

50 376
1967
36

UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTÉ DES SCIENCES

50376
1967
36

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE
POUR L'OBTENTION
DU GRADE DE DOCTEUR D'ÉTAT ÈS SCIENCES

par
Jean-Claude DERIEUX

PREMIER MÉMOIRE

ETUDE CINÉTIQUE DE LA SYNTHÈSE DE
LA PHOSPHATASE ALCALINE PAR DES
FRACTIONS PARTICULÉES D'ESCHERICHIA COLI



Présenté le 25 NOV. 1967 devant la Commission d'examen

Président : M. M. DURCHON

Examineurs : MM. J. MONTREUIL, J. GUILLAUME
MM. Ch. GERNEZ-RIEUX, P. BOULANGER

UNIVERSITE DE LILLE

FACULTE DES SCIENCES

DOYENS HONORAIRES :

MM. PRUVOST, LEFEBVRE, PARREAU

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. ARNOULT, BEGHIN, CAU, CHAPELON, CHAUDRON, CORDONNIER,
DE HEUVELS, DEHORNE, DOLLE, FLEURY, GERMAIN,
KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG, MM. MAZET,
MICHEL, NORMANT, PARISELLE, PASCAL, PAUTHENIER, ROIG,
ROSEAU, ROUBINE, WIENANN, ZAMANSKY, KAMPE DE FERIET.

DOYEN :

Monsieur TILLIEU, Professeur de Physique

ASSESSEURS :

MM. DURCHON	Professeur de Zoologie
HEUBEL	Professeur de Chimie Minérale

PROFESSEURS :

MM. BACCHUS	Astronomie, Calcul Numérique
BECART	Physique
BERKER	Mécanique des Fluides
BLOCH	Psychophysiologie
BONNEMAN BEMIA	Chimie et Physico-Chimie Industrielle
BONTE	Géologie Appliquée
BOUGHON	Mathématiques
BOUISSET	Physiologie Animale
BOURIQUET	Botanique
CELET	Géologie
CORSIN	Paleobotanique

MM.	DECUYPER	Mathématiques
	DEDEKER	Professeur Associé de Mathématiques
	DEFRETIN	Biologie Marine
	DEHORS	Physique Industrielle
	DELATTRE	Géologie
	DELEAU	Géologie
	DELHAYE	Chimie Minérale
	DESCOMBES	Calcul Différentiel et Intégral
	FOURET	Physique
	GABILLARD	Radioélectricité et Electronique
	GLACET	Chimie
	GONTIER	Mécanique des Fluides
	HEIM DE BALZAC	Zoologie
	HOCQUETTE	Botanique Générale et Appliquée
	LEBEGUE	Botanique
Mme	LEBEGUE	Physique
MM.	LEBRUN	Radioélectricité et Electronique
Mlle	LENOBLE	Physique
MM.	LIEBAERT	Radioélectricité
	LINDER	Botanique
	LUCQUIN	Chimie Minérale
	MARION	Chimie
Mlle	MARQUET	Mathématiques
MM.	MARTINOT-LAGARDE	Mécanique des Fluides
	MENESSIER	Géologie
	MONTARIOL	Chimie Minérale Appliquées
	MONTREUIL	Chimie Biologique
	NORIAMEZ	Physique
	PARREAU	Mathématiques
	PEREZ	Physique Expérimentale
	PHAM MAU QUAN	Mécanique Rationnelle et Expérimentale
	POUZET	Calcul Numérique
	PROUVOST	Géologie
	SAVARD	Chimie Générale
	SCHALLER	Zoologie
	SCHILTZ	Physique
Mme	SCHWARTZ	Analyse Supérieure
MM.	TRIDOT	Chimie
	VIVIER	Biologie Animale
	WATERLOT	Géologie et Minéralogie
	WERTHEIMER	Physique

MAITRES DE CONFERENCES :

MM. ATTEIA	Mathématiques
BEAUFILS	Chimie Générale
BELLET	Physique
BLANCHARD	Chimie Organique
BOILLET	Physique
BUI TRONG LIEU	Mathématiques
CHASTRETTE	Chimie Générale Amiens
CHERRUAULT	Mathématiques
COMBET	Mathématiques
CONSTANT	Radioélectricité et Electronique
DERCOURT	Géologie et Minéralogie
DEVRAINNE	Chimie Minérale
Mme DRAN	Chimie Appliquée
MM. GOUDMAND	Chimie Physique
GUILLAUME	Botanique
HENRY	Physique Amiens
HERZ	Calcul Numérique
HUARD DE LA MARRE	Calcul Numérique
JOLY	Zoologie Amiens
LACOSTE	Botanique
LAMBERT	Physique Saint-Quentin
MAES	Physique
METTAL	Zoologie Amiens
MOUVIER	Chimie Saint-Quentin
NGUYEN PHONG CHAU	Mathématiques Saint-Quentin
PANET	Electromécanique
PARSY	Mathématiques Amiens
RAUZY	Mathématiques
SAADA	Physique
SEGARD	Chimie Biologique
TUDO	Chimie Amiens
VAILLANT	Mathématiques
VAZART	Botanique Amiens
VIDAL	Physique Industrielle

SECRETAIRE GENERAL, ATTACHE PRINCIPAL :

Monsieur LEGROS

Nous exprimons notre vive gratitude et notre profond respect à Monsieur le Professeur GERNEZ-RIEUX, Directeur de l'Institut Pasteur de Lille, qui depuis neuf ans nous a ouvert les portes de ses Laboratoires et nous a guidé dans notre carrière scientifique. Nous lui devons d'avoir été affecté au Laboratoire du Professeur GUILLAUME qui n'a cessé de nous prodiguer ses conseils éclairés tout en nous initiant à la recherche fondamentale et en nous communiquant son ardent désir de poursuivre dans cette voie.

Notre gratitude va également à Monsieur le Professeur DURCHON qui nous fait l'honneur d'accepter la Présidence de cette thèse, ainsi qu'à Messieurs les Professeurs BOULANGER et MONTREUIL pour les encouragements et les conseils judicieux que nous avons toujours trouvé auprès d'eux.

Nous sommes reconnaissant au Docteur NISMAN de nous avoir accueilli durant un an au sein de son équipe de

recherche dans son Laboratoire de Gif-sur-Yvette.

Nous remercions chaleureusement Messieurs MARTIN, HAN, DESCHAMPS et PETITPREZ ainsi que toute l'équipe du Laboratoire pour la collaboration amicale qu'ils nous ont apportée dans la réalisation de cette thèse.

Enfin, nous remercions vivement le Centre National de la Recherche Scientifique qui nous a donné les moyens matériels de mener à bien ce travail dans le cadre du Laboratoire associé 36.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
<u>I -La synthèse protéique</u>	3
A.La transcription du DNA en RNA messenger	3
B.La formation de la chaîne peptidique	5
1.Activation et transfert des acides aminés	5
2.Traduction du RNA messenger en protéine	7
C.La régulation de la synthèse des enzymes	10
<u>II-Les systèmes de synthèse in vitro</u>	12
A.Le système de synthèse in vitro de l'hémoglobine	14
B.Le système de Nirenberg	15
C.Le système de Novelli	16
D.Le système de Nisman	18
CHAPITRE I	
METHODES ET TECHNIQUES	20
1.Souches bactériennes	21
2.Milieux de culture	21
3.Milieu utilisé pour la numération des cellules viables	22
4.Obtention du mutant E.coli Arg ⁻ 4	23
5.Obtention des sphéroplastes et préparation de la fraction P1	25
6.Les contrôles réalisés au cours de la préparation du P1	27
a/Vérification de la persistance de l'exigence en arginine de la souche E. coli K10 Arg ⁻ 4	27
b/Les mesures de la densité optique au cours de la lyse	29

c/Les numérations	30
d/Contrôle optique	31
e/Contrôle en microscopie électronique	32
7.Conditions d'incubation nécessaires à la synthèse de la phosphatase alcaline	33
a/Composition du mélange de base	34
b/Mélange d'incubation	35
8.Dosage de la phosphatase alcaline	36
9.Incorporation des acides aminés marqués dans les protéines	38
10.Dosage des protéines	40
11.Dosage des acides nucléiques	40
12.Produits utilisés	41

CHAPITRE II

ETUDE DESCRIPTIVE DES PHASES DE LA SYNTHÈSE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE PAR LA FRACTION P1 D'E. COLI	43
--	----

<u>I -Apparition de l'activité phosphatasique en fonction du temps d'incubation</u>	44
---	----

A.La phase de latence	46
B.Phase de synthèse à taux constant	48
C.Rapport entre la phase de latence et le taux de synthèse	54

<u>II-Discussion</u>	57
----------------------	----

A.Taux de synthèse	57
B.Phase de latence	58
1.L'enzyme ne pourrait être mise en évidence durant la phase de latence	58
2.La phase de latence serait due à la persistance de sphéroplastés dans les préparations P1	60
3.La phase de latence serait due à une réorganisation des sites de synthèse	63

CHAPITRE III

ROLE DES SPHEROPLASTES DANS LA SYNTHÈSE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE PAR LA FRACTION P1

65

I -Etude des sphéroplastés résiduels dans les préparations P1

66

A.Sphéroplastés dénombrés optiquement

68

1.Etude quantitative de l'activité de synthèse en fonction du nombre de cellules totales

70

2.Etat des sphéroplastés dénombrés optiquement

74

B.Sphéroplastés restés viables dans le P1

75

1.Evolution du nombre de cellules viables au cours de la préparation du P1

77

2.Comparaison aux différentes étapes de la préparation P1 entre le nombre de germes viables et le nombre de cellules numérées en cellule de Thoma

84

3.Relation entre l'activité de synthèse et le nombre de germes viables dans le P1

87

II-Dissociation de l'activité de synthèse des sphéroplastés de celle des particules subcellulaires

94

A.Essais préliminaires

95

1.Procédés physiques de séparation

95

a/Filtration sur membranes millipore

95

b/Centrifugation en gradient de saccharose

95

2.Procédés de destruction

98

a/Procédés physiques

98

b/Procédés chimiques

100

c/Vieillissement

101

B.Démonstration de la synthèse de la phosphatase alcaline par les particules subcellulaires

106

1.Etude expérimentale de la lyse des sphéroplastés

106

2.Elimination des sphéroplastés par préincubation

108

3.Discussion

112

CHAPITRE IV

ETUDE DES FACTEURS POUVANT MODIFIER LA PHASE DE LATENCE

122

I -Spécificité de la phase de latence pour la synthèse de la phosphatase alcaline par la fraction P1 de la souche K10 Arg⁻4

123

A.La phase de latence serait spécifique de
la souche

125

B.La phase de latence serait spécifique de
la synthèse d'une grosse molécule active

125

C.La phase de latence serait spécifique de
la préparation P1 elle-même

132

D.Discussion

134

1.Une première phase de latence non
spécifique

135

2.Une deuxième phase de latence spécifique
de la phosphatase alcaline

135

3.Conclusion

142

II-Essais de modifications de la phase de latence

142

A.Modification des techniques d'incubation

143

1.Modification des conditions physiques

143

a/La température

143

b/L'agitation

144

2.Modification de la concentration en
acides aminés

144

3.Modification de la concentration du
glucose

146

4.Discussion

146

B.Procédés physiques employés pour altérer la
structure de la préparation P1

149

1.Homogénéisation violente à l'aide d'une
pipette

149

2.La sonnation

149

3.Le froid

151

4.Discussion

151

C.Procédés de préincubation destinés à modifier la structure de la préparation P1	153
1.Omission de valine, leucine et isoleucine	153
2.Omission d'arginine ou de la totalité des acides aminés	156
3.Discussion	161
<u>III-Action d'inhibiteurs spécifiques de la synthèse protéique</u>	164
A.Action de la ribonucléase et de la désoxyribonucléase	164
B.Action de la puromycine et du chloramphénicol	172
C.Action de l'actinomycine D	176
D.Discussion	180
1.La phase de latence non spécifique	180
2.La phase de latence spécifique de la phosphatase alcaline	187
DISCUSSION ET CONCLUSIONS GENERALES	194
PLANCHE 1	200
PLANCHE 2	202
PLANCHE 3	203
PLANCHE 4	204
BIBLIOGRAPHIE	205

ABREVIATIONS UTILISEES

ATP	adénosine-5'-triphosphate
CAL	chloramphénicol
CTP	cytidine-5'-triphosphate
Δ	différence entre deux mesures
DEAE cellulose	diéthylaminoéthylcellulose
DNA	acide désoxyribonucléique
DNase	désoxyribonucléase
DO 610	absorption à 610 m μ
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
f	fréquence
β -gal	β -galactosidase
GTP	guanosine-5'-triphosphate
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
ONPG	o-Nitrophényl- β -D-galactopyranoside
PA	phosphatase alcaline
PNPP	p-Nitrophényl-phosphate
RNA	acide ribonucléique
mRNA	acide ribonucléique messenger
sRNA	acide ribonucléique soluble
tRNA	acide ribonucléique de transfert
RNase	ribonucléase
TCA	acide trichloracétique
UFA	unités de phosphatase alcaline
UTP	uridine-5'-triphosphate
VLI	mélange de valine, leucine et isoleucine

ETUDE CINETIQUE DE LA SYNTHÈSE
DE LA PHOSPHATASE ALCALINE PAR DES
FRACTIONS PARTICULEES D'ESCHERICHIA COLI

La synthèse d'une molécule protéique est la conséquence d'une chaîne de réactions complexes placée sous la dépendance de nombreux facteurs. Bien que plusieurs, considérés comme des initiateurs ou des accélérateurs, aient été récemment découverts, il n'en demeure pas moins que l'existence d'un grand nombre d'entre eux est encore inconnue ou à peine soupçonnée. C'est une des raisons pour lesquelles il n'a jamais été possible, jusqu'à présent, de réaliser la synthèse totale in vitro d'une molécule protéique déterminée et contrôlée par un DNA avec un mélange de ribosomes et d'enzymes solubles. Par contre, des synthèses partielles, comme l'obtention de RNA messagers transcrits du DNA ou de peptides synthétisés sous le contrôle du RNA messenger, sont possibles avec des systèmes acellulaires. Les recherches concernant ces systèmes ont donné un essor définitif à la biologie moléculaire en élucidant le code génétique et en permettant de démontrer le mécanisme de la synthèse peptidique.

Cependant, seuls des systèmes de synthèse complexes, aussi proches que possible de la cellule vivante, peuvent à notre sens effectuer toutes les réactions aboutissant à l'élaboration d'une protéine à partir du message héréditaire.

Dans ce travail, nous nous sommes attaché à l'étude d'un système membranaire acellulaire, obtenu par dégra-

dition très ménagée des sphéroplastes d'E. coli. Nous avons été amené devant la complexité d'un tel système, à tenter de préciser son fonctionnement en nous efforçant de déterminer la cinétique et les conditions nécessaires à la synthèse de la phosphatase alcaline.

Dans notre introduction, nous allons résumer succinctement les mécanismes fondamentaux qui règlent la synthèse protéique. De nombreuses revues générales existant sur ce sujet, nous insisterons seulement sur certains points intéressants pour notre travail personnel, puis nous décrirons les différents systèmes acellulaires qui ont été utilisés pour son étude, selon le plan suivant :

I - La synthèse protéique

A . La transcription du DNA en RNA messenger

B . La formation de la chaîne peptidique

1 / Activation et transfert des acides aminés

2 / Traduction du RNA messenger en protéines

C . La régulation de la synthèse des enzymes

II - Les systèmes de synthèse in vitro

I . LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE

A . LA TRANSCRIPTION DU DNA EN RNA MESSAGER

Depuis les travaux de Beadle et Tatum (14) en 1941, il est admis que la séquence primaire de chaque protéine est inscrite dans le gène correspondant. Avery et coll. (9) démontraient, en 1944, que cette hérédité était portée par l'acide désoxyribonucléique. Les séquences nucléotidiques du DNA sont transcrites en séquences homologues dans les acides ribonucléiques appelés messagers par Jacob et Monod (98).

La participation des RNA dans la synthèse protéique avait été mise en évidence par Caspersson (26) et Brachet (20, 21) et on a longtemps pensé que le RNA ribosomal, abondant et stable, était porteur de l'information traduite directement en protéines par le ribosome lui-même. Cependant, Hershey (85) détecte la synthèse d'un RNA à marquage rapide et de faible poids moléculaire lors de l'infection d'E. coli par le phage T2, puis Volkin et Astrachan (210) démontrent que cet RNA est spécifique du phage. Plus récemment, Nirenberg et Matthaei (149) par leurs expériences de synthèse *in vitro*, prouvent que le ribosome lors de la synthèse protéique est un support non spécifique de la molécule synthétisée. Entre temps, l'existence d'un RNA, impliqué dans la synthèse des protéines et dont la séquence

des bases transcrit celle du DNA, a été démontrée par de nombreux auteurs chez les bactéries (22,67,81,118,166,198,227,228) ou les cellules animales (13,194). Weiss (217,218), Stevens (204) et Hurwitz (93,94) ont montré que la synthèse du RNA messenger (mRNA) n'avait lieu qu'en présence de la RNA polymérase. Cette enzyme que l'on rencontre aussi bien dans les bactéries que dans les cellules végétales ou animales, reproduit les séquences des bases du DNA, à partir des 4 nucléosides triphosphates, et ne peut fonctionner qu'en présence d'ions magnésium.

Les conditions de transcription du DNA par la RNA polymérase sont différentes selon les conditions expérimentales.

In vitro diverses formes de DNA peuvent servir de modèle : à partir d'un DNA monocaténaire, l'enzyme conduit à un hybride DNA-RNA (28,214). Sous sa forme naturelle, les deux chaînes de DNA sont copiées indifféremment (27,95,96,199,219).

In vivo par contre, et parfois in vitro, la RNA polymérase ne reproduit qu'une seule chaîne de DNA (66,83,122, 130,207) ; il semble en effet, que certains motifs de la chaîne de DNA seraient nécessaires pour que l'enzyme puisse s'y fixer (124). Cependant, d'après Bresler et coll. (23) les deux chaînes seraient susceptibles d'être transcrites en mRNA. Comme le suggèrent les expériences de Contesse et coll. (36) la formation

du RNA messenger parait liée et même dépendante de la synthèse protéique concomitante. Enfin, la présence de ribosomes (193) et de celle d'un facteur de translation favorisent la transcription selon les travaux du groupe de Gros (175,176).

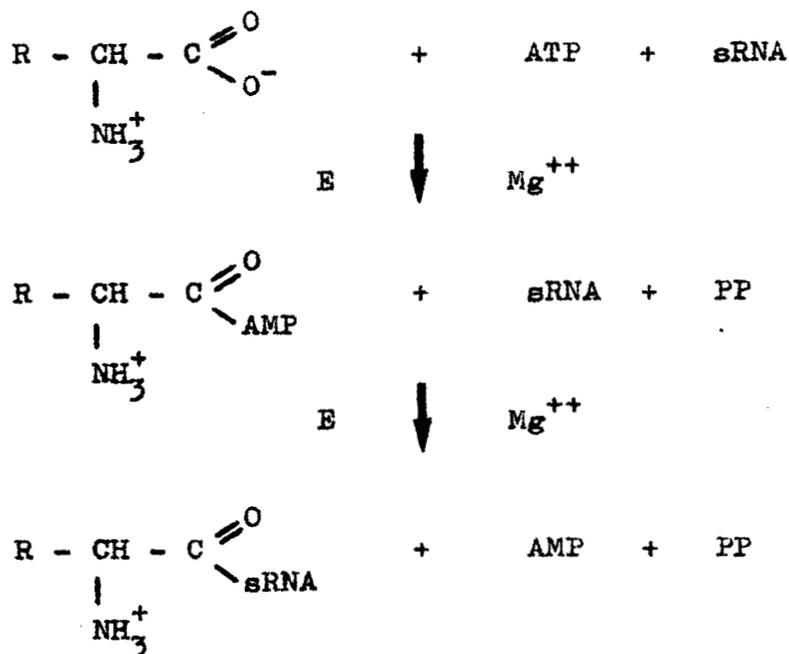
B . LA FORMATION DE LA CHAÎNE PEPTIDIQUE

1 . Activation et transfert des acides aminés

Il ressort des travaux de Lipmann (117), Hoagland (86,87) Berg (15) et Novelli (161) que l'activation et le transfert des acides aminés s'effectuent en deux étapes :

- dans la première une enzyme d'activation, encore appelée aminoacyl RNA synthétase par Berg (16), greffe une molécule d'ATP sur un amino-acide. Puis par pyrophosphorolyse, en présence de Mg^{2+} , il se forme du phosphate inorganique et un adénylate d'aminoacyl.
- au début de la deuxième étape, le groupement aminoacyl est transféré à une molécule de RNA soluble, ou RNA de transfert (tRNA) avec libération de l'enzyme et d'acide adénylique.

Nous avons reproduit sur le schéma suivant, et d'après Neidhart (146) la réaction d'activation et de transfert des acides aminés.



On a longtemps considéré qu'un seul type d'aminocyl RNA synthétase existait pour un acide aminé. Mais les travaux de Yu (225) suggèrent qu'il existe plusieurs synthétases pour la leucine chez *E. coli* ; ceux de Barnett (11) confirment ces faits pour la phénylalanine et l'acide aspartique chez *Neurospora*.

La réaction qui contrôle le transfert des acides aminés fait donc intervenir un RNA particulier appelé RNA de transfert (tRNA). Contrairement au mRNA, la molécule du RNA de transfert est stable. La configuration de sa chaîne polynucléotidique qui pourrait être "en épingle à cheveux", mettrait en évidence la zone fonctionnelle à l'arrondi de l'épingle.

Des travaux récents ont permis de déterminer la structure et l'enchaînement des nucléotides pour certains tRNA, et de montrer la présence d'un triplet caractéristique (anticodon) de l'acide aminé transporté au milieu de la molécule (25,29,90,123).

2 . Traduction du RNA messager en protéine

Le terme de ribosome désigne les particules que l'on trouve fixées au réticulum cytoplasmique. Roberts et coll. (181) étudient leur structure ; ils sont composés de protéines et d'un RNA ribosomal très stable. Yankofsky et Spiegelman (223) démontrent l'origine génique du RNA ribosomal. Au point de vue fonctionnel, les ribosomes sont considérés comme les particules élémentaires au niveau desquelles s'effectue la synthèse protéique (119,192,199,206).

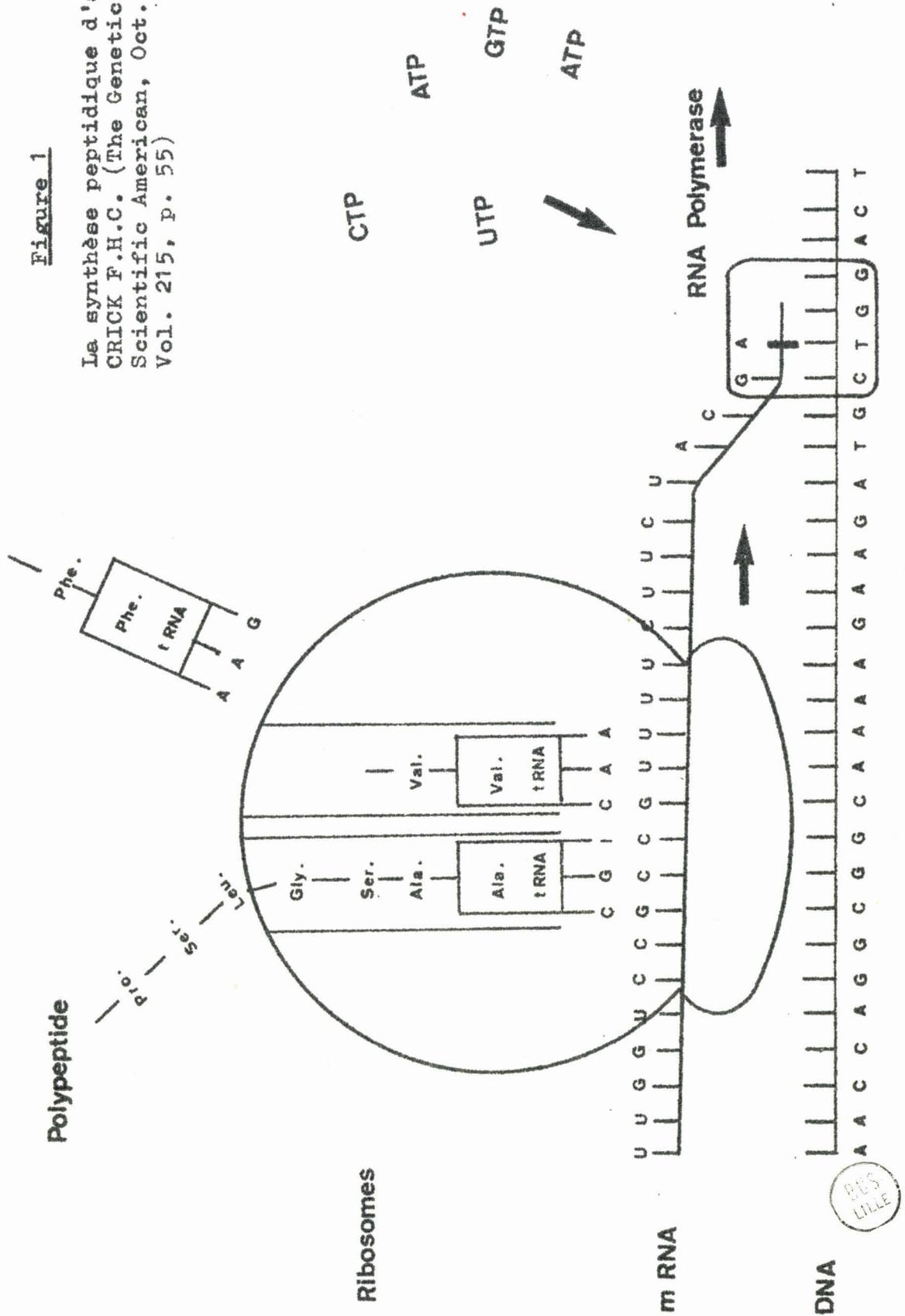
Transportés sur les lieux de synthèse, les acides aminés, portés par leur tRNA spécifique, reconnaîtraient leur position respective grâce à l'anticodon de ce dernier (37,89,100,101,201), anticodon complémentaire des triplets du mRNA constituant le code génétique. Après les travaux des groupes de Nirenberg (147,148,149) d'Ochoa (113) de Khorana (196), le code génétique est maintenant bien déterminé. Wettstein et Noll (220) ont décrit les sites actifs du ribosome. La synthèse protéique débute par l'incorporation de la N-formyl

méthionine formant l'extrémité N-terminale de la molécule (1, 216), quoique récemment, cette propriété ait été attribuée à l'alanine chez *B. subtilis* (91). Le début de la synthèse exige un tRNA particulier à la méthionine formylée et la présence d'un facteur d'initiation, l'extrémité N-terminale paraît ensuite éliminée par l'action d'une enzyme protéolytique (62,159, 205). A partir du point d'initiation, unique pour un opéron et proche de l'opérateur selon Martin (131), on peut penser que le ribosome glisse le long du mRNA en lui restant attaché par l'aminocyl-tRNA engagé à cet instant dans le ribosome (63, 64,160,212). La synthèse de la protéine se fait donc dans le même sens que celui de l'allongement de la chaîne du mRNA (106, 112, 202), elle débute à l'extrémité N-terminale, chaque acide aminé étant incorporé en liant son groupe aminé au groupe carboxyl de l'acide aminé incorporé avant lui. Le schéma de la figure 1 résume la synthèse d'une chaîne peptidique.

Plusieurs ribosomes sont attachés sur le même brin de RNA, comme l'ont montré Rich et Warner (178,179,211). Ces structures qu'ils appellent polysomes furent confirmées ; on les rencontre dans les réticulocytes (82,195,212,213) le foie de rat (129) les cellules HeLa (168) et chez *E. coli* (64,107). Les polysomes peuvent être obtenus *in vitro* par addition d'un polynucléotide aux ribosomes (12,200). *In vivo*, il existe une bonne corrélation entre le nombre de polysomes et le taux de

Figure 1

La synthèse peptidique d'après
CRICK F.H.C. (The Genetic Code.
Scientific American, Oct. 1966,
Vol. 215, p. 55)



BUS
LILLE

synthèse protéique (82,168), bien que ce fait ne soit pas toujours vérifié in vitro (111,128,177).

Cependant, malgré la présence du matériel génétique correspondant, les molécules enzymatiques ne sont pas synthétisées au même taux.

C . LA REGULATION DE LA SYNTHÈSE DES ENZYMES

La vitesse de synthèse d'une protéine déterminée n'est pas constante ; la synthèse est donc régulée par un mécanisme qui réagit en fonction de l'environnement de la cellule et de son état physiologique.

Un substrat qui, par addition, augmente le taux de synthèse d'une enzyme est appelé inducteur, inversement, un métabolite qui diminue la formation d'une protéine, est appelé répresseur. En 1946, Monod et Audureau montrèrent que l'induction enzymatique, alors appelée adaptation enzymatique, était sous contrôle génétique. Depuis, l'induction a été particulièrement étudiée sur le système β -galactosidase d'E. coli par Cohn, Monod, Jacob et Cohen-Bazire (33,35,97,136,138).

Elle correspond à la synthèse d'une protéine enzymatique nouvelle (34,88,98,173,183). Des gènes particuliers

règlent les phénomènes d'induction, ce sont les gènes régulateurs, ils sont distincts des gènes de structure qui sont placés sous leur contrôle (98) ; cela est prouvé par l'existence de mutants, sur le gène de structure, qui synthétisent une protéine dépourvue de propriétés enzymatiques ; les substances qui induisent la formation de l'enzyme chez le type sauvage, induisent de même la synthèse de la protéine modifiée chez le mutant (169). L'induction concerne souvent plusieurs enzymes dont les synthèses sont réglées d'une manière coordonnée à partir d'un groupe de gènes de structure contrôlé par un opérateur, le tout constituant un opéron. Le gène régulateur agissant au niveau de l'opérateur, par l'intermédiaire d'un répresseur qu'il faut distinguer du métabolite répresseur, contrôle la synthèse enzymatique en bloquant ou en ralentissant la transcription des gènes de structure en mRNA.

En présence d'un inducteur, le répresseur devient inactif et la synthèse a lieu. Cette relation directe entre l'induction enzymatique et la synthèse d'un mRNA a été démontrée lors de l'induction enzymatique de la β -galactosidase par différents auteurs (7, 8, 84).

La répression enzymatique, qu'il faut différencier de la rétro-inhibition, a été mise en évidence par Monod et Cohen-Bazire (137) dans le système tryptophane d'E. coli. Elle obéit à un mécanisme essentiellement semblable à celui de l'in-

duction enzymatique mais dans ce système, le répresseur, inactif par lui-même, ne réprime la synthèse qu'en présence du métabolite répresseur. Dans le cas présent, la synthèse de la tryptophane synthétase, est inhibée par le tryptophane. De même, la synthèse de la phosphatase alcaline est inhibée, en présence d'orthophosphate, chez *E. coli* (58,92,209). Nous avons reproduit sur la figure 2 un schéma du mécanisme général de l'induction et de la répression selon Jacob et Monod (98).

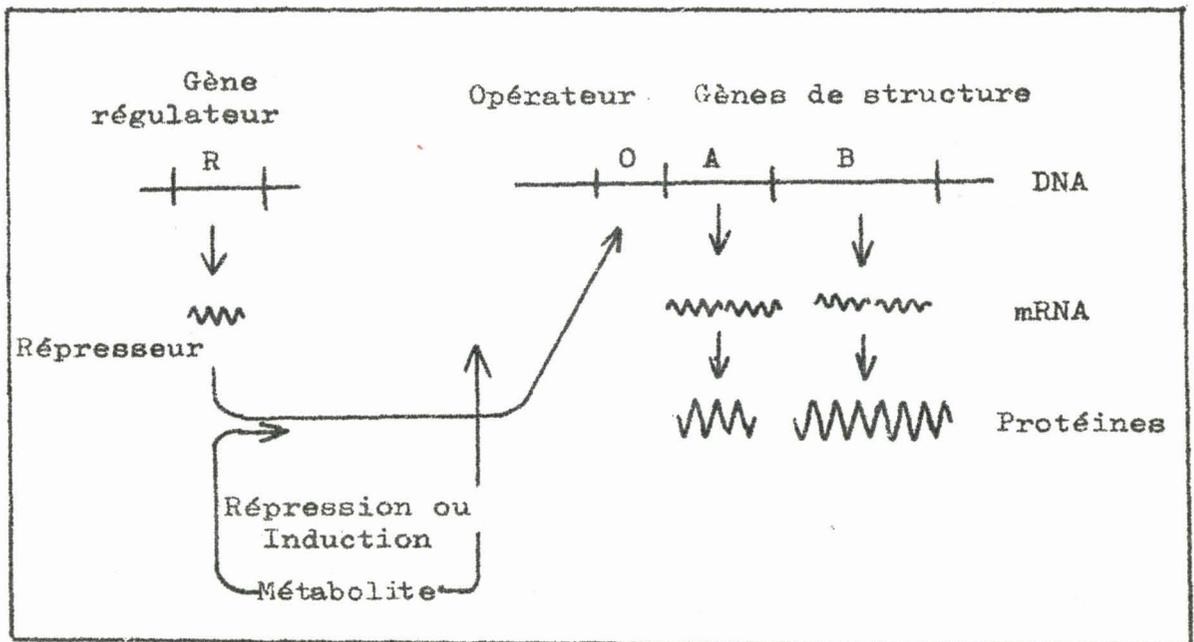
Une fois l'hypothèse du répresseur admise, les auteurs ont tenté d'en déterminer la nature. Jusqu'ici hypothétique (99), la nature protéique du répresseur a été confirmée par Gilbert (65) et tout récemment Rikenberg (180) a démontré que sa synthèse pouvait être indépendante de celle d'un RNA messenger.

II . LES SYSTEMES DE SYNTHÈSE IN VITRO

Les différents systèmes de synthèse in vitro actuellement connus ne réalisent pas toutes les étapes de la synthèse protéique allant de la transcription du DNA à la libération dans le milieu de la protéine. Cependant, l'étude des diverses synthèses partielles réalisées in vitro à partir des systèmes que nous allons décrire, a permis de dé-

Figure 2

Mécanisme de la régulation de la synthèse des protéines selon Jacob et Monod (98).



terminer la chaîne complète des réactions conduisant à la synthèse protéique.

L'activité des premiers systèmes de synthèse protéique in vitro, a été mise en évidence par l'incorporation des acides aminés marqués dans les protéines totales. Ces résultats ont été obtenus par Zamecnik et Keller (229) avec des homogénats de foie de rat, par Littlefield (119) avec ceux de tumeur ascitique et par Tissières, Schlessinger et Gros (206) avec des lysats d'E. coli.

A . LE SYSTEME DE SYNTHÈSE IN VITRO DE L'HEMOGLOBINE

La première synthèse d'une protéine définie, a été réalisée avec ce système. En 1956, Kruh et Borsook (108) montrent que l'hémoglobine représente 85 p. 100 des protéines totales synthétisées in vitro par des réticulocytes de lapin. Rabinovitz et Olson (174) démontrent qu'un système contenant des microsomes de réticulocytes, incorpore du fer dans l'hémoglobine. Schweet et coll. (192) réalisent la synthèse de l'hémoglobine à partir d'un système acellulaire préparé dans les conditions suivantes : les réticulocytes de lapin sont lysés à l'aide d'une solution hypotonique contenant du magnésium. Les microsomes proviennent du culot de centrifugation obtenu à 105.000 g, alors que le surnageant précipité à pH 5 fournira "l'enzyme pH 5".

Ces deux fractions sont les composants de base du milieu réactionnel. Elles peuvent avoir une origine différente : on obtiendra par exemple la globine du lapin, en ajoutant à des ribosomes de réticulocytes de cobaye, la fraction enzyme pH5 du lapin (186). Ce système réagit à une addition d'acide ribonucléique par une activation de la synthèse de l'hémoglobine (109, 110). Dintzis et Knopf (45, 46) ont étudié l'enchaînement des peptides de l'hémoglobine avec un système analogue. Dans ces conditions, le taux de synthèse du système atteint environ 1 p. 100 de celui de la cellule vivante ; le marquage de la chaîne au voisinage de l'acide aminé N-terminal étant presque nul, il semble que la synthèse de novo soit très faible, et que la molécule d'hémoglobine synthétisée provienne de l'achèvement de chaînes préexistantes.

B . LE SYSTEME DE NIRENBERG

En 1961, Matthaei et Nirenberg (134) mettent au point un système de synthèse in vitro à partir d'extraits d'*Escherichia coli*. Les cellules sont broyées en présence d'alumine dans un tampon Tris, contenant du magnésium. Après trois centrifugations à 30.000 g, le dernier surnageant est centrifugé à 105.000 g ; le sédiment obtenu correspond aux ribosomes. La synthèse protéique réalisée par les ribosomes à partir d'acides

aminés marqués, et en présence de RNA solubles (sRNA), est dépendante de l'addition de RNA extraits des ribosomes eux-mêmes.

C'est avec ce système que Matthaei et Nirenberg (132,133,149) ont commencé le déchiffrement du code.

- Plusieurs auteurs ont étudié la synthèse des protéines de l'enveloppe du bactériophage (47,145,163,184), par addition de RNA phagique à un système de ce type, alors que Mueller (142) dans le même ordre d'idée, a utilisé un système obtenu à partir d'homogénats d'embryon de poulet.

- Bonner et coll. (18) ont obtenu la synthèse d'une protéine végétale, la globuline de la semence du pois, à partir d'un tel système.

C . LE SYSTEME DE NOVELLI

La synthèse in vitro de la β -galactosidase à partir d'un système acellulaire, a été décrite par Kameyama et Novelli (50,102,103,162). Ce système se prépare par la destruction à la "French press" des cellules d'E. coli préalablement induites. Après élimination des bactéries intactes, le surnageant centrifugé 30 min à 105.000 g, conduit au culot P30. Une nouvelle centrifugation de 90 min permet de recueillir le surnageant S90. La synthèse de l'enzyme, qui requiert de nombreux facteurs, ne peut se faire que si les fractions P30 et S90 proviennent de

bactéries induites pour la β -galactosidase. Il semble que ce système contiendrait le mRNA nécessaire à la synthèse enzymatique ou qu'il achèverait, la durée de la synthèse étant assez courte, les chaînes commencées par les bactéries.

A partir de techniques similaires, divers auteurs ont réalisé la synthèse in vitro de protéines spécifiques :

- Yura et coll. (226) ont réalisé la synthèse in vitro de la tryptophane synthétase.

- Whiteley et Oishi (221) ont effectué in vitro la synthèse de la phosphatase alcaline, puis Oishi et coll. (164) celle de l' α amylase provenant de *Bacillus subtilis*.

- Kato et coll. (105) ont obtenu in vitro la synthèse de la toxine diphtérique avec un système acellulaire ayant pour origine des cellules de *Corynebacterium diphteriae* cultivées dans un milieu pauvre en fer (165).

Les diverses méthodes employées jusqu'ici pour l'obtention de systèmes de synthèse in vitro ont l'inconvénient de détruire l'architecture cellulaire. Aussi les systèmes obtenus sont-ils très pauvres en fragments organisés qui sont vraisemblablement le support des synthèses spécifiques. Par contre la préparation décrite par Nisman et coll. (17,154), en fragmentant la cellule d'une manière très ménagée, a le mérite de

conduire à un système doué d'une forte activité de synthèse pour des protéines enzymatiques.

D . LE SYSTEME DE NISMAN

A l'origine Nisman fonde son système sur la transformation, en présence de pénicilline, des bactéries en sphéroplastés, et de leur lyse en milieu aqueux (150, 151).

En 1958, il remplace l'eau par une substance tensio-active peu drastique, la digitonine (155). Le lysat obtenu, centrifugé à 25.000 g, conduit à un sédiment qui, après lavages et homogénéisations, donnera la fraction P1 essentiellement constituée de membranes cytoplasmiques. Cohen et Nisman (31), en étudiant cette fraction par analyse en gradient de densité, ont montré qu'elle correspondait à une association DNA-RNA-protéine. Incubée, la fraction P1 effectue la synthèse de la phosphatase alcaline (17) et de la β -galactosidase (153,156). Cette dernière s'effectue en présence d'un inducteur si la fraction P1 provient d'une souche inductible, mais non induite, et en absence d'inducteur si la fraction P1 provient d'une souche constitutive.

Depuis lors, des systèmes assez proches de celui de Nisman ont été utilisés par divers auteurs. Moore et coll. (139) le préparent à partir de sphéroplastés lysozyme de *Streptococcus faecalis*, en remplaçant la lyse par trois passages successifs à

travers une seringue, le reste de la préparation étant basé sur le même principe. Nagata et coll. (143) emploient également le lysozyme pour obtenir des sphéroplastés d'E. coli qu'ils soumettent ensuite à un choc osmotique. Ils obtiennent ainsi un système formé de membranes cytoplasmiques auxquelles sont fixés des ribosomes.

Pour notre travail, nous avons utilisé le système de Nisman ; en effet, la méthode de préparation permet d'obtenir des quantités importantes de matériel biologique très actif.

CHAPITRE I

METHODES ET TECHNIQUES

La méthode de base utilisée pour la préparation de la fraction P1 est celle de Nisman (157). Nous l'avons appliquée à l'étude de la phosphatase alcaline selon les techniques décrites par Bishop (17) et Guillaume (71).

Cependant, nous avons précisé un certain nombre de points de technique, et étudié systématiquement des contrôles réalisables de la préparation : il s'agit particulièrement de la mise au point de la numération des sphéroplastés en milieu solide, de l'évaluation des contaminations exogènes et de l'examen critique des préparations en microscopie électronique. Par ailleurs, nos manipulations sont réalisées dans des conditions aseptiques maximales.

Dans ce chapitre, nous décrivons les techniques et les méthodes utilisées constamment dans ce travail, c'est-à-dire

la préparation des fractions P1, leur contrôle et les conditions d'incubation pour les synthèses.

Les techniques particulières à une expérimentation seront exposées en même temps que les résultats.

1 . Souches bactériennes

Nous avons utilisé la souche E. coli K10 dérivée de la souche K12 et principalement un mutant de cette souche exigeant en arginine E. coli K10 Arg⁻4 (P⁺R₁⁺R₂⁺). Les bactéries sont entretenues sur gélose nutritive.

2 . Milieux de culture

Les milieux de culture suivants ont été employés :

- Milieu MSB1 (70)
- Milieu BPG (78)
- Milieu SP2 (17)
- Milieu 63 (32)

Les milieux liquides sont ensemencés avec 1/100 de leur volume

d'une suspension bactérienne dans l'eau physiologique, contenant 1.10^8 germes par millilitre, provenant d'une culture fraîche de 18 heures sur gélose nutritive.

3 . Milieu utilisé pour la numération des cellules viables

Les cellules devant être dénombrées sont, soit des bactéries, soit surtout des sphéroplastes, cellules particulièrement sensibles au choc osmotique. Cultivées en absence de pénicilline, elles ont la propriété de réverser vers la forme bactérienne avec comme conséquence, l'apparition de colonies numérables.

Notre connaissance des sphéroplastes, acquise à la suite des nombreuses études que nous leur avons consacrées ces dernières années (73,75,78), nous a aidé dans le choix d'un milieu de culture qui leur soit approprié.

Nous utilisons pour leur numération le milieu SP2 contenant de la gélose (1 p. 100) du saccharose (0,5M) et du magnésium ($1,5.10^{-2}M$).

