

	Leberfeldbestrahlung (Serie I–II)			Totalbestrahlung (Serie III)		
	Kontrolle (12 Tiere)	Test (12 Tiere)	Relative Abwei- chung von der Norm	Kontrolle (6 Tiere)	Test (6 Tiere)	Relative Abwei- chung v. d. Norm
Relatives Lebergewicht (100 × Lebergewicht/Körpergewicht) . . . . .	3,35 ± 0,11	3,67 ± 0,09*	+10%	3,21 ± 0,09	3,52 ± 0,21	+10%
Wassergehalt der Leber (%) . . . . .	70,0 ± 0,3	69,8 ± 0,3	–	69,6 ± 0,4	70,1 ± 0,3	–
Grösse der Mitochondrienfraktion (totaler N- Gehalt der Fraktion in % desjenigen des Ge- samtgewebes) . . . . .	28,1 ± 1,1	27,7 ± 1,6	–	29,3 ± 1,4	29,3 ± 1,5	–
Succinodehydrogenase-Aktivität (mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> /h/mg N des Totalhomogenats) . . . . .	729,0 ± 51,1	731,3 ± 46,2	0	722,0 ± 36,9	726,8 ± 38,3	0
Pyruvatoxydation (mm <sup>3</sup> O <sub>2</sub> /h/mg N der Mitochondriensuspension). . . . .	187,6 ± 6,4	165,9 ± 5,7	–12%	182,6 ± 8,0	163,3 ± 4,9	–11%
Extinktion der 1:50 verdünnten Mitochondrien- suspension (Mannit isoton.) . . . . .	0,589 ± 0,018	0,572 ± 0,014	–	0,588 ± 0,006	0,555 ± 0,033	–

\* Statistische Auswertung von Serie I–II: Die beim relativen Lebergewicht und der Pyruvatoxydation auftretenden Abweichungen von der Norm sind im *t*-Test nach STUDENT als signifikant befunden worden (*p* 0,05). Angegeben sind jeweiligen Durchschnitt und mittlerer Fehler des Mittelwertes. Bei der Analyse des vorliegenden Versuchsmaterials lassen sich zunächst keine gesicherten Unterschiede zwischen Bestrahlung durch Betatron (Serie I) und Röntgenröhre (Serie II) erkennen. Eine Abhängigkeit der beobachteten Bestrahlungseffekte von der Zeit ist innerhalb des geprüften Bereiches nicht nachweisbar.

werden, dass die hier im Bereich des Leberstoffwechsels beobachteten Störungen für den letalen Ausgang bei der Totalbestrahlung allein für sich nicht wesentlich sind, dass sie indessen als Ausdruck eines direkten Strahlungsschadens bewertet werden müssen.

H. RYSER, H. AEBI und A. ZUPPINGER

Röntgeninstitut und Medizinisch-Chemisches Institut  
der Universität Bern, den 8. Februar 1954.

#### Summary

A study was made of the influence of local (liver field) and total irradiation (1,000 r) on the enzymatic activity of isolated liver mitochondria from adult rats. While the succinodehydrogenase activity remains unaltered, the oxydation of pyruvate—as well as the structural stability of the mitochondria—are found to be reduced, entailing a decrease in the oxydative phosphorylation. These variations remain the same even after total or local irradiation.

#### Inhibition sélective de quelques enzymes respiratoires chez *Escherichia coli*

Dans un mémoire précédent<sup>1</sup>, nous avons montré que grâce à un procédé physique d'inhibition: la pression, il était possible de dissocier des fonctions physiologiques d'un microbe telles que son pouvoir de prolifération, sa respiration, éventuellement sa mobilité. Des pressions qui abaissent, par exemple, considérablement les facultés de prolifération du microbe laissent persister une activité respiratoire notable.

Dans le cas des enzymes de la respiration, nous avons recherché les pressions limites qui entraînent l'inhibition totale ou quasi totale des enzymes oxydatifs de diacides: acides succinique, fumarique, malique et oxalacétique et de monoacides: acides pyruvique et acétique. Notre matériel expérimental était *Escherichia coli*, souche Monod.

