéries compétentes dans du milieu frais (dilution qui interrompt l'établissement de la compétence).

L'expérience dont les conditions et les résultats sont fournis par le Tableau I montre:

TABLEAU I
INHIBITION DE LA TRANSFORMATION PAR LA RIBONUCLÉASE

Des aliquotes d'une culture compétente (stabilisée par refroidissement à 0°) sont diluées 20 fois dans deux séries de tubes de milieu frais, contenant de l'ADN et de la RNase (Armour) aux concentrations indiquées dans le tableau. La température de la première série de tubes est de 37°; des dilutions de ces cultures sont coulées en gélose à la streptomycine après 75 min d'incubation, destinées à permettre l'expression du phénotype. La température de la seconde série de tubes est de 22°. Après 45 min à cette température, les cultures sont incubées 75 min à 37° pour compléter l'expression phénotypique; des dilutions sont alors coulées en gélose à la streptomycine Centres formateurs de colonies: $1.2 \cdot 10^8$ /ml de culture compétente. Transformations par ml de culture compétente:

	a. réaction à 37°		b. réaction à 22°	
	5 µg/ml ADN	8.2 · 10 ⁵	5 µg/ml ADN	1.6 · 10 ⁶
	0.05 µg/ml ADN	3.3 · 10 ⁴	0.05 µg/ml ADN	1.1 · 10 ⁴
<i>Concentration de la RNase</i>				
	200 µg/ml	500 µg/ml	1000 µg/ml	
% d'inhibition de la transformation				
(a) réaction à 37°				
	5 µg/ml ADN	75.6	96.8	99.4
	0.05 µg/ml ADN	99.9 ₄	99.9 ₇	99.9 ₁
(b) réaction à 22°				
	5 µg/ml ADN	89.3	99.0	99.3
	0.05 µg/ml ADN	99.9 ₈	99.9 ₈	99.9 ₆

1. Que la ribonucléase peut provoquer une réduction massive de la transformation en agissant sur un stade postérieur à l'établissement de la compétence.

2. Que le pourcentage d'inhibition de la transformation dépend non seulement de la concentration de la ribonucléase, mais aussi, de façon très marquée, de la concentration de l'ADN transformant: une même concentration de ribonucléase est d'autant plus active que la concentration de l'ADN transformant est plus faible.

S'il s'agissait d'une action de la ribonucléase sur les cellules, on s'attendrait à ce que l'effet dépende essentiellement de la concentration de la ribonucléase. Que l'effet dépende très largement de la concentration en ADN suggère une interaction RNase-ADN (complexe?).

3. La comparaison des deux parties de l'expérience (où la réaction des bactéries compétentes se produit, respectivement, à 37° et à 22°) montre que l'effet est au moins aussi prononcé à 22° qu'à 37°. Ceci suggère que l'activité enzymatique de la ribonucléase —dont le coefficient de température est de l'ordre de 5— ne joue aucun rôle dans l'effet observé.

L'expérience suivante est destinée à voir si la ribonucléase du milieu peut encore

produire son effet inhibiteur lorsque la réaction entre les bactéries compétentes et l'ADN libre du milieu a été pratiquement bloquée par dilution. La Fig. 1 montre que ce n'est pas le cas. Ce résultat renforce — sans la prouver — l'hypothèse selon laquelle l'effet inhibiteur de la ribonucléase résulte d'une interaction (complexe?) avec l'ADN libre du milieu.