Lors de l'ensemencement, la suspension de sphéroplastes est diluée dans le milieu Tris $2.10^{-2}M$, pH 7,3, saccharose 0,5M, $Mg SO_4$ $1,5.10^{-2}M$. Nous introduisons 0,1 ml de

la dilution envisagée dans 25 ml de milieu de culture maintenu à 40°C. Le tout est homogénéisé durant 5 secondes au "Rotamixer" avant d'être coulé en boîte de Petri.

Dans ces conditions, la réversion a lieu au sein même de la gélose et la lyse est nettement moins importante que celle observée pour la même culture réalisée en surface (tableau XVII). Les colonies sont numérotées après un séjour de 48 heures à 30°C.

Les numérations bactériennes sont faites avec le même milieu, mais les dilutions sont plus importantes et l'ensemencement s'effectue directement en boîte de Petri, par l'étalement en surface de 0,1 ml de la dilution considérée. Le séjour à 30°C est réduit à 24 heures.

4 . Obtention du mutant E. coli Arg⁻4

E. coli K10 est cultivé sous agitation, dans 20 ml de milieu 63 glucosé (0,8 p. 100) additionné de vitamine B1 (0,0002 p. 100) durant 18 heures à 30°C. Après centrifugation le culot est repris dans du milieu 63 dilué 20 fois, de façon que la densité optique (D₀) de cette suspension mesurée à 610 mμ soit de 0,1. Cette suspension en boîte de Petri, sous

une épaisseur de 2 mm est exposée durant 20 secondes au rayonnement d'une lampe à ultra-violet, placée à 13 cm (General Electric Germicidal 4 W). Les manipulations sont effectuées en chambre noire afin d'empêcher l'effet réactivateur de la lumière.

A 20 ml de milieu 63 additionné de glucose, de vitamine B1 et d'arginine (0,004 p. 100) on ajoute 1 ml de la suspension soumise aux UV. On centrifuge, après culture d'une nuit, sous agitation, à 30°C. Le culot est lavé deux fois dans du milieu 63 dilué au 1/20. Puis finalement suspendu dans du milieu 63 glucosé et vitaminé B1, de façon à avoir une DO 610 de 0,05. Le tout est remis en culture agitée à 37°C. Lorsque la DO 610 de la culture a doublé, on ajoute 2000 unités de pénicilline par ml de milieu et l'on continue l'agitation à 37°C pendant 3 heures. A ce moment, différentes prises d'essai sont respectivement diluées à 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} et 10^{-4} dans du milieu 63 au 1/20. Chaque dilution sert à ensemercer cinq boîtes de milieu 63 complet gélosé à 1,5 p. 100. Après 48 heures de culture à 37°C, chaque boîte est repliquée au velours sur milieu 63 complet gélosé, mais privé d'arginine.

Après 48 heures, seules les colonies qui se sont développées sur le milieu contenant de l'arginine sont prélevées.

Un nouveau passage sur les deux types de milieu permet d'isoler le mutant recherché.

Parmi les différents mutants obtenus, nous avons sélectionné la souche dont la transformation en sphéroplastes, sous l'action de la pénicilline se fait avec le meilleur rendement (E. coli K10 Arg⁻⁴).

5 . Obtention des sphéroplastes et préparation de la fraction P1

Lors des numérations sur boîtes, effectuées systématiquement au cours de nos premières préparations P1, nous avons constaté la présence de nombreuses contaminations bactériennes. Ceci nous a amené à réaliser aussi stérilement que possible la préparation du P1. Toutes les solutions et tous les récipients sont stérilisés au préalable ; seules les solutions de pénicilline et de digitonine ne sont pas autoclavées.

Les bactéries sont cultivées dans le milieu BPG pendant 16 heures à 30°C soumis à une agitation mécanique. On en dilue une partie aliquote à 1000 ml avec du milieu SP2 glucosé à 4 p. 100, et préalablement porté à 30°C, de sorte que la DO 610 soit de 0,1. Le tout est remis en incubation dans les mêmes conditions.

Lorsque la DO 610 atteint 0,5, on ajoute au milieu de culture 15 ml d'une solution de glucose à 40 p. 100, et 350 ml du mélange contenant pour 1000 ml de saccharose 2M, 50 ml de Mg SO₄ M, et 6.10⁶ unités de pénicilline. La transformation des bactéries en sphéroplastés est habituellement totale 2 heures après l'addition de la pénicilline ; elle est contrôlée par l'examen au microscope en contraste de phase.

A partir de ce moment, toutes les manipulations sont effectuées entre 0° et 2°C.

Les sphéroplastés sont centrifugés 15 min à 6000 g (Sorvall couronne GSA) et lavés deux fois avec le milieu I :

Saccharose	0,5 M
Mg SO ₄	1,5.10 ⁻² M
Tris	2.10 ⁻² M, pH 7,3
Pénicilline	2000 unités par ml

La mesure de la densité optique à 610 mμ de la suspension du culot de sphéroplastés dans 60 ml de milieu I, va nous donner le volume final de la préparation P1 :

$$V = \frac{DO \times 2}{100}$$

On amène les 60 ml de la suspension de sphéroplastés à 100 ml avec 40 ml d'une solution de digitonine à 2,5 p. 100 préalablement dissoute par ébullition dans le milieu I, et re-

froidie à 0°C. Dans certains cas, nous avons remplacé la digitonine par le Brij 58 à la même concentration. La préparation est placée sur un agitateur magnétique réglé à très faible vitesse, la lyse se poursuit en général durant une heure.

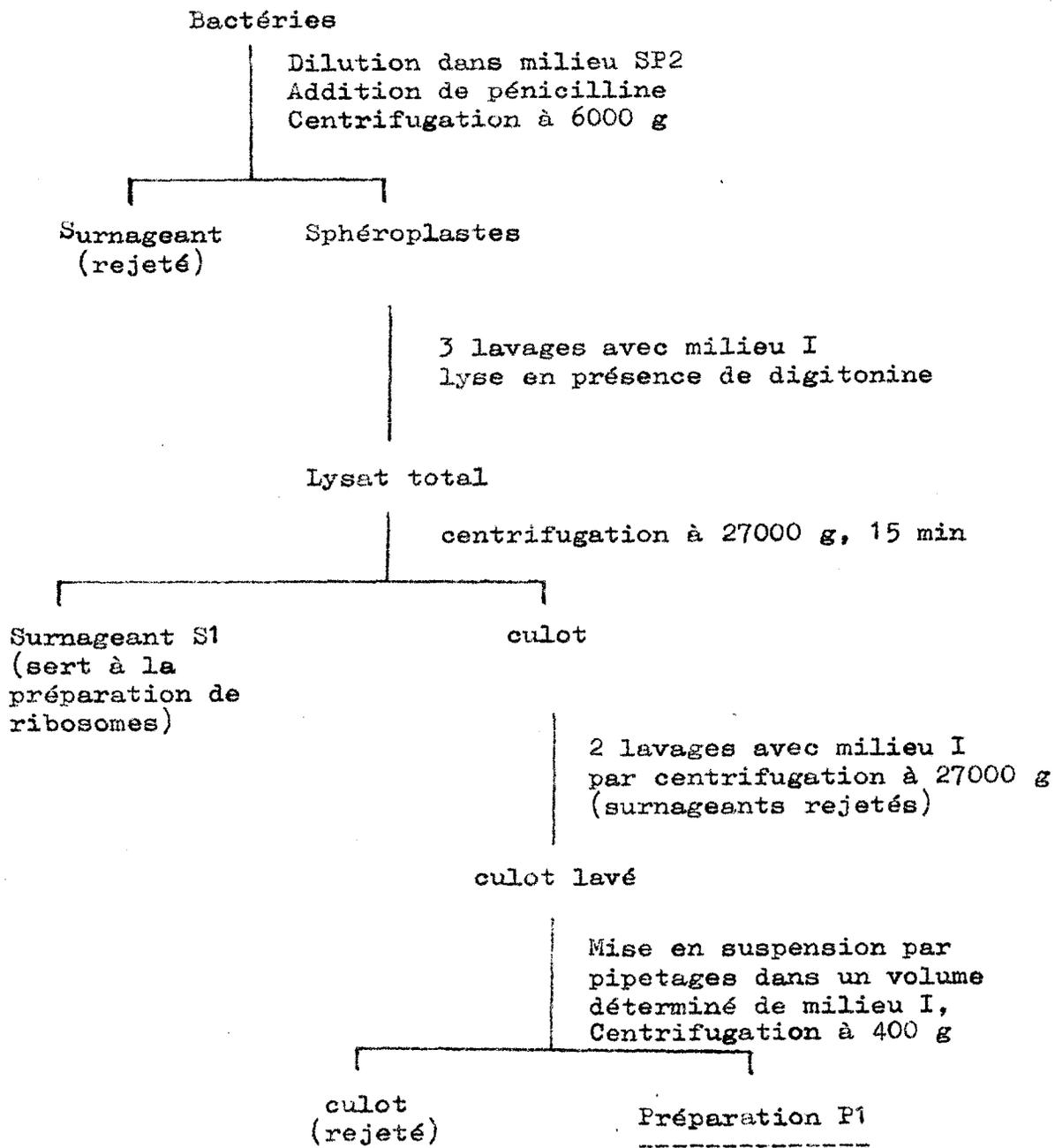
Elle est contrôlée par la mesure de la DO à 610 m μ , par des numérations réalisées d'une part en cellule de Thoma, d'autre part, selon la méthode que nous avons précédemment décrite.

On ajoute au lysat obtenu 0,50 g de bentonite et on centrifuge le tout durant 15 min à 27000 g (couronne Sorvall SS-34). Le sédiment est lavé deux fois par centrifugation dans le milieu I avant d'être repris et homogénéisé dans le même milieu par aspirations et refoulements successifs dans une pipette dont l'embout est écourté. Les fragments non homogénéisés sont éliminés par une dernière centrifugation de 4 min à 500 g. La préparation P1 ainsi obtenue conserve intacte son activité biosynthétisante pour la phosphatase alcaline durant cinq jours à 0°C. Le tableau I résume la méthode de préparation du P1.

6 . Les contrôles réalisés au cours de la préparation du P1

a / Vérification de la persistance de l'exigence en argi-

TABLEAU I



nine de la souche E. coli K10 Arg⁻4.

Cette vérification est réalisée sur chaque culture avant utilisation pour la préparation du P1. Il fallait donc utiliser un test simple et rapide.

Nous employons le milieu synthétique MSB1 gelosé à 1,5 p. 100 dont l'unique source d'azote est le sulfate d'ammonium. Le prélèvement bactérien effectué sur la culture en milieu BPG est dilué à 1/200 avec du tampon Tris 10⁻²M pH 7,3. Deux boîtes de Petri sontensemencées par étalement en surface de 0,1 ml de la dilution. Nous déposons sur l'une d'elles un disque de papier filtre imprégné d'une solution d'arginine à 2 p. 100. Après 48 h de séjour à l'étuve à 30°C, la culture ne doit se développer que sur la boîte où se trouve le disque.

b / Les mesures de la densité optique au cours de la lyse

Elles permettent de suivre l'évolution de la lyse des sphéropastes. Les prélèvements, effectués dès le départ à des intervalles de temps réguliers, sont lus à 610 mμ (Spectrophotomètre Frolabo) après dilution au 1/100 dans le milieu I. Une étude détaillée de la lyse est réalisée dans le troisième chapitre.

c / Les numérations

Elles sont exprimées sauf mention contraire, en nombre de germes contenus dans 1 litre de milieu SP2 immédiatement avant l'addition de la pénicilline.

- Les numérations optiques sont effectuées à l'aide de la cellule de Thoma, aux différents stades de la préparation du P1. Elles donnent donc :

le nombre de bactéries initial (SP2)

le nombre de sphéroplastés en fin de transformation

le nombre de sphéroplastés après les deux lavages

le nombre de sphéroplastés après la lyse

le nombre de sphéroplastés dans la préparation terminée.

- Les numérations des cellules viables sont réalisées à partir des mêmes prélèvements. Nous discutons dans le chapitre III des avantages respectifs des deux méthodes, les résultats obtenus sont consignés dans le tableau X.

Mais de plus, la numération des cellules viables permet de déceler lors du comptage les contaminations bactériennes. C'est à l'occasion de ce type de numération que nous nous sommes aperçu que certaines préparations contenaient des Bacillaceae. Ce fait nous a amené à travailler ensuite stérilement avec comme conséquence, l'élimination de toute contamination. Un autre contrôle de contamination est effectué à

la fin de l'incubation dans le milieu de synthèse, comme nous le verrons plus loin.

d / Contrôle optique

Il consiste en l'observation au microscope en contraste de phase des différents échantillons. Il permet de suivre l'évolution de la préparation et d'y remédier immédiatement si nécessaire.

Nous avons reproduit sur la planche 1 deux aspects de la préparation du P1.

La première photographie représente des sphéroplastés en fin de transformation. Le saccharose et le magnésium ajoutés au milieu SP2 les ont préservés de la lyse.

Sur la deuxième, nous observons un échantillon de la préparation P1 elle-même. Elle est constituée d'un amas de petites particules provenant de la lyse des sphéroplastés ; cependant, certains d'entre eux, au lieu de se fragmenter sous l'action de la digitonine se sont vidés de leur contenu cellulaire tout en conservant leur forme sphérique. Ces "fantômes" ou "ghosts" indiqués par les flèches, donnent par comparaison une idée de la taille des particules qui constituent le P1.

e / Contrôle en microscopie électronique

Il est évident que ces contrôles ne peuvent être réalisés pour toutes les préparations du P1. Nous avons constaté que les images obtenues sont parfaitement reproductibles et nous ne contrôlons l'aspect des particules que lorsque les propriétés de biosynthèse du P1 changent pour une série de préparations (par exemple synthèse anormalement faible ou élevée de phosphatase alcaline).

Nous avons rassemblé sur la planche 2 les images obtenues en microscopie électronique au cours d'une préparation de P1.

La première est une préparation de bactéries en cours de transformation dans le milieu SP2 rendu hypertonique et contenant de la pénicilline. Il faut remarquer l'aspect caractéristique "en creilles de lapin" de la cellule située au centre de la photographie.

La deuxième nous montre un sphéroplaste entièrement transformé. On constate qu'il est limité par deux enveloppes ; la plus externe correspond à la paroi devenue plastique, et la plus interne à la membrane cytoplasmique. Quant à l'appareil nucléaire, il forme des plages claires, réparties au milieu d'un matériel cytoplasmique assez dense.

La troisième photographie est celle d'un sphéroplaste qui se lyse sous l'action de la digitonine. Les amas de ribosomes commencent à se disperser et les filaments de DNA maintiennent encore une certaine cohésion structurale. Les fragments de parois et de membranes sont encore assez importants, l'action de la digitonine va se poursuivre en les morcelant davantage.

La dernière préparation représente les particules P1 proprement dites. Parois et membranes libres se sont enroulées sur elles-mêmes, d'où la forme sphérique plus ou moins fermée acquise par les particules.

Lorsque l'enveloppe sphérique est unique, ribosomes et DNA s'y accolent du côté externe, par contre lorsqu'elle apparaît double, ribosomes et DNA disparaissent, mais une certaine structure organisée pourrait peut être s'établir entre les deux enveloppes (flèche).

7 . Conditions d'incubation nécessaires à la synthèse de la phosphatase alcaline

Le mélange d'incubation est composé d'un mélange stock, dont les composants et leur concentration ne varient que dans certains cas déterminés. A ce mélange de base peuvent

s'ajouter diverses solutions ; c'est en jouant sur leur concentration qu'il est possible de créer les conditions adéquates nécessaires à certaines expériences particulières.

a / Composition du mélange de base

Il est composé de telle sorte que sa concentration finale soit :

- Tampon Tris pH 7,3	$2 \cdot 10^{-1} M$
- Mélange d'acides aminés	$5,2 \cdot 10^{-2} M$
- Pénicilline	10000 unités/ml
- Glucose	$6 \cdot 10^{-3} M$
- Ca Cl ₂	$1,2 \cdot 10^{-2} M$
- Saccharose	$2 \cdot 10^{-1} M$
- KCl	$1 \cdot 10^{-2} M$

Le mélange d'acides aminés de la série L est réalisé dans les proportions des constituants de la phosphatase alcaline. La concentration en acides aminés est la suivante ($\mu\text{mole/ml}$) :

Alanine	7,5	Méthionine	2,50
Arginine	0,29	Phénylalanine	4,20
Acide aspartique	11,3	Proline	6
Acide glutamique	10,3	Sérine	6,2
Glycocolle	14,5	Thréonine	11,6

Histidine	2,65	Tryptophane	4,08
Leucine	7,60	Tyrosine	2,20
Isoleucine	7,60	Valine	6,50
Lysine	2,60	Glutamine	6,50
		Asparagine	6,5

La concentration d'arginine, initialement vingt fois plus élevée, a été abaissée sauf mention contraire, à 0,29 $\mu\text{mole/ml}$ afin d'augmenter l'incorporation d'arginine ^{14}C dans les protéines synthétisées par la fraction P1 ; cela, sans qu'aucune diminution de la quantité de phosphatase alcaline synthétisée soit observable dans nos conditions expérimentales.

b / Mélange d'incubation :

Le mélange d'incubation définitif est formé selon les proportions suivantes :

Fraction P1	400 à 900 μg de protéines sous	0,3 ml
Milieu I		0,3 ml
Mélange de base		1 ml
Mg SO_4 1.10^{-1}M		0,2 ml
	(soit une concentration finale de 1.10^{-2}M)	
Eau distillée		0,2 ml

On incube stérilement le mélange à 30°C dans des

tubes à raison de 0,25 ml par système. On effectue les dosages de la phosphatase alcaline directement dans les tubes où toute synthèse ultérieure de protéines a été bloquée par l'addition de 400 µg/ml de chloramphénicol (CAL).

Nous avons rassemblé, dans le tableau II, à titre indicatif, les activités phosphatasiques contenues dans différents systèmes après 7 heures d'incubation à 30°C. Remarquons que l'addition des différents nucléosides triphosphates au milieu réactionnel exerce dans nos conditions expérimentales un effet inhibiteur sur la synthèse de la phosphatase alcaline ; nous les avons supprimés, pour cette raison, du mélange d'incubation.

Le contrôle bactériologique réalisé tout au long de la préparation du P1 se termine ici en vérifiant qu'en fin d'incubation le milieu est exempt de toute contamination bactérienne.

Le prélèvement (0,05 ml) est directement étalé sur boîte de Pétri. La lecture se fait après 24 h à l'étuve à 30°C.

8 . Dosage de la phosphatase alcaline

Il est réalisé selon une variante de la technique décrite par Garen et Levinthal (60). Le substrat employé au

TABLEAU II

Unités de phosphatase alcaline synthétisée après 7 h d'incubation à 30°C. La fraction P1 utilisée a été préparée à partir de la souche E. coli K10 Arg⁻⁴ (*).

L'unité d'enzyme est définie comme l'activité qui libère à 30°C une μ mole de p-nitrophénol par heure.

	Unités	Taux de synthèse
Système complet	496	738
Système sans acides aminés	9,6	14,3
Système sans arginine	6,4	9,5
Système sans calcium	123	183
Système sans glucose	145	216
Système sans magnésium	247	368
Système avec ATP, CTP, GTP, UTP $2 \cdot 10^{-4}$ M chaque	279	415

(*) Sauf mention contraire les expériences décrites au cours de ce travail sont effectuées à partir de la souche E. coli K10 Arg⁻⁴.

cours du dosage est le p-nitrophenyl-phosphate.

Le mélange d'incubation (0,25 ml) est dilué avec 0,25 ml de tampon Tris M pH 8. Le tout est placé au bain-marie à 30°C. Au temps zéro, on ajoute 0,25 ml de solution de p-nitrophenyl-phosphate à 10 mg par ml dans du tampon Tris M pH 8, $Mg^{2+} 10^{-2}M$, mercaptoéthanol $10^{-3}M$. Après un temps d'incubation à 30°C, exactement mesuré, la réaction est arrêtée par addition de 1,5 ml de tampon phosphate de potassium M à pH 8 contenant de l'EDTA $10^{-2}M$. La libération de p-nitrophénol est mesurée au spectrophotomètre à 410 m μ . Une unité d'enzyme correspond à l'activité libérant dans ces conditions 1 μ mole de p-nitrophénol en une heure. L'activité enzymatique est linéaire en fonction du temps d'incubation et de la concentration en enzyme.

9 . Incorporation des acides aminés marqués dans les protéines

L'introduction d'un acide aminé marqué dans le mélange d'incubation permet d'étudier l'incorporation de cet acide aminé dans les protéines totales.

Nous avons employé la L arginine ^{14}C (CEA, 93,5 mCi/mmole) à raison de 7 mCi/mmole ; la L lysine ^{14}C (CEA, 93,7 mCi/mmole) à raison de 1,5 mCi/mmole ou de 30 mCi/mmole ; et la L methionine-methyl ^{14}C (CEA, 10,8 mCi/mmole) à raison

de 0,8 mCi/mmole.

Les prélèvements (0,25 ml) sont précipités à froid par l'acide trichloracétique (TCA) 5 p. 100 et conservés une nuit en chambre froide.

Dans des cas précis les tRNA sont éliminés en portant les échantillons 5 min à 100°C. On procède ensuite selon la technique habituelle :

Après addition de 0,25 mg de sérum albumine comme entraîneur, les précipités sont lavés cinq fois à froid par centrifugation et resuspension successives dans le TCA 5 p. 100. Le précipité repris par 1 ml de NH_4OH 1 N est neutralisé par l'acide acétique 5 N en présence d'une goutte d'un mélange de bleu de méthyle et de rouge neutre au 1/200.

On ajoute 1 ml d'une solution de chlorhydrate d'hydroxylamine 2M à pH 7 et on laisse reposer pendant 1 h à la température du laboratoire. (Ce traitement rend non précipitable par les acides la radioactivité fixée sous forme non protéique). Après addition de 2,5 ml de TCA à 20 p. 100, les précipités sont dissous dans l'ammoniaque 1 N et la radioactivité est mesurée à l'aide d'un compteur Tracerlab.

10 . Dosage des protéines

Le dosage des protéines de la préparation P1 est réalisé selon la méthode de Lowry et coll. (120) en prenant comme référence la sérum-albumine de boeuf cristallisée.

11 . Dosage des acides nucléiques

Le DNA est dosé par la méthode de Dische modifiée par Burton (24) et le RNA par la méthode à l'orcinol de Mejbaum (135) en prenant respectivement comme référence le DNA de sperme de saumon et le ribose.

PRODUITS UTILISES

Sels minéraux	Prolabo
Agar	Difco
Extrait de levure	Difco
Extrait de viande	Liebig
Peptone	Difco
Protéose peptone	Difco
Tryptone	Difco
Glucose	Kuhlmann
Saccharose	Kuhlmann et the British Drug Houses Ltd. (Analar)
L Amino-acides (sauf DL Aspartique)	Nutritional Biochemicals Corporation et Sigma
β -Mercaptoéthanol	Prolabo
Sel tétrasodique de l'acide éthylènediamine tétraacétique	Nutritional Biochemicals Corporation
Tris (hydroxyméthyl) aminométhane	British Drug Houses Ltd.
Digitonine	Prolabo
Brij 58 : polyoxythylène-(20)-cethyl-ether	Atlas chemical industries

Adénosine-5'-triphosphate (sel disodique)	
Cytidine-5'-triphosphate (sel de sodium)	Sigma
Guanosine-5'-triphosphate (sel de sodium)	
Uridine-5'-triphosphate (sel trisodique)	
Actinomycine D (*)	Merck & Co, Inc.
Chloramphénicol	Sigma
Puromycine (dichlorhydrate)	Sigma
Spécilline-G	Spécia
Désoxyribonucléase (stock N° DN-C)	Sigma
Ribonucléase (type I-A)	Sigma
Acide désoxyribonucléique (type III)	Sigma
p-Nitrophényl-phosphate (sel disodique)	Koch Light Laboratories
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside	Sigma
o-Nitrophényl- β -D-galactopyranoside	Mann Research Laboratories

(*) Nous remercions le docteur John S. Tzoumertis, Assistant Director, Merck & Co, Inc. qui nous a procuré très aimablement de l'actinomycine D.

CHAPITRE II

ETUDE DESCRIPTIVE DES PHASES DE LA SYNTHÈSE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE PAR LA FRACTION P1 D'E. COLI

Lorsque la fraction P1 est incubée dans les conditions expérimentales précédemment décrites, l'activité phosphatasique ne commence à se manifester qu'après une phase de latence assez importante.

Dans ce chapitre, nous étudions la cinétique de l'activité enzymatique et nous recherchons par une étude statistique s'il est possible de considérer la phase de latence comme un phénomène reproductible.

Ensuite, nous discutons des facteurs principaux pouvant intervenir dans cette phase, pour retenir deux d'entre eux, qui seront l'objet des travaux relatés dans les chapitres suivants.

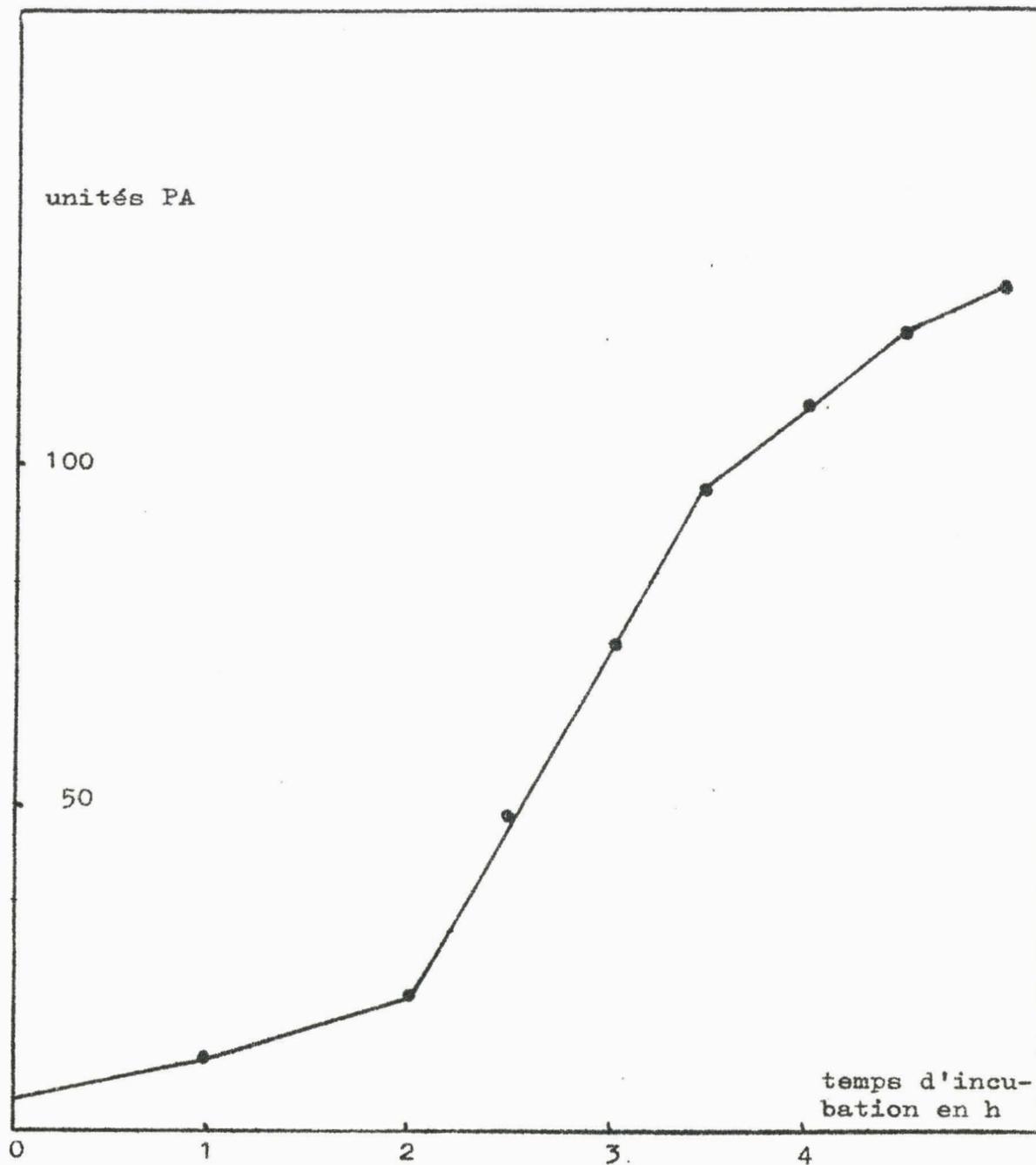
I . APPARITION DE L'ACTIVITE PHOSPHATASIQUE EN FONCTION DU TEMPS D'INCUBATION

La courbe de l'activité phosphatasique en fonction du temps d'incubation d'une préparation P1 est constituée de trois phases (figure 3). Au cours de la première, aucune augmentation notable de l'activité enzymatique dans le milieu d'incubation ne peut être mise en évidence, c'est la phase de latence.

Au cours de la seconde qui correspond à la synthèse proprement dite, on constate un accroissement linéaire de l'activité phosphatasique en fonction du temps, c'est la phase de synthèse à taux constant ; sur la figure 3, on remarque qu'elle est parfois suivie, dans nos conditions expérimentales, d'une troisième phase correspondant à un ralentissement et même à un arrêt de la synthèse.

Notons dès à présent l'importance de la phase de latence qui doit être considérée comme une phase préparatoire. Son étude peut nous donner des indications précieuses sur le mécanisme de la synthèse protéique et plus particulièrement sur celle de la phosphatase.

Courbe de l'activité phosphatasique en fonction du temps d'incubation d'une préparation P1.



A . LA PHASE DE LATENCE

Sur la figure 4, nous comparons les courbes d'activité phosphatasique données par des P1 choisis pour la diversité de leur phase de latence ; l'allure générale de ces courbes est identique. Cependant, selon la préparation utilisée, la synthèse ne commence qu'après deux heures, trois heures trente ou cinq heures d'incubation. La durée de la phase de latence, quoique toujours importante, est donc variable, elle dépend vraisemblablement de la nature des préparations P1 qui sont cependant réalisées, autant que cela est possible, dans des conditions expérimentales identiques. Il faut admettre que certains facteurs physiques ou chimiques intervenant dans la synthèse nous sont inconnus ; l'hypothèse la plus vraisemblable est que l'état physiologique des sphéroplastes au moment de leur lyse est à l'origine des différences observées.

Pour préciser dans quelles limites peut varier la durée de la phase de latence, nous avons déterminé le temps de latence de 73 préparations P1 précédant la synthèse de la phosphatase alcaline. La distribution de fréquences en résultant, nous a permis de réaliser l'histogramme représenté sur la figure 5. L'intervalle de classe utilisé est de 30 minutes. Les limites réelles des classes ont été choisies de telle

Figure 4

Variation de la durée de la phase de latence pour différentes préparations P1.

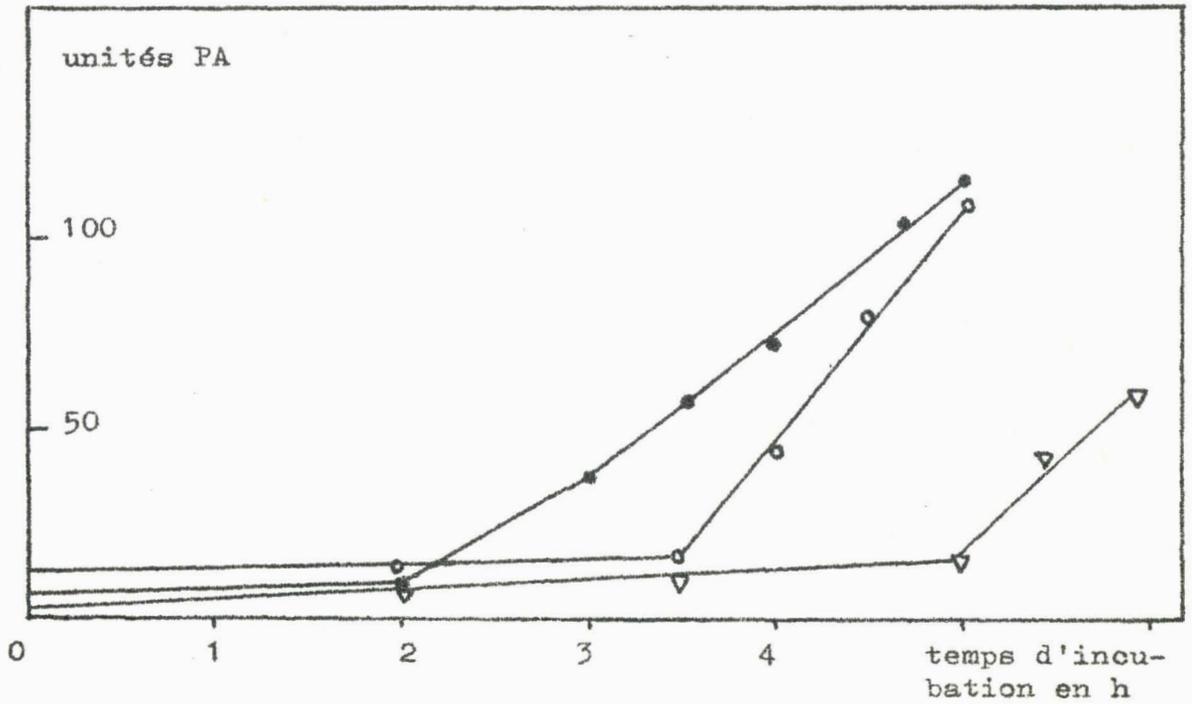
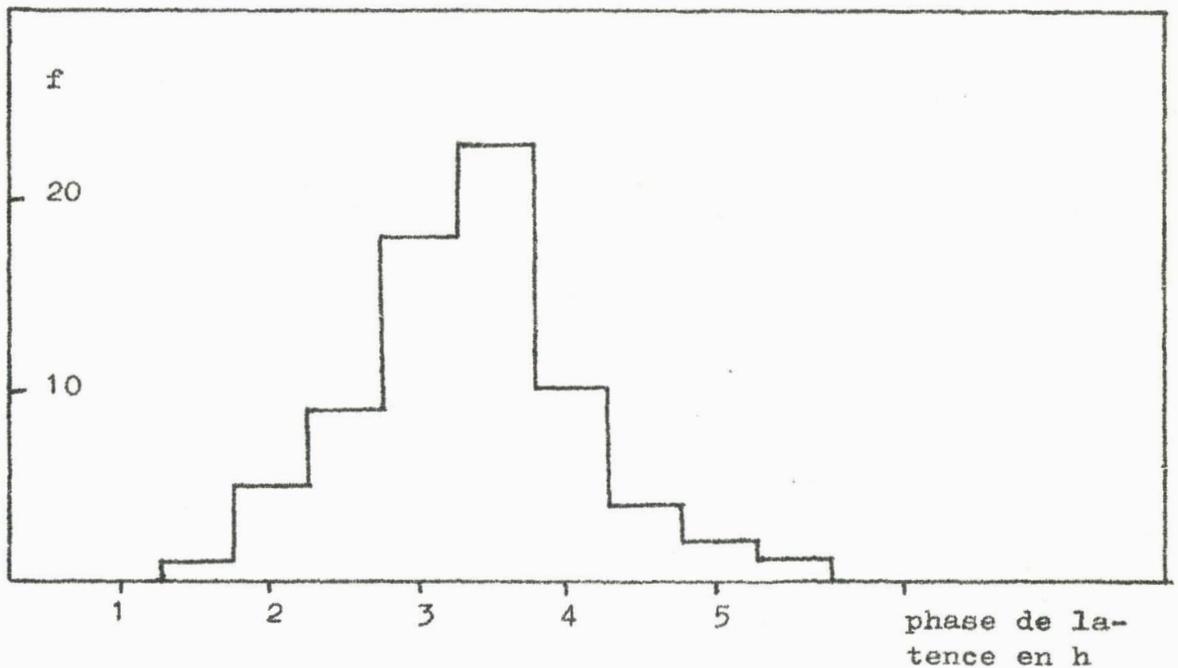


Figure 5

Histogramme obtenu à partir des temps de latence de 73 préparations P1.



sorte qu'elles ne coïncident pas avec une valeur possible du temps de latence. Nous remarquons que, dans la majorité des cas, la durée de la phase de latence est de 3 h ou de 3 h 30 min, la moyenne de la distribution de fréquence étant de 3 h 19 min.

B . PHASE DE SYNTHÈSE A TAUX CONSTANT

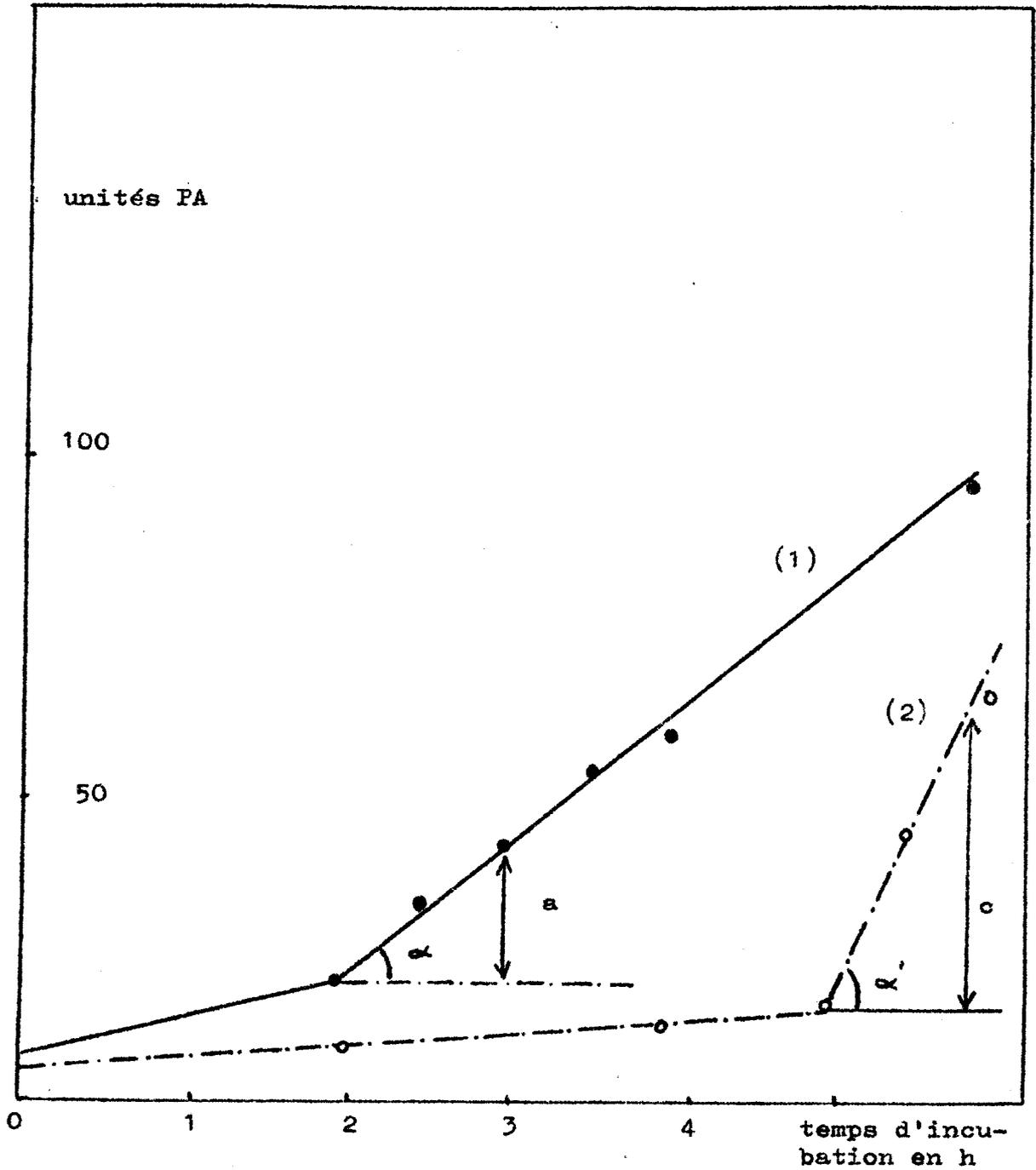
Durant cette phase, la synthèse de la phosphatase alcaline s'accroît linéairement en fonction du temps. La pente de la droite obtenue nous a paru être une mesure convenable du taux de synthèse puisqu'elle demeure constante durant plusieurs heures.

Le taux de synthèse est défini par la tangente de l'angle α : il est égal au nombre d'unités de phosphatase alcaline synthétisée par unité de temps et ramené à une concentration déterminée en protéines particulières ; l'unité de temps est l'heure et la concentration protéique est donnée en mg pour un volume d'incubation de 0,25 ml. Par exemple, les courbes (1) et (2) de la figure 6 auront comme taux de synthèse respectifs :

$$\begin{aligned} \text{taux (1)} &= \frac{a}{\text{protéines}} = \frac{20}{0,09} = 222 \\ \text{taux (2)} &= \frac{c}{\text{protéines}} = \frac{48}{0,112} = 428 \end{aligned}$$

Il nous semble que le taux de synthèse donne une

Détermination du taux de synthèse de la phosphatase alcaline : défini par la tangente de l'angle α il est égal au nombre d'unités de PA synthétisée par unité de temps et ramené à la concentration protéique exprimée en mg pour 0,25 ml d'incubation.



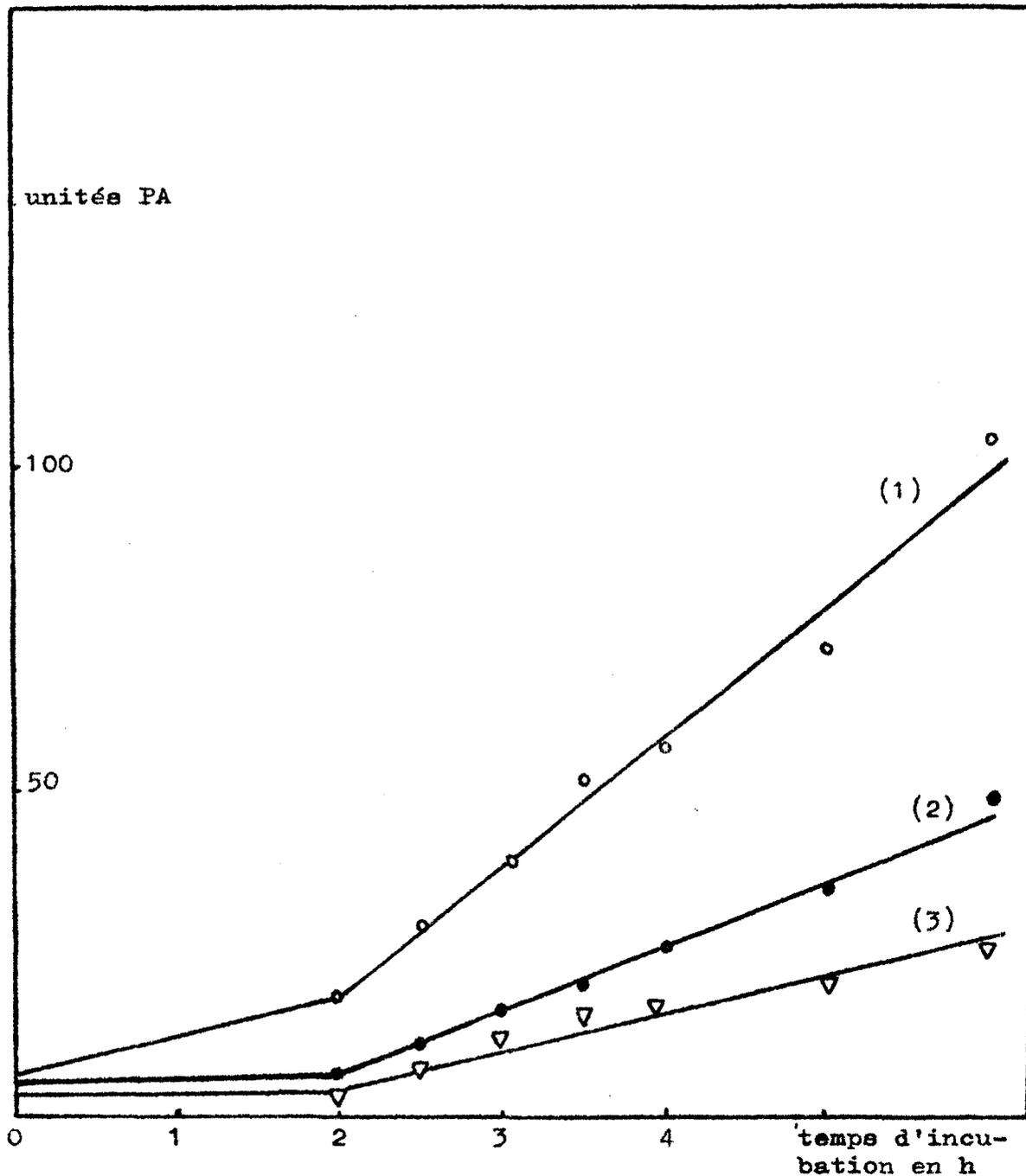
évaluation convenable de l'activité des préparations P1 ; en effet, nous avons montré que l'angle α est, dans certaines limites, proportionnel à la concentration en protéines pour une préparation P1 donnée.