<sup>1</sup> P. VIGNAIS, M. MACHEBOEUF et J. BASSET, J. Chim. Phys. (1953) (sous presse).

Signalons que JOHNSON et EYRING<sup>1</sup> ont recherché comment évoluait sous de faibles pressions une réaction enzymatique (luciférase-luciférine) chez des bactéries luminescentes. Notre étude est différente: les bactéries à l'état non proliférant sont soumises en absence de substrat à de hautes pressions pendant un temps très court puis ramenées à la pression atmosphérique; on recherche alors les altérations subies par divers systèmes enzymatiques.

**Protocole expérimental.** L'étude des activités enzymatiques s'effectue sur des bactéries à l'état non proliférant. La culture qui sert à la préparation de ces bactéries est obtenue de la façon suivante: Un inoculum bactérien provenant d'une gélose nutritive sert à ensemencer 10 ml d'eau peptonée. Après quelques heures (8 à 10 h) de prolifération à 37°C, on prélève deux gouttes pour ensemencer 50 ml de milieu nutritif (un litre de ce milieu contient: 10 g de peptone VAILLANT, 5 g de phosphate bipotassique, 100 ml d'extrait de levure SPRINGER; le pH est ajusté à 7). Un inoculum de 5% en volume provenant de la dernière subculture est ajouté à 300 ml de milieu nutritif contenus dans une fiole de FERNBACH de 2 l de capacité. La culture est agitée sur une machine à secousses à 37°C; la prolifération s'opère ainsi dans des conditions d'aération optimum. De plus, les repiquages successifs assurent une population homogène. Au bout de 5 h, les bactéries sont recueillies par centrifugation à 2500 t./min. Les suspensions obtenues après 2 lavages successifs à l'eau bidistillée suivis de centrifugation renferment 8 à 10 mg de bactéries (poids sec) par millilitre.

Sur ces bactéries à l'état non proliférant on étudie l'action inhibitrice de la pression. La technique utilisée a été exposée dans un mémoire antérieur<sup>2</sup>. La suspension microbienne est introduite dans des sacs de caoutchouc «para pur» et soumise pendant 5 min à des pressions qui s'échelonnent entre 1600 et 3600 kg/cm<sup>2</sup>. La température à l'intérieur des presses est stabilisée à 37°C. Les montées en pression et les décompressions s'effectuent

<sup>1</sup> F. H. JOHNSON, H. EYRING, R. STEBLAY, H. CHAPLIN, C. HÜBER et G. GHERARDI, J. Gen. Phys. 28, 463 (1945). – F. H. JOHNSON et H. EYRING, Ann. N. Y. Acad. Sci. 49, 376 (1948).

<sup>2</sup> P. VIGNAIS, E. BARBU, M. MACHEBOEUF et J. BASSET, Bull. Soc. Chim. Biol. 34, 43 (1952).

lentement; leur durée est de l'ordre d'une minute par 1000 kg/cm<sup>2</sup>.

A leur sortie de presse on étudie le métabolisme oxydatif des bactéries vis-à-vis des différents substrats: sel de sodium des acides acétique, pyruvique, oxalacétique, succinique, fumarique et malique. Les solutions de ces différents sels sont préparés extemporanément. Pour chaque substrat la consommation d'oxygène est mesurée par la méthode manométrique de WARBURG, sa valeur est obtenue après déduction de la respiration endogène. Chaque fiole de l'appareil de WARBURG contient:

- dans la cupule: 1 ml de suspension microbienne, 0,1 ml de tampon phosphate M/15 de pH 7,2;
  - dans le diverticule latéral: éventuellement 0,2 ml de solution M/20 du substrat (soit 10 μM);
  - dans le godet central: 0,2 ml de lessive de potasse à 20 %.
- On ajuste à 2 ml avec de l'eau bidistillée.

Résultats expérimentaux

1° Pressions limites d'inhibition complète. Nous avons recherché les pressions qui déterminent chez les bactéries une inhibition presque totale de leur activité oxydative vis-à-vis des différents substrats énumérés plus haut.