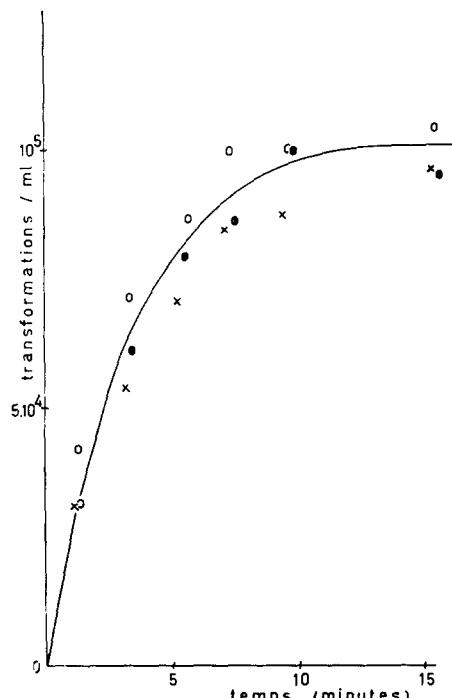


Fig. 1. Absence d'effet inhibiteur de la ribonucléase après l'interruption de la réaction des bactéries compétentes avec l'ADN libre du milieu. Les bactéries compétentes sont diluées (1:1) au temps 0 dans du milieu frais contenant 5 µg/ml ADN. Aux temps indiqués en abscisses, la réaction des bactéries compétentes avec l'ADN libre du milieu est pratiquement interrompue par dilution (100 fois) dans du milieu frais contenant 0 (X), 500 (O) ou 3000 (●) µg/ml RNase (Armour). En ordonnées, les nombres de transformations, rapportés à 1 ml de culture compétente non diluée.

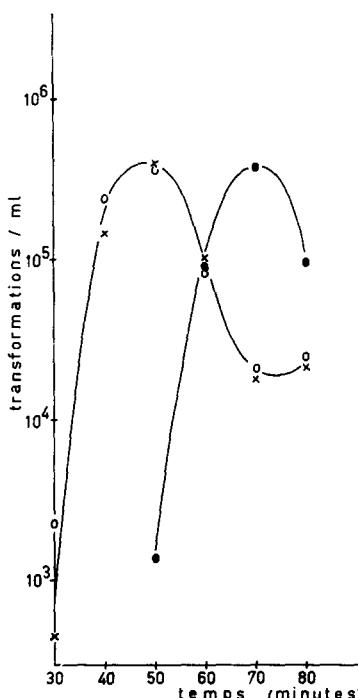


Fig. 2. Effet de la ribonucléase sur l'établissement de la compétence. La compétence a été suivie en fonction du temps, en utilisant la technique de dilution, dans trois cultures parallèles. La première (X) est une culture témoin, la seconde (O) contient 2 mg/ml lysozyme et la troisième contient 2 mg/ml RNase (Armour).

Effets de l'albumine et de la ribonucléase sur l'établissement de la compétence

Le succès des transformations du Pneumocoque dépend, entre autres, de la présence d'un facteur que HOTCHKISS ET EPHRUSSI-TAYLOR¹¹ ont pu identifier à l'albumine; les milieux utilisés pour les transformations de Pneumocoque sont toujours additionnés de serum ou d'albumine purifiée. Nous avons observé précédemment⁹ que l'effet principal de l'albumine porte sur l'établissement de la compétence: si l'albumine est ajoutée à la culture de compétence avec un retard croissant l'ordre de compétence apparaît du plus en plus tard.

L'effet de la ribonucléase sur l'établissement de la compétence a été étudié de la manière suivante: Des cultures de compétence sont ensemencées simultanément;

le milieu de culture a été additionné préalablement de 0·1 volume de solution saline ($\text{NaCl } 0\cdot14 M$) contenant ou non 20 mg/ml RNase (Armour). Après différents temps d'incubation, la compétence est déterminée par dilution (100 fois) dans du milieu frais contenant de l'albumine (2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ADN, incubation de 75 min à 37° et étalement en gélose à la streptomycine. Dans ces conditions la ribonucléase n'agit probablement que sur l'établissement de la compétence. Il a été vérifié, en effet, qu'à la concentration d'ADN utilisé (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) la concentration résiduelle de la ribonucléase après la dilution (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) est insuffisante pour que l'effet de complexion soit sensible. La Fig. 2 montre le résultat d'une telle expérience, où l'effet de la ribonucléase a été, en outre, comparé à celui d'une concentration égale de lysozyme. On voit que l'établissement de la compétence se trouve retardé très sensiblement en présence de ribonucléase, alors que la culture contenant du lysozyme se comporte exactement comme la culture témoin; le retard occasionné par la présence de RNase est assez constant d'une expérience à l'autre.

Nous n'avons pas étudié la question de savoir si des concentrations croissantes d'enzyme déplacent le pic de compétence de manière graduelle ou continue. La spécificité de cet effet de la RNase n'a pas davantage été approfondi. L'absence d'effet du lysozyme, dont la masse moléculaire et la basicité sont voisines de celles de la ribonucléase, suggère qu'il ne s'agit pas d'un effet général des petites protéines basiques.

La signification de cet effet nous échappe au même titre que la nature même de la compétence.