C'est ce qui ressort de l'étude des figures 7 et 8. Pour une même préparation P1, la synthèse est sensiblement proportionnelle à la concentration en particules, donc le taux de synthèse est constant. Cependant, pour des concentrations extrêmes, systèmes (1) et (4) de l'expérience 1910 du tableau III, le taux de synthèse diminue. Lorsque les concentrations en P1 sont élevées, la synthèse de molécules protéiques antérieure à celle de la phosphatase, pourrait provoquer l'épuisement du milieu en constituants indispensables. Cela provoquerait une diminution, en valeur relative, de la synthèse de la phosphatase alcaline. A l'opposé, l'emploi de faibles concentrations aboutit également au même résultat : on peut penser que les chances de rencontre des molécules et des particules qui entrent en jeu durant la synthèse diminuent considérablement.

La phase à taux constant est suivie d'une phase d'arrêt de la synthèse ; cette phase n'apparaît pas systématiquement au cours des incubations. Dans les cas positifs, elle est caractérisée soit par un fléchissement, soit par un arrêt total de la synthèse, conséquence vraisemblable d'un

Figure 7

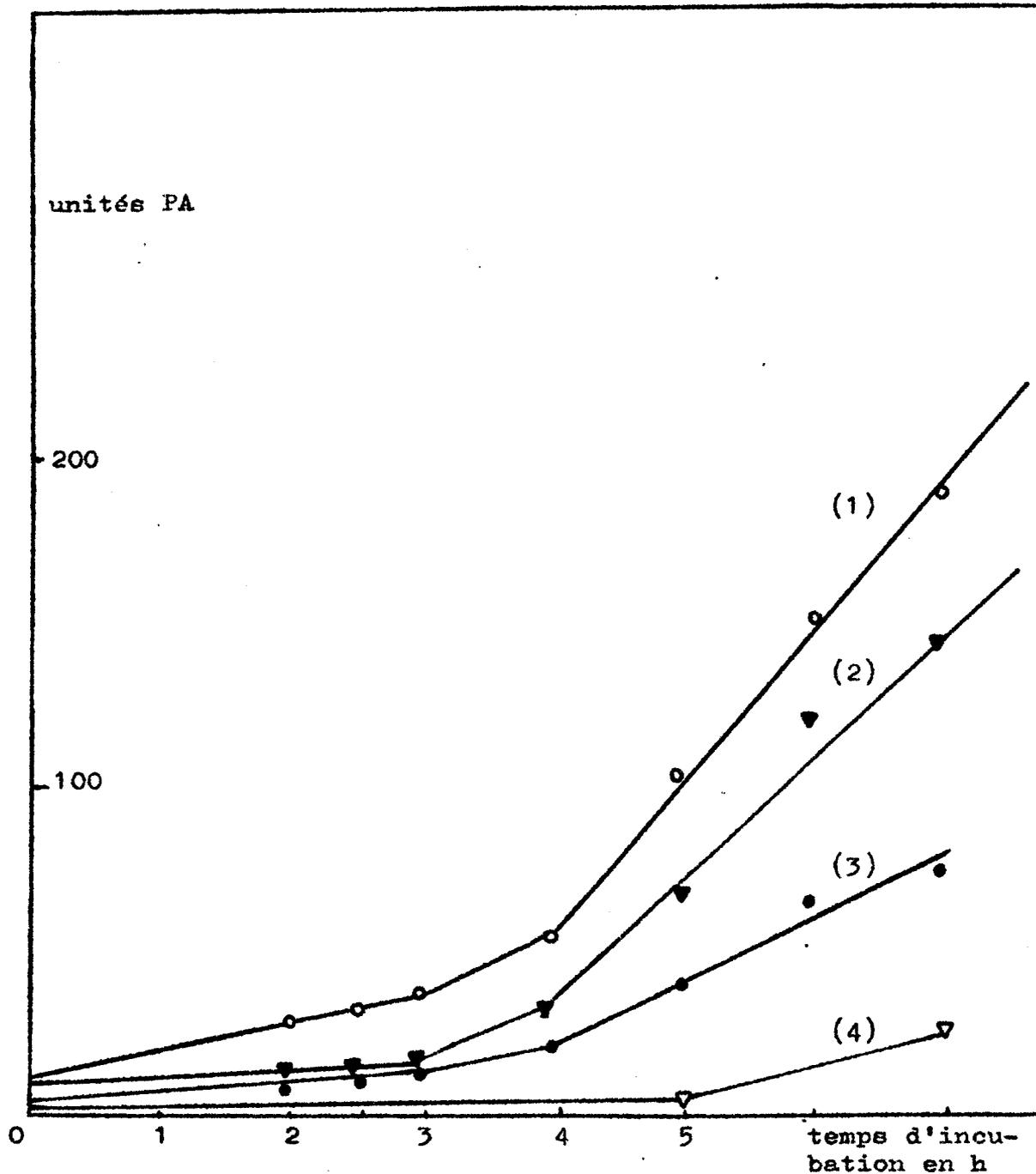
Cinétiques de l'activité phosphatasique obtenues par diverses concentrations d'une même préparation P1. On observe une proportionnalité entre l'activité et la concentration en particules du milieu d'incubation.



- (1) 0,30 ml de P1 pour 2 ml de mélange d'incubation
- (2) 0,15 ml de P1 pour 2 ml de mélange d'incubation
- (3) 0,10 ml de P1 pour 2 ml de mélange d'incubation

Figure 8

Détermination des concentrations de P1 au delà desquelles l'activité ne leur est plus proportionnelle. Cela est observé avec les concentrations utilisées dans les incubations (1) et (4). (Confère expérience 1910 du tableau III).



- (1) 0,9 ml de P1 pour 2 ml de mélange d'incubation
- (2) 0,6 ml de P1 pour 2 ml de mélange d'incubation
- (3) 0,3 ml de P1 pour 2 ml de mélange d'incubation
- (4) 0,05ml de P1 pour 2 ml de mélange d'incubation

Pour faciliter la représentation, les activités relatives à la courbe (4) sont multipliées par 3.

TABLEAU III

Taux de synthèse en fonction de la concentration en protéines du milieu d'incubation

Expérience 1710 Les courbes correspondantes sont celles de la figure 7			Expérience 1910 Les courbes correspondantes sont celles de la figure 8	
Systèmes	mg de prot. pour 0,25 ml d'incubation	taux de synthèse	mg de prot. pour 0,25 ml d'incubation	taux de synthèse
(1)	0,09	222	0,292	167
(2)	0,045	220	0,195	190
(3)	0,03	233	0,097	194
(4)	-	-	0,016	125

épuiement du système ou de son autodestruction.

C . RAPPORT ENTRE LA PHASE DE LATENCE ET LE TAUX DE
SYNTHÈSE

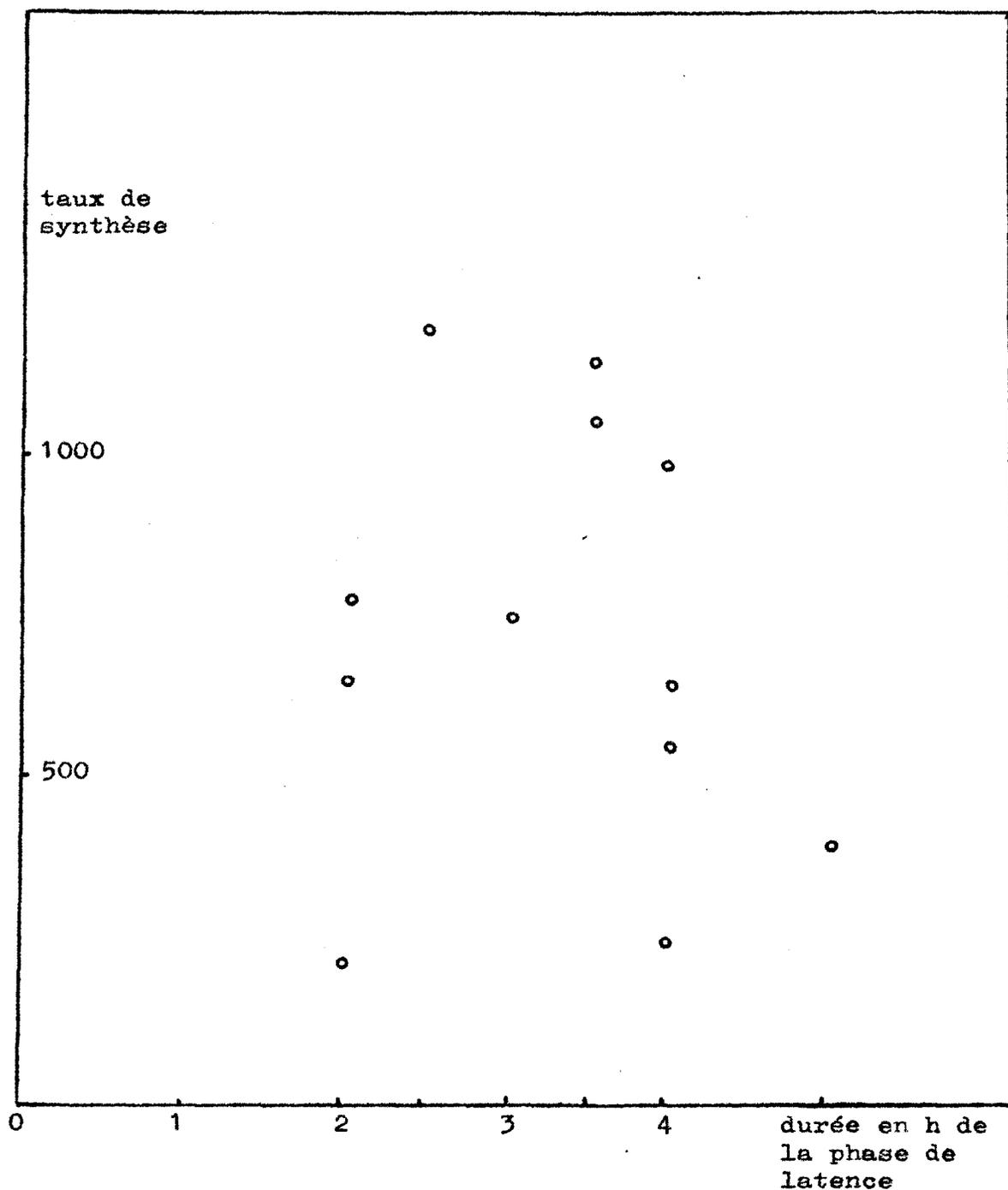
Les courbes des figures 7 et 8 montrent que les variations des concentrations en P1 des systèmes n'influent pas sur la durée de la phase de latence excepté dans un cas : c'est celui qui correspond, sur la figure 8, à la plus faible concentration en P1, (courbe 4) ; elle est dans ces conditions, prolongée d'une heure. Cependant, cette concentration six à dix fois inférieure à la concentration habituelle, provoque des conditions d'incubation anormales, comme nous l'avons vu précédemment.

Quoiqu'il en soit, nous avons recherché s'il y avait une relation entre la durée de la phase de latence et le taux de synthèse pour différentes préparations P1, employées en concentrations normales. Sur la figure 9, nous avons porté en abscisse le taux de synthèse, et en ordonnée la durée de la phase de latence pour 12 préparations P1 prises au hasard. La répartition des points élimine toute relation entre la durée de la phase de latence et le taux de synthèse.

La courbe représentative de l'activité de la phosphatase alcaline en fonction du temps, est donc caractérisée

Figure 9

Recherche d'une relation entre le taux de synthèse et la durée de la phase de latence. Chaque point est déterminé, en abscisse par le taux de synthèse d'une préparation P1 et en ordonnée par la durée en heures de la phase de latence correspondante.



par deux valeurs indépendantes :

- une phase de latence, durant laquelle une légère synthèse peut s'effectuer. Cette phase de latence est exprimée en heures.
- une phase de synthèse constante qui permet de calculer le taux de synthèse.

Pour les différentes préparations P1, la phase de latence et le taux de synthèse sont variables, indépendants l'un de l'autre. Par contre, la phase de latence et le taux de synthèse sont deux constantes lorsque la synthèse de la phosphatase alcaline est réalisée à plusieurs jours d'intervalle avec une même préparation P1. Ce fait est primordial car il nous a permis de répéter nos expériences dans les mêmes conditions durant une semaine.

II . DISCUSSION

Nous avons vu dans le paragraphe précédent que la durée de la phase de latence et le taux de synthèse sont des constantes pour une préparation F1 déterminée, mais varient d'une préparation à l'autre.

A . TAUX DE SYNTHÈSE

Pratiquement proportionnel à la concentration en protéines particulières pour une expérience, il subit des modifications selon la composition du milieu d'incubation (cf. tableau II chapitre des techniques). Nous utilisons toujours les conditions optimales d'incubation, et pour toute une série d'expériences, des conditions identiques (mêmes solutions) ; cependant, on constate des variations de taux de synthèse d'une préparation à l'autre. Il n'a jamais été possible de trouver une relation quelconque entre le taux de synthèse et un des facteurs physiques ou chimiques que nous sommes capables de faire varier. L'hypothèse la plus vraisemblable est que l'activité de synthèse dépend de l'état initial des sphéropastes dont il n'a pas été possible de codifier exactement la formation. Les essais tendant à faire varier le taux de synthèse en même temps que le temps de latence seront décrits dans le chapitre IV.

B . PHASE DE LATENCE

La durée de la phase de latence est toujours importante, et subit relativement peu de variations. Nous avons classé artificiellement les raisons possibles de cette phase de latence en 3 groupes :

- elle pourrait provenir d'une difficulté de mise en évidence de l'enzyme active.
- elle serait peut-être due à la synthèse de précurseurs par des sphéroplastes survivants dans les préparations.
- elle pourrait enfin correspondre à l'absence d'un site indispensable à la synthèse.

1 . L'enzyme ne pourrait être mise en évidence durant la phase de latence

Au cours de l'incubation des préparations P1, on constate que la plus grande partie de l'activité enzymatique se trouve sous forme soluble dans le surnageant, alors qu'une fraction seulement reste attachée aux particules. Cette fraction sédimentable représente 8 à 34 p. 100 de l'activité enzymatique totale (tableau IV) ; les cinétiques suggèrent que la forme particulaire de la phosphatase est transitoire, l'enzyme étant ensuite libérée dans le milieu extérieur. On peut penser :

- soit que l'enzyme resterait liée aux polysomes des particules

TABLEAU IV

Exp.	unités PA pour 0,25 ml d'incubation	unités PA du surnageant	unités PA du culot	$\frac{\text{U.PA du culot}}{\text{U.PA totales}}$ en p. 100
2005	96	65	33	34,3
1402	158	97,6	51,2	32,2
0106	198	155	32	16,1
0203	217	177,6	19,2	8,7

Répartition entre culot et surnageant de l'activité phosphatase après 6 heures d'incubation dans les conditions expérimentales habituelles.

jusqu'à l'achèvement complet de la molécule qui deviendrait alors soluble.

- soit que la phosphatase synthétisée rapidement resterait enfermée dans les particules de sorte qu'elle ne pourrait pas être atteinte par le substrat ; ultérieurement, comme nous l'avons remarqué, l'aspect des particules se modifie et l'enzyme, alors libérée, pourrait être dosée.

L'imperméabilité de la membrane bactérienne aux substrats est un phénomène habituel chez les bactéries ; pour doser convenablement certaines enzymes comme la β -galactosidase, les cellules doivent être traitées par le toluène qui rend perméable la membrane cytoplasmique. Nous avons suivi l'activité phosphatasique des préparations P1 en fonction du temps, en effectuant le dosage avec le PNPP soit directement, soit après incubation durant 1 heure en présence de 20 p. 100 de toluène, soit encore après addition de 1 p. 100 de brij et de 20 p. 100 de toluène. En aucun cas la cinétique n'a été modifiée par la présence de toluène ou de brij, ce qui exclue formellement toute forme inapparente de l'enzyme active.

2 . La phase de latence serait due à la persistance de sphéroplastés dans les préparations P1

En comparant les cinétiques de la synthèse de la

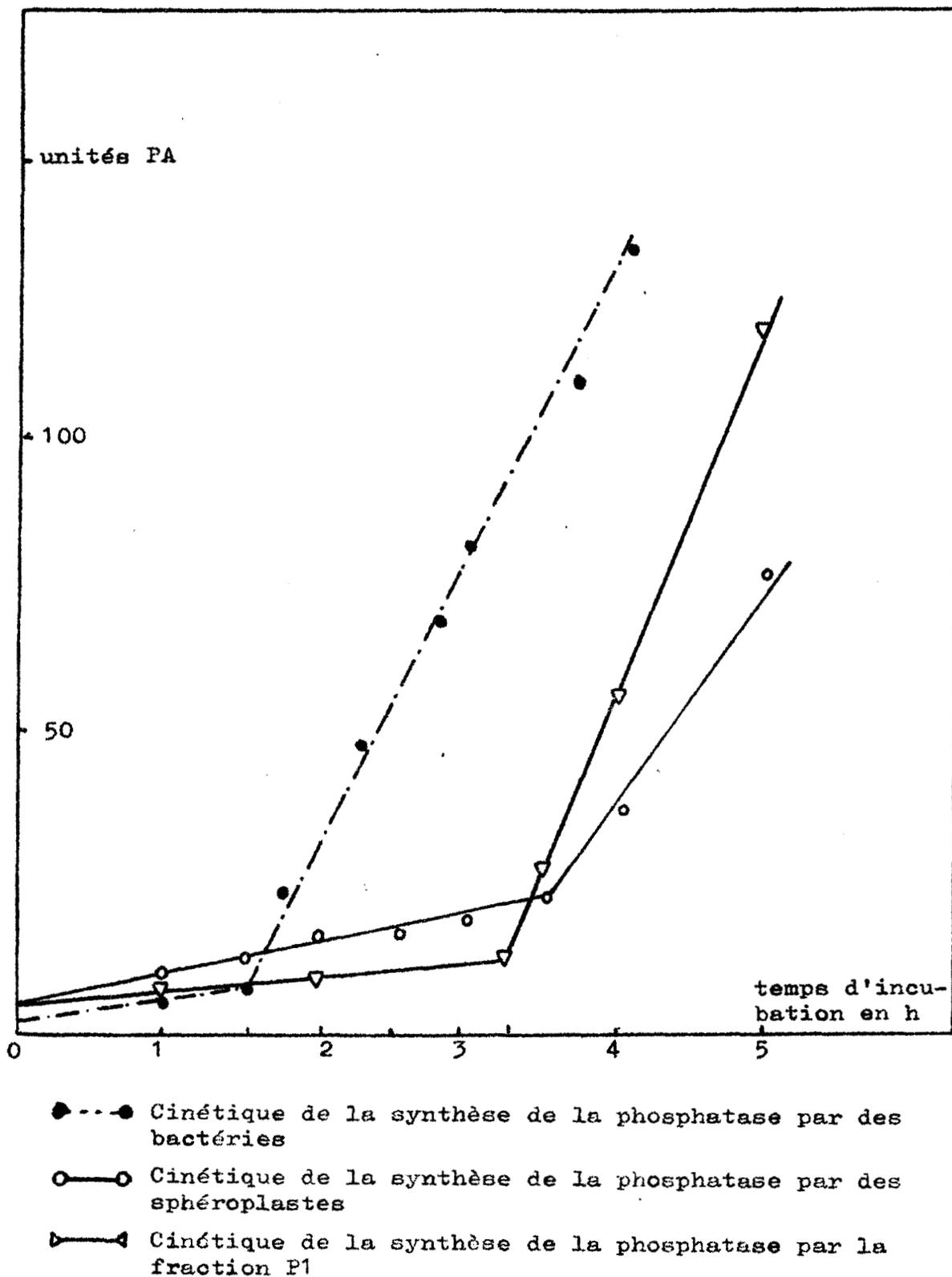
phosphatase alcaline dans les mêmes conditions d'incubation par les bactéries, les sphéroplastes ou la préparation P1 en résultant, on constate que la phase de latence des cellules bactériennes est toujours nettement plus courte que celle des sphéroplastes ou du P1 ; dans l'expérience décrite sur la figure 10, sa durée passe de 1 h 30 min pour les bactéries à 3 heures pour les sphéroplastes.

Il semble donc que le fait de passer à l'état de sphéroplastes, provoque une lésion d'un site de synthèse de l'enzyme et allonge considérablement la phase de latence. Elle devient alors identique à celle des préparations P1 ; comme ces dernières contiennent constamment une certaine proportion de sphéroplastes intacts, on peut se demander si l'activité est due aux particules subcellulaires ou aux cellules survivantes ; le fait que les sphéroplastes se lysent durant l'incubation, ne change rien à ce raisonnement ; les sphéroplastes synthétiseraient un précurseur de l'enzyme, dont la molécule serait ultérieurement complétée par les enzymes des particules.

Dans le chapitre III, nous examinerons ces hypothèses qui nous ont amené à chercher les preuves que la synthèse de la phosphatase alcaline était réalisée in vitro par les particules de la fraction P1.

Figure 10

Comparaison des cinétiques obtenues à partir d'incubations de bactéries, de sphéroplastes et de P1. Les conditions expérimentales sont identiques dans les 3 cas.



3 . La phase de latence serait due à une réorganisation des sites de synthèse

Dans la fraction P1 comme dans les sphéroplastes, les sites formateurs d'enzymes pourraient avoir perdu un élément indispensable, qui devrait être reconstitué avant que la synthèse ne commence. Nous allons ici très brièvement schématiser les différentes hypothèses que nous avons envisagées, et qui seront exposées en détail dans le chapitre IV. La première consiste en la formation préalable d'un facteur indispensable à la synthèse de l'enzyme : dans nos conditions expérimentales de répression par le phosphate de la phosphatase alcaline avant incubation, la synthèse du RNA messenger spécifique de la phosphatase doit précéder l'apparition de l'enzyme. Cependant d'autres facteurs préalables peuvent être soupçonnés : la formation d'un RNA messenger est elle-même, selon le schéma de Jacob et Monod (98) dépendante de la disparition de la molécule de répresseur, qui pourrait être plus stable dans nos conditions expérimentales. On retrouve les mêmes effets si l'on admet l'hypothèse de Manson (127), selon laquelle le phosphate lui-même inhiberait la dimérisation de la molécule enzymatique, ce qui provoquerait un blocage de toute la chaîne de biosynthèse.

Enfin, on peut penser qu'au cours de la préparation

des particules, les sites de la synthèse ont pu être modifiés : les enzymes n'occuperaient plus des positions déterminées les unes par rapport aux autres sur les structures membranaires, ce qui rendrait impossible toute synthèse coordonnée ; ce serait seulement après un certain temps d'incubation que les structures actives réorganisées commenceraient à fonctionner.

CHAPITRE III

ROLE DES SPHEROPLASTES DANS LA SYNTHÈSE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE PAR LA FRACTION P1

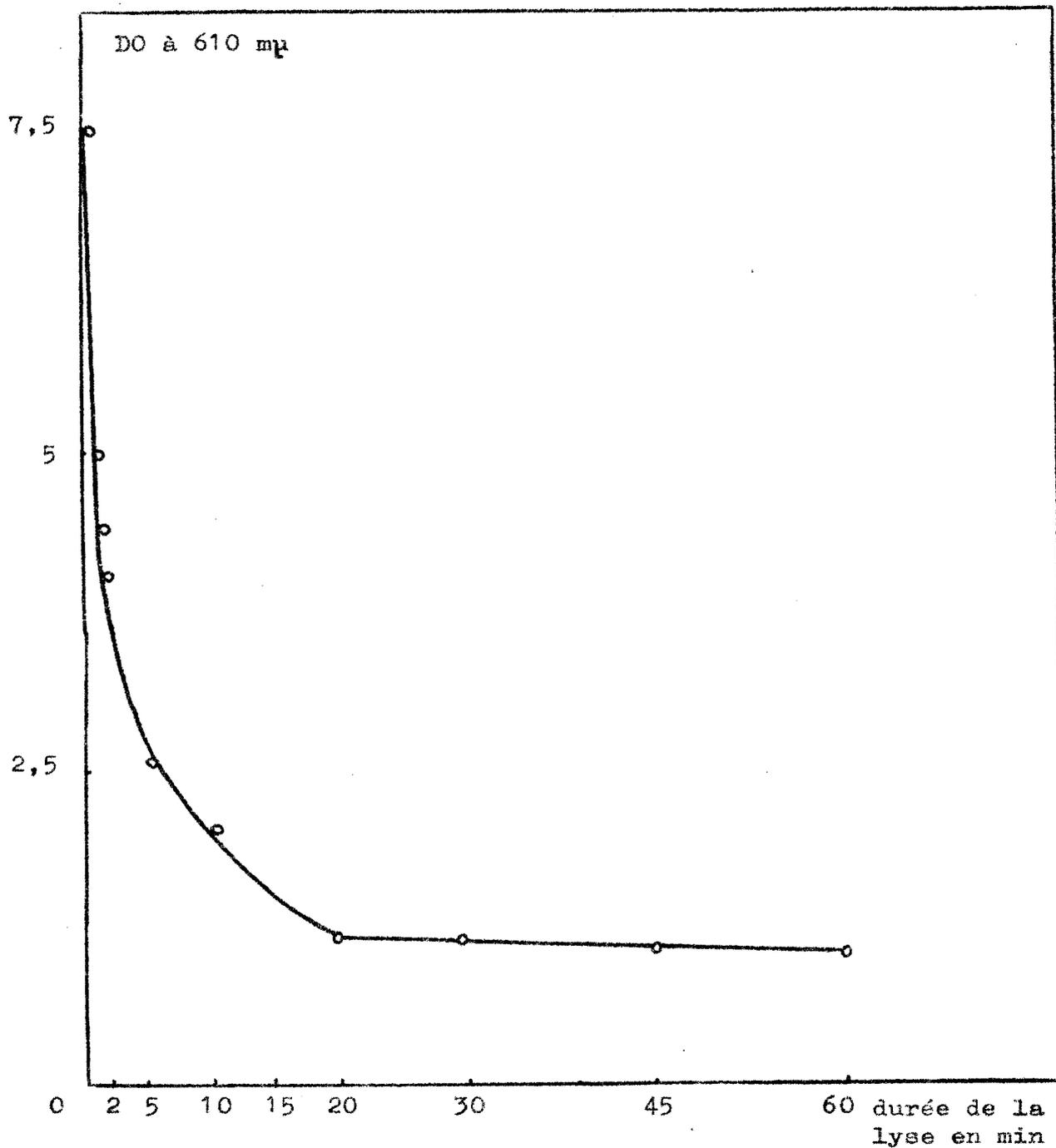
Les cinétiques de la synthèse de la phosphatase alcaline par la fraction P1 ou les sphéroplastes, sont très semblables. Les préparations P1 contenant toujours une certaine proportion de sphéroplastes non lysés, nous cherchons, dans ce chapitre, à évaluer la part de la synthèse qui revient, soit aux sphéroplastes, soit aux particules subcellulaires. Dans une première partie, nous étudions l'importance de la population des sphéroplastes dans les préparations P1 et les relations existant entre la synthèse protidique et le nombre de cellules intactes. Dans la deuxième, nous décrivons comment il a été possible de dissocier l'activité des particules de celle des sphéroplastes, ce qui nous permet de démontrer que les particules effectuent la synthèse in vitro.

I . ETUDE DES SPHEROPLASTES RESIDUELS DANS LES PREPARATIONS P1

Une des caractéristiques de la préparation acellulaire P1 de Nisman est la lyse des sphéroplastés au moyen d'une solution de digitonine. Cette lyse est contrôlée par la mesure à 610 m μ de la densité optique à différents moments après l'addition de la substance tensioactive. La courbe de la figure 11 représente cette densité optique en fonction du temps ; elle permet de constater que la lyse commence immédiatement à un taux maximum ; en effet, après cinq minutes, la densité optique a déjà diminué de moitié. La courbe obtenue est du même type que celle résultant de l'action d'un antiseptique sur une population bactérienne, c'est-à-dire que par unité de temps, le pourcentage des cellules altérées est constant. La baisse de densité optique peut-être suivie par examen au microscope en contraste de phase (planche 1), on constate alors l'éclatement des sphéroplastés, qui laissent exsuder leur contenu cytoplasmique dans le milieu extérieur et la désintégration des membranes en résultant. Cette désintégration conduit à de petits fragments dont la structure n'est plus observable en microscopie optique. La présence de ceux-ci explique la densité optique résiduelle, qu'il n'est pas possible de faire baisser quel que soit le temps de contact avec

Figure 11

Cinétique de la lyse des sphéroplastes en présence d'une solution de digitonine à 2,5 p. 100. Après 5 min de contact la DO 610 a diminué de plus de 50 p. 100.



la digitonine.

A . SPHEROPLASTES DENOMBRES OPTIQUEMENT

Cependant, si par mesure de l'absorption à 610 m μ , la lyse semble très nette, l'examen en microscopie optique du lysat montre qu'une certaine proportion de cellules de l'ordre de 3.10^7 à 3.10^8 par ml de P1 échappe à l'action de la digitonine. Nous avons suivi cette lyse par numération des germes en cellule de Thoma. Il s'agit ici d'une numération de cellules paraissant intactes et non des cellules viables. Les résultats sont exprimés en nombre de cellules pour la totalité de la préparation. Sur le tableau V, on peut apprécier l'importance de la lyse : dans tous les cas plus de 98 p. 100 des bactéries initiales ont été lysées soit lors de la transformation en sphéroplastés, soit lors de l'action de la digitonine. Ce pourcentage de cellules non détruites qui paraît faible en valeur relative, s'avère très gênant lorsqu'il s'agit d'étudier l'activité de synthèse in vitro. En effet, ce faible pourcentage se traduit en valeur absolue par un nombre important de cellules intactes dans la préparation P1. Dans ces conditions, est-il possible de parler de synthèse in vitro et ne faut-il pas préciser le rôle des germes résiduels dans la synthèse de la phosphatase alcaline par la préparation P1 ?

TABLEAU V

Rapport entre le nombre de cellules d'un P1 et la quantité de bactéries qui a servi à la préparation de ce P1.

Exp.	Nombre de bactéries dans 1 l de milieu SP2	Nombre de cellules dans le P1 correspondant	<u>Cellules du P1</u> Bact. initiales en p. 100
1210	$8,2 \cdot 10^{10}$	$1,3 \cdot 10^9$	1,58
1411	$2,8 \cdot 10^{11}$	$5 \cdot 10^9$	1,78
2911	$2,4 \cdot 10^{11}$	$1,1 \cdot 10^9$	0,45
0712	$2,6 \cdot 10^{11}$	$1,2 \cdot 10^9$	0,47
2702	$2,4 \cdot 10^{11}$	$4,2 \cdot 10^9$	1,7
1303	$3,8 \cdot 10^{11}$	$1,8 \cdot 10^9$	0,47

1 . Étude quantitative de l'activité de synthèse en fonction du nombre de cellules totales

Pour cela, nous avons étudié la synthèse de la phosphatase alcaline en fonction d'un nombre déterminé de sphéroplastés numérés en cellule de Thoma. La première colonne du tableau VI donne le nombre de cellules contenues dans le volume de 0,25 ml sous lequel la préparation est incubée, ce nombre varie selon les préparations de $1,25 \cdot 10^6$ à $7,5 \cdot 10^6$. Ces différences ne se retrouvent pas dans l'activité de biosynthèse des diverses préparations (colonne 2 et 3). En effet, l'activité totale de la préparation ramenée à un nombre déterminé de cellules intactes n'est pas fixe, il n'y a aucune proportionnalité entre le nombre de cellules que l'on trouve dans la préparation et l'activité de synthèse de cette préparation. Ramenée à 10^6 cellules, l'activité mesurée après cinq heures d'incubation passe de 1 à 10, selon le P1 utilisé. Ces résultats nous ont fait penser que l'activité du P1 n'était pas due aux cellules qu'il contenait, mais que les particules P1 en tant que telles effectuaient in vitro la synthèse de la phosphatase alcaline.

Par ailleurs, nous avons incubé dans des conditions identiques des préparations de sphéroplastés et de particules P1 provenant de la lyse de ces sphéroplastés. Les numérations,

TABLEAU VI

La quantité de phosphatase alcaline synthétisée après 5 h et 7 h d'incubation est ramenée à 10^6 cellules dans les colonnes (4) et (5). Les numérations sont effectuées en cellule de Thoma.

Exp.	Nombre de cellules	unités PA synthétisée après une incubation de		unités PA synthétisée par 10^6 cellules après une incubation de	
		5 h	7 h	5 h	7 h
2911	$5,2 \cdot 10^6$	38,4		7,4	
0712	$3 \cdot 10^6$	35,2	102,4	11,7	34,1
1502	$7,5 \cdot 10^6$	152	246,4	20,2	32,8
2410	$4,4 \cdot 10^6$	92,8	161,6	21	36,7
2802	$2,75 \cdot 10^6$	115	300	41,6	109
	$1,25 \cdot 10^6$	48	166	38,4	132,8
1312	$3,4 \cdot 10^6$	152	328	44,6	96,4
1602	$5,6 \cdot 10^6$	388		69,2	
0112	$4,5 \cdot 10^6$	336		74,6	
1503	$1,5 \cdot 10^6$	125		83,3	
colonne	1	2	3	4	5

comme précédemment, sont réalisées en cellules de Thoma et l'on compare l'activité biosynthétisante des sphéroplastés et du P1 correspondant. Les résultats sont exprimés dans les deuxième et troisième colonnes du tableau VII. Les nombres correspondent aux unités de phosphatase alcaline synthétisée durant cinq ou sept heures d'incubation, la quantité de phosphatase alcaline préformée étant déduite. Dans ces conditions la première expérience rapportée dans ce tableau tend à prouver que l'activité du P1 est due aux sphéroplastés qu'il contient, puisque cette activité ramenée à un nombre déterminé de cellules intactes est semblable pour les sphéroplastés et le P1 en provenant (colonnes 4 et 5) ; par contre, l'activité prévisible des préparations acellulaires calculée d'après le nombre de sphéroplastés qu'elles contiennent, est nettement inférieure à celle qui est observée. Ceci est particulièrement illustré par les rapports calculés dans les colonnes 6 et 7, on constate que l'activité du P1 peut-être due, pour un dixième environ, à la présence des cellules intactes.

Ces résultats, comme les précédents, semblent démontrer que le P1 réalise bien "in vitro" la synthèse de la phosphatase alcaline.

Cependant, la variabilité de l'activité de synthèse des différentes préparations P1 et celle des rapports de la phosphatase alcaline synthétisée au nombre de cellules intactes,

TABLEAU VII

Comparaison des activités phosphatasiques obtenues à partir d'incubations de sphéroplastes d'une part et de P1. d'autre part en fonction du nombre total de cellules. Les rapports de ces activités ramenés à 10^6 cellules sont indiqués dans les colonnes 6 et 7. Les numérations sont effectuées en cellule de Thoma.

colonne		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
Exp.	Incubation de	Nombre de cell. dans 0,25 ml	U PA synthétisée après une incubation de		U PA synthétisée par 10^6 cell. après une incubation de		pour 10^6 cellules U PA sphéro./U PA P1	
			5 h	7 h	5 h	7 h	5 h	7 h
2802	Sphéro.	$4,25 \cdot 10^6$	201	300	47,2	70,5	1,13	0,64
	P 1	$2,75 \cdot 10^6$	115	300	41,6	109		
0812	Sphéro.	$6,7 \cdot 10^6$		31,2		4,6		0,14
	P 1	$3 \cdot 10^6$		99		33		
1503	Sphéro.	$7,25 \cdot 10^6$	68,9		9,6		0,11	
	P 1	$1,5 \cdot 10^6$	125,9		84			
0604	Sphéro.	$4,75 \cdot 10^6$	58,8		12		0,20	
	P 1	$2 \cdot 10^6$	116		58			

nous a donné quelques doutes sur la validité de nos résultats. En particulier, nous nous sommes demandés si la numération de cellules intactes correspondait à la réalité des faits, et si ce nombre obtenu était constant au cours de la synthèse de l'enzyme. Cela nous a amené à examiner en microscopie électronique les sphéroplastes et les préparations P1.

2 . Etat des sphéroplastes dénombrés optiquement

On constate qu'une population de sphéroplastes lavés n'est pas homogène. Certaines cellules présentent un cytoplasme dense, et du matériel nucléaire réparti soit au centre, soit en plusieurs amas. Par contre, la plupart paraissent altérées ; leur membrane est souvent décollée de la paroi sous-jacente, ou encore le contenu cellulaire semble s'être partiellement vidé dans le milieu extérieur ; cela doit se traduire par des activités de synthèse très diverses.

Nous avons recherché un autre test permettant d'évaluer le nombre des cellules intactes. Le plus simple nous a semblé être la mesure de la viabilité des cellules. La comparaison des nombres de cellules par numération totale et numération viable, nous a montré qu'au moment de la lyse, le premier diminuait nettement alors que le second restait pratiquement le même. Cette dissociation entre les deux modes

de numération, nous a fait reprendre l'étude de l'activité en fonction du nombre de cellules de la préparation, mais cette fois en nous basant sur le nombre de cellules viables.

B . SPHEROPLASTES RESTES VIABLES DANS LE P1

Nous venons de voir les raisons pour lesquelles nous avons substitué, dans notre étude sur la préparation P1, la numération des germes sur boîte de Pétri, à celle réalisée en cellule de Thoma.

Nous avons dénombré, par cette technique, le nombre de cellules viables en début et en fin de neuf préparations P1 différentes. Les rapports exprimés en pour cent du nombre de cellules viables d'une préparation P1 au nombre correspondant de bactéries initiales, sont consignés dans la troisième colonne du tableau VIII. La moyenne des pourcentages qui est de 1,07 lorsque les germes sont numérés en cellule de Thoma (tableau V) n'est plus que de 0,104 lorsque les cellules viables sont seules numérées. Cette chute importante nous a incité, avant de rechercher l'existence d'une relation entre le nombre de cellules viables dans le P1 et son pouvoir de synthèse, à déterminer la cause des différences observées entre les résultats donnés par les deux types de numération. En effet, il semblait anormal d'obtenir pour la même prépa-

TABLEAU VIII

Les chiffres de la dernière colonne indiquent le pourcentage de cellules viables du P1 par rapport à la quantité de bactéries initiales.

Exp.	Nombre de bact. pour 1 l de milieu SP2	Nombre de cell. viables du P1 correspondant	<u>cell. du P1</u> <u>bact. initiales</u> en p. 100
0408	$5 \cdot 10^{10}$	$6,5 \cdot 10^7$	0,13
1908	$7 \cdot 10^{10}$	$4 \cdot 10^7$	0,057
1509	$1,5 \cdot 10^{11}$	$1,35 \cdot 10^8$	0,09
2109	$9 \cdot 10^{10}$	$1,20 \cdot 10^8$	0,13
2911	$2,4 \cdot 10^{11}$	$1,60 \cdot 10^8$	0,06
0301	$2,3 \cdot 10^{11}$	$1,47 \cdot 10^8$	0,06
2102	$2,4 \cdot 10^{11}$	$2,30 \cdot 10^8$	0,09
0703	$2,5 \cdot 10^{11}$	$1,80 \cdot 10^8$	0,07
2003	$1,5 \cdot 10^{11}$	$4 \cdot 10^8$	0,26

ration P1 des nombres variant de 1 à 10, selon le type de numération envisagée, bien qu'en début de préparation, les numérations des bactéries viables ou totales donnaient sensiblement les mêmes résultats.

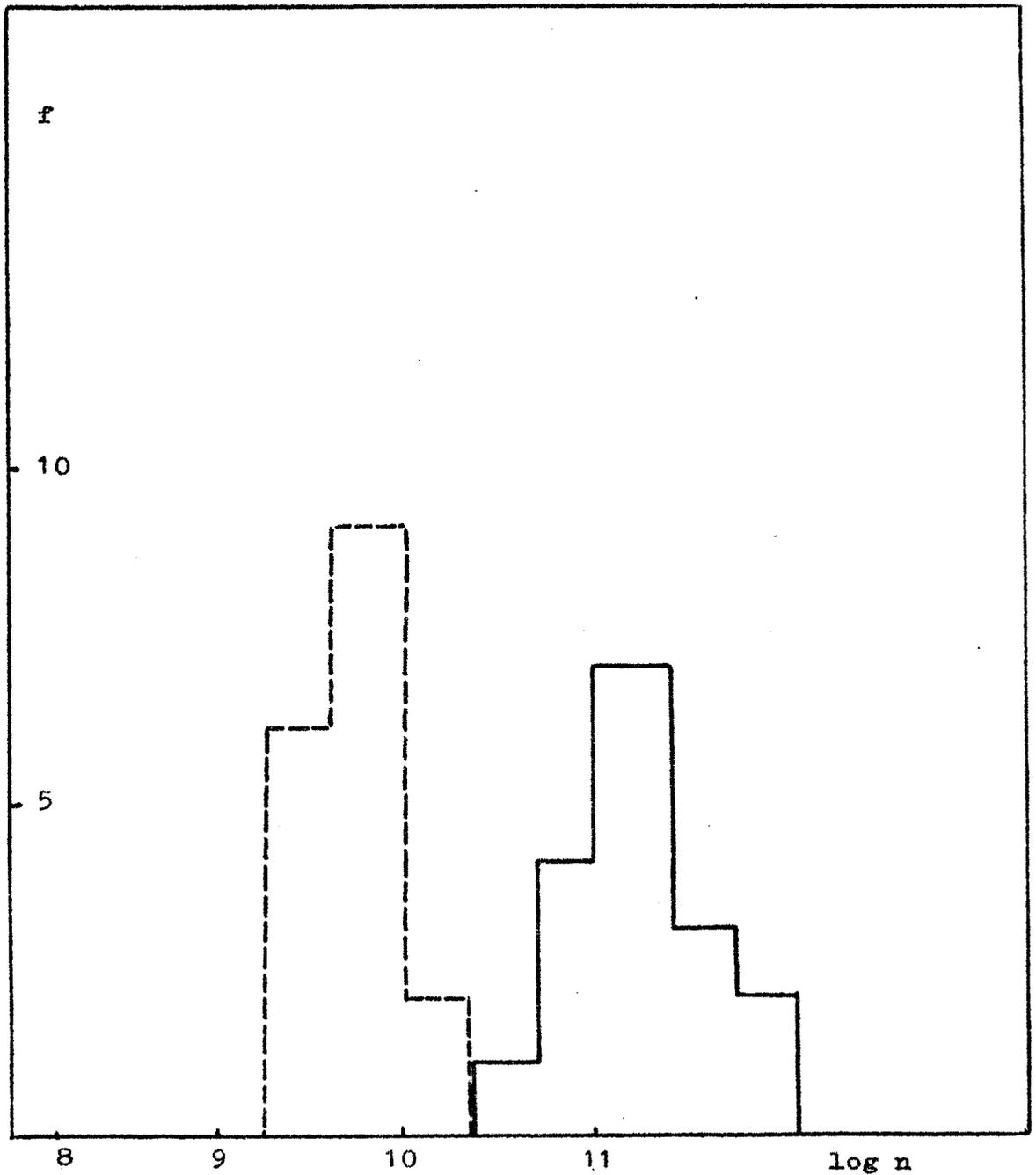
1 . Evolution du nombre de cellules viables au cours de la préparation du P1

Nous avons déterminé au cours de plusieurs préparations P1, et à chaque étape de ces préparations (stade bactéries, sphéroplastés avant lavage ; sphéroplastés après lavage , lysat, P1 proprement dit) le nombre total de cellules viables. Nous avons réuni les résultats des différentes numérations effectuées à un même stade sur diverses préparations de P1, et nous avons réalisé l'histogramme correspondant à chacun de ces stades. Nous comparons sur chaque figure les deux histogrammes provenant de deux étapes successives. Le nombre de germes viables est exprimé en logarithme. Nous avons choisi les limites réelles pour déterminer les classes et convenu que la limite supérieure d'une classe appartenait à la classe suivante. L'intervalle de classe est ici de 0,333.