Nous avons choisi comme norme une inhibition supérieure à 90% après un contact de 100 min à 37°C avec 10 μM de substrat. (Nous avons constaté qu'au delà de ce temps, l'oxydation n'évoluait pratiquement plus.)

Le tableau suivant montre que le seuil des pressions qui entraînent cette inactivation limite est bien différent pour chaque substrat.

Tableau I

Substrat	Pressions entraînant une inactivation supérieure à 90%
Acétate . . . . .	1900 kg/cm <sup>2</sup> (5 min)
Pyruvate . . . . .	2200 kg/cm <sup>2</sup> (5 min)
Oxalacétate . . . . .	2200 kg/cm <sup>2</sup> (5 min)
Malate ou fumarate. . . . .	2800 kg/cm <sup>2</sup> (5 min)
Succinate* . . . . .	3600 kg/cm <sup>2</sup> (5 min)

\* Dans le cas du succinate le seuil d'inhibition n'est pas net: pour 2500 kg/cm<sup>2</sup> l'inhibition est de 87%; elle ne dépasse 90% qu'à partir de 3600 kg/cm<sup>2</sup>.

Lorsque des bactéries sont soumises à des pressions inférieures aux pressions limites d'inhibition complète, elles conservent une activité oxydative partielle. Ainsi, une pression d'une certaine valeur peut entraîner pour un système enzymatique une inhibition totale ou sub-totale et pour d'autres une inhibition partielle; par exemple, des suspensions bactériennes qui ont été comprimées à 2200 kg/cm<sup>2</sup> n'oxydent plus l'acétate de sodium, ni le pyruvate, ni l'oxalacétate alors qu'elles métabolisent encore notablement le malate, le fumarate, le succinate.

Grâce à un procédé physique d'inhibition, il devient donc possible de bloquer à un stade quelconque les réactions d'une chaîne métabolique.

2° Pressions d'inhibition partielle. En étudiant pour chaque système enzymatique l'influence de pressions de valeurs différentes, on peut se faire une idée de l'évolution de l'inhibition en fonction de la pression. L'inhibition partielle porte:

- sur la vitesse d'oxydation du substrat;
- sur la quantité totale de substrat oxydé;

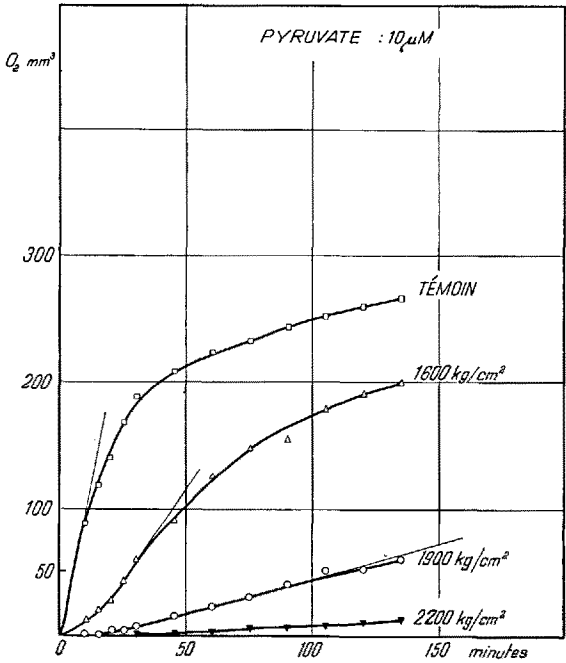
sur l'aptitude de l'enzyme à oxyder immédiatement le substrat.

a) Vitesse d'oxydation. Les vitesses d'oxydation se calculent facilement d'après la pente des courbes de consommation d'oxygène – la pente est mesurée dans la région de la courbe où la vitesse d'oxydation est maximum. Mais il arrive que chez les bactéries endommagées par la pression, l'activité résiduelle n'apparaisse qu'après un certain temps de contact avec le substrat; dans ce cas on tient compte de la partie de la courbe qui suit le temps de latence. Les figures 1 à 5 illustrent l'action plus ou moins inhibante des différentes pressions sur les vitesses d'oxydation enzymatique. Dans le tableau II nous avons noté les pourcentages d'inhibition:  $P_t - P_p / P_t \times 100$  où  $P_t$  et  $P_p$  représentent respectivement les pentes des courbes d'oxydation pour les bactéries témoins et pressées.