Effet favorable des protéines du milieu sur le rendement de la réaction entre les bactéries compétentes et l'ADN transformant.

1. Nous avons vu que la présence d'albumine influence de manière décisive l'établissement de la compétence.

L'idée que l'albumine joue aussi un rôle ultérieurement s'est imposée lorsque nous avons réalisé qu'une assez forte dilution des bactéries dans du milieu frais sans albumine peut réduire d'un facteur de plusieurs unités le rendement de la transformation. Ce résultat est imputable, plutôt qu'à la dilution elle-même, à une concentration résiduelle trop faible de l'albumine. La question de savoir si cet effet est spécifique de l'albumine ou s'étend au contraire à d'autres protéines ou, plus généralement, à d'autres macromolécules n'a pas été étudiée. Un effet favorable de la ribonucléase se manifeste dans des conditions où les deux effets inhibiteurs sont éliminés, mais le mécanisme de cet effet pourrait être différent de celui de l'albumine.

Un premier type d'expériences était destiné à localiser dans le temps l'effet de l'albumine. Une première dilution, dans du milieu contenant de l'ADN, interrompt l'établissement de la compétence et déclenche en même temps la réaction des bactéries avec l'ADN. La seconde dilution a lieu à différents temps dans du milieu contenant la même concentration d'ADN et une concentration finale d'albumine, soit de 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, soit de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Les résultats d'une telle expérience sont représentés par la Fig. 3. On voit qu'une seconde dilution à différents temps, dans du milieu contenant la même concentration d'ADN et une concentration élevée d'albumine n'a pas d'effet sensible sur la transformation, quel que soit le moment de cette dilution. Au contraire, aussitôt après la première dilution, une seconde dilution dans du milieu contenant toujours la même concentration d'ADN mais une concentration finale d'albumine de

$2 \mu\text{g}/\text{ml}$ seulement, réduit le nombre de transformation d'un facteur 2; si cette seconde dilution est différée, la réduction du nombre des transformations diminue pour disparaître à partir d'un intervalle de 10 min entre les deux dilutions. Les paliers des deux courbes sont égaux.

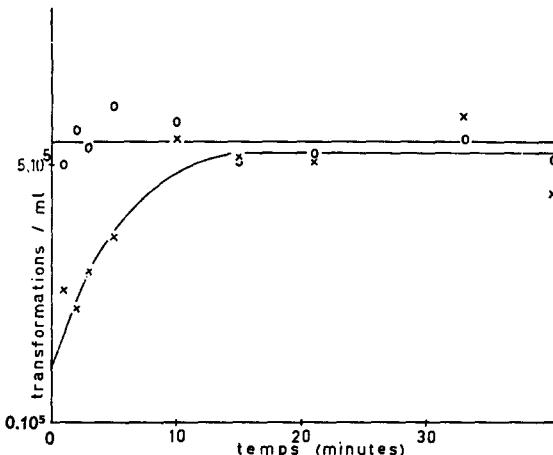


Fig. 3. Localisation dans le temps de l'effet favorable de l'albumine sur le rendement de la réaction entre les bactéries compétentes et l'ADN transformant. Une culture compétente est diluée (10 fois) au temps 0 dans du milieu frais sans albumine ajoutée (la concentration résiduelle de l'albumine est donc de $200 \mu\text{g}/\text{ml}$), et contenant $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ADN. Aux temps indiqués en abscisses, des aliquotes sont diluées (100 fois) dans du milieu contenant la même concentration d'ADN et, soit $2000 \mu\text{g}/\text{ml}$ albumine (\circ) soit pas d'albumine ajoutée (\times), ce qui mène à une concentration résiduelle d'albumine de $2 \mu\text{g}/\text{ml}$.

Le besoin d'albumine se localise donc, dans les conditions utilisées, pendant les dix premières minutes qui suivent le contact des bactéries avec l'ADN. Plus précisément, on peut montrer que ce besoin se limite à la période de la réaction des bactéries compétentes avec l'ADN libre du milieu: si cette réaction est bloquée par une forte dilution dans du milieu sans ADN, la présence ou l'absence d'albumine dans le milieu de dilution n'influence pas le nombre des transformations (Fig. 4).