Les différents histogrammes obtenus sont représentés sur la figure 12 (a, b, c, d, e). Nous comparons sur la figure 12a, les nombres des germes viables au départ des

Figure 12a

En trait plein, histogramme correspondant au stade bactéries des préparations P1
En pointillés, histogramme correspondant au stade sphéroplastes avant lavage des préparations P1.

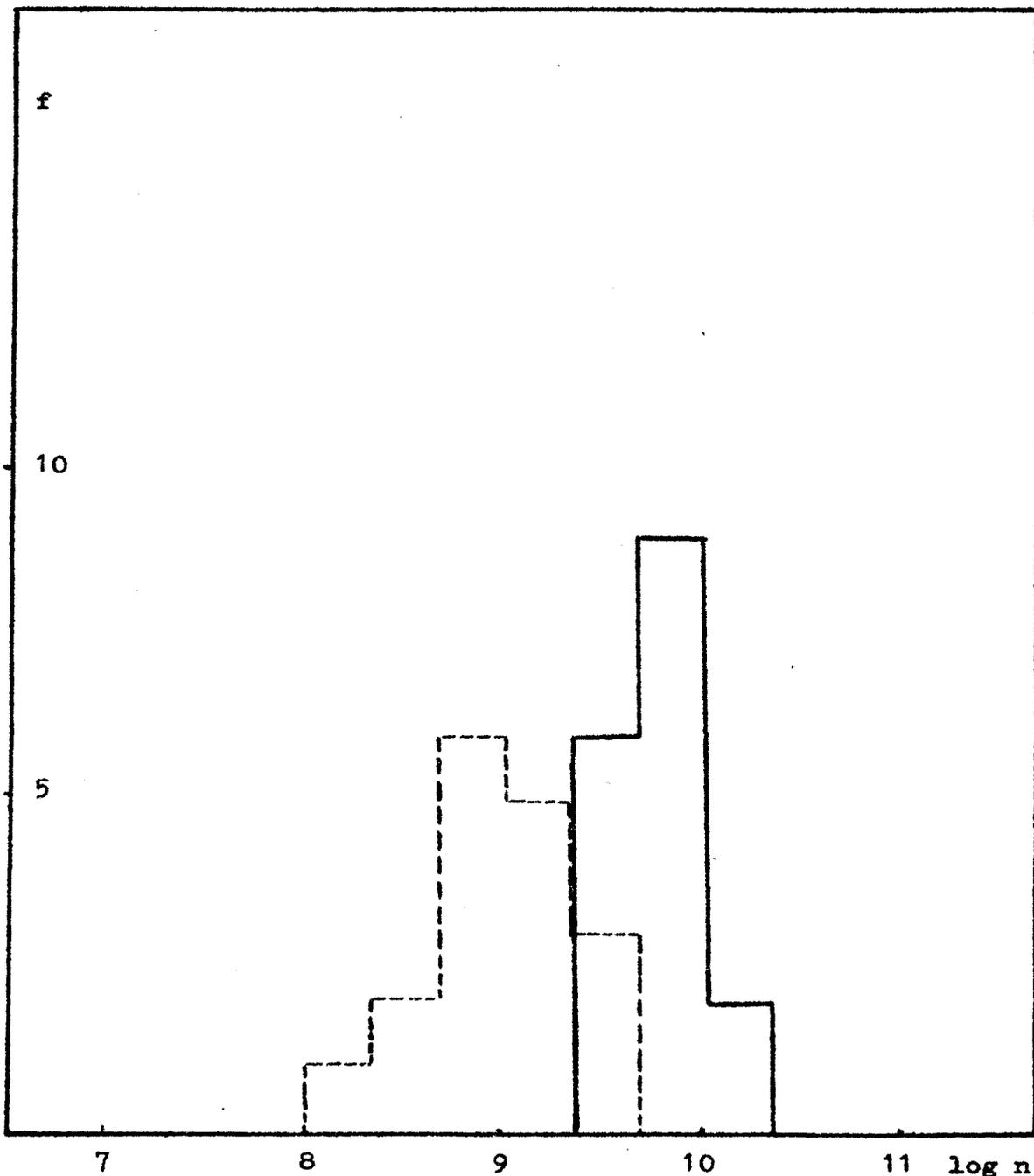


En abscisse on a porté le logarithme du nombre de cellules viables ($\log n$).
En ordonnée on a porté la fréquence de la classe correspondante (f).

préparations (stade bactéries) avec ceux du deuxième stade (sphéroplastés avant lavage). Nous constatons dans ce cas, que sous l'action de la pénicilline, la transformation des bactéries en sphéroplastés est responsable de la perte de la viabilité pour 90 p. 100 de germes ; nous verrons ultérieurement quelle destinée est réservée à ces cellules. La figure 12b, rend compte de la comparaison effectuée entre les sphéroplastés avant lavage et après lavage. Ici encore la perte de la viabilité cellulaire, moins prononcée que dans le cas précédent, est encore très importante. L'examen de la figure 12c, est particulièrement intéressant ; il permet de comparer le nombre de sphéroplastés dénombrés avant et après la lyse digitonine. Ce nombre reste pratiquement constant dans nos conditions expérimentales, c'est-à-dire après une lyse d'une heure ; les cellules viables sont donc pratiquement insensibles à l'action de la digitonine et la diminution de la densité optique du lysat observé précédemment en cours de lyse s'explique par la lyse des sphéroplastés non viables. Or, la lyse des sphéroplastés par l'emploi de détergents doux, est considérée comme le fait capital de la préparation du P1 : en effet, c'est à ce niveau que la suspension cellulaire s'éclaircit et s'homogénéise. Nos constatations démontrent l'inefficacité des tensioactifs vis-à-vis des cellules viables, leur activité se limitant à lyser les sphéro-

Figure 12b

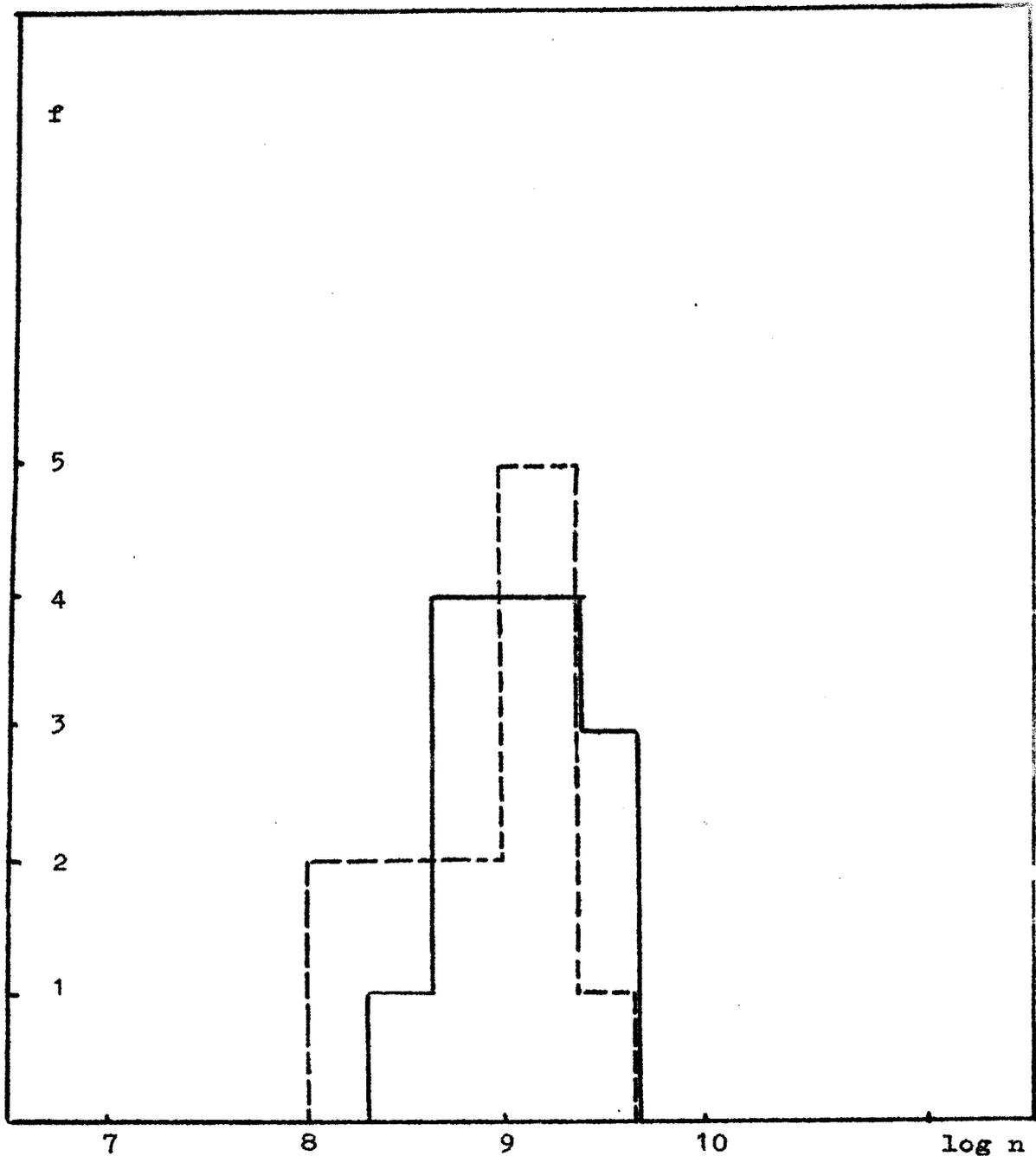
En trait plein, histogramme correspondant au stade sphéro-plastes avant lavage des préparations P1.
En pointillés, histogramme correspondant aux mêmes sphéro-plastes après lavage.



En abscisse on a porté le logarithme du nombre de cellules viables ($\log n$).
En ordonnée on a porté la fréquence de la classe correspondante (f).

Figure 12c

En trait plein, histogramme correspondant au stade sphéroplastes après lavage.
En pointillés, histogramme correspondant au stade de la lyse.



En abscisse on a porté le logarithme du nombre de cellules viables ($\log n$).

En ordonnée on a porté la fréquence de la classe correspondante (f).

plastés en mauvais état. Les deux derniers stades de la préparation du P1 sont représentés sur la figure 12d. Nous observons ici une lyse provoquée par le traitement mécanique auquel la préparation P1 est soumise (homogénéisations avec pipette à boule, centrifugations). Enfin, nous avons représenté sur la dernière figure (12e) les histogrammes correspondant aux bactéries initiales et aux cellules viables du P1 ; 1 p. 1000 des cellules initiales sont encore viables à la fin de la préparation, et cela de manière constante. Il est intéressant de déterminer la nature de ces germes viables, sur lesquels les divers traitements mis en oeuvre au cours de la préparation P1 étaient restés sans effet. Ils peuvent être constitués par des sphéroplastés dont les enveloppes plus résistantes les ont protégés de la lyse, ou bien de bactéries dont la transformation en sphéroplastés sous l'action de la pénicilline s'effectue mal ; il suffit, comme nous l'avons montré antérieurement avec Guillaume et Martin (78) d'effectuer les dilutions nécessaires aux numérations dans le milieu I, d'une part, et dans l'eau d'autre part. Les sphéroplastés se lysant presque instantanément dans un milieu hypotonique, ici l'eau, le résultat de la division du nombre de germes viables après dilution dans l'eau par celui après dilution dans le milieu I, indique l'état de transformation de la préparation cellulaire. Nous avons exprimé ce quotient

Figure 12d

En trait plein, histogramme correspondant au stade de la lyse.
En pointillés, histogramme correspondant au stade final des préparations P1.

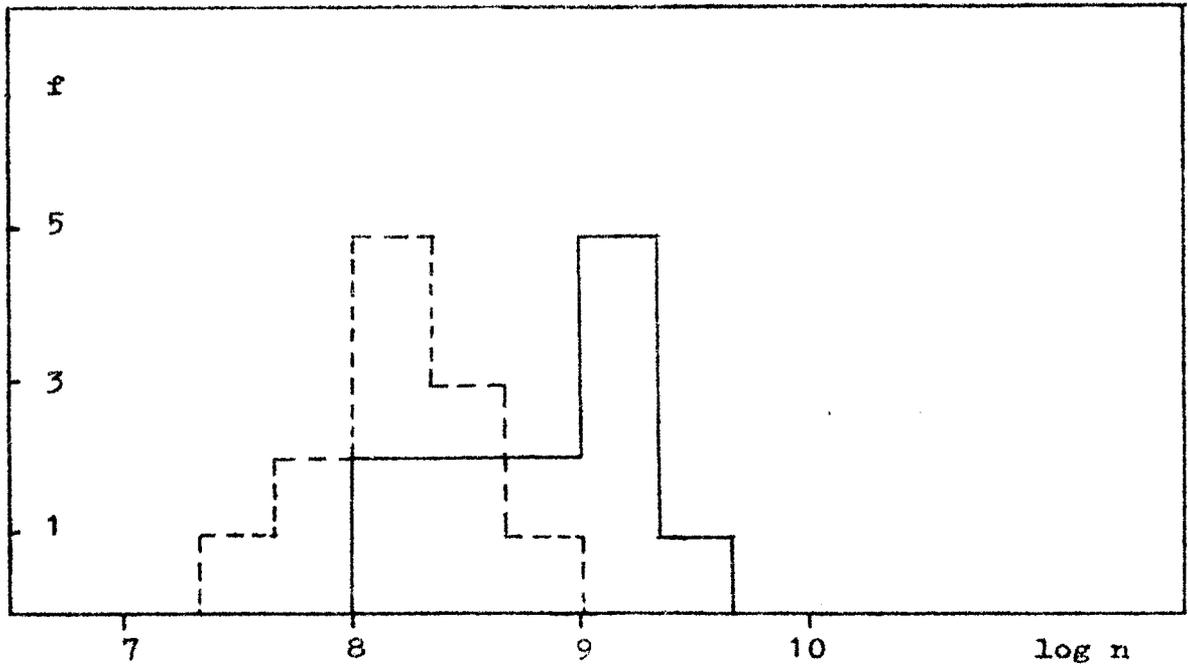
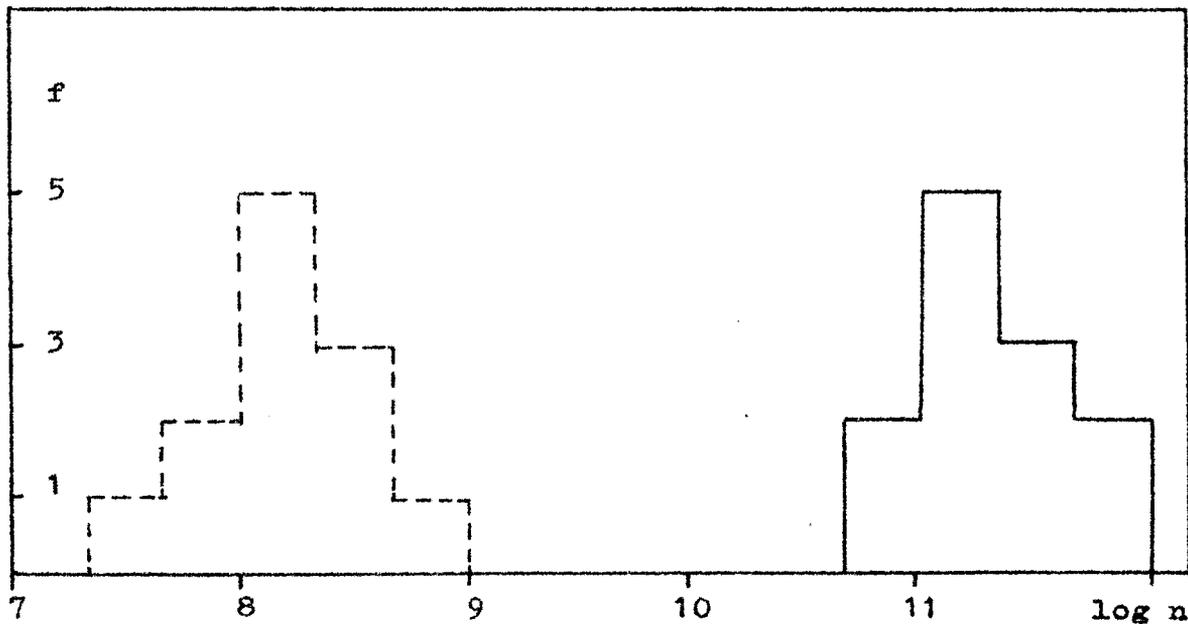


Figure 12e

En trait plein, histogramme correspondant au stade bactéries
des préparations P1.
En pointillés, histogramme correspondant au stade final des
préparations P1.



en pourcentage pour divers P1 dans le tableau IX : il montre que les cellules viables résiduelles de la préparation P1 sont formées presque exclusivement de sphéroplastes et non de bactéries.

2 . Comparaison aux différentes étapes de la préparation P1 entre le nombre de germes viables et le nombre de cellules numérees en cellule de Thoma

Nous venons de voir que la préparation P1 achevée renfermait environ 1 p. 1000 des germes viables initiaux. En comparant sur la première partie du tableau X, le nombre de bactéries numérees en cellule de Thoma, en début et en fin de préparation, nous constatons que le P1 renferme plus de 9 p. 1000 de sphéroplastes. Il suffit de comparer, en se reportant aux deux parties du tableau X, les moyennes des résultats obtenus au cours de différentes préparations P1, pour observer l'existence de deux différences essentielles entre les deux types de numérations :

- La première est relative à la transformation des bactéries en sphéroplastes sous l'effet de la pénicilline. La diminution du nombre de cellules viables est près de 7 fois supérieure à celle enregistrée pour les germes dénombrés en cellule de Thoma. C'est à ce niveau que s'observe la diffé-

TABLEAU IX

Les chiffres de la dernière colonne indiquent le pourcentage de cellules viables de divers P1 après dilution dans l'eau par rapport au nombre de cellules viables après dilution dans le milieu I de ces mêmes P1.

Exp.	Nombre de cell. viables après dilution dans le milieu I	Nombre de cell. viables après dilution dans l'eau	<u>cell. dans l'eau</u> cell. dans milieu I en p. 100
2109	$1,2 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^6$	1,66
1312	$2,2 \cdot 10^8$	$6 \cdot 10^5$	0,27
1912	$3,9 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^6$	0,46
2812	$6 \cdot 10^7$	$2,6 \cdot 10^5$	0,43
3001	$4 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^5$	1,75
2003	$4 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^6$	0,52

TABLEAU IX

Les chiffres de la dernière colonne indiquent le pourcentage de cellules viables de divers P1 après dilution dans l'eau par rapport au nombre de cellules viables après dilution dans le milieu I de ces mêmes P1.

Exp.	Nombre de cell. viables après dilution dans le milieu I	Nombre de cell. viables après dilution dans l'eau	<u>cell. dans l'eau</u> cell. dans milieu I en p. 100
2109	$1,2 \cdot 10^8$	$2 \cdot 10^6$	1,66
1312	$2,2 \cdot 10^8$	$6 \cdot 10^5$	0,27
1912	$3,9 \cdot 10^8$	$1,8 \cdot 10^6$	0,46
2812	$6 \cdot 10^7$	$2,6 \cdot 10^5$	0,43
3001	$4 \cdot 10^7$	$7 \cdot 10^5$	1,75
2003	$4 \cdot 10^8$	$2,1 \cdot 10^6$	0,52

TABLEAU X

Comparaison entre les deux types de numération (en cellule de Thoma et sur boîtes de Petri) de l'évolution du nombre total de cellules au cours de différentes préparations P1.

	Exp.	Bactéries	Sphéroplastés avant lavage	Sphéroplastés après lavage	lyse	P 1
I Numération en cellule de Thoma	0112	$7,4 \cdot 10^{10}$	$3,7 \cdot 10^{10}$	$2,6 \cdot 10^{10}$	$1 \cdot 10^{10}$	$3,5 \cdot 10^9$
	0712	$2,6 \cdot 10^{11}$	$1,6 \cdot 10^{11}$	$2,2 \cdot 10^{10}$	$2 \cdot 10^{10}$	$1,2 \cdot 10^9$
	0301	$2,7 \cdot 10^{11}$	$2,4 \cdot 10^{11}$	$1,3 \cdot 10^{10}$	$1,3 \cdot 10^{10}$	$2 \cdot 10^8$
	2102	$3,5 \cdot 10^{11}$	$1,3 \cdot 10^{11}$	$3,4 \cdot 10^{10}$	$8 \cdot 10^9$	$2,1 \cdot 10^8$
	0703	$1,9 \cdot 10^{11}$	$7,5 \cdot 10^{10}$	$1,9 \cdot 10^{10}$	$1 \cdot 10^{10}$	$5,3 \cdot 10^9$
	moyenne		$2,28 \cdot 10^{11}$	$1,28 \cdot 10^{11}$	$2,28 \cdot 10^{10}$	$1,22 \cdot 10^{10}$
II Numération sur boîtes de Pétri	0112	$8 \cdot 10^{10}$	$1,05 \cdot 10^{10}$	$3,6 \cdot 10^9$	$2,4 \cdot 10^9$	$5 \cdot 10^8$
	0712	$2,3 \cdot 10^{11}$	$3,75 \cdot 10^9$	$7,5 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^8$	$1,2 \cdot 10^8$
	0702	$1,2 \cdot 10^{11}$	$5,3 \cdot 10^9$	$3 \cdot 10^9$	$4 \cdot 10^9$	$3,4 \cdot 10^8$
	2102	$2,4 \cdot 10^{11}$	$5,4 \cdot 10^9$	$2,4 \cdot 10^9$	$2,1 \cdot 10^9$	$2,3 \cdot 10^8$
	0703	$2,55 \cdot 10^{11}$	$3,9 \cdot 10^{10}$	$6,6 \cdot 10^9$	$8 \cdot 10^9$	$1,8 \cdot 10^8$
	moyenne		$1,85 \cdot 10^{11}$	$1,28 \cdot 10^{10}$	$3,27 \cdot 10^9$	$3,4 \cdot 10^9$

rence la plus caractéristique entre les deux types de numération.

- la deuxième confirme ce que nous avons décrit plus haut au sujet de la lyse proprement dite : la digitonine inactive sur les cellules viables, lyse dans des proportions de 50 à 80 p. 100 les cellules numérées optiquement.

3 . Relation entre l'activité de synthèse et le nombre de germes viables dans le P1

Nous avons d'abord recherché, en fonction du nombre de germes viables, ce que devenait aux diverses étapes d'une préparation P1 le pouvoir de synthèse. La première expérience du tableau XI montre que, ramené à 10^5 germes viables, le pouvoir de synthèse des sphéroplastes lavés, du lysat ou du P1 lui-même, est identique. Il est par conséquent proportionnel au nombre de cellules viables rencontrées au cours d'une préparation. La deuxième expérience confirme ces résultats. Il n'a pas été possible, dans nos conditions expérimentales, de déterminer l'activité totale que donneraient les bactéries de départ. En effet, durant les cinq ou sept heures d'incubation, elles continuent à se multiplier, enlevant toute valeur aux numérations. Mais, si on réalise leur incubation en présence de pénicilline, dans les mêmes condi-

TABLEAU XI

Détermination de l'activité phosphatasique en fonction des cellules dénombrées d'une part sur boîtes de Pétri et d'autre part en cellule de Thoma au cours de différents stades de la préparation F1. Les valeurs indiquées sont ramenées à celles que l'on obtiendrait en incubant la totalité des sphéroplastes du lysat ou du F1 préparés à partir d'une culture d'un litre de SP2.

Exp.	Incubation de	U PA synthétisée après 7h incubation	Nombre de cell. viables	U PA synthétisée par 10 ⁵ cell. viables	Numération en cell. de Thoma	
					Nombre de cell.	U PA synthétisée par 10 ⁵ cell.
1403	Sphéro. lavés	590 000	9.10 ⁸	65,5	2,35.10 ¹⁰	2,51
	Lysat	292 000	4,2.10 ⁸	69,7	1,05.10 ¹⁰	2,78
	P 1	99 000	1,4.10 ⁸	70,7	3,4.10 ⁹	2,89
2802	Sphéro. lavés	1 080 000	1,35.10 ⁹	80		
	P 1	180 600	2,4 .10 ⁸	75,2		

tions que celles observées pour les sphéroplastes lavés ou du P1, le milieu d'incubation contient un mélange de bactéries, de sphéroplastes et de lysat dont l'activité ne peut être prise en considération. L'ensemble de ces faits tend à démontrer que seuls les germes viables du P1 sont responsables de la synthèse qui s'y produit, car il ne nous a pas été possible, pour une même préparation, de mettre en évidence une discordance entre la synthèse réalisée et le nombre de germes viables.

Nous venons d'étudier comment évolue, au sein d'une même préparation P1, le pouvoir de synthèse. Il fallait compléter cette étude en comparant entre elles les activités de différentes préparations de P1, celles-ci étant toujours exprimées en fonction du nombre de germes viables. Nous pensons que ces comparaisons sont valables puisque les préparations de P1 et les incubations sont toujours réalisées dans les mêmes conditions expérimentales.

Nous avons résumé sur le tableau XII les résultats de quinze expériences différentes (numérotées de 1 à 15). Le nombre de germes viables contenus dans les incubations est inscrit dans la première colonne verticale. Dans les trois colonnes suivantes, nous trouvons successivement pour une incubation de cinq heures : le nombre d'unités phosphatasiques synthétisées, ce même nombre ramené à 10^5 cellules viables et

TABLEAU XII

Comparaison des activités phosphatasiques de différentes préparations P1 après 5 h ou 7 h d'incubation (colonnes 2 et 5). Cette activité est d'une part ramenée à 10^5 cellules (colonnes 3 et 6) et d'autre part calculée en fonction de la concentration en protéines du milieu exprimée en mg/ml (colonnes 4 et 7). L'activité de départ est soustraite de celle observée après 5 h ou 7 h d'incubation (ΔU PA 5 h ou ΔU PA 7 h).

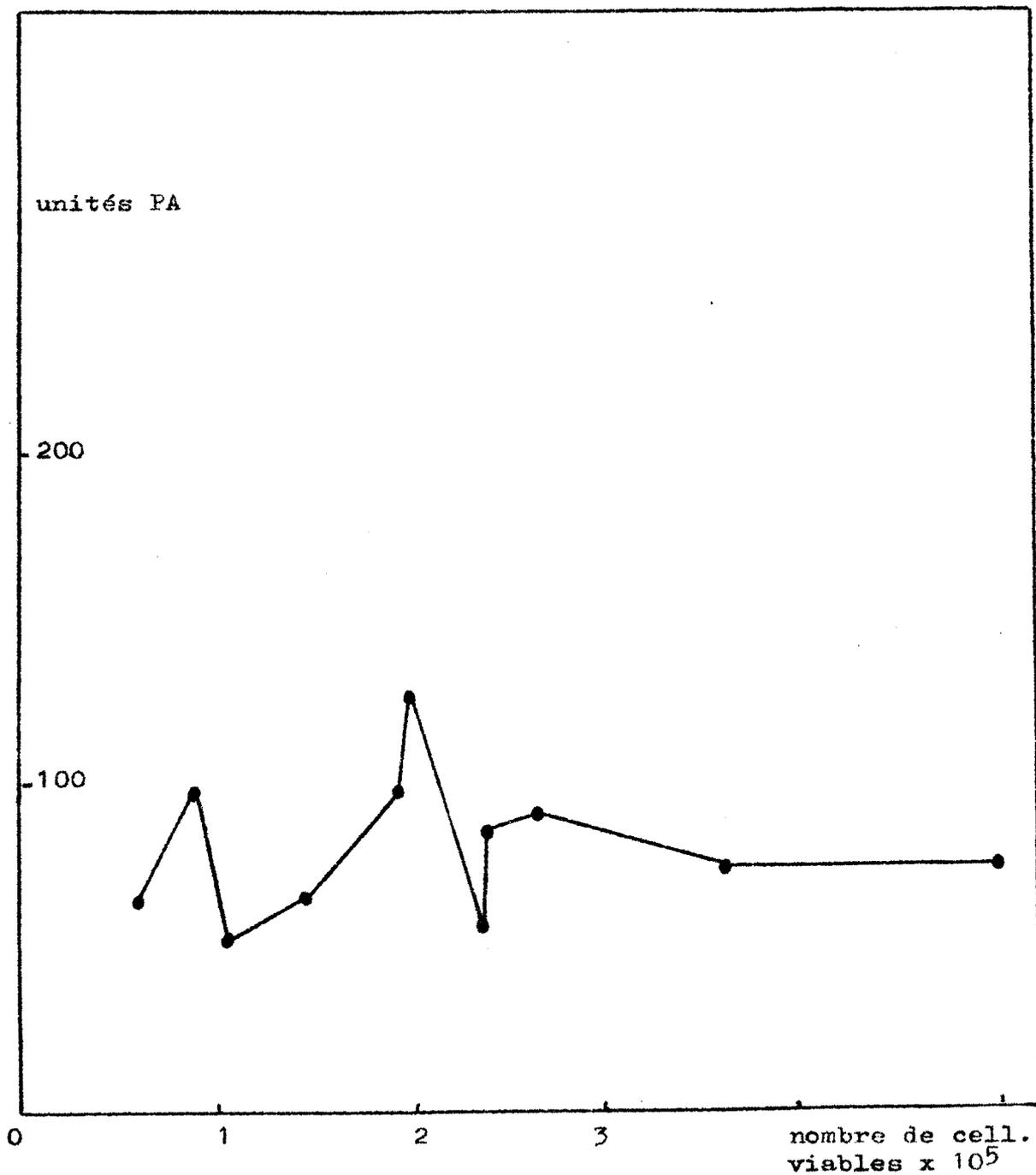
Exp.	Nombre de cell. dans l'incubation	ΔU PA 5 h	$\frac{\Delta U \text{ PA 5 h}}{10^5 \text{ cell.}}$	$\frac{\Delta U \text{ PA 5 h}}{\text{protéines}}$	ΔU PA 7 h	$\frac{\Delta U \text{ PA 7 h}}{10^5 \text{ cell.}}$	$\frac{\Delta U \text{ PA 7 h}}{\text{protéines}}$
1	$2 \cdot 10^5$	129,4	64,7	2303			
2	$2,35 \cdot 10^5$	56,5	24	504			
3	$1,45 \cdot 10^5$	65,5	45,1	1169	108,8	74,4	1928
4	$0,90 \cdot 10^5$	98,4	109,3	1951			
5	$0,60 \cdot 10^5$	64	106,6	520			
6	$5 \cdot 10^5$	76,8	15,3	853	176	35,2	1955
7	$1,05 \cdot 10^5$	52,8	50,2	550	64	60,9	666
8	$3,60 \cdot 10^5$	75,2	20,8	626	128	32,7	1066
9	$2,65 \cdot 10^5$	92,8	33	828			
10	$2,75 \cdot 10^5$				100,8	36,6	1625
11	$1,87 \cdot 10^5$	96	51,3	1200	315,2	168	3940
12	$2,30 \cdot 10^5$				291	126	3383
13	$3,15 \cdot 10^5$				105	33,3	972
14	$2,40 \cdot 10^5$	87	36,2	750	225,6	94	1943
15	$5,50 \cdot 10^5$				352	64	2838
colonne	1	2	3	4	5	6	7

la valeur de l'activité phosphatasique par rapport à la concentration en protéines du milieu exprimé en mg/ml. Les trois dernières colonnes expriment les résultats obtenus après des incubations de 7 heures. Nous remarquons immédiatement l'extrême diversité des résultats lorsque l'activité est exprimée en fonction du nombre de germes vivants. Après cinq heures d'incubation et pour 10^5 germes, 24 unités phosphatasiques sont synthétisées dans l'expérience n° 2 et 109 dans l'expérience n°4 ; c'est-à-dire environ quatre fois plus. On retrouve les mêmes variations pour des incubations de 7 heures: il y a cinq fois plus d'unités phosphatasiques synthétisées dans l'expérience n°11 que dans l'expérience n°8. Comme il est assez surprenant qu'un même nombre de germes puisse avoir dans les mêmes conditions une activité quintuple d'une expérience à l'autre, on peut se demander si ces discordances ne sont pas la preuve que le P1 effectue une synthèse "in vitro". De plus, en comparant les incubations 4 et 7, on remarque que pour un nombre de germes initial sensiblement identique ($0,9 \cdot 10^5$; $1,05 \cdot 10^5$) l'activité phosphatasique exprimée en fonction de la concentration en protéines du milieu varie dans un rapport de 1 à 5.

Enfin, nous avons représenté sur la figure 13, l'activité de différentes préparations P1 en fonction du nombre des germes viables qu'elles contiennent. On constate que

Figure 13

Activité phosphatasique de différentes préparations P1 en fonction du nombre de cellules viables qu'elles contiennent.



l'activité de synthèse reste relativement stable, alors que le nombre total de germes viables augmente. Il ne peut s'agir d'une absence de substrat dans le milieu pour les fortes concentrations en cellules : en effet, un nombre de germes de l'ordre de 5.10^5 n'est pas capable d'épuiser le milieu nutritif dans nos conditions d'incubation.

Tous ces faits contredisent nos conclusions du paragraphe précédent et semblent indiquer qu'une synthèse indépendante s'effectue en même temps que celle réalisée par les cellules viables. Il fallait chercher à dissocier le mélange F1 et germes viables pour étudier séparément l'activité des deux composants.

II . DISSOCIATION DE L'ACTIVITE DE SYNTHÈSE DES SPHEROPLASTES
DE CELLE DES PARTICULES SURCELLULAIRES

Nous avons vu que pour une même préparation de P1, le pouvoir de synthèse était toujours proportionnel au nombre de cellules viables contenues dans la préparation.

Nous avons modifié toute une série de facteurs, dans le but d'essayer de dissocier l'activité de synthèse des sphéroplastes de celle des particules P1.

Nous avons d'abord tenté de séparer les particules des cellules intactes par les procédés classiques de séparation comme la filtration ou la centrifugation ; puis, devant l'insuccès de ces procédés, nous avons recherché si les techniques physiques ou enzymatiques de destruction n'étaient pas capables d'altérer spécifiquement soit les cellules, soit les particules. Enfin, nous avons été amené à utiliser des artifices techniques basés sur les propriétés des sphéroplastes de se lyser dans les milieux d'incubation.

A . ESSAIS PRELIMINAIRES

1 . Procédés physiques de séparation

a / Filtration sur membranes millipore

Elle s'est d'emblée révélée décevante. En effet, pour être efficace, le type de filtre qu'il faut utiliser doit retenir les bactéries et les sphéroplastes. La préparation P1, du fait de sa haute teneur en DNA et de sa forte concentration en saccharose (0,5 M) est une solution visqueuse formant feutrage avec les particules. Dans ces conditions, le filtre se colmate immédiatement.

b / Centrifugation en gradient de saccharose

- Gradient discontinu

Nous introduisons successivement dans un tube à centrifuger, en évitant de mélanger :

- 3 ml d'une solution de saccharose à 70 p. 100, 0,015M en ions Mg^{2+} , 0,02M en Tris pH 7,3, et contenant 2000 unités par ml de pénicilline.
- 3 ml d'une solution de saccharose à 50 p. 100 ayant les mêmes caractéristiques
- 3 ml de la préparation P1

Les concentrations de saccharose employées peuvent surprendre. Elles découlent cependant de la nature même du P1 qui est un matériel dense. Ici encore, la viscosité du P1, provenant de sa teneur en DNA, et les fortes concentrations en saccharose nécessaires expliquent les difficultés rencontrées dans ces essais de purification du P1. Par ailleurs, nous avons souvent remarqué que les concentrations élevées en saccharose inhibaient le pouvoir de synthèse de la préparation. Ce fait vient compliquer le problème : les fractions inactives recueillies après centrifugation ne le sont-elles pas justement à cause de leur richesse en saccharose ? Après une centrifugation de 45 minutes à 900 g, la DO 610 des 3 ml de la préparation P1 déposés sur le gradient, a diminué. L'observation en microscopie optique y montre les particules caractéristiques du P1. Puis au niveau de la première interphase, en partant du sommet, se trouvent rassemblés des sphéroplastes abimés, divers fragments provenant de leur lyse et les plus grosses particules du P1 ; au niveau de la deuxième interphase, on observe essentiellement un mélange de sphéroplastes abimés et intacts. Ces différentes fractions sont testées soit seules, soit réassociées entre elles, dans les conditions habituelles. Dans tous les cas, l'activité phosphatasique est devenue nulle ou insignifiante par rapport à la préparation P1 d'où elles proviennent. Malgré ces résultats décevants, nous avons essayé d'u-

tiliser un gradient continu de saccharose.

- Gradient continu de saccharose

La suspension des particules P1 en milieu I est déposée sur un gradient de saccharose préformé de concentrations extrêmes 20 - 70 p. 100 avec les mêmes concentrations en Tris et ions Mg^{2+} que précédemment. Après 45 minutes de centrifugation à 56.000 g en couronne Spinco SW 25, le gradient est collecté par fractions de 1,5 ml qui sont ensuite testées avec le milieu habituel d'incubation. L'activité nulle ou faible, est répartie au long du gradient et nous ne pouvons mettre en évidence des fractions ayant conservé un pouvoir de synthèse convenable.

Il faut noter que ces divers procédés donnent, d'une expérience à l'autre, des résultats inconstants. Il est difficile d'obtenir une séparation identique avec des préparations P1 différentes. Les variations sont dues aux fortes concentrations de DNA du P1. Lors des centrifugations le DNA entraîne à la fois les sphéroplastes et le P1. La microscopie électronique permet d'apprécier l'importance du DNA mélangé aux cellules et aux particules lors de leur centrifugation (planche 4).

2 . Procédés de destruction

a / Procédés physiques

Nous avons, à l'aide de ces procédés, tenté d'abaisser, soit le nombre de germes viables du P1, soit son pouvoir de synthèse.

- Congélation

Nous avons remarqué que par congélation à basse température, une grande partie des cellules directement numérables, disparaissait.

Pour réaliser cette congélation, la préparation P1 est répartie par fraction de 2 ml dans les tubes de 1 cm de diamètre. Les tubes sont plongés dans l'azote liquide durant cinq minutes. Ils sont ensuite décongelés lentement de sorte que la température ne dépasse jamais 4°C à l'intérieur du tube. Les numérations des germes viables sont faites avant et après congélation. Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau XIII.

Les activités des différents P1 ayant subi la congélation sont variables : elles passent de 2,5 à 60 p. 100 de l'activité initiale, mais restent dans tous les cas sensiblement proportionnelles au nombre de germes viables.

TABLEAU XIII

Influence de la congélation et de la sonnation sur l'activité phosphatasique de divers P1 après 5 h ou 7 h d'incubation (colonnes 2 et 4). Cette activité est ramenée à 10^5 cellules viables dans les colonnes 3 et 5. Les activités de départ sont soustraites de celles observées en fin d'incubation ($\Delta U PA$).

Exp.	Incubation	Nombre de cell. viables	$\Delta U PA$ 5 h	$\frac{\Delta U PA}{10^5 \text{ cell.}}$ 5 h	$\Delta U PA$ 7 h	$\frac{\Delta U PA}{10^5 \text{ cell.}}$ 7 h
2109	P1	$4,25 \cdot 10^5$	52,8	12,4		
	P1 congelé	$2,50 \cdot 10^5$	31,2	12,5		
0911	P1	$3,25 \cdot 10^5$			156	48
	P1 congelé	$1,10 \cdot 10^4$			3,8	35
1611	P1	$6 \cdot 10^5$			155	25,8
	P1 congelé	$2,75 \cdot 10^5$			57,8	20,9
1811	P1	$5,20 \cdot 10^5$	92,8	17,8		
	P1 congelé	$9,50 \cdot 10^4$	16	16,8		
0410	P1	$0,60 \cdot 10^5$	64	106		
	P1 sonné	$0,04 \cdot 10^5$	3,9	97		
colonne		1	2	3	4	5



- Sonnation

Des résultats semblables s'obtiennent lorsque l'incubation est réalisée avec du P1 préalablement soumis à la sonnation, à l'aide du Raytheon Sonic Oscillator 10 kc (dernière expérience du tableau XIII). Après sonnation du P1, le rapport de l'activité au nombre de germes viables reste le même. Ces résultats ne peuvent s'expliquer que par un comportement identique des sphéroplastes et des particules cellulaires vis-à-vis des divers traitements employés.

b / Procédés chimiques

- Désoxyribonucléase

Nous avons essayé en soumettant le P1 à l'action de la désoxyribonucléase, de diminuer le pouvoir de synthèse des particules, sans modifier le nombre de cellules viables. Les sphéroplastes viables ne sont pas touchés par ce traitement, mais l'activité de synthèse reste le plus souvent inchangée. Nous devons faire agir la DNase à 0°C (50 µg par ml durant 12 heures en milieu I), car à température plus élevée, une préparation témoin non traitée par l'enzyme, perd toute activité. L'action de la DNase est inconstante et les variations observées peuvent s'expliquer par la grande quantité de DNA que renferme la préparation P1. Le DNA fonc-

tionnel localisé au niveau des particules serait masqué par le DNA libre du milieu. Nous reverrons ce problème d'une manière plus détaillée lors de l'étude de l'action de la DNase sur l'activité du P1, dans le chapitre IV.

c / Vieillissement

- en milieu I à 0°C

Ayant remarqué que la préparation P1 conservée à 0°C dans le milieu I, gardait une activité sensiblement constante durant plusieurs jours, nous avons recherché comment évoluait au cours de cette période le nombre de germes viables. Les résultats rassemblés dans le tableau XIV, montrent que l'activité de différentes préparations P1 ramenée à 10^5 germes viables, reste constante après un vieillissement de 84 heures pour la préparation 2109, qu'elle a augmenté après 60 heures pour la préparation 0310, alors qu'elle diminue dans le même temps pour l'expérience 2003. Au cours du vieillissement, le nombre de cellules viables diminue peu et ces expériences ne permettent pas de dissocier leur pouvoir de synthèse de celui des particules.