Tableau II

	1600 kg/cm <sup>2</sup>	1900 kg/cm <sup>2</sup>	2200 kg/cm <sup>2</sup>	2500 kg/cm <sup>2</sup>	3100 kg/cm <sup>2</sup>
	%	%	%	%	%
Acétate . . . . .	77	95	97		
Pyruvate . . . . .	73	93	98		
Oxalacétate . . . . .	36	84	96		
Fumarate . . . . .	30	58	73		
Succinate . . . . .		50		66	83

b) Quantité totale de substrat oxydé. Des bactéries qui ont été soumises à une certaine pression peuvent conserver la faculté d'oxyder la même quantité de substrat que le témoin (fumarate: témoin et 1600 kg/cm<sup>2</sup>). Mais souvent l'oxydation d'un substrat par des bactéries «pressées» tend vers une limite qui reste notablement inférieure à celle des témoins.

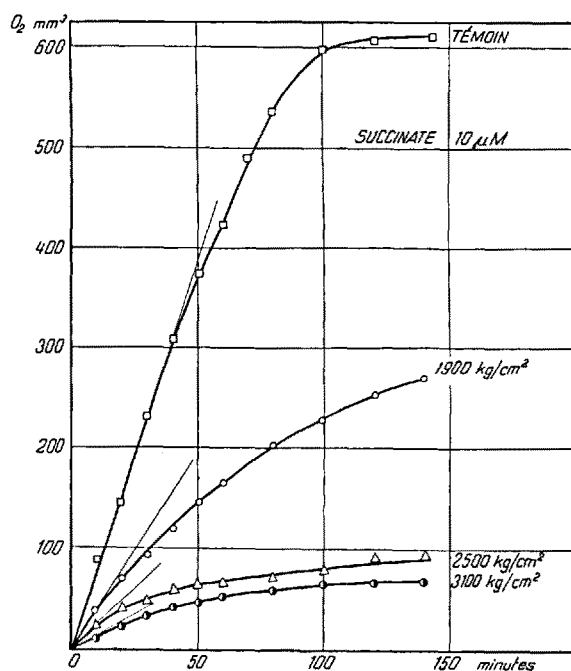
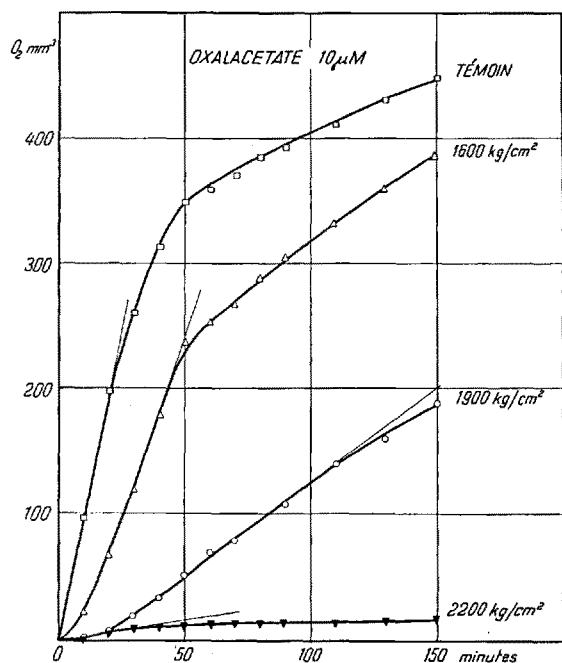


D'autre part, bien que les inhibitions portant sur les vitesses d'oxydation et sur les quantités de substrat oxydé augmentent avec la pression, il n'existe pas de corrélation très stricte entre ces 2 processus.

c) Aptitude de l'enzyme à oxyder immédiatement le substrat. Certains systèmes enzymatiques de bactéries «pressées» oxydent leur substrat dès que les bactéries sont

mises à son contact. D'autres présentent une inhibition totale pendant les premiers instants et ne métabolisent le substrat qu'après un temps de latence de plusieurs minutes. Ainsi, des bactéries comprimées à  $1900 \text{ kg/cm}^2$

substrat n'évoluant pas au delà d'une limite bien définie. On peut penser que pour les substrats étudiés (mono- et diacides) qui constituent une chaîne métabolique normale chez *E. coli*, l'inhibition totale portant sur l'oxy-



puis mises au contact du pyruvate n'oxydent ce dernier qu'après 15 min; le même phénomène a été mis en évidence dans le cas de l'oxalacétate et de l'acétate.