Il paraît donc raisonnable d'envisager un effet de l'albumine soit sur la réactivité des bactéries compétentes avec l'ADN soit sur le maintien de l'état de compétence, les deux possibilités ne s'excluant du reste pas. Si la seconde éventualité intervient, la concentration de l'albumine dans le milieu de dilution doit influencer le résultat de la transformation même si l'ADN n'est pas encore présent. L'expérience suivante, décrite par la Fig. 5, montre qu'il en est bien ainsi.

Les trois courbes de la Fig. 5 doivent être comparées deux à deux. Les conditions qui fournissent les courbes A' et B ne diffèrent qu'en ce qui concerne la concentration de l'albumine avant l'addition de l'ADN transformant; en revanche les conditions de la réaction entre les bactéries compétentes et l'ADN sont identiques. L'examen de ces deux courbes permet donc de comparer l'allure de la chute de compétence dans des milieux contenant respectivement $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ et $2000 \mu\text{g}/\text{ml}$ d'albumine. On voit qu'en présence d'une forte concentration d'albumine, la chute de la compétence est nettement ralentie.

Les conditions des courbes A et A' ne diffèrent qu'en ce qui concerne la concentration de l'albumine, à partir du moment de l'addition de l'ADN. Chacune de ces deux

courbes donne une image de la chute de compétence dans le milieu contenant $2 \mu\text{g/ml}$ d'albumine; comme on doit s'y attendre, la décroissance est parallèle. Les nombres absolus de transformations diffèrent, de la courbe A à la courbe A', d'un facteur qui représente l'effet de l'albumine après l'addition d'ADN. Ce point peut être expliqué, du moins partiellement, par l'effet de l'albumine sur la chute de la compétence. En effet, la compétition entre la chute de la compétence (réaction 1) et la réaction des bactéries encore compétentes avec l'ADN (réaction 2) est un facteur déterminant du rendement de la transformation⁹; aussi, tout ralentissement de la chute de la compétence au cours de la réaction des bactéries avec l'ADN doit-il améliorer le taux de la transformation.

Il est vraisemblable cependant, que des facteurs autres que le maintien de la

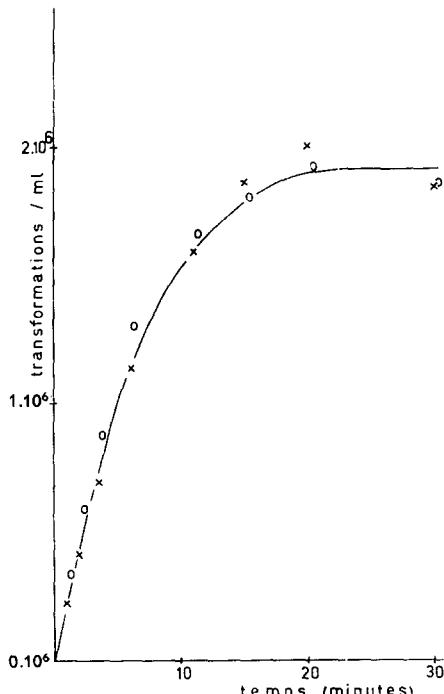


Fig. 4. Absence d'effet favorable de l'albumine après l'interruption de la réaction des bactéries compétentes avec l'ADN libre du milieu. Une culture compétente est diluée 100 fois (temps 0) dans du milieu sans albumine ajoutée, contenant $5 \mu\text{g/ml}$ ADN. Aux temps indiqués en abscisses la réaction des bactéries compétentes avec l'ADN libre du milieu est interrompue par dilution (100 fois) dans du milieu sans ADN, contenant soit $2000 \mu\text{g/ml}$ albumine (○), soit pas d'albumine ajoutée (×), ce qui donne une concentration résiduelle d'albumine de $2 \mu\text{g/ml}$.

dilution (I), transférées dans des tubes ne contenant que l'ADN; A' (○) aliquotes de la dilution (I), transférées dans des tubes contenant, outre l'ADN, suffisamment d'albumine pour que la réaction des bactéries compétentes avec l'ADN ait lieu en présence de $2000 \mu\text{g/ml}$ albumine; B (●) aliquotes de la dilution (2), transférées dans des tubes contenant l'ADN.