- en milieu d'incubation à 30°C

Le vieillissement en milieu I à 0°C n'ayant donné aucun résultat, tandis que par conservation dans ce milieu à température plus élevée, toute activité est détruite, nous

TABEAU XIV

Influence du vieillissement sur le nombre de cellules viables et l'activité de synthèse de divers P1. Dans les deux dernières colonnes la phosphatase synthétisée après 5 h ou 7 h d'incubation a été ramenée à 10⁵ cellules viables.

Exp.	Age de la préparation en h	Nombre de cell. dans 0,25 ml d'incubation	$\frac{\Delta U_{PA} 5 h}{10^5 \text{ cell.}}$	$\frac{\Delta U_{PA} 7 h}{10^5 \text{ cell.}}$
1209	12	2,35.10 ⁵	23,8	
	36	1,85.10 ⁵	39	
2109	12	1,42.10 ⁵	89	119
	36	1,65.10 ⁵	84,3	109
	84	1,30.10 ⁵	78,9	
0310	12	0,60.10 ⁵	106	
	36	0,43.10 ⁵	144	
	60	0,35.10 ⁵	169	
	84	0,36.10 ⁵	68	
1810	12	1,05.10 ⁵	50,2	60,9
	36	1,10.10 ⁵	18,1	41,4
2702	12	2,10.10 ⁵		79,2
	36	3,10.10 ⁵		85
2003	12	2,50.10 ⁵	51,2	128
	36	2,25.10 ⁵		127
	60	2,75.10 ⁵		26,1

avons cherché quel était l'effet de l'incubation dans le milieu de synthèse sur la survie des sphéroplastés.

Sur les figures 14 et 15, nous avons représenté en fonction du temps d'incubation, le nombre de cellules restées viables, et la cinétique de la synthèse de la phosphatase alcaline. Les cellules viables numérotées au commencement de l'incubation disparaissent rapidement, alors que la vitesse de synthèse de l'enzyme, après la phase de latence, est sensiblement constante. Dans l'expérience décrite figure 14, après 2 h 30 min d'incubation, le nombre de germes viables correspond au tiers de celui du départ, par contre il diminue considérablement dans l'expérience de la figure 15, puisqu'il passe de $7 \cdot 10^4$ à $2 \cdot 10^2$, après 5 heures d'incubation, moment où débute la synthèse de l'enzyme active. Dans ce dernier cas, lorsque la phase de latence se termine, le système qui renferme 22 unités de phosphatase alcaline va en synthétiser 100 durant les 2 h 30 min suivantes.

Dans ces conditions, si la synthèse était réalisée uniquement par les cellules viables, 10^5 d'entre elles synthétiseraient 50000 unités de phosphatase en 2 h 30 min, ce qui est très supérieur à la quantité d'enzyme synthétisée par les bactéries en absence de pénicilline; dans les mêmes conditions 10 unités sont formées par 10^5 bactéries en 2 h 30 min

Figure 14

Activité phosphatasique et nombre de cellules viables d'une préparation P1 en fonction du temps d'incubation.

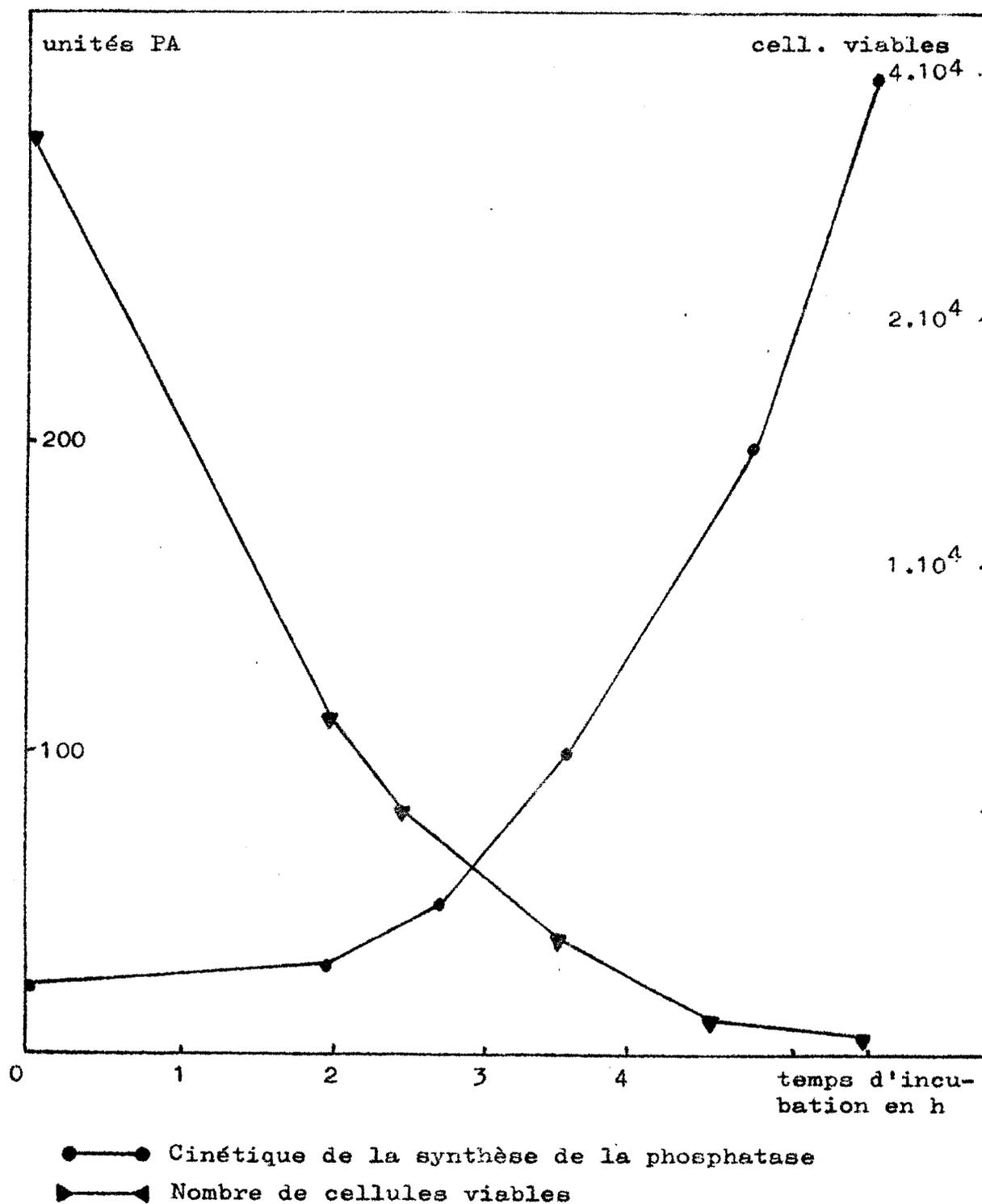
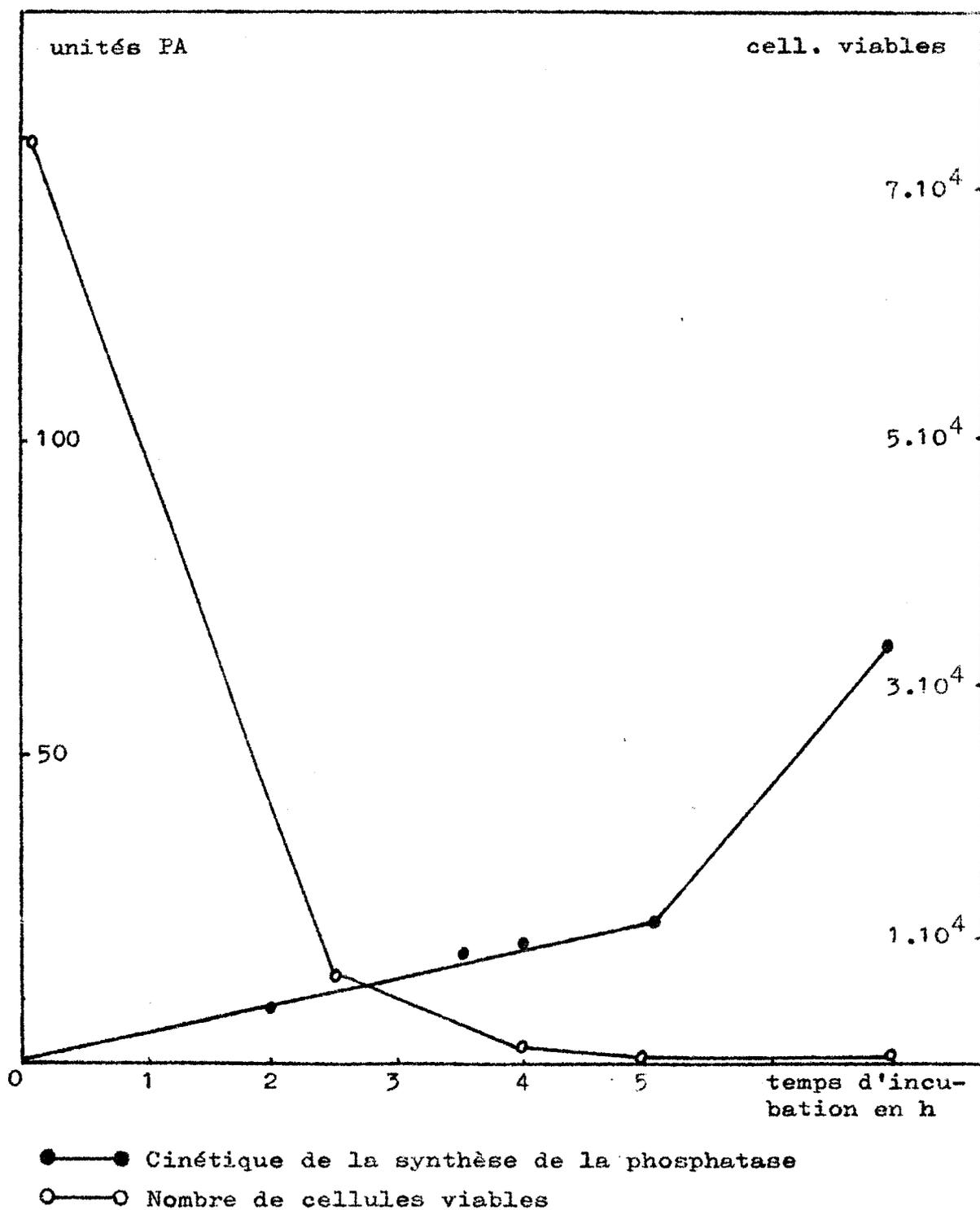


Figure 15

Activité phosphatasique et nombre de cellules viables d'une préparation P1 en fonction du temps d'incubation.



durant la phase de synthèse à taux constant. Il n'est cependant pas encore possible d'affirmer que le P1 réalise dans ce cas la synthèse in vitro de la phosphatase alcaline, en effet, au cours des cinq premières heures d'incubation, les sphéroplastes pourraient synthétiser des précurseurs de la phosphatase alcaline qu'ils libéreraient dans le milieu, au fur et à mesure de leur lyse ; les particules, en achevant la synthèse, permettraient la mise en évidence de l'activité enzymatique.

Cependant, l'observation de la diminution constante du nombre de germes viables au cours de l'incubation, nous a amené à considérer l'incubation comme un moyen de dissocier l'activité de synthèse des particules de celle des cellules viables.

B . DEMONSTRATION DE LA SYNTHÈSE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE PAR LES PARTICULES SUBCELLULAIRES

1 . Etude expérimentale de la lyse des sphéroplastes

Les résultats obtenus en numérant sur gélose les cellules viables du P1, montrent qu'elles persistent durant un temps assez long à 0°C, alors qu'elles se lysent lorsqu'elles sont incubées à 30°C.

La microscopie électronique, comme on peut le constater sur la planche 3, met en évidence les modifications que présentent les sphéroplastés en cours d'incubation. Dès les premières minutes, le cytoplasme devient plus clair, tandis que le matériel nucléaire se condense à la périphérie. Mais les transformations les plus importantes se passent au niveau de la paroi ; celle-ci se déchire et forme par endroits des enroulements ; puis le phénomène de lyse s'accélère, et après 2 h 30 min, il ne reste pratiquement que les débris de membranes, des "fantomes" et des sphéroplastés en très mauvais état. Il n'est donc pas possible de dire que nous réalisons une incubation de sphéroplastés puisque la plupart d'entre eux se sont lysés dès les premières minutes d'incubation. Lorsque l'on compare une préparation P1 avec une préparation de sphéroplastés, on compare en réalité, des particules P1 additionnées de quelques cellules intactes avec des cellules intactes mélangées avec un grand nombre de "fantomes". A notre avis, cette comparaison n'est évidemment pas valable.

La propriété des sphéroplastés de se lyser au cours de l'incubation, est le seul procédé que nous ayons à notre disposition pour éliminer ces cellules des préparations, et étudier l'activité des particules subcellulaires elles-mêmes.

2 . Elimination des sphéroplastes par préincubation

Le principe de l'expérimentation est d'effectuer une préincubation des préparations P1 dans un milieu tel que la synthèse protéique ne puisse se réaliser. Après quelques heures, la plupart des cellules viables se sont lysées ; on effectue alors l'incubation dans des conditions normales. La quantité de phosphatase obtenue est comparée à celle synthétisée directement par la même préparation non préincubée.

Pour empêcher la synthèse protéique de se réaliser durant la préincubation, nous avons privé le milieu d'incubation de divers acides aminés. Il faut remarquer cependant, que l'incubation, dans des conditions telles que les sphéroplastés soient incapables de synthétiser leurs propres protéines, abaisse nettement leur taux de lyse, comme nous l'avons montré antérieurement (44). La diminution du nombre de sphéroplastés reste encore appréciable, mais subit des variations d'une expérience à l'autre. Trois types d'essais ont été réalisés :

a / Lors d'expériences précédentes, nous avons constaté que des bactéries ou des sphéroplastés, provenant d'une culture sur milieu riche, étaient incapables, après lavages et pendant les temps habituels d'expérience, d'effectuer la synthèse des protéines enzymatiques lorsque le milieu d'incuba-

tion était privé de valine, de leucine et d'isoleucine (VLI). Nous avons retrouvé ce fait avec le P1. Les préparations P1 contenant un certain nombre de cellules viables, sont préincubées dans le milieu utilisé habituellement pour la synthèse de la phosphatase alcaline, mais privé de VLI.

L'addition de VLI à la fin de différents temps de préincubation en absence de ces trois acides aminés, provoque la reprise de la synthèse enzymatique. Dans ces conditions, l'activité de synthèse du P1, si l'on suppose qu'elle est due aux sphéroplastés vivants, serait devenue, selon les cas, 4 à 10 fois plus grande, ce qui nous paraît absurde. Une telle expérience est représentée sur la figure 16.

Le nombre de cellules viables du système qui est de $1,25 \cdot 10^5$ pour le témoin, tombe à $1,25 \cdot 10^4$ et $1 \cdot 10^4$ après préincubations respectives de 2 h 30 min et 3 heures en absence de VLI. Ces deux systèmes contiennent donc moins du dixième des cellules viables du témoin ; ces systèmes incubés dans les conditions normales, vont synthétiser les trois quart ou la moitié de la phosphatase alcaline produite par le témoin (renfermant $1,25 \cdot 10^5$ cellules viables).

Les deux premières expériences du tableau XV rendent compte de résultats identiques.

Figure 16

Cinétiques de la synthèse de la phosphatase en fonction du nombre de cellules viables au temps 0.

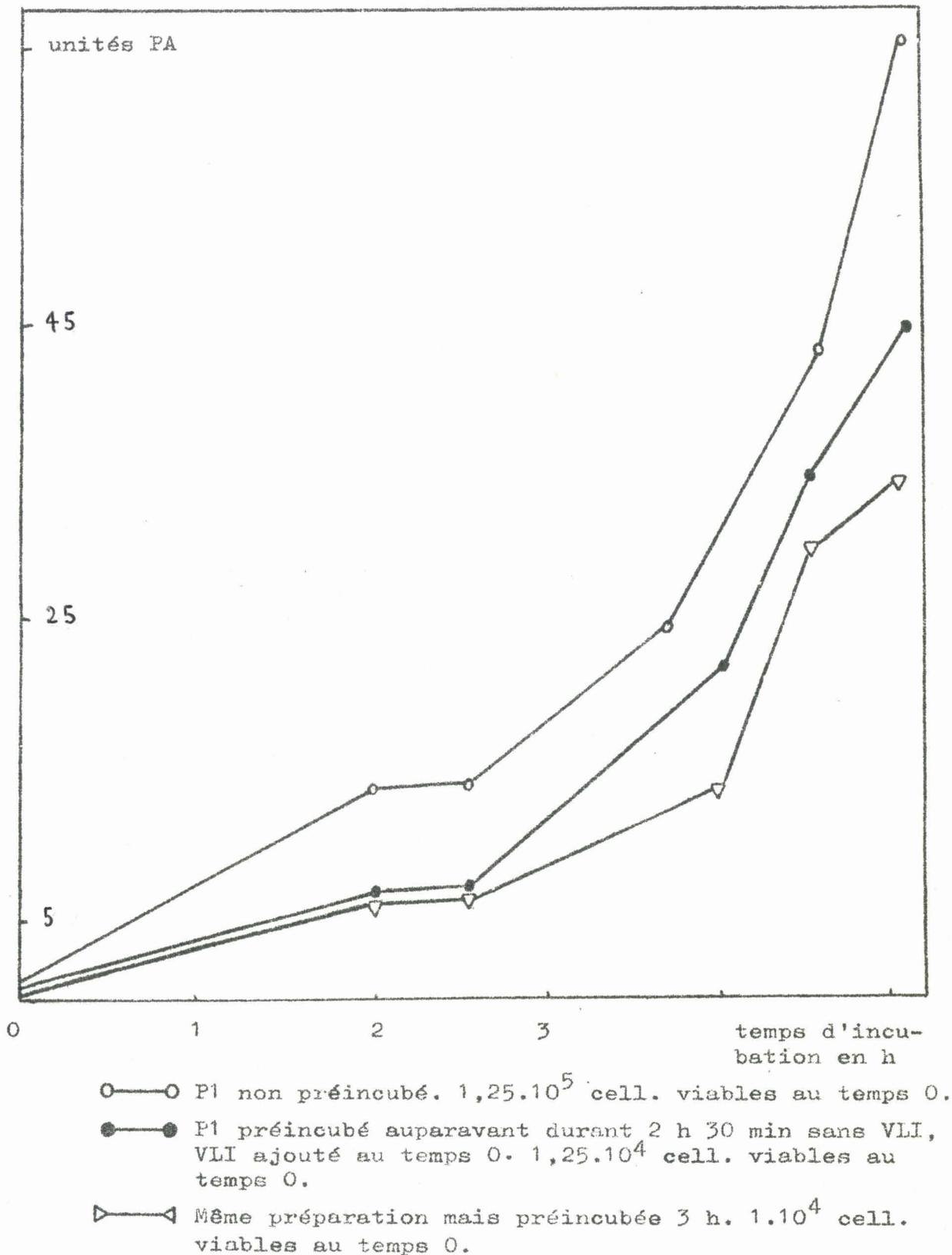


TABLEAU XV

Unités de phosphatase alcaline synthétisée par la fraction P1 préincubée dans différentes conditions. Les témoins (a) correspondent à la même fraction incubée directement dans le milieu complet. Les témoins (b) sont incubés durant 5 h dans les milieux incomplets.

	Temps d'incubation		ΔU PA 5 h	Nombre de cell. viables au temps 0	$\frac{\Delta U \text{ PA } 5 \text{ h}}{10^4 \text{ cell.}}$
	0	5 h			
<u>Exp. 2209 :</u>					
témoin (a)	4,7	131,7	127	$1,25 \cdot 10^5$	10,16
témoin sans VLI (b)	1,6	4,8	3,2	$1,25 \cdot 10^5$	0,25
préincubé 3h sans VLI. VLI ajouté au temps 0	3,8	90,8	87	$2,25 \cdot 10^4$	40,4
<u>Exp. 0610 :</u>					
témoin (a)	3,8	80	76,2	$4,40 \cdot 10^4$	17,3
témoin sans VLI (b)	4	11	7	$4,40 \cdot 10^4$	1,6
préincubé 3h sans VLI. VLI ajouté au temps 0	6,8	136	129,2	$8,50 \cdot 10^3$	152
<u>Exp. 2010 :</u>					
témoin (a)	4,8	24,8	20	$1,10 \cdot 10^5$	1,8
témoin sans arginine (b)	6,4	9,6	3,2	$1,10 \cdot 10^5$	0,29
préincubé 2 h 30 min sans Arg. Arg ajouté au temps 0	8,8	40	31,2	$2 \cdot 10^4$	15,6

b / Nous avons confirmé ces résultats en préincubant le P1, soit en absence d'arginine (tableau XV), soit de tous les acides aminés (tableau XVI). Le P1 étant obtenu à partir d'une souche Arg⁻, l'absence de cet acide aminé, comme de l'ensemble de ceux-ci, empêche toute synthèse protéique. Les résultats obtenus sont superposables à ceux donnés par les expériences de préincubation sans VLI. Il semble donc que la synthèse de la phosphatase alcaline soit le fait d'éléments autres que les sphéroplastes vivants. Nous allons cependant examiner un certain nombre d'objections qui peuvent être apportées à cette démonstration.

3 . Discussion

Les expériences des tableaux XV et XVI permettent de calculer la quantité minimum de phosphatase alcaline synthétisée par les particules subcellulaires proprement dites. Dans l'expérience 2209, 127 unités de phosphatase sont synthétisées à la fois par le P1 et les $1,25 \cdot 10^5$ cellules viables que renferme le milieu en début d'incubation.

Nous nous placerons dans les plus mauvaises conditions en supposant que ces 127 unités sont exclusivement synthétisées par des germes viables. Examinons maintenant le système sans VLI préincubé 3 heures ; il renferme lors de l'addition

TABLEAU XVI

Unités de phosphatase alcaline synthétisée par la fraction P1 préincubée dans différentes conditions. Les témoins (a) correspondent à la même fraction incubée directement dans le milieu complet. Les témoins (b) sont incubés durant 5 h dans les milieux incomplets.

	Temps d'incubation		Δ U PA 5 h	Nombre de cell. viables au temps 0	Δ U PA 5 h 10^4 cell.
	0	5 h			
<u>Exp. 0410 :</u>					
témoin (a)	12,8	75,2	62,4	$6,20 \cdot 10^4$	10,06
témoin sans ac. am. (b)	11,2	12,8	1,6	$6,20 \cdot 10^4$	0,25
préincubé 3h sans ac. am.; ac. am. ajoutés au temps 0	6,4	54,4	48	$5 \cdot 10^3$	96
<u>Exp. 0510 :</u>					
témoin (a)	4,8	67,2	62,4	$3,75 \cdot 10^4$	16,6
témoin sans ac. am. (b)	4,8	4	0		
préincubé 3h sans ac. am.; ac. am. ajoutés au temps 0	4	52,8	48,8	$1,75 \cdot 10^4$	27,8
<u>Exp. 2501 :</u>					
témoin (a)	21	75,2	54,2	$3 \cdot 10^5$	1,8
témoin sans ac. am. (b)	20,8	22	1,2	$3 \cdot 10^5$	0,04
préincubé 3h sans ac. am.; ac. am. ajoutés au temps 0	20,1	108	87,9	$9 \cdot 10^4$	9,7

de ces acides aminés, $1,25 \cdot 10^4$ germes, c'est-à-dire 5,5 fois moins que précédemment.

Si la synthèse était le fait des sphéroplastés, elle devrait être dans le cas présent de 127 divisé par 5,5 c'est-à-dire 23 unités. Or, elle est de 87 unités. La différence qui représente la quantité d'enzyme synthétisée par les particules subcellulaires, s'élève pour cette expérience à 73 p. 100 de la quantité totale de phosphatase synthétisée ; il s'agit d'une valeur minimale si l'on considère que les sphéroplastés se lysent continuellement au cours de la synthèse. Le même calcul appliqué à l'expérience 0410 dans laquelle la préincubation est effectuée sans acides aminés (tableau XVI) attribue aux particules 89 p. 100 de la synthèse totale de la préparation P1. On peut donc conclure que la fraction particulaire P1 est responsable en moyenne de plus de 80 p. 100 de la synthèse de la phosphatase alcaline.

Le raisonnement que nous venons d'exposer, ne peut-être tenu que si quatre conditions sont remplies :

a / Il faut d'abord que le nombre de cellules viables trouvé corresponde à la réalité. En effet, il s'agit de cultiver les sphéroplastés, cellules fragiles, en milieu solide. L'expérience que nous avons acquise dans la culture des sphéroplastés

(42 , 72 , 78) nous a fait choisir la technique de culture en profondeur, en milieu très riche contenant du saccharose et du sulfate de magnésium, comme nous l'avons exposé au chapitre Méthodes et Techniques. Le tableau XVII montre que le nombre de colonies obtenues est quatre fois plus important par ce procédé que par la culture en surface habituellement préconisée. Il est évident qu'un certain nombre de cellules, quoique viables, ne se développent pas sur notre milieu ; incapable de les cultiver, leur pourcentage nous est évidemment inconnu. Nous rejoignons ici le problème très général de la numération des cellules bactériennes, numération toujours relative à la technique utilisée. Dans le cas présent, on pourrait penser que les sphéroplastes, après incubation, sont légèrement altérés, donc moins aptes à se développer dans les milieux de culture ; ce fait pourrait fausser nos numérations. Cependant, lorsqu'on suit la lyse au cours de l'incubation en microscopie optique, on constate une proportion de lyse sensiblement égale à celle trouvée par numération. Par ailleurs, les examens en microscopie électronique confirment cette lyse.

b / Il faut ensuite que la synthèse de la phosphatase soit proportionnelle à la quantité de P_i ou de cellules utilisées ; en effet, si dans nos conditions expérimentales, il y avait en cours de synthèse épuisement du milieu, elle deviendrait d'au-

TABLEAU XVII

Numération des cellules restées viables dans la préparation P1 : comparaison selon la technique employée des résultats obtenus.

	1	2	3
Numération en surface (S)	565	236	63
Numération en profondeur (P)	2.360	756	298
Rapport P/S	4,18	3,20	4,72

tant plus grande que le nombre de cellules viables serait plus petit, il s'en suivrait donc lors des réincubations des modifications du pouvoir de synthèse qui rendraient sans valeur nos essais. Or les courbes des figures 7 et 8 montrent que pour des concentrations voisines de celles que nous utilisons habituellement (0,3 ml de P1 pour 2 ml final de milieu d'incubation), l'activité phosphatasique reste proportionnelle au volume de P1 utilisé dans le mélange d'incubation, donc proportionnelle aussi au nombre de cellules viables qu'il contient.

Dans les expériences consignées sur le tableau XVIII, nous avons ramené la quantité d'enzyme synthétisée par quatre préparations P1, à 10^5 cellules vivantes, pour chaque préparation P1 correspondante (en supposant que la synthèse est le fait des cellules viables). On constate pour chaque préparation que la dilution n'entraîne pas d'augmentation relative de la synthèse. La diminution du nombre de cellules viables ne peut donc expliquer en aucun cas l'augmentation relative de la synthèse.

Par ailleurs, il faut remarquer que l'emploi de faibles concentrations de P1 réalise des systèmes d'incubation renfermant environ $2 \cdot 10^4$ cellules viables, et que dans ces conditions, la synthèse de phosphatase alcaline est encore mise en évidence. Ces résultats vont à l'encontre de ceux

TABLEAU XVIII

Etude, en fonction de la concentration en P1 du milieu d'incubation, de l'activité phosphatasique ramenée à un nombre déterminé de cellules viables.

P1 utilisé pour 2 ml de mélange d'incubation	ΔU PA 5 h 10 ⁵ cell. viables	ΔU PA 6 h 10 ⁵ cell. viables	ΔU PA 6 h 10 ⁵ cell. viables	ΔU PA 7 h 10 ⁵ cell. viables
0,9		37,9		
0,6		47,8	20	
0,5	14			
0,4	16,6			82,1
0,3	18,7	45,6	19,3	88
0,2	18,3			89
0,15			22	
0,1	14			
0,075		55	14,7	
0,0187		10		
Exp.	1204	1410	0112	0803

obtenus par Rabinowitz (208) pour la synthèse de la β -galactosidase. Celui-ci en effet, ne décèle plus aucune synthèse lorsque le nombre de germes viables est inférieur à $1,1.10^7$ par ml de milieu d'incubation.

c / On peut se demander si, comme le suggère Rabinowitz (208), au cours de l'incubation, les sphéroplastes survivants ne croissent pas en volume ; un nombre inférieur de cellules viables renfermerait au total une masse identique de matériel cytoplasmique, et de ce fait, posséderait le même pouvoir de synthèse. Rabinowitz base son hypothèse sur le fait que les bactéries sont capables de se développer dans le milieu d'incubation, donc d'augmenter leur masse cytoplasmique. Cependant, il ne s'agit pas ici de bactéries, mais de sphéroplastes dans un milieu contenant 5000 unités de pénicilline par ml.

Nous avons constaté antérieurement, dans une étude en microcinématographie, que des sphéroplastes en milieu contenant de la pénicilline fortement peptoné et gélosé, donc protecteur, sont capables de survivre, d'augmenter de volume, et dans certains cas, de se diviser (79). Par contre, en milieu d'incubation dépourvu de protéines solubles, les sphéroplastes, comme nous l'avons déjà décrit (41, 44), se lysent très rapidement et nous n'avons jamais observé de modifications de leur volume après plusieurs heures à 30°C (planche 3) ; cela ne pourrait

passer inaperçu, puisque le diamètre des cellules devrait au moins doubler pour que le volume cellulaire reste le même lorsque 90 p. 100 des cellules se sont lysées lors de l'incubation.

d / On peut encore objecter que, si la formation de la molécule enzymatique active est bien le fait des particules subcellulaires, celles-ci ne font que compléter un précurseur synthétisé par les cellules viables avant leur lyse. Ce problème rejoint celui de la synthèse "de novo", à savoir si les particules sont capables d'effectuer la synthèse induite de la molécule à partir de RNA messenger, et d'aminoacyl-tRNA, ou bien si une chaîne préformée est indispensable. Ici nous ne tirerons parti que des expériences déjà décrites ; nous donnerons dans le quatrième chapitre la démonstration basée sur l'impossibilité de former la moindre molécule de phosphatase active en absence de synthèse de RNA messenger.

Les expériences du tableau XVI montrent qu'en absence de tout acide aminé, la lyse des sphéroplastes a lieu et qu'après, le taux de synthèse de l'enzyme, reste cependant pratiquement le même. Dans ces conditions de préincubation, une quantité faible de protéines peut être synthétisée, mais elle nous semble tout à fait insuffisante pour assurer à ce moment la construction, même partielle, de la molécule pro-

tidique ; à moins que la phosphatase, dans les conditions de dérépression, soit formée préférentiellement, ce qui n'est pas le cas comme nous le montrerons dans le chapitre IV. Les sphéroplastes pourraient synthétiser le RNA messager spécifique de la phosphatase avant leur lyse. Ce mRNA, en solution, se fixerait sur les particules, et permettrait l'élaboration de la molécule enzymatique ; le mRNA devrait être soluble, car les synthèses protidiques sont réalisées au niveau même des particules préexistant dans la préparation P1, et non sur les fragments de membranes provenant de la lyse des sphéroplastes au cours de l'incubation (résultat d'autoradiographie en microscopie électronique, communication personnelle : Guillaume, Petitprez, Deschamps). Or, il n'a jamais été possible d'accélérer les synthèses, en ajoutant le surnageant d'une réaction en cours d'incubation, à un système en début d'incubation. Il n'y a donc pas formation d'un mRNA soluble servant d'initiateur à la synthèse dans les particules.

Ces différents arguments mettent en évidence l'absence de précurseur synthétisé par les sphéroplastes, avant leur lyse au sein de la préparation P1, et l'ensemble des résultats expérimentaux exposés dans ce chapitre démontre que les particules subcellulaires sont responsables de la synthèse de la phosphatase alcaline dans la fraction P1.

o

o

o

CHAPITRE IV

ETUDE DES FACTEURS POUVANT MODIFIER

LA PHASE DE LATENCE

Nous avons démontré dans le chapitre III, que la phase de latence précédant la synthèse de la phosphatase alcaline par la fraction P1, quoique semblable à celle donnée par une préparation de sphéroplastés, n'était pas due à la présence d'une certaine proportion de cellules viables dans le milieu d'incubation.

Nous avons vu dans le deuxième chapitre que la durée de cette phase varie selon les préparations P1, mais reste statistiquement toujours importante. Elle est supérieure de 1 h 30 min à celle constatée lors de la synthèse de la phosphatase alcaline par les bactéries provenant de la même souche.

Avant de rechercher les facteurs responsables de la phase de latence dans la synthèse de la phosphatase alca-

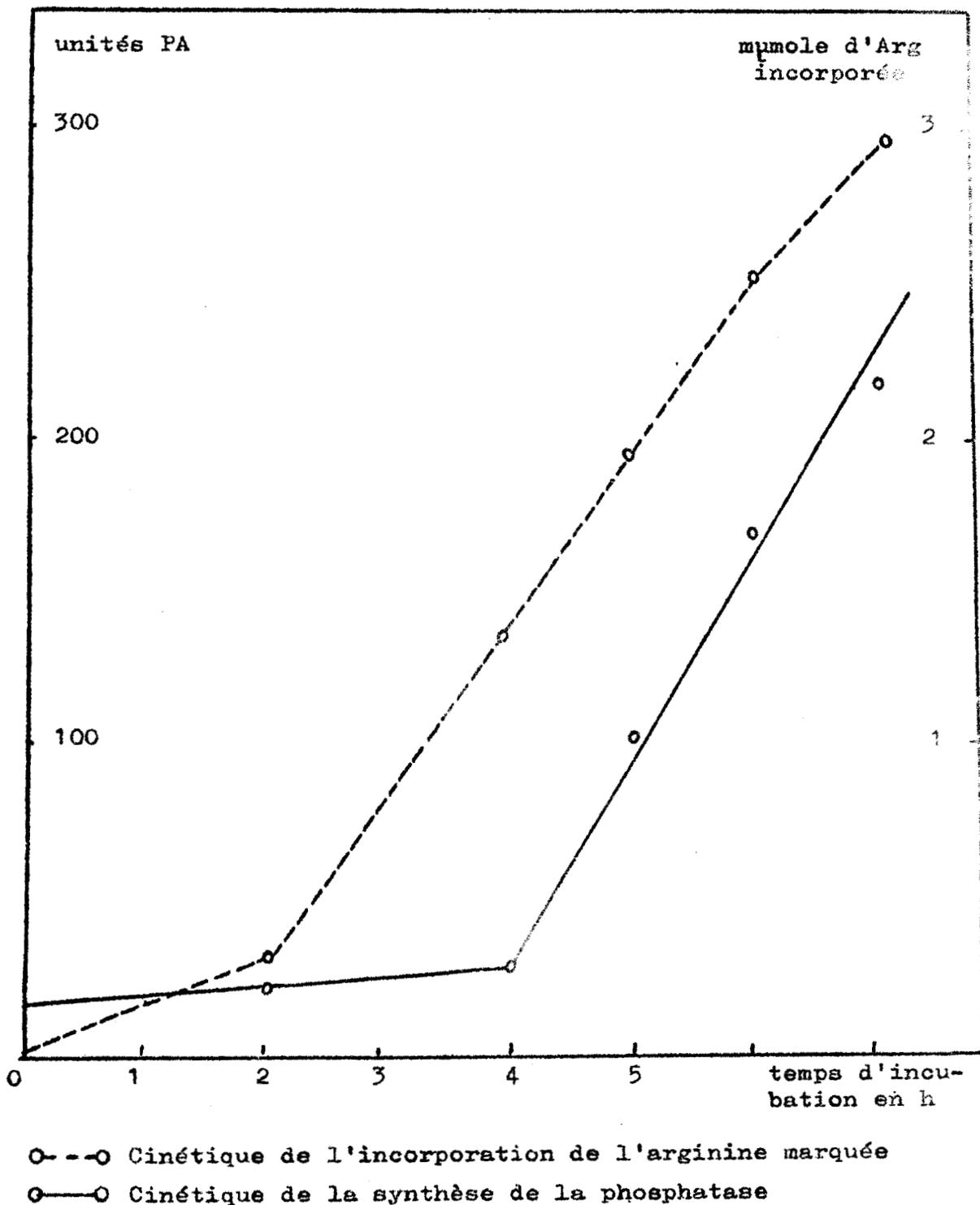
line déréprimée, nous allons étudier sa spécificité dans un premier paragraphe.

I . SPECIFICITE DE LA PHASE DE LATENCE POUR LA SYNTHÈSE DE LA PHOSPHATASE ALCALINE PAR LA FRACTION P1 DE LA SOUCHE K10 Arg⁻⁴

Avant d'étudier plus particulièrement la phase de latence que nous avons précédemment décrite, il fallait en déterminer la cause. En effet, cette phase de latence peut-être spécifique de la synthèse de la phosphatase alcaline elle-même, de la souche ou de la préparation P1. La comparaison entre la durée de la phase de latence pour la phosphatase alcaline et celle nécessaire pour que débute la synthèse globale des protéines, est représentée sur la figure 17. L'évaluation de la synthèse protéique totale est donnée par l'incorporation de l'arginine ¹⁴C dans le précipité obtenu en présence d'acide trichloracétique (TCA). Par ce procédé, la formation des petits peptides, celle des protéines actives, et l'achèvement de chaînes préexistantes, ne peuvent être distingués les uns des autres. On constate (figure 17) que la synthèse globale des polypeptides débute 1 h à 2 h avant celle de la phosphatase alcaline. A quels facteurs attribuer cette différence ?

Figure 17

Comparaison des temps de latence pour la synthèse de la phosphatase alcaline et des protéines totales. La synthèse de ces dernières est suivie par incorporation d'arginine ^{14}C .



A . LA PHASE DE LATENCE SERAIT SPECIFIQUE DE LA SOUCHE

Le fait d'utiliser un mutant exigeant en arginine, qui pourrait incorporer préférentiellement cet acide aminé contenu dans le milieu extérieur, pourrait être à la base du phénomène observé.

Divers résultats nous font rejeter cette hypothèse :

- Nous obtenons les mêmes types de courbes en remplaçant l'arginine ^{14}C du milieu d'incubation, soit par la méthionine ^{14}C , soit par la lysine ^{14}C (figures 18 et 19).

- Les résultats sont encore identiques lorsque le P1 utilisé a été préparé à partir de la souche E. coli K10 Arg⁺ (figure 20), mais également lorsque la souche utilisée est très différente (200 FS Flac, Hfr C, provenant toutes deux de la souche K12). La différence que l'on observe entre la durée de la phase de latence de la phosphatase alcaline et celle de la synthèse globale des protéines est donc un phénomène général, reproductible, indépendant de la souche.

B . LA PHASE DE LATENCE SERAIT SPECIFIQUE DE LA SYNTHÈSE

D'UNE GROSSE MOLECULE ACTIVE

Dans le cas présent, le temps nécessaire à la synthèse de la phosphatase alcaline serait plus important que

Figure 18

La phase de latence observée lors de la synthèse globale des protéines est indépendante de l'acide-amino marqué utilisé.

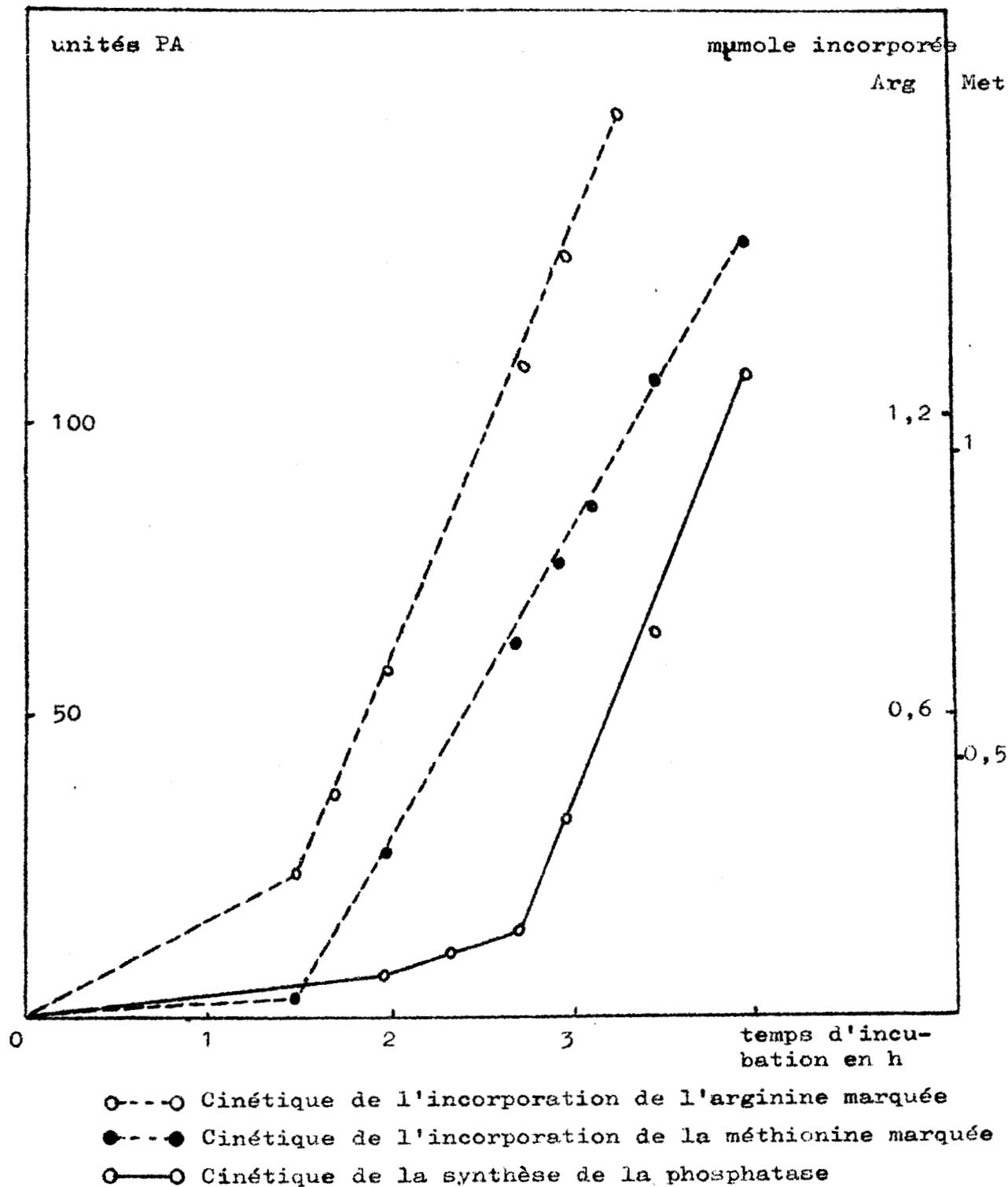


Figure 19

La phase de latence observée lors de la synthèse globale des protéines est indépendante de l'acide-amino marqué utilisé.