**Discussion.** 1° Les seuils de pression qui entraînent une inhibition complète rendent compte d'un effet global sur les systèmes enzymatiques d'*Escherichia coli*; dans le

dation d'un métabolite retentit sur l'oxydation des autres de façon partielle mais irréversible.

3° Plusieurs interprétations peuvent être données pour expliquer le temps de latence qui précède parfois la reprise d'activité enzymatique.

— La pression aurait une action dénaturante partiellement réversible sur la « structure secondaire » des protéines enzymatiques. La reprise d'activité correspondrait au réarrangement de cette structure et à la reconstitution des molécules sous leur forme native.

— Il est possible également que des bactéries possédant une quantité d'enzyme suffisante pour métaboliser un substrat peuvent néanmoins au contact de ce substrat synthétiser de nouvelles molécules d'enzyme. Cette « néogénèse » pourrait s'effectuer à partir de précurseurs présents dans la cellule bactérienne. Elle est normalement masquée par l'activité de l'enzyme constitutif, mais pourrait apparaître si ce dernier était inhibé.

— Enfin, il n'est pas impossible que la bactérie endommagée puisse utiliser après un certain temps d'adaptation une voie accessoire de métabolisme lorsque la voie normale se trouve coupée.

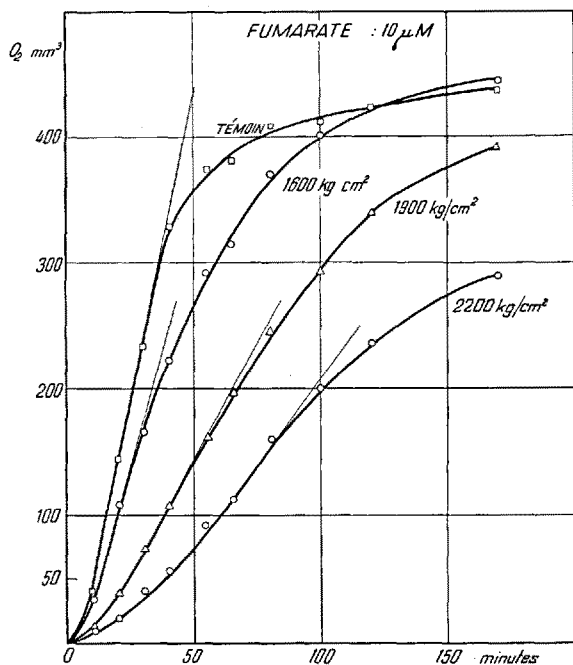
Nous tenons à remercier J. BASSET qui a mis ses presses à notre disposition et G. J. LEPESQUEUR qui effectua de nombreuses mises en pression.

PAULETTE VIGNAIS et P. VIGNAIS

Service de Chimie biologique, Institut Pasteur, Paris, le 30 novembre 1953.

#### Summary

It is possible to dissociate the activity of different enzymatic systems of the bacterium *Escherichia coli* by the action of high hydrostatic pressures. This activity is studied in the microbes after having been subjected to high hydrostatic pressure. Each enzymatic system is inhibited at different pressures. The enzymes of the bacteria submitted to pressures lower than the inhibiting limit show a residual enzymatic activity; sometimes this activity appears after a phase of lag.



cas où l'oxydation d'un substrat donné met en jeu simultanément plusieurs systèmes enzymatiques l'inhibition totale porte sur l'ensemble de ces systèmes.

2° Certaines pressions provoquent des inhibitions partielles mais cependant irréversibles, l'oxydation du