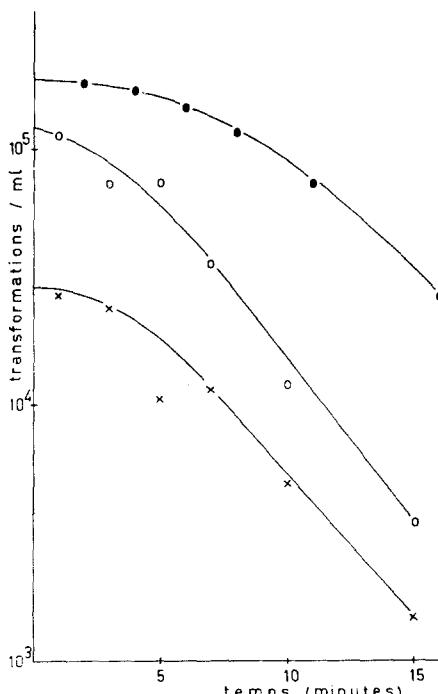


Fig. 5. Effets de l'albumine sur la chute de la compétence après dilution et sur la réaction des bactéries compétentes avec l'ADN. Une culture compétente est diluée 1000 fois (1) dans du milieu sans albumine (concentration résiduelle en albumine: $2 \mu\text{g/ml}$), (2) dans du milieu contenant $2000 \mu\text{g/ml}$ albumine. La chute de la compétence dans les deux cultures diluées est suivie en fonction du temps par transfert d'aliquotes dans des tubes contenant l'ADN transformant (concentration finale: $0.5 \mu\text{g/ml}$). Les trois courbes correspondent respectivement aux conditions suivantes: A (×) aliquotes de la dilution (1), transférées dans des tubes ne contenant que l'ADN; A' (○) aliquotes de la dilution (1), transférées dans des tubes contenant, outre l'ADN, suffisamment d'albumine pour que la réaction des bactéries compétentes avec l'ADN ait lieu en présence de $2000 \mu\text{g/ml}$ albumine; B (●) aliquotes de la dilution (2), transférées dans des tubes contenant l'ADN.

compétence, puissent contribuer à l'effet favorable de l'albumine. Si l'albumine n'agissait que sur la compétition entre les réactions 1 et 2 on s'attendrait, en effet, à ce que l'effet disparaîsse aux concentrations saturantes d'ADN, où la vitesse de la réaction 2 est suffisante pour que tous les sites compétents aient eu le temps de réagir avant de perdre la compétence. Il ne semble pas que tel soit le cas.

2. Deux effets de la ribonucléase sur la transformation ont été décrits plus haut. Le premier résulte vraisemblablement de la formation d'un complexe ADN-RNase et se traduit par une inhibition, qui peut être complète de la transformation. Le second, dont la signification nous échappe totalement, consiste en un retard de l'établissement de la compétence.

Lorsque l'on utilise des conditions telles que ces deux effets soient éliminés ou minimisés, on observe que la présence de ribonucléase peut améliorer sensiblement (d'un facteur de l'ordre de 3) le rendement de la transformation.

Dans une première série d'expériences, les bactéries compétentes ont été diluées 10 fois dans du milieu frais contenant ou non une forte (2000 µg/ml) concentration de RNase (Armour). Après un séjour de 3 min, sauf mention d'une autre durée, dans ce milieu, les cultures sont diluées 40 fois (ce qui donne une concentration résiduelle de 50 µg/ml RNase) dans du milieu frais contenant différentes concentrations d'ADN. Ces conditions éliminent l'effet de la RNase sur l'établissement de la compétence. D'autre part, on peut s'attendre, d'après les résultats représentés par le Tableau I, à ce que la concentration résiduelle de RNase (50 µg/ml) soit ou non, selon la concentration de l'ADN, suffisante pour produire une complexion appréciable. Effectivement, aux concentrations faibles d'ADN (0.5 ou 0.05 µg/ml) l'inhibition de la transformation est nette; à la concentration de 5 µg/ml d'ADN l'effet favorable de la ribonucléase se manifeste. Dans certains cas la durée du traitement à la ribonucléase et le temps choisi pour interrompre par dilution l'établissement de la compétence ont été variés, sans effet sur l'amélioration du taux de transformation par la ribonucléase. Il paraît clair, en particulier, que la chute de la compétence n'est pas retardée par la présence de RNase. Le palier de la courbe donnant la fréquence de la transformation en fonction de la concentration d'ADN est le même, que les bactéries compétentes aient été ou non traitées par la ribonucléase. Ceci suggère que l'effet de la RNase, n'est pas d'augmenter le nombre des bactéries transformables mais d'accroître la vitesse de leur réaction avec l'ADN.