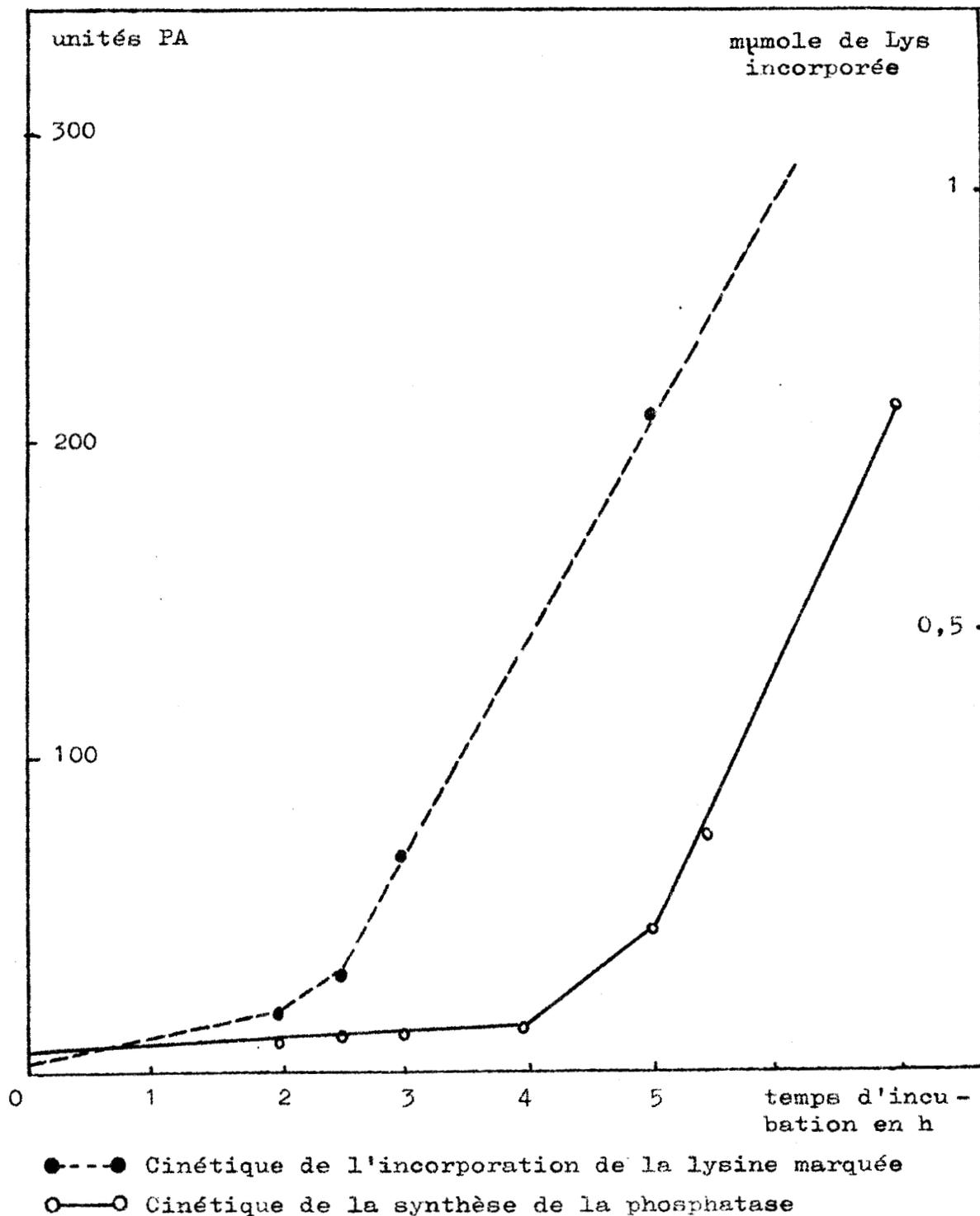
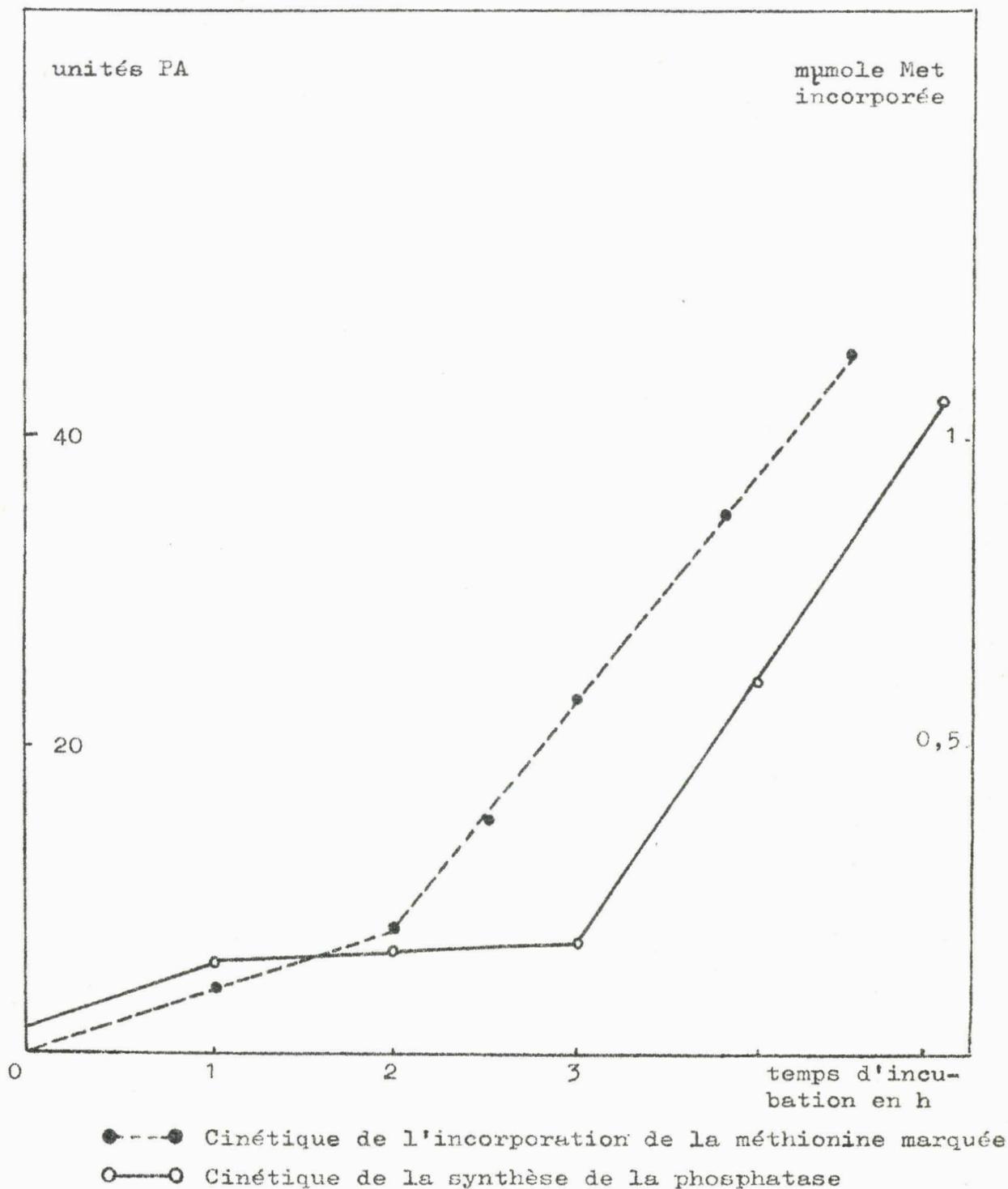


Figure 20

Le P1 utilisé a été préparé à partir de la souche *E. coli* K10 Arg⁺. L'aspect général des cinétiques n'est pas modifié. Le décalage observé entre les temps de latence n'est donc pas spécifique de la souche *E. coli* K10 Arg⁻4.



celui requis pour l'élaboration ou la finition de petites molécules précipitables par le TCA.

Nous avons éliminé les acides aminés marqués liés à leur RNA de transfert, et qui sont précipitables par le TCA à froid, par chauffage à 100°C durant 5 min du mélange de précipitation. Le temps très court d'hydrolyse n'entraîne que la destruction des molécules fragiles qui sont éliminées par lavages.

- Nous avons représenté sur la figure 21 les courbes qui correspondent à la synthèse de la phosphatase alcaline et à l'incorporation de l'arginine ^{14}C dans les précipités TCA avant et après traitement à 100°C. Si, dans ce dernier cas, l'incorporation est diminuée, la différence représentant l'accumulation des aminoacyl-tRNA à ce niveau, la phase de latence n'est pas augmentée, ce qui devrait être si la synthèse de ces molécules masquait simplement une phase de latence identique à celle de la phosphatase alcaline.

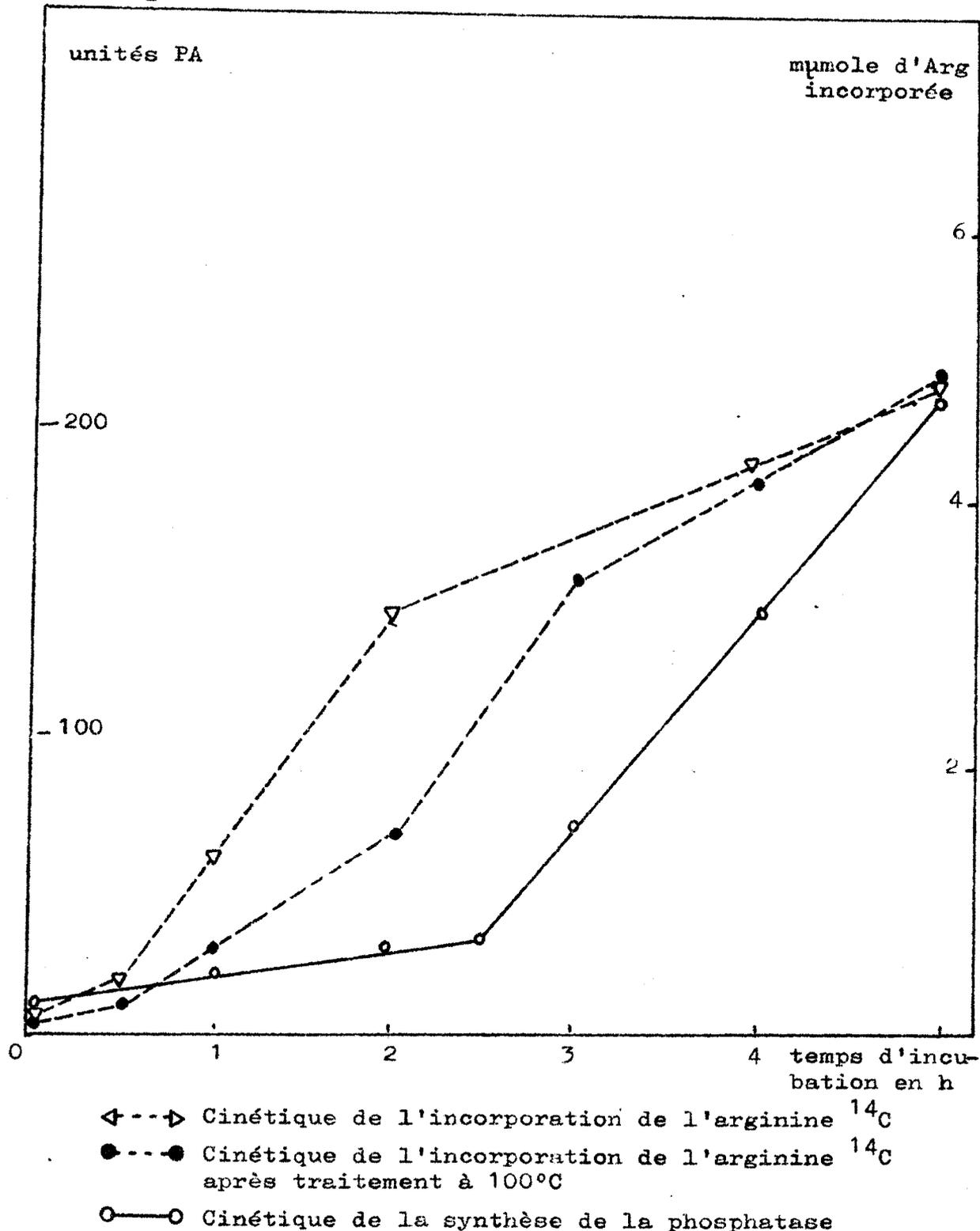
- Pour confirmer ces faits, nous avons étudié la synthèse d'une autre molécule enzymatique, celle de la β -galactosidase à l'aide de la même souche K10 Arg⁻⁴.

La préparation du P1 est identique à celle décrite dans le chapitre I.

Les conditions d'incubation et de dosage sont celles

Figure 21

Cinétiques correspondant à la synthèse de la phosphatase et à l'incorporation de l'arginine ^{14}C dans les précipités TCA avant et après traitement à 100°C . L'élimination par ce procédé des aminoacyl-tRNA laisse la phase de latence protéique inchangée.



décrites par le groupe de Nisman (152,154,156).

Les conditions d'incubation sont voisines de celles que nous avons décrites pour la synthèse de la phosphatase alcaline. Les différences sont les suivantes : absence de calcium, qui n'est pas nécessaire ici pour bloquer les ions phosphate ; absence aussi de glucose, répresseur de la synthèse induite de la β -galactosidase ; par contre l'addition de manganèse en bloquant la polynucléotide phosphorylase, augmente l'activité de synthèse alors que pour la phosphatase, comme l'ont montré Guillaume et coll. (80), la présence des ions Mn^{2+} inhibe spécifiquement sa synthèse ; le mélange d'acides aminés utilisé correspond à la composition en acides aminés de la β -galactosidase ; enfin, les concentrations en particules P1 sont 5 fois moins importantes que pour la synthèse de la phosphatase alcaline.

La synthèse de l'enzyme ne commence qu'après addition de l'inducteur ; nous avons employé l'isopropyl thio β -galactoside (IPTG) à la concentration finale de $2 \cdot 10^{-3} M$. Selon le schéma de Jacob et Monod, que nous avons reproduit sur la figure 2, l'addition d'IPTG déclenche la synthèse du mRNA correspondant à la β -galactosidase, comme l'absence de phosphate inorganique (répresseur) provoquerait la formation du messenger de la phosphatase.

Les cinétiques de la synthèse des 2 enzymes par la

même préparation P1 employée au même moment, sont représentées sur la figure 22. Nous remarquons que celle relative à la synthèse de la β -galactosidase induite présente une phase de latence nettement inférieure à celle de la phosphatase, et pratiquement superposable à celle obtenue par l'incorporation d'un acide aminé marqué dans les polypeptides.

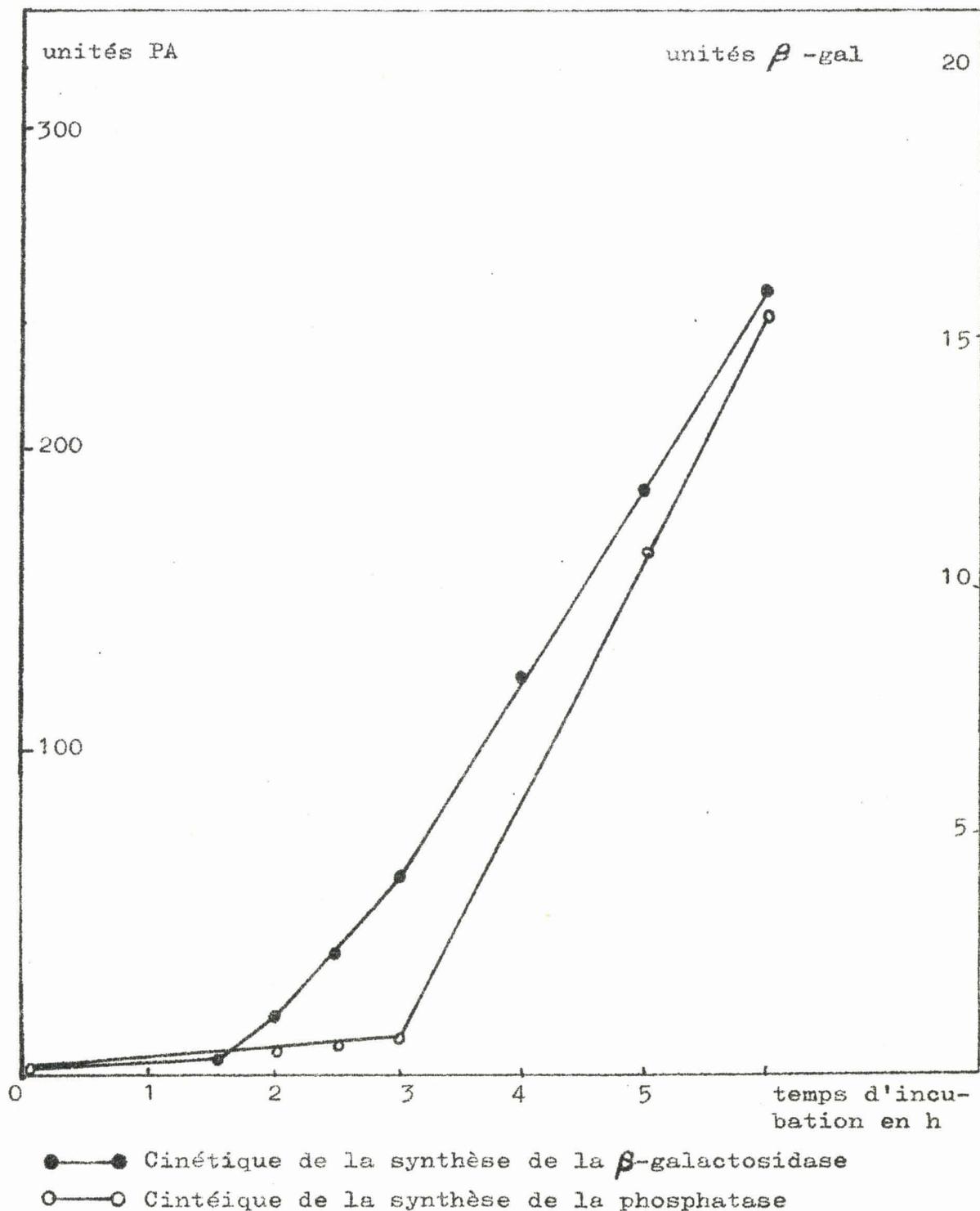
Il ressort des deux expériences que nous venons de décrire, que ce n'est pas la difficulté de synthétiser une molécule enzymatique active qui est à l'origine de la phase de latence ; on pourrait admettre en effet, que la molécule de β -galactosidase, composée de trois monomères et de poids moléculaire supérieur à celui de la phosphatase, serait plus difficile à élaborer, donc qu'elle se synthétiserait plus lentement que celle de la phosphatase.

C . LA PHASE DE LATENCE SERAIT SPECIFIQUE DE LA PREPARATION P1 ELLE-MEME

La phase de latence pour nous, est un phénomène reproductible, mais dont la durée est légèrement variable. Par contre, Bishop et coll. (17) qui ont également travaillé avec la fraction P1, ont obtenu dans le cas de la phosphatase alcaline une phase de latence réduite à 45 min ; inversement, elle s'élève à 2 h 30 min pour les préparations P1 de Manson

Figure 22

Comparaison des cinétiques pour la synthèse de la phosphatase et de la β -galactosidase. Pour la β -galactosidase, les conditions d'incubation sont décrites dans le texte. Une unité de β -galactosidase hydrolyse une μ mmole d'ONPG par minute à 30°C.



et coll. (127). Nous avons vu précédemment que la durée moyenne de la phase de latence observée avec nos préparations était de 3 h 20 min.

Si nous effectuons les mêmes comparaisons pour la phase de latence relative à la synthèse de la β -galactosidase nous la trouvons égale à 45 min dans les travaux de Nisman et coll. (158), alors qu'elle se prolonge durant 1 h 30 min au cours de nos expériences.

Elle est dans ce cas, sensiblement égale à celle que nous observons au cours de la synthèse totale des protéines (30 min et 2 h 30 min étant des valeurs extrêmes), alors que pour Nisman et coll. l'incorporation s'effectue d'emblée selon un taux constant. Il semble donc que la phase de latence soit caractéristique du mode de préparation de la fraction P1.

D . DISCUSSION

L'examen des cinétiques de l'incorporation des acides aminés marqués et des synthèses de la phosphatase alcaline et de la β -galactosidase, nous amène à considérer deux parties dans la phase de latence totale observée lors de la synthèse de la phosphatase.

1 . Une première phase de latence non spécifique

Elle débute avec l'incubation et prend fin lorsque la synthèse de la β -galactosidase et l'incorporation des acides aminés marqués commencent; durant cette phase, l'activité de synthèse de la préparation est extrêmement faible.

Elle peut être due à un procédé de préparation qui dégrade anormalement la fraction P1. Elle serait donc liée à la structure des particules qui doivent se reconstituer avant de devenir le support membranaire indispensable à la synthèse des grosses molécules actives. Mais il ne s'agit pas seulement ici de la formation de protéines fonctionnelles, mais aussi de celle de petits peptides. On peut donc admettre que cette phase de latence serait provoquée par l'élimination au cours de la préparation, d'un facteur indispensable devant être synthétisé ou recombiné avant que la synthèse ne commence.

2 . Une deuxième phase de latence spécifique de la phosphatase alcaline

Elle correspond au décalage observé entre le début de la synthèse globale des polypeptides et celle de la phosphatase alcaline.

Pour aborder ce problème, nous allons faire le point

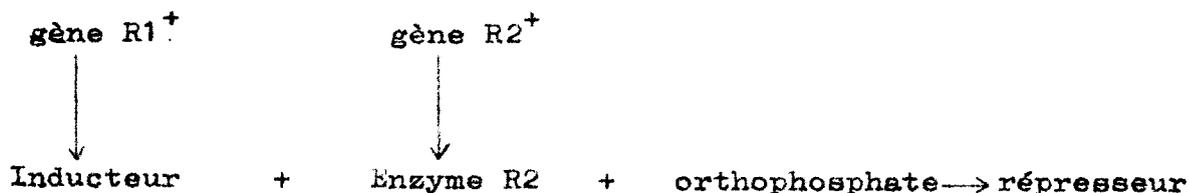
de la conception actuelle de la synthèse de la phosphatase alcaline et de sa régulation. Horiuchi et coll. (92) puis Torriani (209) observent que la privation en phosphate inorganique du milieu de culture d'E. coli entraîne la synthèse de la phosphatase alcaline, inversement aucune activité enzymatique n'est décelable après culture sur milieu contenant un excès d'orthophosphate. Divers auteurs (48,61,115) et principalement Garen et Echols (58) ont démontré que la synthèse de la phosphatase alcaline est sous le contrôle de trois gènes : un gène de structure P et deux gènes régulateurs R1 et R2. L'existence du gène de structure est nettement établie par le fait que des mutations à son niveau se traduisent par des altérations de la molécule de phosphatase alcaline lors de sa synthèse. Cette démonstration a demandé de nombreux travaux sur l'isolement, la structure et les propriétés de la phosphatase alcaline. Isolée par Garen et Levinthal (60) par chromatographie sur DEAE cellulose, elle a été cristallisée par Malamy et Horecker (125,126) et diverses techniques de purification ont été comparées par nous-mêmes (43). Garen et Levinthal lui attribuent un poids moléculaire de 80.000 et la considèrent comme une métalloenzyme, ce que confirment Floke et Levinthal (171) en démontrant la présence de deux molécules de Zn^{2+} par molécule d'enzyme. Levinthal et coll. (116) par réduction du groupement disulfure lié aux ions Zn^{2+} disso-

cient la molécule enzymatique en deux monomères. Divers auteurs ont étudié les propriétés de cette enzyme (60,187,188) les ont comparées (55). Il semble maintenant certain que les sites actifs de l'enzyme seraient formés de phosphate de sérine (51, 170,172,190,191). En utilisant la méthode des "fingerprints" Rothman et Byrne (182) trouvent que les deux monomères sont identiques. Schlesinger et Levinthal (189) puis Fan et coll. (53) par dimérisation de phosphatases provenant de mutants dont la mutation porte sur le gène de structure P, obtiennent in vitro, par recombinaison, des hybrides dont les activités enzymatiques spécifiques peuvent être différentes.

La réalisation de ces travaux a donné une idée précise du fonctionnement du gène de structure, ce qui n'est pas le cas pour les gènes régulateurs R1 et R2. Le système proposé pour la régulation génétique de la phosphatase alcaline est très complexe et l'absence de publication sur ce sujet depuis celle de Garen et Echols (58) montre que nous ne sommes pas le seul à considérer que le problème n'est pas engagé sur une bonne voie.

Selon le schéma de Jacob et Monod, la synthèse de la phosphatase est réprimée par le phosphate minéral. En présence de celui-ci, une molécule devient un répresseur actif qui empêche la transcription du gène de structure P. Ce répresseur serait de nature protéique (59) et métaboliquement

instable (56, 57). Cependant deux types de contrôles existeraient, l'un aurait pour site le gène R1, une mutation à son niveau permettrait la synthèse d'enzyme en présence de concentrations faibles en phosphate, l'autre aurait pour site R2, sa mutation entraînerait la formation de phosphatase, quelle que soit la concentration en phosphate minéral. Pour expliquer le fonctionnement de ces gènes, Garen et Echols (58) émettent l'hypothèse suivante, illustrée sur le schéma ci-dessous :



Du gène R1 serait transcrit un inducteur cytoplasmique actif en présence de PO_4^{3+} . En effet, il faut une concentration minimale en phosphate pour obtenir une synthèse d'enzyme, du gène R2 proviendrait un répresseur inactif ; si la concentration en PO_4^{3+} du milieu augmente, une combinaison inducteur - phosphate - répresseur inactif, se formerait ; elle jouerait le rôle d'un répresseur actif empêchant la transcription du gène de structure P. Cette hypothèse valable pour un mutant totalement

déréprimé du type $P^+R1^+R2^-$, n'explique pas pourquoi certains mutants $P^+R1^-R2^+$ ne sont que partiellement déréprimés. Cependant, de très nombreux travaux ont eu pour objet de déterminer à quel niveau s'effectue la régulation, ceux-ci ont été à la base d'hypothèses pouvant être appliquées à la synthèse de la phosphatase.

Spencer et Harris (197) et, aussi, Aronson et del Valle (6) situent la régulation au niveau de la translation, c'est-à-dire lors de la lecture du mRNA qui dans ce cas, se synthétiserait et se dégraderait simultanément lorsqu'il est de type instable, ou se trouverait stocké lorsqu'il est d'un type plus stable. Des conditions physiologiques cellulaires appropriées seraient nécessaires pour qu'il soit traduit en protéines ; un autre modèle d'après Stent (203) place la régulation au niveau de la transcription mais lie transcription et traduction : il ne peut y avoir dans les conditions normales de transcription sans translation concomitante. Pour vérifier ces hypothèses Fan (52) et plus récemment Moses (141) ont recherché si la dérépression de la synthèse enzymatique pouvait se faire en absence totale de synthèse de mRNA. Bien que le dernier cité ne rejette pas formellement le schéma de Stent, ses expériences semblent prouver que la régulation pour la phosphatase alcaline chez *B. subtilis*, est

bien au niveau de la transcription selon le modèle de Jacob et Monod.

Certains faits étudiés par Manson (127) avec le système P1 de Nisman, éclairent d'un jour nouveau la régulation de la synthèse de la phosphatase alcaline.

Manson a démontré que :

1° - Dans des préparations P1, qu'elles proviennent de souches constitutives ($P^+R1^+R2^-$) ou sauvages ($P^+R1^+R2^+$) la synthèse de la phosphatase alcaline est réprimée de la même façon par le PO_4^{3+} et par les mêmes concentrations.

2° - La réassociation des monomères de la phosphatase réalisée en présence de Zn^{2+} est fortement inhibée lorsqu'on ajoute des ions PO_4^{3+} au milieu, car le phosphate précipite le zinc ; il en conclut que l'orthophosphate inhibe la synthèse de l'enzyme en bloquant la formation des dimères actifs. Donc l'absence de Zn^{2+} , c'est-à-dire la présence de PO_4^{3+} , empêche la formation de la molécule enzymatique active. Il en résulterait un blocage des polysomes par les monomères qui restent fixés sur les ribosomes. Les étapes successives de la synthèse protéique paraissant étroitement liées (la transcription du DNA en mRNA est obligatoirement accompagnée de la traduction du mRNA en protéines (36) pour assurer la survie du messenger), son arrêt au niveau des ribosomes bloquerait toute la chaîne

jusqu'à la transcription elle-même. Il n'est évidemment pas exclu que deux possibilités de régulation, d'une part synthèse d'un répresseur, d'autre part inhibition de la chaîne de proche en proche, puissent se superposer.

Le retard que nous observons dans la synthèse de la phosphatase alcaline par rapport à celle de la β -galactosidase n'est certainement pas dû à la difficulté de synthétiser le mRNA puisque la β -galactosidase est synthétisée immédiatement après l'addition de l'inducteur.

Quelle que soit l'hypothèse de régulation envisagée, on peut donner plusieurs explications à cette constatation :

- La présence dans les particules d'un répresseur stable, alors qu'il est instable dans la cellule bactérienne.

- L'impossibilité de débarrasser totalement la préparation P1 du phosphate, malgré l'addition de calcium ; après un temps variable d'incubation, le phosphate serait métabolisé, et la synthèse enzymatique pourrait commencer.

- Une concentration insuffisante en ions zinc dans le milieu ; cette hypothèse peut être rejetée immédiatement car la synthèse de la phosphatase se fait sans addition d'ions Zn^{2+} ; le zinc n'accélère pas le processus.

3 . Conclusion

Dans les paragraphes suivants, nous étudierons en même temps les deux phases de latence, en effet, elles sont indissociables l'une de l'autre le plus souvent.

Nous avons classé arbitrairement toutes les expériences ayant pour but de déterminer les causes de ces phases de latence en deux parties :

- D'abord celles que nous avons réalisées, à vrai dire au hasard, dans le but de modifier la phase de latence soit en soumettant la préparation P1 avant son emploi à des procédés physiques, soit en employant des artifices techniques comme la préincubation en absence de synthèse protidique.

- Puis les expériences réalisées pour prouver ou infirmer nos hypothèses. Une bonne partie d'entre elles sont basées sur l'action des différents inhibiteurs, les autres nous permettant de discuter nos hypothèses.

II . ESSAIS DE MODIFICATIONS DE LA PHASE DE LATENCE

Les essais que nous avons faits dans le but d'obtenir des variations de la phase de latence sont de trois types :

- La comparaison des préparations 1 et 2 de la planche 4

met en évidence la disparition du DNA interparticulaire durant l'incubation de la fraction P1. Nous avons pensé à partir de cette observation que le changement de certaines conditions d'incubation pouvait, en modifiant l'évolution structurale de la fraction P1 incubée, se répercuter sur la durée de la phase de latence.

- Comme il nous semblait que la phase de latence non spécifique, c'est-à-dire celle que l'on rencontre quelle que soit la synthèse envisagée, était liée à la structure même des particules, nous avons tenté par divers procédés physiques de modifier cette structure et d'en rechercher les conséquences.

- Enfin, puisqu'il nous était possible de réaliser les incubations sans synthèse protéique (par omission de divers acides aminés comme nous l'avons vu dans le chapitre III), puis de la faire débiter à volonté, nous avons profité de cette technique pour étudier les effets de la préincubation sur la phase de latence.

A . MODIFICATION DES TECHNIQUES D'INCUBATION

1 . Modification des conditions physiques

a / La température

Aucune modification de la phase de latence n'est

constatée, si l'on incube à des températures différentes.

b / L'agitation

Si la phase de latence était due à une réorganisation des particules, l'agitation devrait la modifier : soit la raccourcir en accélérant les contacts entre les particules, soit l'allonger en empêchant les contacts entre particules. Or les phases de latence obtenues avec une incubation normale ou une incubation sous agitation constante, sont identiques (figure 23).

2 . Modification de la concentration en acides aminés

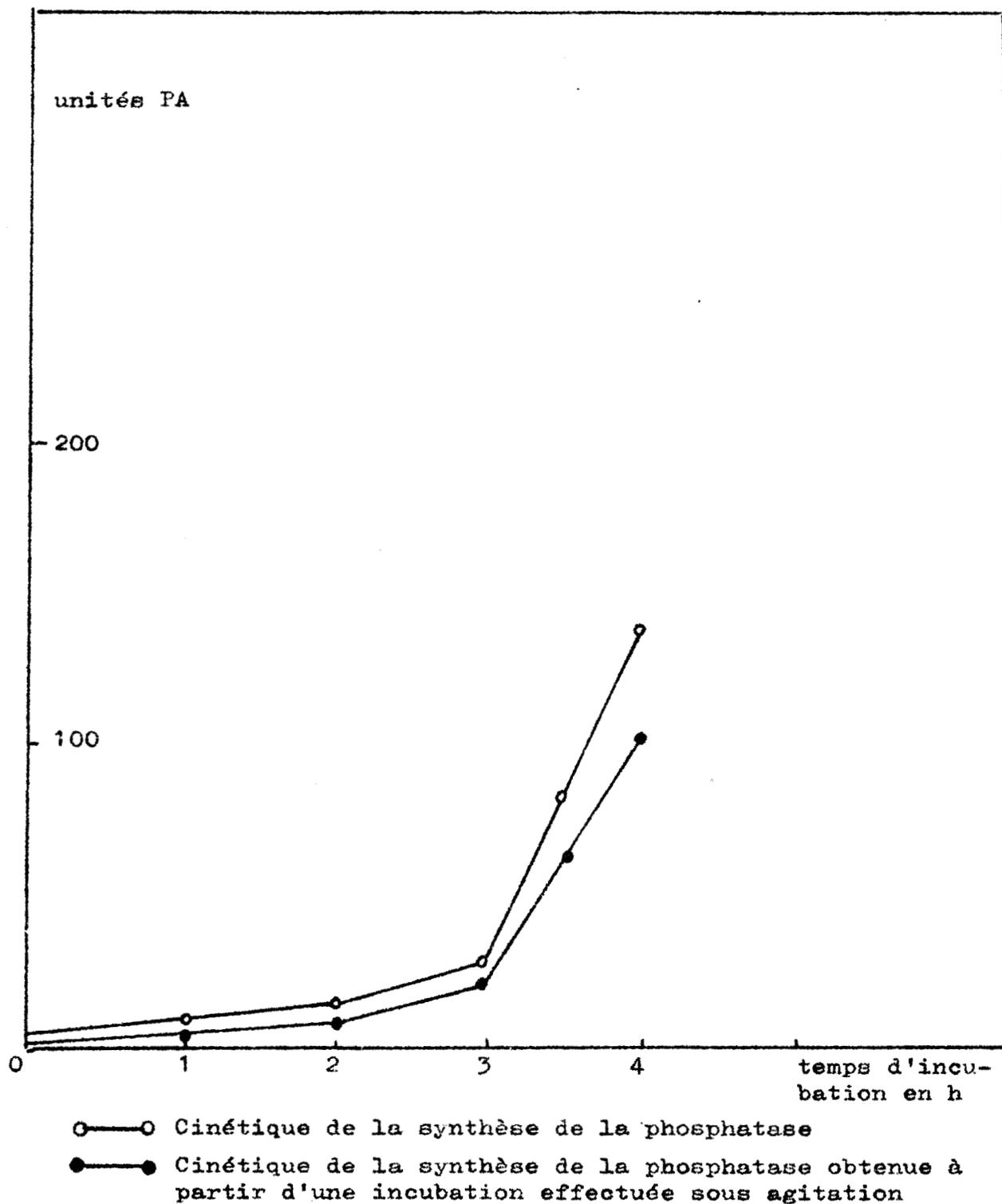
a / La diminution simultanée de la concentration de tous les acides aminés permettait d'étudier divers facteurs susceptibles d'interférer avec la phase de latence non spécifique :

- La formation des aminoacyl-tRNA pourrait être plus longue d'où une phase de latence plus importante.

- L'inhibition possible du système par un acide aminé pourrait être levée du fait d'une concentration moindre, d'où une phase de latence plus courte ; le même raisonnement pourrait se tenir dans le cas où une impureté inhibitrice serait contenue dans une des solutions d'acides aminés.

Figure 23

Essai de modifications de la phase de latence :
l'incubation réalisée sous agitation constante n'entraîne aucune
modification du temps de latence.



Or si l'accroissement du taux de synthèse est proportionnel à la concentration en acides aminés lorsque cette concentration est critique, la phase de latence reste constante (figure 24).

b / La concentration en arginine pouvait être la cause d'un déséquilibre entre les aminoacyl-tRNA et l'arginyl-tRNA, puisque nous utilisons pour augmenter l'incorporation de l'arginine ^{14}C une concentration d'arginine froide vingt fois inférieure à celle des autres acides aminés. Comme les résultats de la figure 25 sont comparables à ceux obtenus avec les différentes concentrations d'acides-amino, cette hypothèse est rejetée.

3 . Modification de la concentration du glucose

Ici encore si le taux de synthèse est modifié, aucune modification de la phase de latence n'est enregistrée.

4 . Discussion

Quelles que soient les conditions d'incubation, il ne nous a pas été possible de mettre en évidence un changement dans la phase de latence non spécifique. Il semble bien que cette phase soit due à la nature même du P1 et non aux conditions

Figure 24

Essai de modifications de la phase de latence :
les variations de la concentration en amino-acides du milieu
d'incubation n'entraînent aucune modification du temps de
latence.

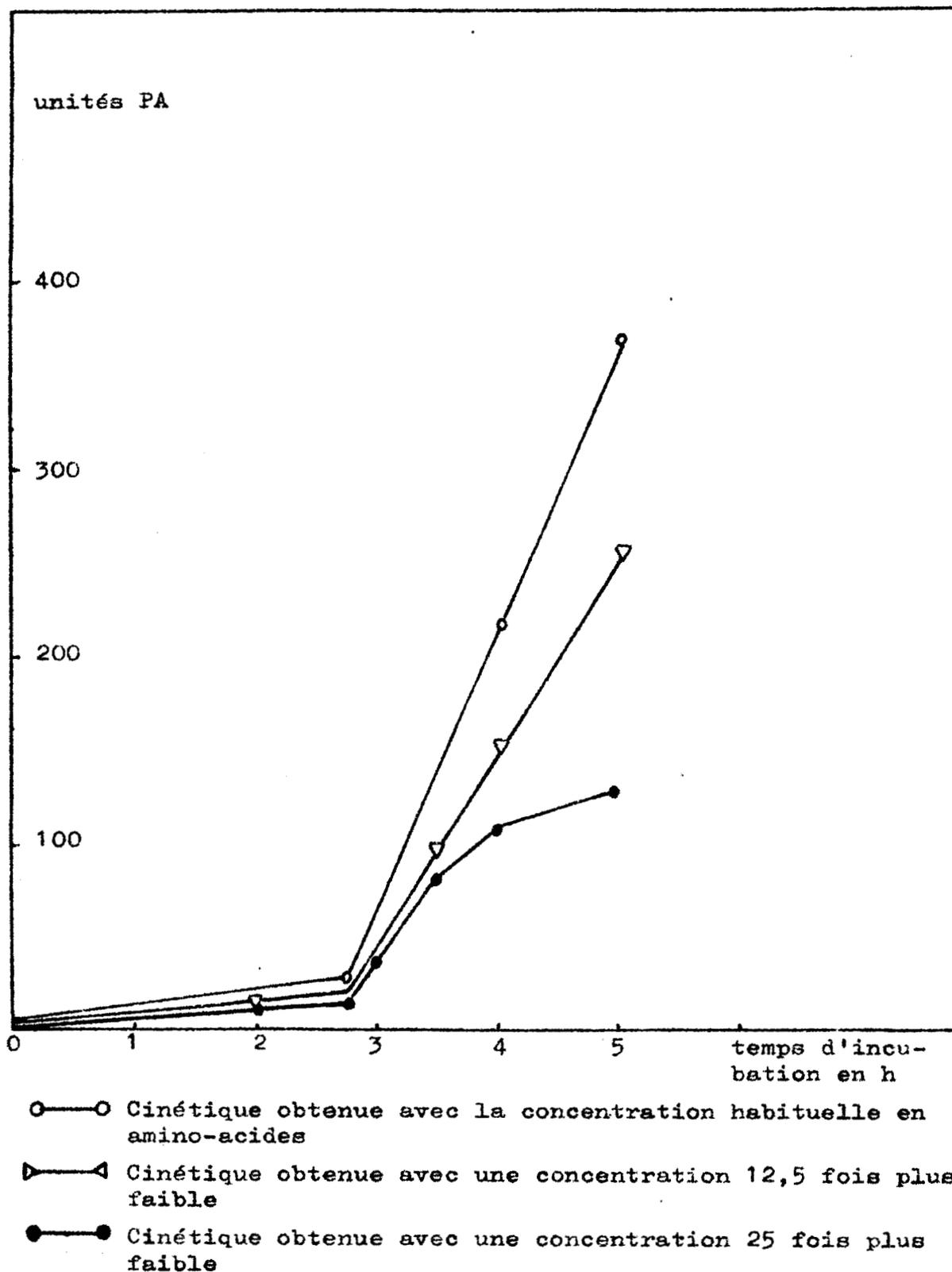
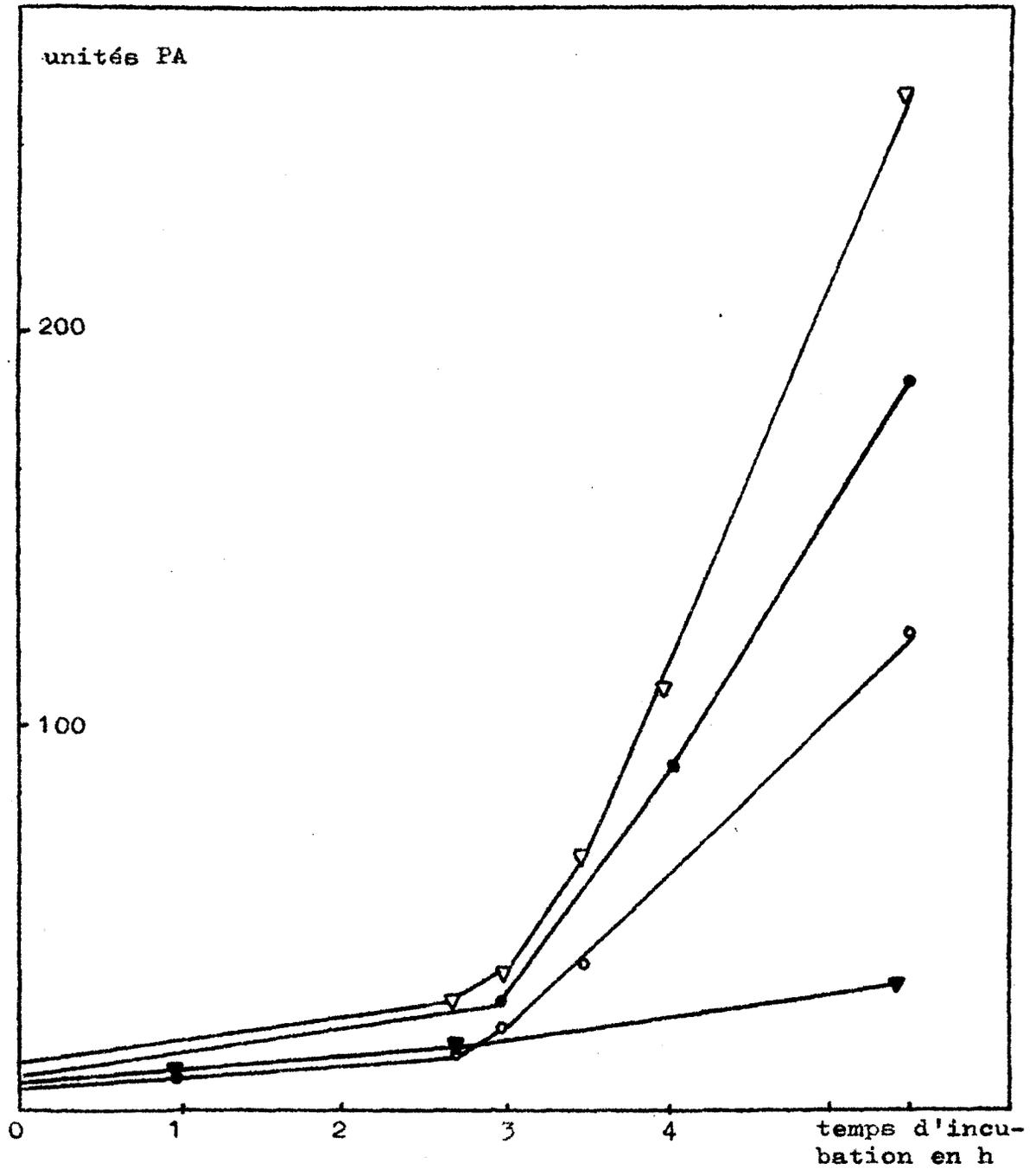


Figure 25

Essai de modifications de la phase de latence :
les variations de la concentration en arginine du milieu d'incubation n'entraînent aucune modification du temps de latence.



Concentrations d'arginine en μ mole par ml de
mélange d'incubation :

- ▷◁ 0,05
- 0,10
- ◯ 0,025
- ◀▶ 0,006

dans lesquelles il fonctionne. Même l'addition d'un surnageant de P1 en cours d'incubation à un P1 en début d'incubation ne modifie en rien la phase de latence. Il n'y a donc pas de substance soluble agissant sur cette phase en cours d'incubation, car le surnageant P1 devrait alors contenir tous les éléments indispensables au démarrage de la synthèse.

B . PROCÉDES PHYSIQUES EMPLOYÉS POUR ALTERER LA STRUCTURE DE LA PRÉPARATION P1

1 . Homogénéisation violente à l'aide d'une pipette

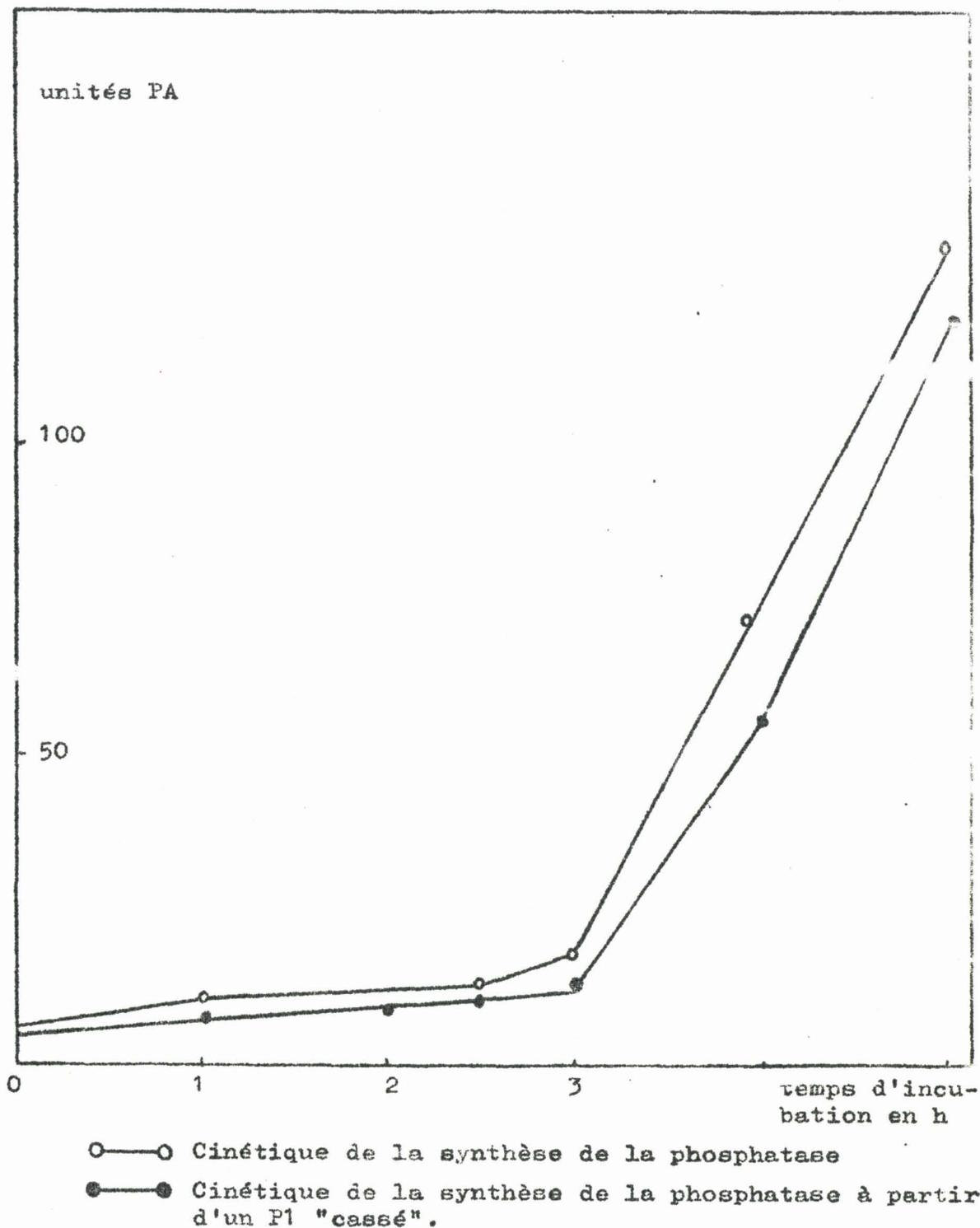
Outre l'homogénéisation habituelle, les particules P1 sont altérées par des passages répétés dans une pipette à boule, par aspirations et refoulements successifs. L'examen de la figure 26 montre, pour le P1 cassé, une très légère diminution du taux de synthèse, mais une phase de latence identique à celle de la préparation normale.

2 . La sonnation

Elle est effectuée à l'aide du Raytheon Sonic Oscillator durant 2 min. Seul le taux de synthèse diminue fortement, la phase de latence n'est pas influencée.

Figure 26

Essai de modifications de la phase de latence :
une fragmentation plus poussée des particules P1 n'entraîne
aucune modification du temps de latence.



3 . Le_froid

La préparation P1 est conservée à 0°C durant 72 heures. Elle est testée lors de sa préparation, puis toutes les 24 heures. Nous constatons sur l'expérience schématisée sur la figure 27, que le taux de synthèse reste constant pour les divers essais, mais que la phase de latence s'est allongée d'une heure ; ce phénomène n'est cependant pas constant, car le plus souvent, on n'observe pas de modifications de la phase de latence au cours de la conservation du P1

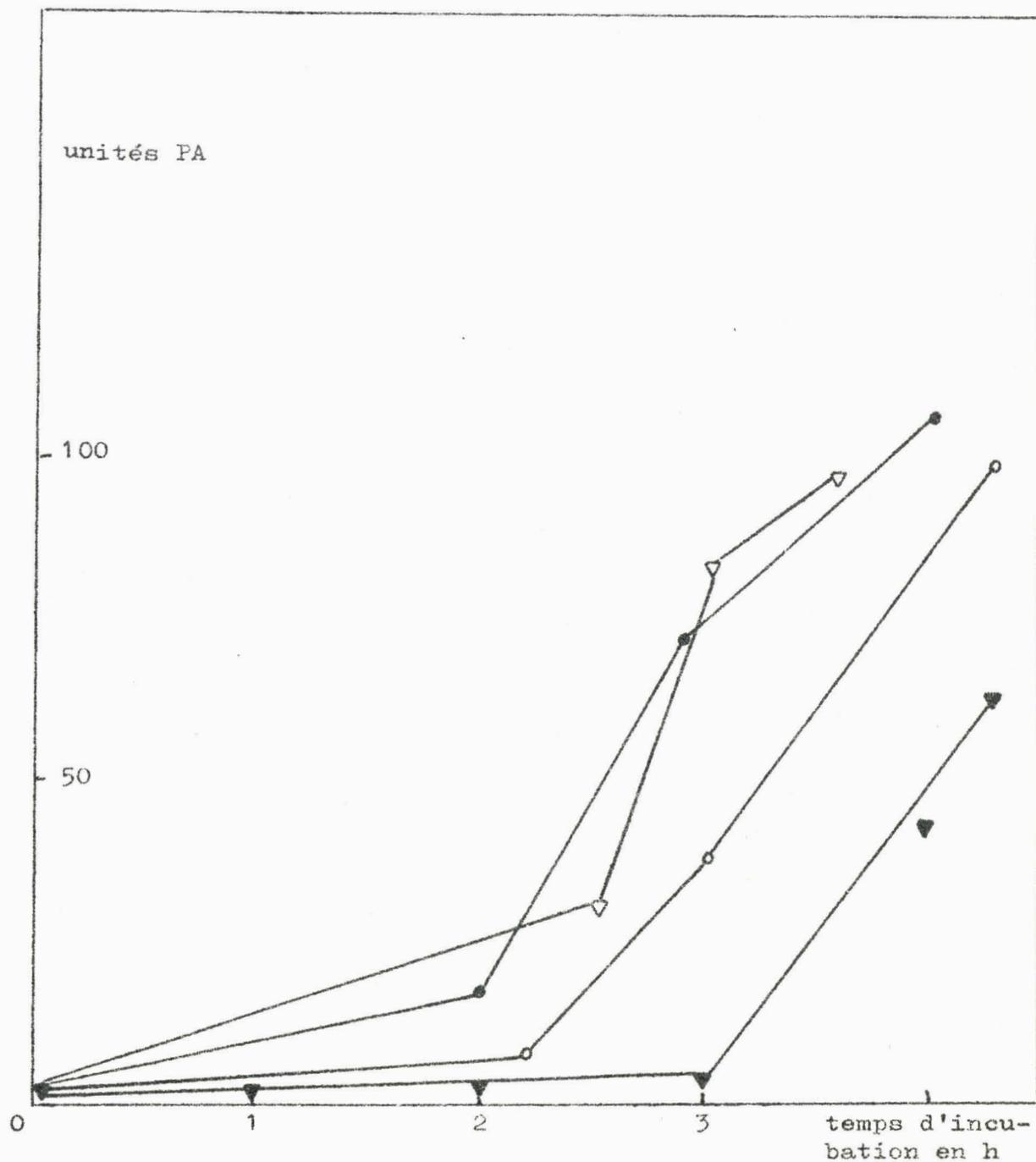
4 . Discussion

Comme le montre la microscopie électronique, il semble que les procédés de cassage ne fragmentent pas de façon homogène les particules. La proportion de particules non touchées varie avec les procédés physiques employés. Si l'on admet que l'activité est due à ces particules, il est normal que la phase de latence reste constante, alors que le taux de synthèse diminue en fonction du nombre de particules restées actives lors du traitement physique. Par contre, l'augmentation inconstante du temps de latence observé au cours du vieillissement du P1 à 0°C reste inexplicable.

Nous avons donc essayé de modifier la phase de

Figure 27

Essai de modifications de la phase de latence :
après 72 h de conservation à 0°C le temps de latence peut-
être allongé d'1 h.



Cinétique de la synthèse de la phosphatase

- lors de sa préparation
- ▷—▷ après 12 h de conservation à 0°C
- après 48 h de conservation à 0°C
- ◀—▶ après 72 h de conservation à 0°C

latence par préincubation du système, puisque durant l'incubation il y a des modifications de la structure du P1.

C . PROCÉDES DE PREINCUBATION DESTINÉS A MODIFIER LA STRUCTURE DE LA PRÉPARATION P1

Au cours de l'incubation, en absence d'un ou de plusieurs acides aminés indispensables, le nombre de cellules viables d'une préparation P1 diminue considérablement (chapitre III). En même temps, la synthèse de protéine est très faible, sinon totalement abolie ; il n'est plus possible de mettre en évidence la moindre augmentation d'activité phosphatasique ; par contre une certaine proportion d'acides aminés marqués est encore incorporée dans la fraction TCA insoluble (tableau XIX). Puis après l'addition des acides aminés omis, on constate la reprise de la synthèse. Nous avons voulu savoir si, après cette addition, la durée de la phase de latence était diminuée.

1 . Omission de valine, leucine et isoleucine

On constate sur la figure 28, que l'addition de VLI à la fin d'une préincubation, en absence de ces trois acides aminés, n'a aucun effet sur la phase de latence de la phosphatase alcaline. (La courbe correspondant au système préincubé durant 2 h 30 min a été déportée de 2 h 30 min vers l'origine. Il en

TABLEAU XIX

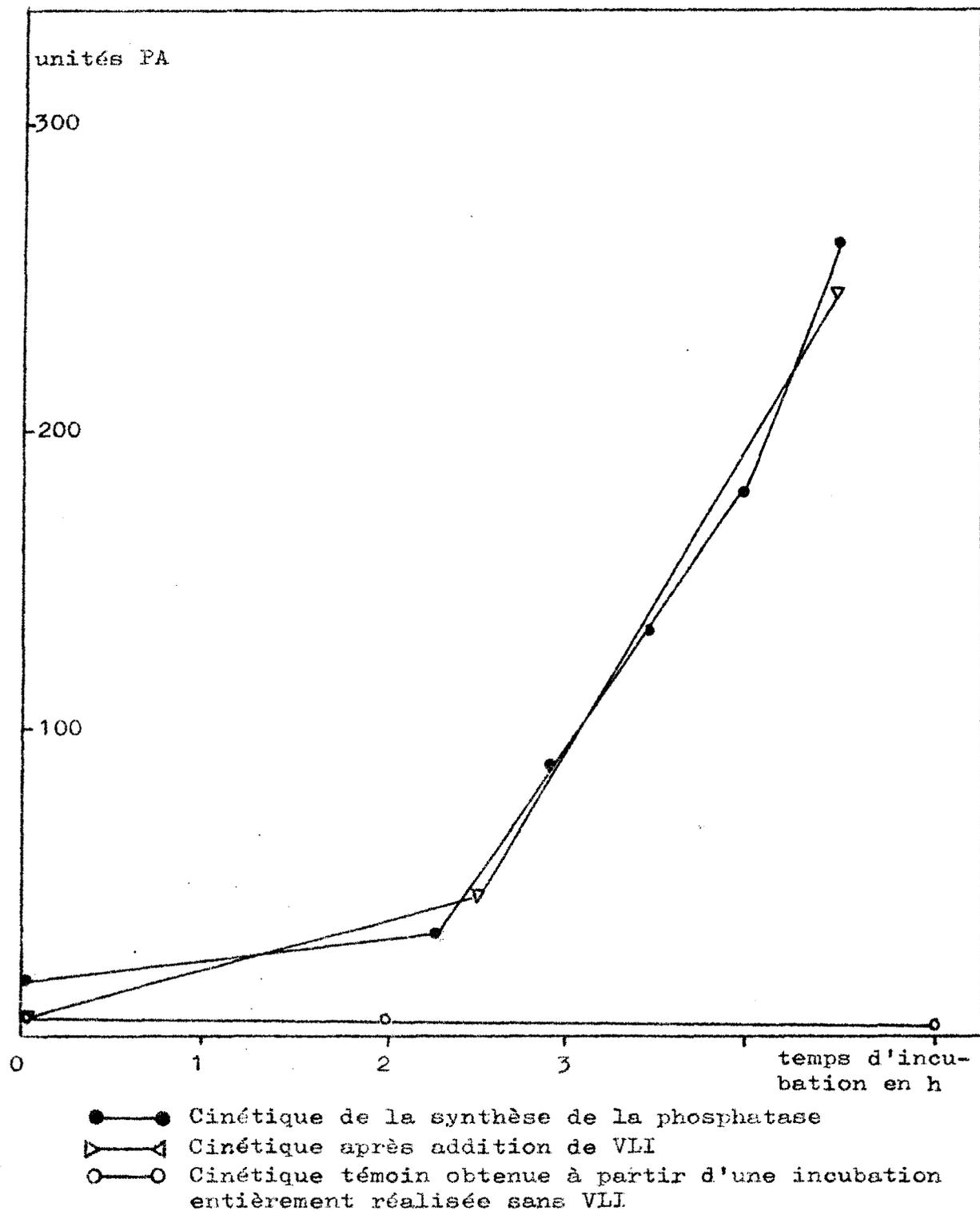
Incorporation d'acides aminés marqués en absence de synthèse phosphatasique : on observe quand même dans ces conditions l'incorporation d'une certaine proportion d'acides aminés marqués dans la fraction TCA insoluble.

Incubation de 5 h 30 min	Milieu d'incubation complet	Milieu d'incubation sans Arg	Milieu d'incubation sans VLI
Unités phosphatasiques	72	0	4,8
µmole de lysine incorporée	1,1	0,28	0,20

Incubation de 5 h	Milieu d'incubation complet	Milieu d'incubation sans VLI
Unités phosphatasiques	76	7,4
µmole d'arginine incorporée	1,8	0,32
µmole de méthionine incorporée	1,5	0,4

Figure 28

Essai de modifications de la phase de latence : l'addition de VLI à la fin d'une préincubation de 2 h 30 min (*) n'entraîne aucune modification du temps de latence



(*) Dans toutes les figures la courbe correspondant au système préincubé durant un certain temps a été déportée de ce même temps vers l'origine.

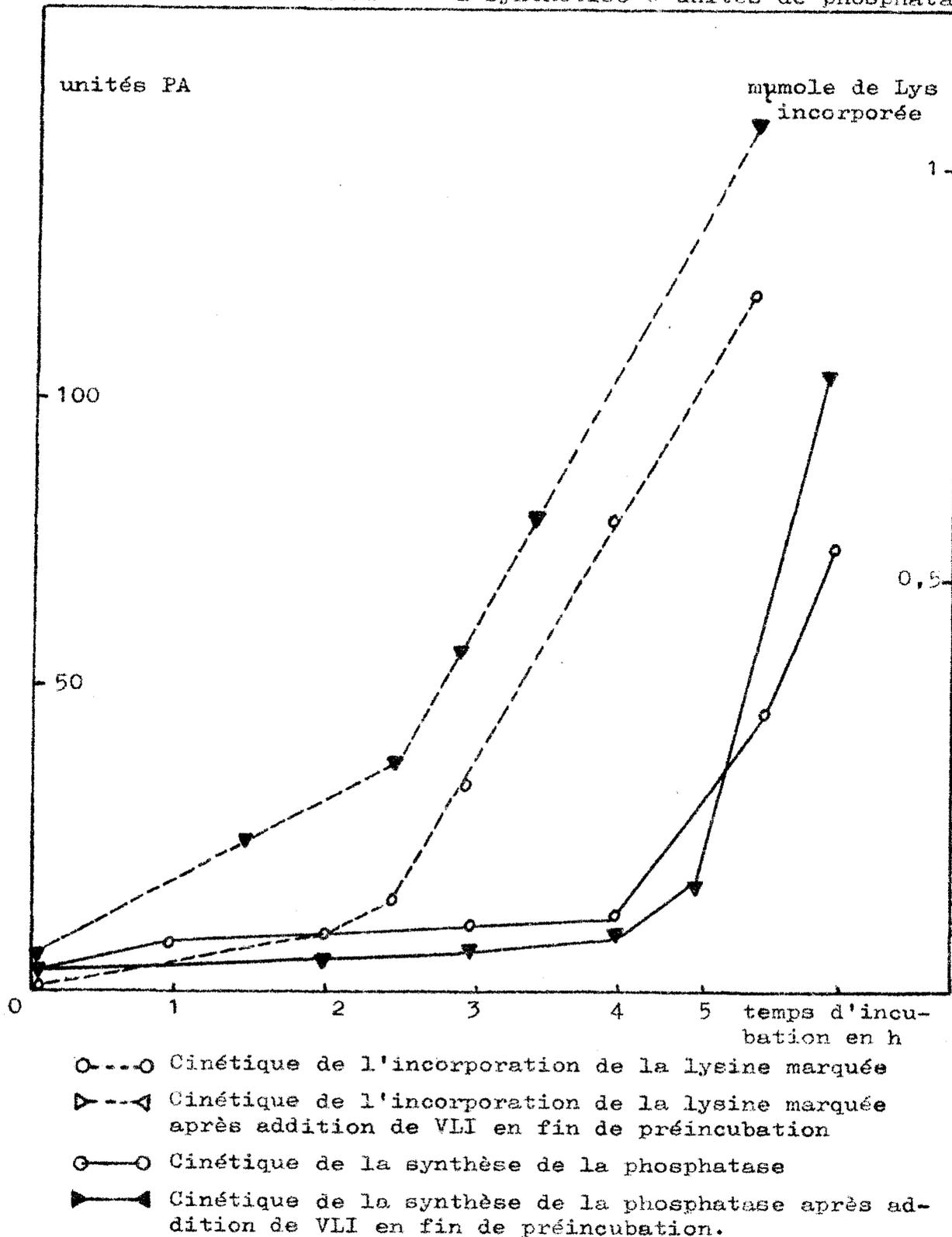
sera de même dans toutes les expériences de préincubation ; le temps origine correspond au moment où l'on ajoute le ou les acides aminés manquants). On pouvait se demander cependant, si l'une des deux parties précédemment définies de la phase de latence, ne serait pas modifiée par rapport à l'autre. Sur la figure 29, nous pouvons comparer les cinétiques de la synthèse de la phosphatase alcaline et de l'incorporation de la lysine ^{14}C avec celles obtenues après une préincubation sans VLI de 2 h 30 min : elles demeurent identiques. Donc la préincubation, en absence de synthèse protéique, ne modifie ni la phase de latence non spécifique (correspondant à la mise en place des structures actives), ni la phase de latence spécifique de la phosphatase alcaline.

2 . Omission d'arginine ou de la totalité des acides aminés

Les courbes provenant du même type d'expérience, l'arginine étant ajoutée après 2 h ou 2 h 30 min de préincubation, sont reproduites sur la figure 30. Les résultats sont identiques aux précédents : la durée des deux phases de latence reste constante. Cependant, si l'on constate parfois une légère diminution du temps de latence (figure 31), elle n'excède jamais une heure, que l'arginine soit ajoutée au système après 2 h ou 3 h de préincubation (figure 32).

Figure 29

Comparaison des cinétiques de la synthèse de la phosphatase et de l'incorporation de lysine ¹⁴C avec celles obtenues après une préincubation sans VLI de 2 h 30 min. Après 5 h 30 min d'incubation le témoin sans VLI a synthétisé 6 unités de phosphatase.



Comparaison des cinétiques de la synthèse de la phosphatase et de l'incorporation d'Arg ^{14}C avec celles obtenues après une préincubation sans Arg de 2h ou de 2h 30 min. Après 5h d'incubation le témoin sans Arg a synthétisé 4,8 unités de phosphatase.

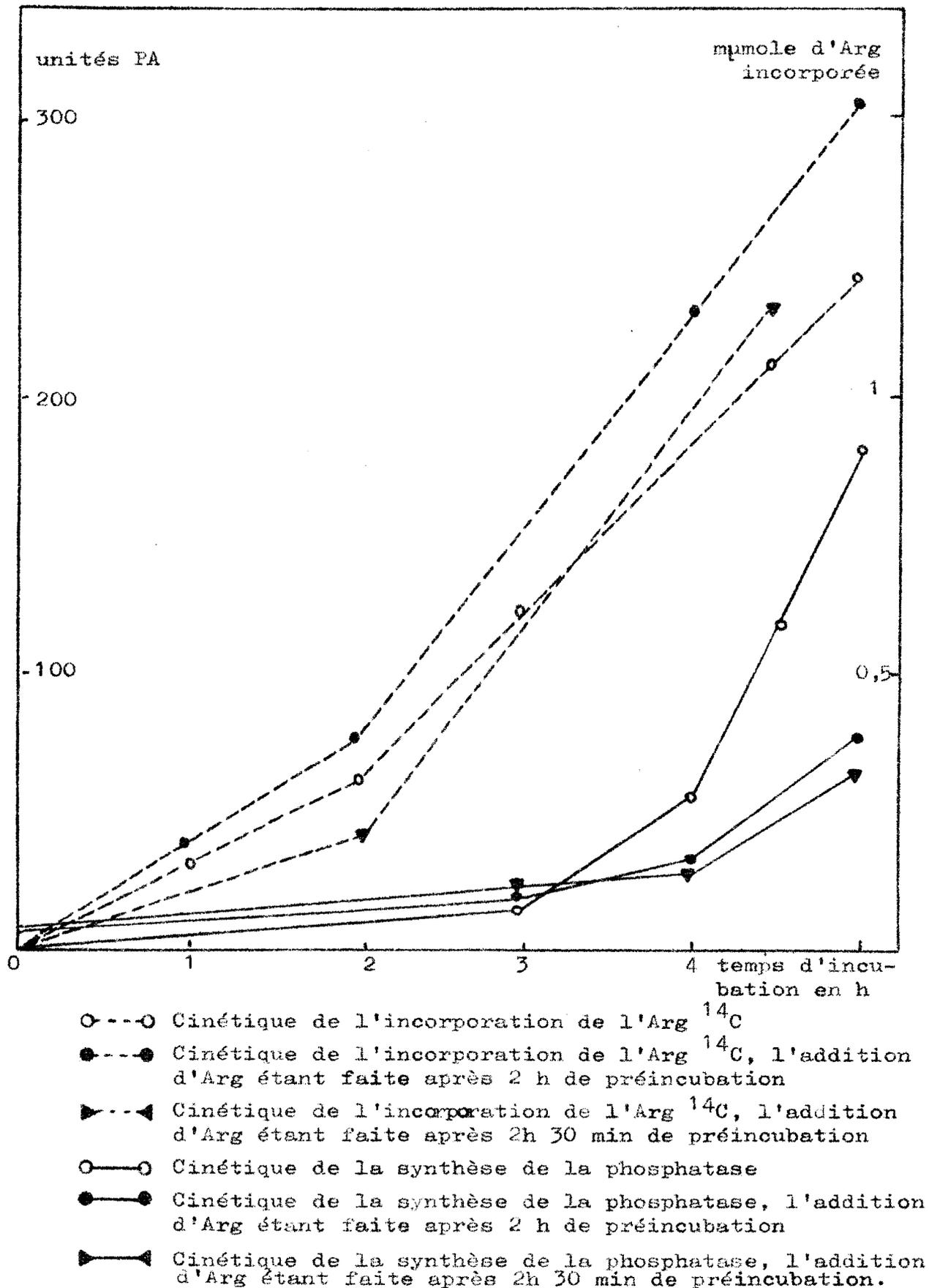


Figure 31

Comparaison des cinétiques de la synthèse de la phosphatase après une préincubation de 2 h 30 min sans arginine d'une part et sans amino-acides d'autre part.

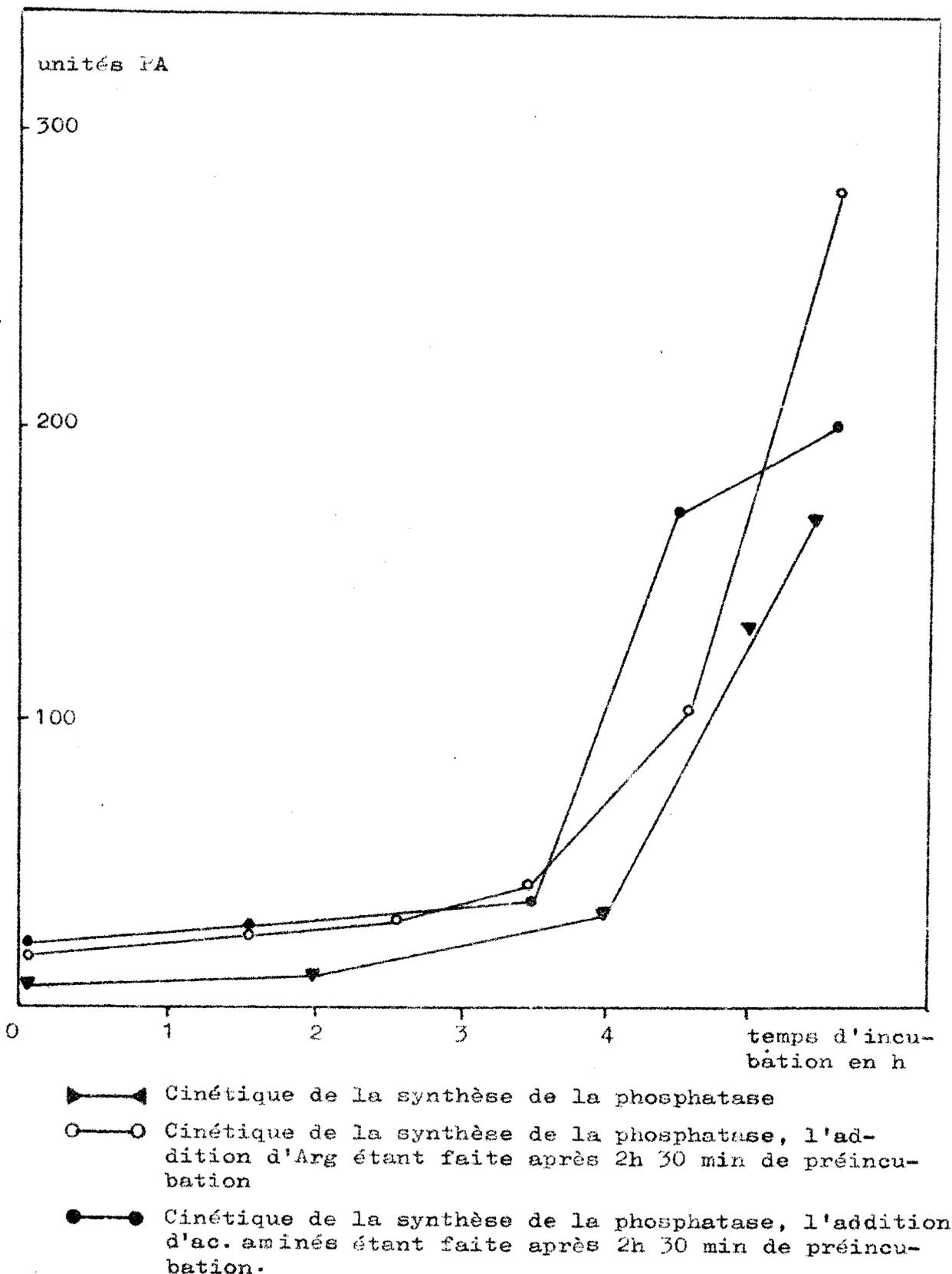
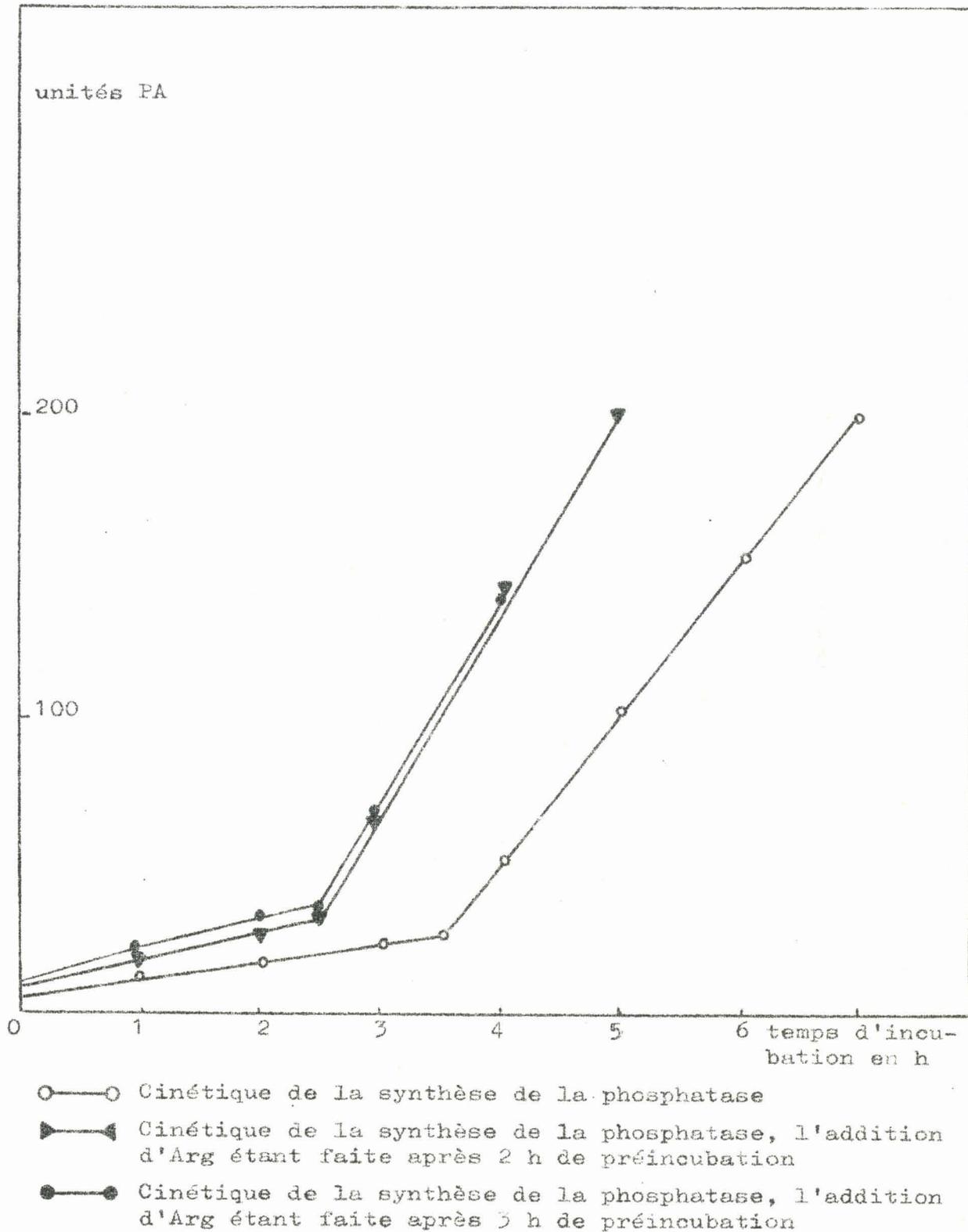


Figure 32

Comparaison des cinétiques de la synthèse de la phosphatase après des préincubations de 2 h ou de 3 h sans arginine : la diminution du temps de latence n'excède jamais une heure quelque soit le cas. Après 5 h d'incubation, le témoin sans arginine a synthétisé 4 unités de phosphatase.



3 . Discussion

Nous venons de voir que dans la plupart des cas la préincubation n'était pas capable de raccourcir la phase de latence.

Par conséquent, puisque dans nos conditions expérimentales aucune synthèse protéique importante ne peut avoir lieu durant la préincubation et que la synthèse du mRNA est indépendante de la synthèse protéique, il faut considérer que la phase de latence non spécifique est sous la dépendance de la synthèse protéique, bien que celle-ci ne puisse être mise en évidence, par définition, au cours de cette phase. Il ne s'agit pas d'une restructuration mécanique (due aux dommages structuraux causés lors de la préparation), car celle-ci se ferait aussi bien en absence d'arginine qu'en sa présence. Il ne s'agit pas également d'une réparation due aux chocs thermiques, car ici aussi on ne voit pas comment cela pourrait être lié à la synthèse protéique. Ces deux hypothèses sont encore infirmées par le fait qu'après 2 h 30 min d'incubation, si l'on centrifuge du P1 à 0°C et qu'on le remet en suspension, (ce qui correspond au traitement mécanique à froid habituel du P1) soit dans son propre surnageant, soit dans un milieu d'incubation neuf, on n'observe pas d'augmentation de la phase de latence.

Il faut donc concevoir que la synthèse peptidique ne

peut commencer qu'après une période de préparation (2 h à 2 h 30 min) durant laquelle les particules doivent se trouver dans les conditions absolument normales d'incubation. Cependant, la quantité minime de matériel précipitable au TCA qui peut être décelée, prouve que si, durant cette période les acides aminés sont pris en charge par leur tRNA spécifique, ils ne sont pas utilisés.

L'explication la plus simple serait que les particules ne retrouvent leur activité propre qu'après la synthèse d'une ou plusieurs protéines indispensables à leur structure ou à leur fonctionnement. Cependant, ce raisonnement nous conduit à une impasse si l'on considère l'ensemble des particules comme une fraction homogène.

En effet, il se pourrait que la synthèse d'un facteur protéique, indispensable à la restructuration, soit faite à l'état de traces, ce qui ne nécessiterait pas de restructuration préalable. Or, même en absence d'acides aminés indispensables, on constate une incorporation mesurable d'acides aminés marqués dans des peptides (tableau XIX) correspondant au moins à 20 p. 100 de l'incorporation normale. Cette incorporation se fait, nous semble-t-il, à partir d'acides aminés résiduels dans la préparation P1, ou encore provenant du turnover de peptides préexistants. Si une synthèse protéique relativement importante

peut avoir lieu, il n'est pas possible d'expliquer pourquoi elle n'est pas soumise à une phase de latence.

Par contre, si l'on considère que les particules forment une population très inhomogène, certaines d'entre elles, les moins abimées, mais aussi les moins nombreuses, doivent pouvoir synthétiser immédiatement des protéines, mais la très grande majorité doit retrouver des structures actives. On peut penser que les particules capables de synthèse forment à partir des acides aminés certaines enzymes indispensables, qui permettent à la grande masse de la préparation, de commencer les synthèses. Ceci nous semble l'hypothèse la plus vraisemblable, quoique nous n'ayons jamais pu déceler dans un surnageant d'incubation, un facteur accélérant la synthèse d'une préparation P1 nouvelle.

Le fait que dans certains cas la phase de latence soit diminuée après préincubation, s'explique de la manière suivante : si l'addition de l'acide aminé omis est faite après la fin de la phase de latence non spécifique, donc durant la formation du RNA messager de la phosphatase alcaline, (en supposant que la deuxième phase de latence corresponde à cette synthèse) la phase de latence obtenue sera d'autant plus courte que la synthèse du mRNA avant l'addition de l'acide aminé manquant, aura été plus longue.

III . ACTION D'INHIBITEURS SPECIFIQUES DE LA SYNTHÈSE PROTÉIQUE

Nous allons d'abord étudier les substances pouvant dégrader des structures ou des molécules indispensables à la synthèse protéique. Nous examinerons ensuite, en employant les inhibiteurs de cette synthèse, les effets qui en résultent.

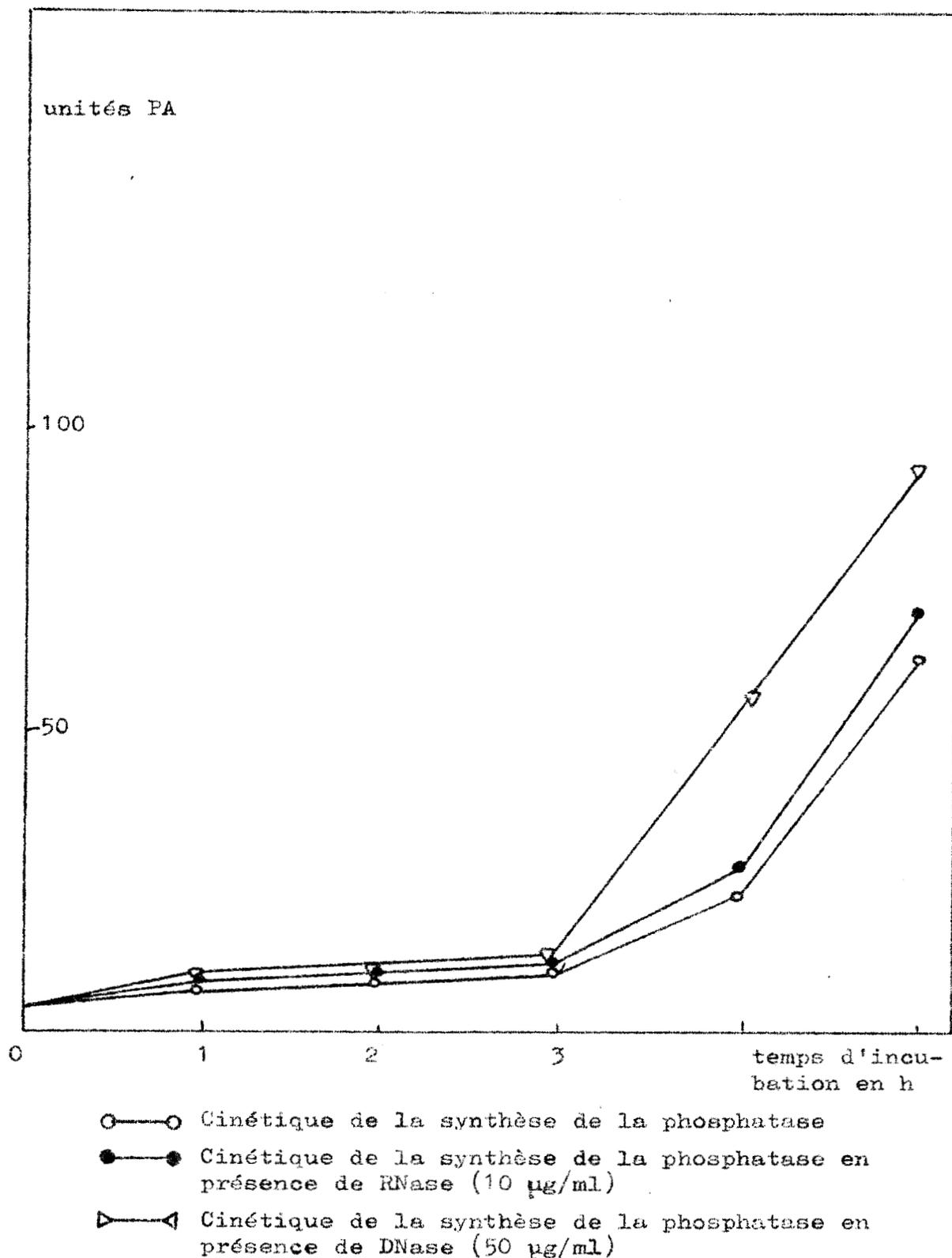
A . ACTION DE LA RIBONUCLEASE ET DE LA DESOXYRIBONUCLEASE

La figure 33 représente la cinétique de la formation de la phosphatase alcaline en présence de DNase (50 µg/ml) ou de RNase (10 µg/ml) ajoutées l'une et l'autre au début de l'incorporation.

Contrairement à ce que l'on pouvait attendre, ni l'une ni l'autre n'inhibent fortement le pouvoir de synthèse de la préparation P1. On constate seulement une augmentation de la durée de la phase de latence ; ce phénomène n'est d'ailleurs pas constant et le plus souvent l'addition de DNase ou de RNase au moment où débute l'incubation ne se traduit par aucune modification de la cinétique. Puisque la préparation P1 se trouve avant l'incubation, dans des conditions de répression pour la synthèse de la phosphatase alcaline, il y a donc au cours de l'incubation transcription du DNA des particules en RNA qui

Figure 33

Cinétique de la synthèse de la phosphatase alcaline en présence de DNase ou de RNase. L'addition des nucléases est faite dès le départ de l'incubation.



est lui-même copié. Comme dans les systèmes simples, in vitro, la DNase empêche la transcription du DNA par la RNA polymérase et que la RNase bloque immédiatement et totalement les systèmes formés de ribosomes, enzymes solubles, tRNA (149) il faut en conclure que le DNA portant l'information pour la molécule de phosphatase et le mRNA correspondant, sont parfaitement protégés dans les particules de nos préparations P1. Un argument supplémentaire confirme ces faits : il s'agit des essais que nous avons tentés pour bloquer en début d'incubation le DNA de la fraction P1 par les histones riches en arginine. Nous avons montré précédemment que les histones possédaient une action bactéricide intense grâce à leur pouvoir de flocculer certaines protéines (74) en plus de leur propriété fondamentale de se combiner avec le DNA. Nous constatons sur le tableau XX que la synthèse de la phosphatase, en présence de 1000 µg d'histones par ml, reste très importante (60 p. 100 de l'activité initiale). Les concentrations inhibitrices en histones sont trop fortes par rapport aux concentrations en DNA du P1, pour que l'on puisse attribuer leur activité à un blocage de l'acide nucléique.