Dans des conditions où l'effet favorable n'est pas intentionnellement dissocié de l'effet de complexion on peut observer, selon les concentrations de RNase et d'ADN, toute la gradation depuis une forte inhibition jusqu'à un accroissement sensible du taux de transformation. L'effet de complexion domine aux fortes concentrations de ribonucléase, de l'ordre de 100 µg/ml. Aux concentrations plus faibles de RNase l'effet favorable peut l'emporter si la concentration de l'ADN est appropriée. Ajoutons que différentes préparations commerciales de ribonucléase se comportent différemment en ce qui concerne l'effet complexant ou, au contraire, activateur, d'une concentration donnée.

DISCUSSION

1. L'un des effets de la ribonucléase sur les transformations du Pneumocoque se traduit par une inhibition, qui peut être quasi-totale, du phénomène. Les expériences

décrivées sont compatibles avec l'idée que cet effet résulte de la formation de complexes entre l'ADN et la RNase. La formation de tels complexes a été décrite à diverses reprises. Citons la démonstration par MAC DONALD (communication personnelle) d'une inhibition de l'activité enzymatique de la RNase par l'ADN. Dans ce cas, le constituant susceptible d'un dosage d'activité biologique est la ribonucléase et l'agent inhibiteur est l'ADN, de sorte que la situation est, en quelque sorte, symétrique de celle qui est décrite dans le présent travail. Un complexe RNase-ADN a aussi été mis en évidence par électrophorèse¹². On peut imaginer que ce type de complexes est peu spécifique, et semblable à celui que l'ADN formerait avec n'importe quelle protéine basique; le présent travail ne contient, cependant, aucun renseignement à cet égard. Rappelons que l'acide apurinique (produit de la dégradation acide ménagée de l'ADN) est rendu acidosoluble non seulement par la RNase¹³ mais aussi par d'autres protéines basiques¹⁴.

On peut se demander par quel mécanisme la formation d'un complexe entre l'ADN transformant et la RNase empêche l'établissement de la transformation. Une agrégation des molécules d'ADN aurait pour conséquence une diminution du nombre de particules transformantes et, vraisemblablement, des difficultés accrues de pénétration de l'agent transformant dans les bactéries. Il n'est pas exclus, cependant, que des molécules d'ADN, même combinées à une ou plusieurs molécules de ribonucléase, puissent néanmoins pénétrer dans les bactéries; dans ce cas, on peut concevoir que la transformation échoue parce que la RNase, introduite dans la cellule par ce procédé du type "cheval de Troie", interrompt l'une des étapes de la transformation ou, plus brutalement, tue la cellule*. Il a été montré dans une série de cas que la RNase peut, effectivement, tuer les cellules dans lesquelles elle réussit à pénétrer (revue BRACHET¹⁶).

2. L'effet favorable qui peut être mis en évidence dans certaines conditions peut probablement être attribué, lui aussi, à la nature basique de la RNase. Ainsi que nous l'avons vu plus haut, tout se passe comme si la réaction entre l'ADN et les bactéries compétentes traitées à la RNase était accélérée. La réduction de la charge nette négative des cellules pourrait intervenir. Une interprétation plus précise de ce phénomène sera dans doute fournie par le développement des observations récentes selon lesquelles diverses substances basiques, telles que les polyamines trouvées dans les bactériophages, et diverses protéines basiques, peuvent dans certaines conditions améliorer le rendement des transformations (GOODGAL, communication personnelle; MARMUR, communication personnelle).

3. Nous n'avons aucune indication en ce qui concerne la signification du retard de l'établissement de la compétence en présence de RNase. Rappelons que le lysozyme, dont la masse moléculaire et la basicité sont voisines de celles de la RNase, est sans effet.

4. En ce qui concerne l'effet de l'albumine soit sur l'établissement de la compétence, soit aux stades ultérieurs, on peut faire deux remarques: (a) L'idée que les protoplastes bactériens seraient capables d'absorber de l'ADN du milieu dans des conditions où les cellules normales ne peuvent le faire —en d'autres termes, que la

* Remarquons qu'un tel mécanisme pourrait concilier deux points de vue en apparence contradictoires: (a) la démonstration par LERMAN ET TOLMACH¹⁵ de la spécificité de l'état de compétence vis-à-vis de l'ADN, à l'exclusion de l'ARN (et, *a fortiori*, des protéines). (b) La suggestion⁹ selon laquelle la DNase pourrait bien pénétrer dans les cellules compétentes. Selon le mécanisme du "cheval de Troie", la DNase pénétrerait dans les cellules compétentes à la faveur de leur fixation sur une molécule d'ADN.

paroi cellulaire est l'obstacle majeur de la transformation —doit être très répandue, si l'on en juge par le nombre de travaux en cours, tendant à transformer des protoplastes ou à les infecter avec des préparations d'ADN de phage. (b) L'albumine est un facteur de stabilité des protoplastes, ou du moins de certaines préparations^{17,18}. Il serait absurde d'assimiler les bactéries compétentes à des protoplastes, car aucune tendance à la formation de telles structures ne s'observe au microscope lors de l'établissement de la compétence. On peut néanmoins se demander si certaines propriétés de la surface des bactéries compétentes ne pourraient pas être, ne fût-ce que localement, voisines de celles des protoplastes. Deux observations, l'une favorable, l'autre défavorable à cette idée, peuvent être citées ici: (a) Il existe une certaine corrélation entre la chute de viabilité d'une population de Pneumocoque soumise au choc osmotique et son degré de compétence. (b) Lorsqu'une culture compétente est fortement diluée dans du milieu frais le titre viable n'est pas différent selon que ce milieu contient ou non de l'albumine (THOMAS, observations non publiées).

RÉSUMÉ

La ribonucléase interfère, à trois niveaux au moins, avec les transformations bactériennes. On observe:

1. Un effet inhibiteur, dû vraisemblablement à la formation d'un complexe entre l'acide désoxyribonucléique et la ribonucléase;
2. Un délai sensible de l'établissement de la compétence;
3. Dans des conditions qui excluent les deux effets précités, le rendement de la transformation peut être amélioré d'un facteur 2 ou 3 en présence de ribonucléase.

L'albumine joue un rôle dans l'établissement de l'état de compétence, et intervient également à un second niveau, vraisemblablement en prolongeant la durée de la compétence.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. BRACHET dans E. CHARGAFF ET J. N. DAVIDSON, *The Nucleic Acids*, Vol. II, Academic Press, New York, 1955, p. 475.
- ² R. THOMAS, *Arch. intern. physiol. biochem.*, 66 (1956) 528.
- ³ R. THOMAS, *Biochem. J.*, 66 (1957) 38.
- ⁴ R. D. HOTCHKISS, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 40 (1954) 49.
- ⁵ O. T. AVERY, C. M. MACLEOD ET M. McCARTY, *J. Exptl. Med.*, 79 (1944) 137.
- ⁶ H. EPHRUSSI-TAYLOR, *Exptl. Cell Research*, 2 (1951) 589.
- ⁷ S. ZAMENHOF, H. E. ALEXANDER ET G. LEIDY, *J. Exptl. Med.*, 98 (1953) 373.
- ⁸ R. D. HOTCHKISS dans W. D. McELROY ET B. GLASS, *The chemical basis of Heredity*, The Johns Hopkins Press, Baltimore, 1957, p. 321.
- ⁹ R. THOMAS, *Biochim. Biophys. Acta*, 18 (1955) 467.
- ¹⁰ H. E. TAYLOR, *Compt. rend.*, 228 (1949) 1258.
- ¹¹ R. D. HOTCHKISS ET H. EPHRUSSI-TAYLOR, *Federation Proc.*, 10 (1951) 200.
- ¹² A. A. HAKIM, *Nature*, 178 (1957) 1293.
- ¹³ M. C. DURAND ET R. THOMAS, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 416.
- ¹⁴ M. R. McDONALD ET B. P. KAUFMANN, *J. Histochem. Cytochem.*, 2 (1954) 387.
- ¹⁵ L. S. LERMAN ET L. J. TOLMACH, *Biochim. Biophys. Acta*, 26 (1957) 68.
- ¹⁶ J. BRACHET, *Publ. Staz. Zool. Napoli*, 27 (1955) 146.
- ¹⁷ N. D. ZINDER ET W. F. ARNDT, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 42 (1956) 586.
- ¹⁸ J. SAMS, *Thesis*, Bloomington (Indiana), 1957.