Par contre, elles correspondent bien au rapport des concentrations nécessaires pour obtenir la précipitation protéines-histones. La diminution d'activité semble donc correspondre à ce second phénomène. Les histones étant nettement plus réactives, avec le DNA qu'avec les protéines, on peut en conclure que le

TABLEAU XX

Action des histones-arginine sur la synthèse de la phosphatase alcaline à partir du système P1. Les histones ont été préparées selon la technique de Daly et Mirsky (38) modifiée (40).

Concentration des histones en µg/ml	Unités de phosphatase al- caline synthétisée
0	320
1000	190
500	284
200	272
100	332

Les milieux d'incubation renferment 480 µg de protéines (P1) par ml, et 120 µg de DNA.

Les histones sont ajoutées avant l'incubation et en absence d'ions Ca^{2+} . Ceux-ci sont additionnés au début de l'incubation.

DNA est protégé dans les particules, par des protéines.

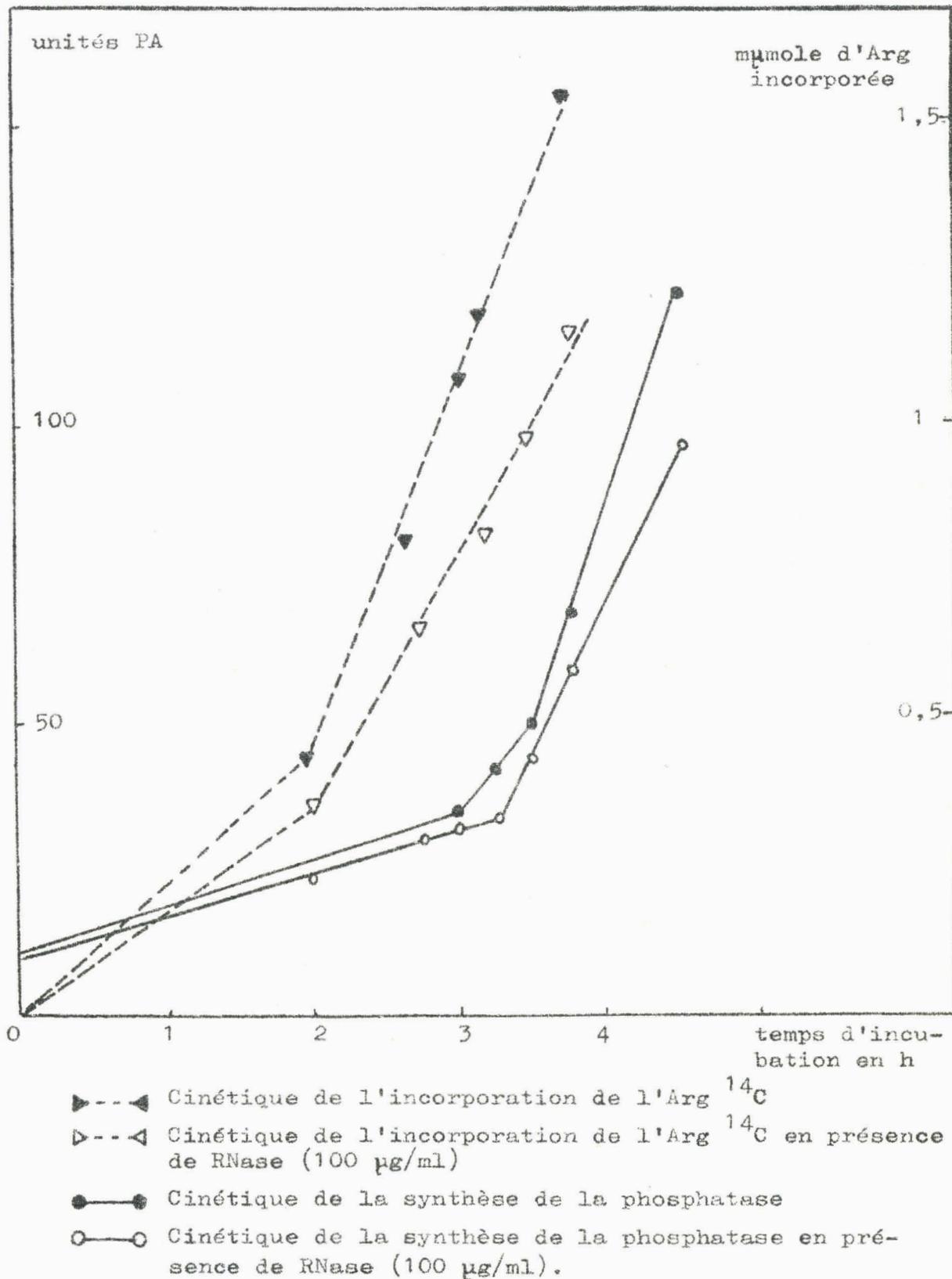
Il faut remarquer que les préparations P1 réalisées à partir de la même souche, mais dans un laboratoire différent, se montrent très sensibles à l'action des deux enzymes (114) et que des préparations faites dans ce même laboratoire pour la synthèse de la β -galactosidase induite (167) se montrent, comme les nôtres, résistantes aux nucléases. On doit donc penser que selon le mode de préparation de la fraction P1 et les souches utilisées, les acides nucléiques actifs sont plus ou moins bien enfermés dans les particules. Cette résistance de nos préparations aux nucléases est-elle particulière à la synthèse de la phosphatase alcaline ou générale pour tous les peptides ?

L'examen de la figure 34 montre que la ribonucléase n'a pas plus d'activité sur la synthèse de la phosphatase alcaline que sur l'incorporation des acides aminés marqués, on peut tout au plus déceler une légère diminution du taux de synthèse.

Dans les mêmes conditions, des constatations identiques sont faites avec la DNase. Par contre, on obtient des résultats différents lorsque l'enzyme est ajoutée avant l'incubation ou au cours de la synthèse. En effet, si la nucléase est ajoutée après 2 h 30 min d'incubation, son action inhibitrice sur la synthèse de l'enzyme est importante (60 p. 100),

Figure 34

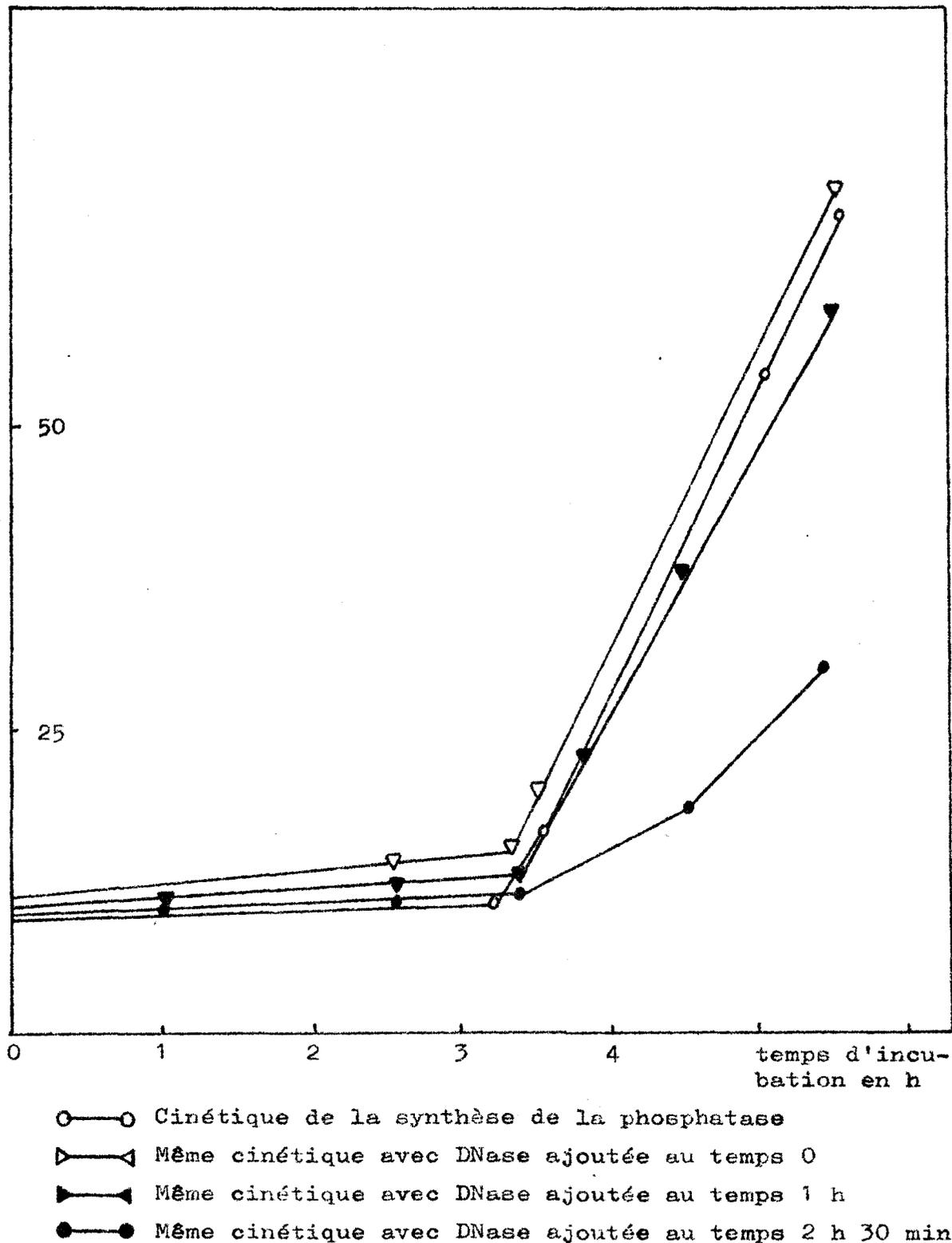
Action de la RNase, ajoutée au temps zéro, sur la cinétique de l'incorporation de l'arginine marquée et sur celle de la synthèse de la phosphatase.



après une heure, elle est légèrement active, alors qu'additionnée au temps zéro, elle est pratiquement inactive. On peut interpréter ces résultats en s'aidant de la microscopie électronique. Comme nous l'avons précédemment mentionné, la morphologie des particules évolue au cours de l'incubation, le DNA interstitiel disparaît et les membranes paraissent se distendre. Les particules deviendraient alors perméables à la DNase. Cependant, il faut admettre que la nucléase ajoutée au temps zéro, a été détruite dans les premières heures de l'incubation, puisqu'elle n'agit plus ultérieurement lorsque les particules s'ouvrent. La conséquence importante de cette expérience dont les cinétiques qui en résultent sont reportées sur la figure 35, est qu'après 2 h 30 min d'incubation, le gène de structure de la phosphatase alcaline n'est pas encore transcrit, la latence prenant fin dans ce cas après 3 h 30 min. L'accroissement de l'activité de la DNase observé lorsqu'elle est ajoutée après un certain temps d'incubation, n'est cependant pas un fait reproductible. Sur dix préparations de P1 différentes, en moyenne, quatre d'entre elles sont sensibles à la DNase après 2 h 30 min d'incubation, deux y sont sensibles d'emblée et les quatre dernières toujours résistantes. Il est vraisemblable que ces variations dépendent du moment où est transcrit le DNA par rapport au moment où le système devient perméable aux nucléases. S'il est perméable avant la transcription, la DNase ajoutée tardivement bloque la

Figure 35

Action de la DNase (50 $\mu\text{g/ml}$) ajoutée à différents temps, sur les cinétiques de l'incorporation de l'arginine marquée et de la synthèse de la phosphatase.



synthèse. Pour la RNase, son addition à des temps divers, ne nous a jamais donné de résultats nets.

B . ACTION DE LA PUROMYCINE ET DU CHLORAMPHENICOL

Ces deux antibiotiques agissent à des niveaux très voisins mais différents. Le chloramphénicol (CAL) bloque la synthèse in vitro des protéines d'E. coli (149) mais demeure inactif sur un système obtenu à partir de réticulocytes (49), alors que la puromycine agit dans ces deux cas (49,224). La puromycine, de par sa structure d'aminocyl nucléoside (10) est très voisine d'un aminocyl-AMP et interfère dans le transfert, des aminocyl-tRNA aux protéines microsomales de foie de rat (39, 144,224). Selon Yarmolinsky et de la Haba (224) et Guarino(69) ce type d'antibiotique agirait comme un analogue du tRNA, l'extrémité terminale portant l'acide aminé. La puromycine se substituerait à l'aminocyl-tRNA comme accepteur du peptide dont le carboxyl est activé et qui se trouve lié au complexe ribosome mRNA (241). La fixation de la puromycine en bout de chaîne (2, 3) élimine le peptide du ribosome (4,19, 140). Flaks et coll. (54) ont recherché des différences entre l'action du CAL et celle de la puromycine sur le système de synthèse in vitro de Nirenberg. Alors que la puromycine inhibe la légère synthèse existant en absence de mRNA surajouté, dans ce cas,

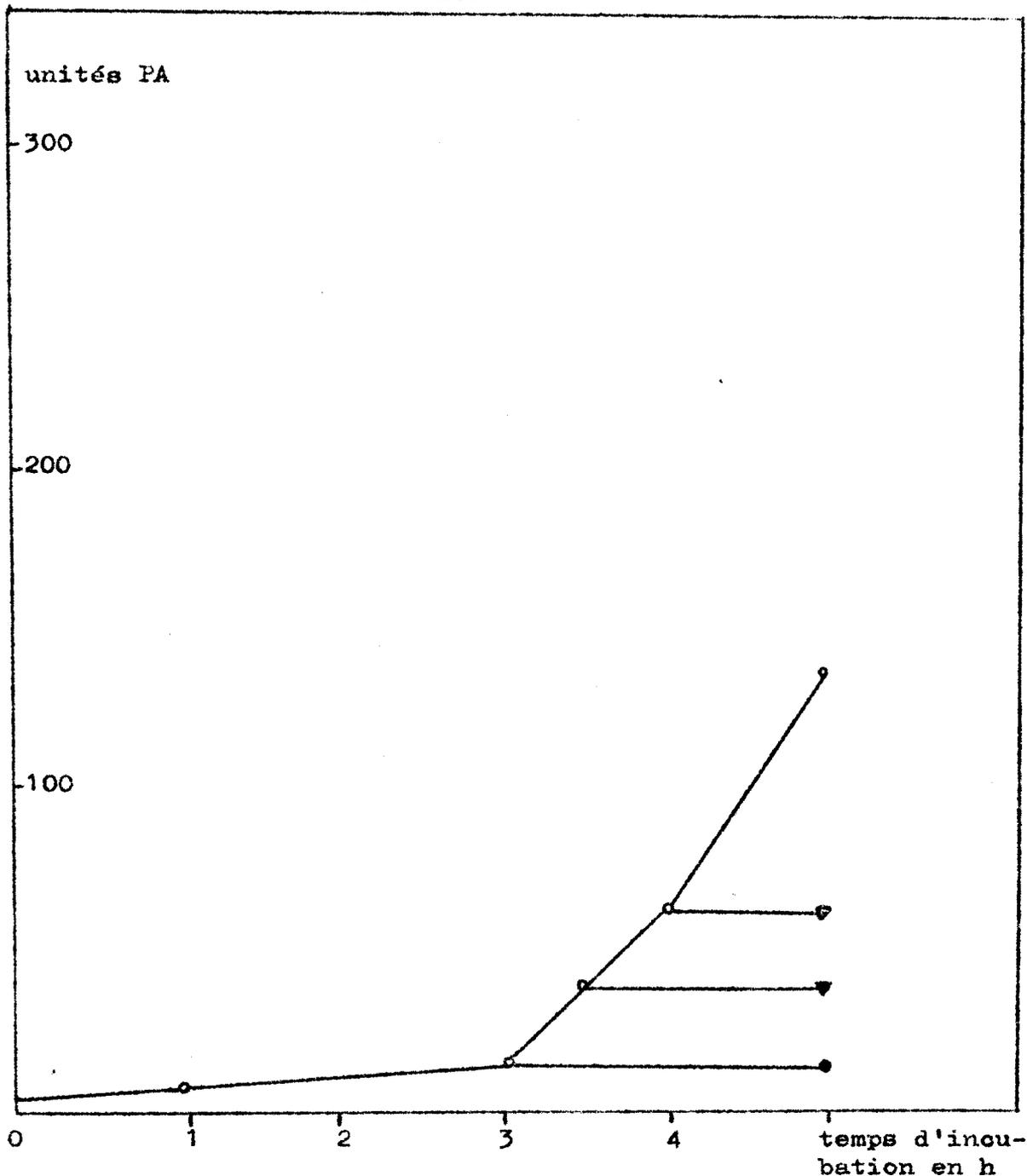
le chloramphénicol est inactif ; ceci s'expliquerait par le fait qu'il empêcherait la fixation du ribosome sur le mRNA. Cependant, de nombreux auteurs (149,206,222) et nous-même avons constaté que le CAL bloque l'incorporation des acides aminés dans les systèmes bactériens, sans RNA ajouté. Weber et De Moss (215) ont montré récemment que le CAL inhibe directement la formation de la chaîne peptidique sans empêcher le ribosome de se fixer sur le mRNA et sans bloquer la protéine sur le ribosome. La figure 36 montre que le CAL bloque totalement, quel que soit le moment de son addition, toute synthèse de phosphatase alcaline dans le milieu d'incubation. Il en est de même pour l'incorporation des acides aminés marqués. Ces résultats s'observent avec une concentration en CAL de 30 µg par ml.

Quant à la puromycine, ses effets sont beaucoup plus nuancés. On constate sur la figure 37 que l'inhibiteur ajouté soit au temps zéro, soit à différents temps après le début de l'incubation, bloque pratiquement toute synthèse d'enzyme active. Si par contre elle bloque toute incorporation lorsqu'elle est ajoutée au temps zéro, la formation de peptides se poursuit lorsque l'addition est faite 1 h ou 2 h 30 min après le début de l'incubation.

La puromycine élimine les peptides qui se trouvent

Figure 36

Inhibition de la synthèse de la phosphatase alcaline par le chloramphénicol (30 µg/ml) quelque soit le temps de son addition au milieu d'incubation.

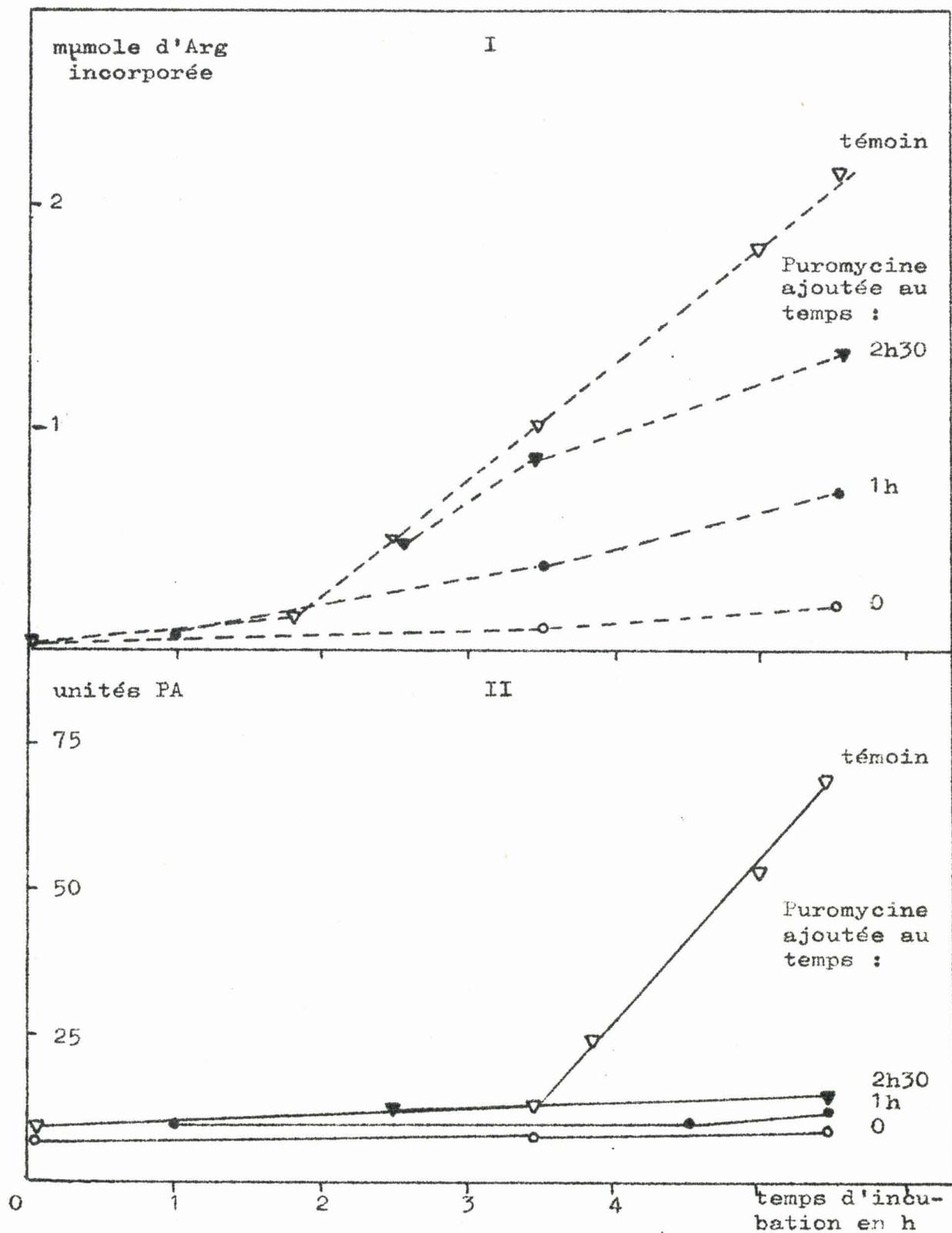


Cinétique de la synthèse de la phosphatase :

- sans chloramphénicol
- △ le chloramphénicol étant ajouté au temps 4 h
- ▲ le chloramphénicol étant ajouté au temps 3 h 30 min
- le chloramphénicol étant ajouté au temps 3 h

Figure 37

Action de la puromycine (100 $\mu\text{g/ml}$), ajoutée à différents temps, sur les cinétiques de l'incorporation de l'arginine marquée (I) et de la synthèse de la phosphatase (II).



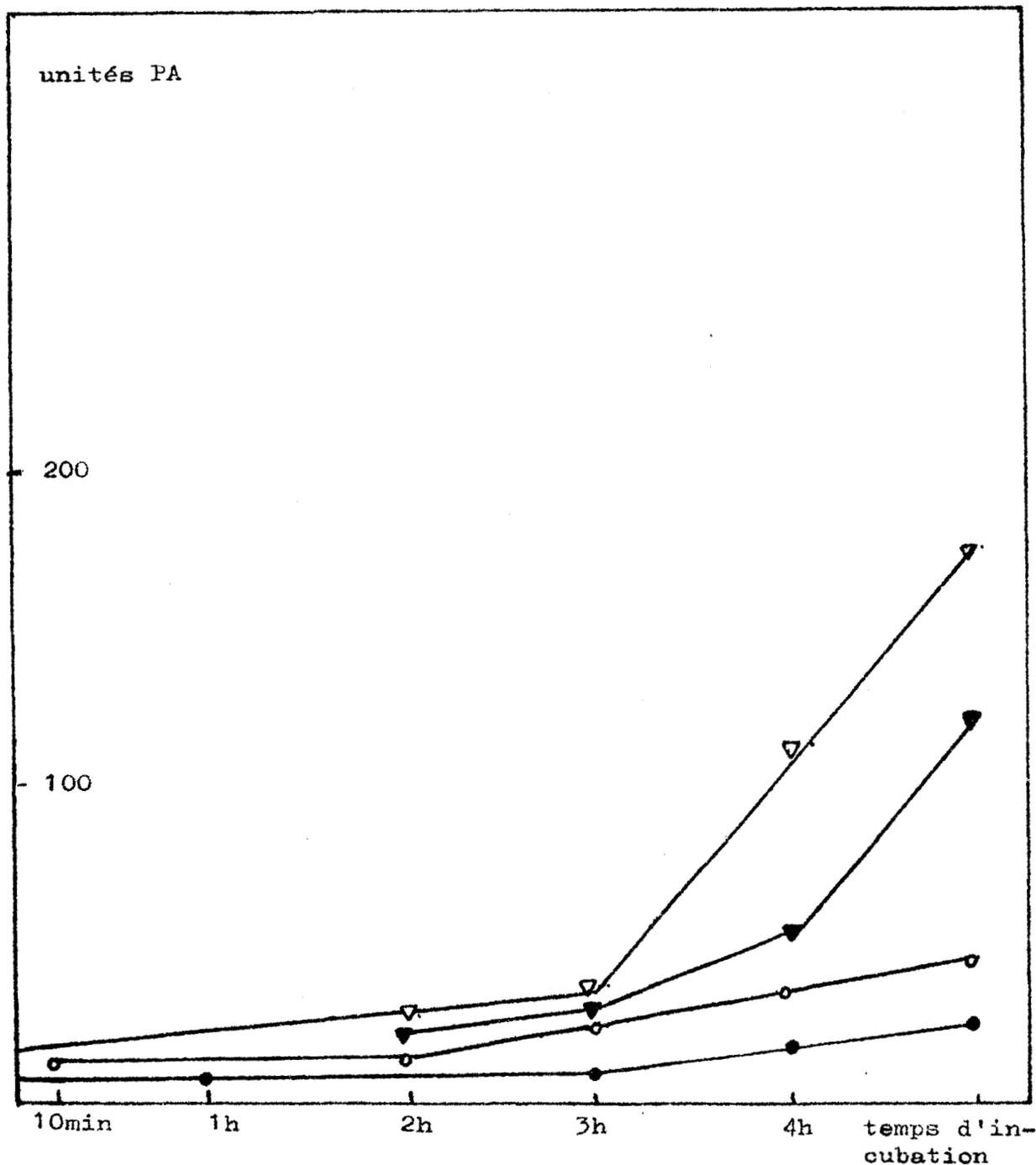
sur les ribosomes et par le fait, entrave leur achèvement en molécule enzymatique active. Quant à l'incorporation des acides aminés marqués, elle est inhibée par l'antibiotique ajouté au temps zéro, car le nombre des sites de synthèse protidique est alors très faible et la puromycine est en excès par rapport au nombre de polysomes fonctionnels. Cependant, il nous semble que, additionnée après la fin de la phase de latence non spécifique, la puromycine se trouve éliminée par fixations successives sur les très nombreuses chaînes protéiques en cours de synthèse.

C . ACTION DE L'ACTINOMYCINE D

L'actinomycine, comme on pouvait s'y attendre, inhibe totalement la synthèse de la phosphatase alcaline lorsqu'elle est ajoutée au moment où débute l'incubation. Introduite au système après 10 min (figure 38) et même 1 h d'incubation (figure 39) elle est encore très inhibitrice, ce qui prouve que lors de son addition, le DNA spécifique de la phosphatase alcaline n'est pas transcrit. Par contre, elle n'a pratiquement plus d'effet lorsqu'elle est incorporée après 2 h pour l'expérience de la figure 38 ou après 3 h pour l'expérience de la figure 39. Comme les phases de latence sont respectivement de

Figure 38

Action de l'actinomycine (20 µg/ml), ajoutée à différents temps sur la cinétique de la synthèse de la phosphatase.

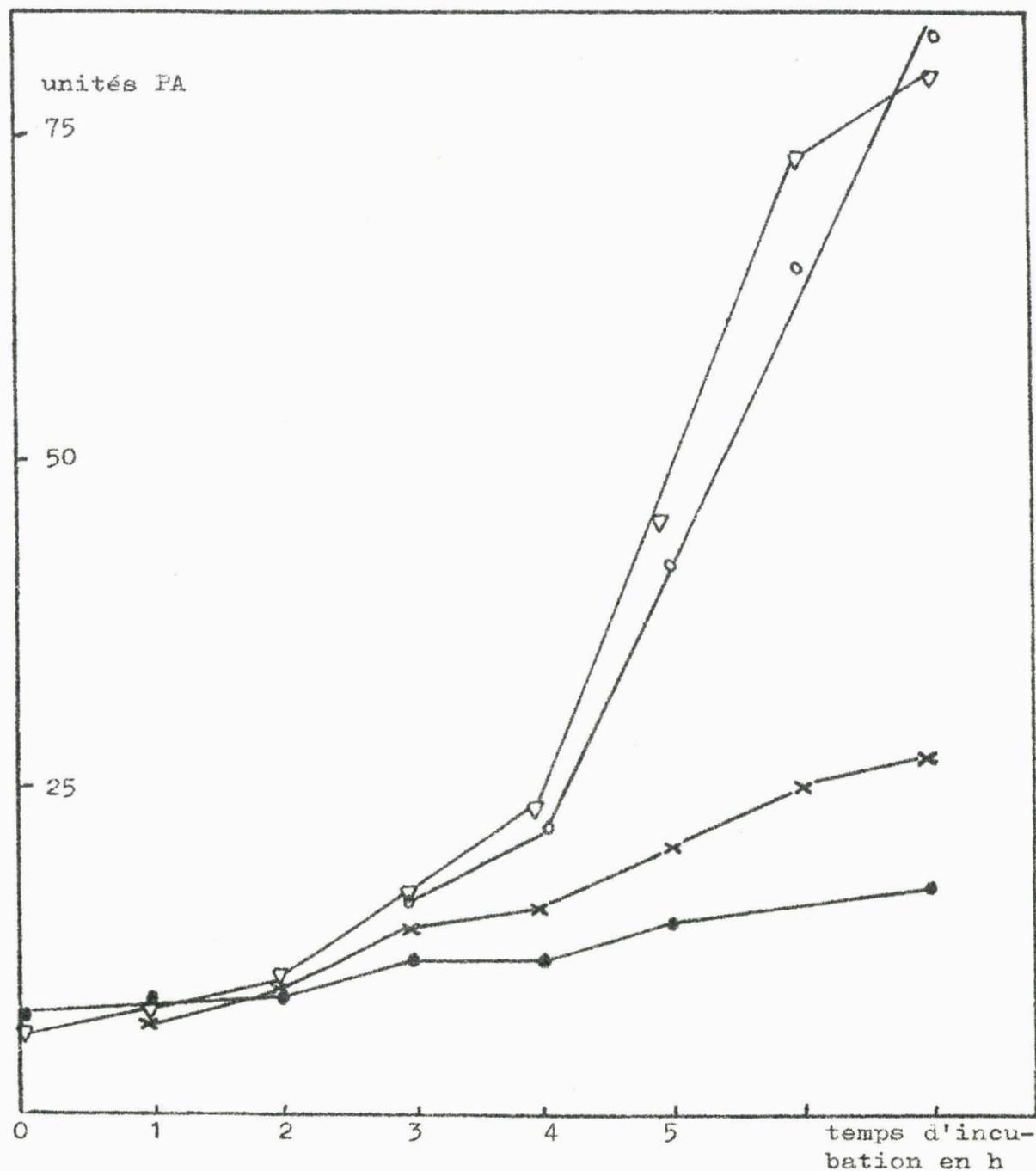


Cinétique de la synthèse de la phosphatase :

- ▷—◁ sans actinomycine
- ▲—▲ l'actinomycine étant ajoutée après 2 h d'incubation
- l'actinomycine étant ajoutée après 10min d'incubation
- L'actinomycine étant ajoutée dès le départ.

Figure 39

Action de l'actinomycine (20 $\mu\text{g/ml}$), ajoutée à différents temps sur la cinétique de la synthèse de la phosphatase.



Cinétique de la synthèse de la phosphatase :

- ▷—▷ sans actinomycine
- l'actinomycine étant ajoutée après 3 h d'incubation
- ×—× l'actinomycine étant ajoutée après 1 h d'incubation
- l'actinomycine étant ajoutée dès le départ.

3 h pour la première, et de 4 h pour la seconde, il faut en déduire que l'actinomycine est inactive lorsqu'elle est ajoutée une heure avant le début de la synthèse effective de la molécule enzymatique.

Deux hypothèses peuvent être émises : la première correspondrait à une mauvaise accession de l'actinomycine aux sites de transcription. Cela pourrait provenir par exemple, d'une pénétration lente, amenant l'antibiotique au contact du DNA une heure après son addition dans le milieu d'incubation. Or, les résultats que nous avons obtenus par l'emploi de la DNase, permettent d'éliminer cette hypothèse puisque le DNA protégé au départ de l'incubation, devient souvent accessible à cette enzyme 2 h plus tard.

La deuxième hypothèse est que le mRNA de la phosphatase alcaline est déjà transcrit 1 h avant que ne débute la synthèse. Cela implique, non seulement que le messenger est stable dans le système P1, mais aussi que le message, quoique présent, ne s'exprime pas durant une heure, donc que sa traduction en enzyme active est bloquée par un système de régulation différent de celui qui fait intervenir un répresseur au niveau de la transcription.

D . DISCUSSION

Nous avons vu que la phase de latence totale de la phosphatase alcaline était en fait la succession de deux phases distinctes :

- La première, non spécifique, durant laquelle certains remaniements biologiques et structuraux doivent provoquer la formation de sites actifs de synthèses.

- La deuxième est spécifique de la phosphatase alcaline.

1 . La phase de latence non spécifique :

Comme sa durée varie seulement d'une préparation de P1 à l'autre, il faut penser qu'il y a un rapport entre l'importance de cette phase et l'état des structures actives des particules P1. La restructuration, plus ou moins prolongée, ne peut se faire que dans un milieu complet où la synthèse protéique est possible :

- Soit que la préparation étant inhomogène, une fraction active synthétise les éléments nécessaires à la réédification de la partie abimée de la préparation, bien que l'emploi de fractions solubles de préparations en cours d'incubation n'ait aucune action sur la durée de cette phase de

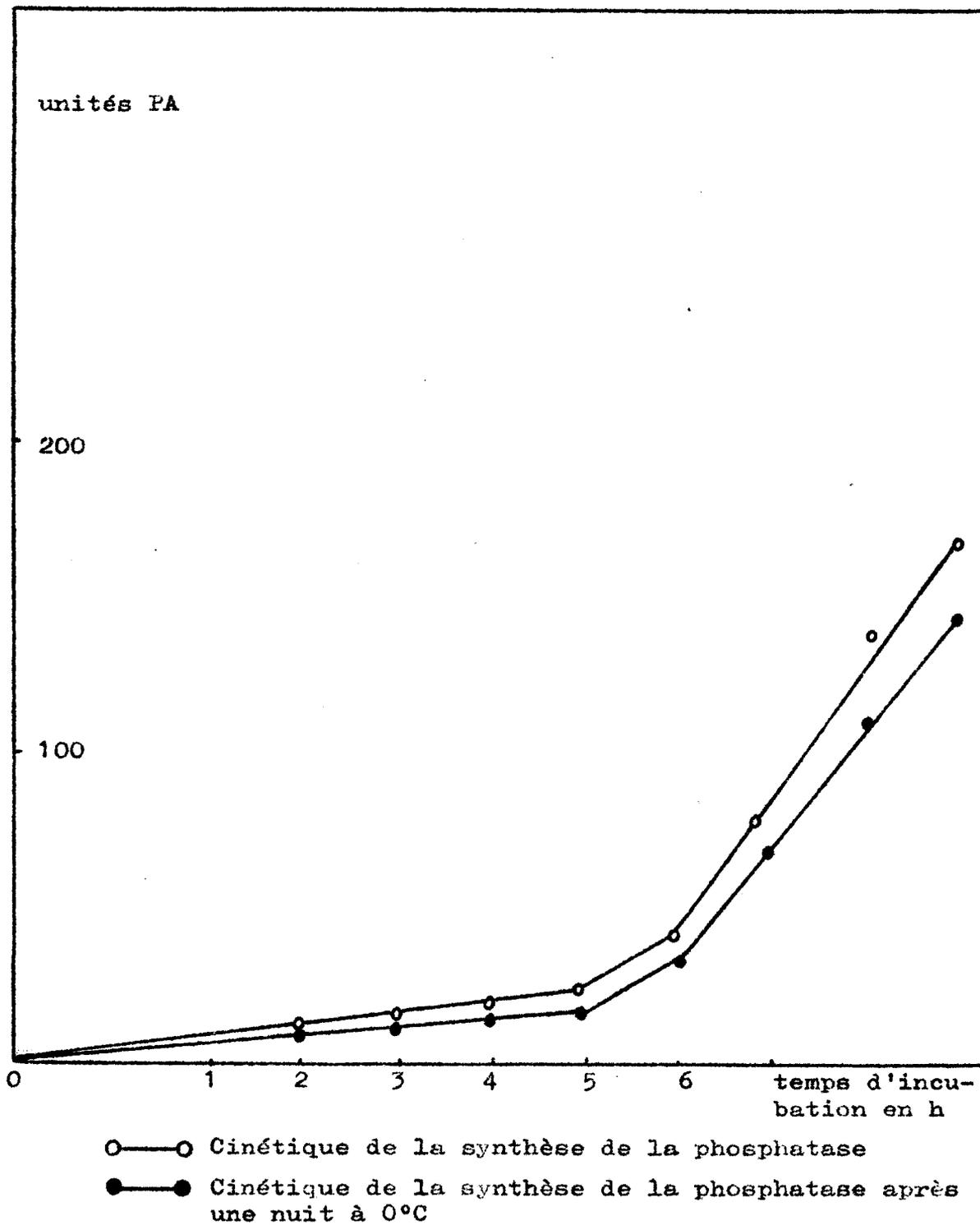
latence.

- Soit, plus vraisemblablement, que la restructuration consiste à une complémentation ou une synthèse sur des polysomes préexistants de structures protéiques en cours de formation ou fragmentées au cours de la préparation. En effet, les sphéroplastes utilisés au moment de la lyse proviennent de bactéries en phase active de croissance, c'est-à-dire que tous leurs constituants cellulaires indispensables sont en cours de synthèse. Il existe donc dans la préparation P1 des polysomes prêts à fonctionner pour donner des protéines sans apport de mRNA. Celui qui est induit dans le P1 est stable, puisque l'addition d'actinomycine au bout d'un certain temps n'empêche pas les synthèses de se poursuivre.

Une synthèse protéique amenant sans doute une restructuration est indispensable pour que celle-ci puisse se réaliser. En effet, après une incubation d'une nuit à 0°C, c'est-à-dire dans des conditions empêchant toute synthèse, la réincubation du système à 30°C n'amène aucune modification de la phase de latence par rapport à celle d'un témoin incubé le jour même (figure 40). De plus le pouvoir de synthèse acquis par les particules P1 au cours de la phase de latence non spécifique s'accompagne d'une fragilisation des particules elles-mêmes. En effet, si après 1 h 30 min à 30°C le système incubé

Figure 40

L'incubation d'un système à 0°C durant une nuit n'entraîne aucune modification du temps de latence lors de sa réincubation.



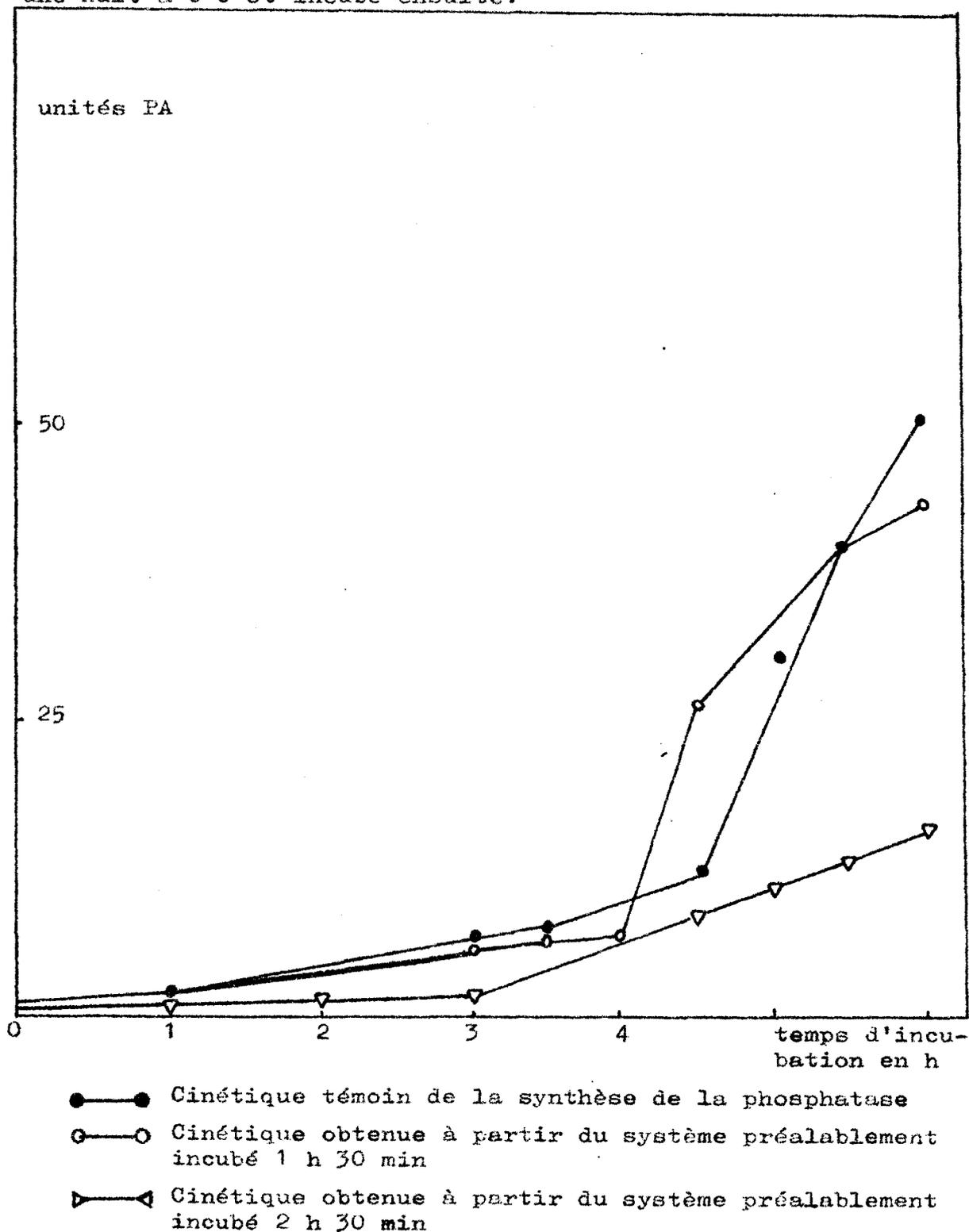
est conservé une nuit à 0°C pour être ensuite réincubé, on constate que le début de la synthèse n'a lieu que 30 min avant celle d'un témoin non incubé la veille (figure 41). La synthèse observée est presque nulle si l'on réalise la même expérience avec au départ une incubation de 2 h 30 min (figure 41). Ceci démontre :

- que dans la première expérience la structure des particules P1 réactivées est labile à 0°C puisque la phase de latence n'est pas raccourcie lors de la réincubation. On peut penser que c'est le même phénomène qui se produit au cours de la préparation P1 et que de lui découle, à notre avis, la phase de latence non spécifique.

- que dans la deuxième, l'arrêt de l'incubation après un certain temps, 2 h 30 min dans le cas présent, entraîne à 0°C une dégradation irréversible au sein de la fraction P1 puisque lors de la réincubation, la synthèse est devenue négligeable.

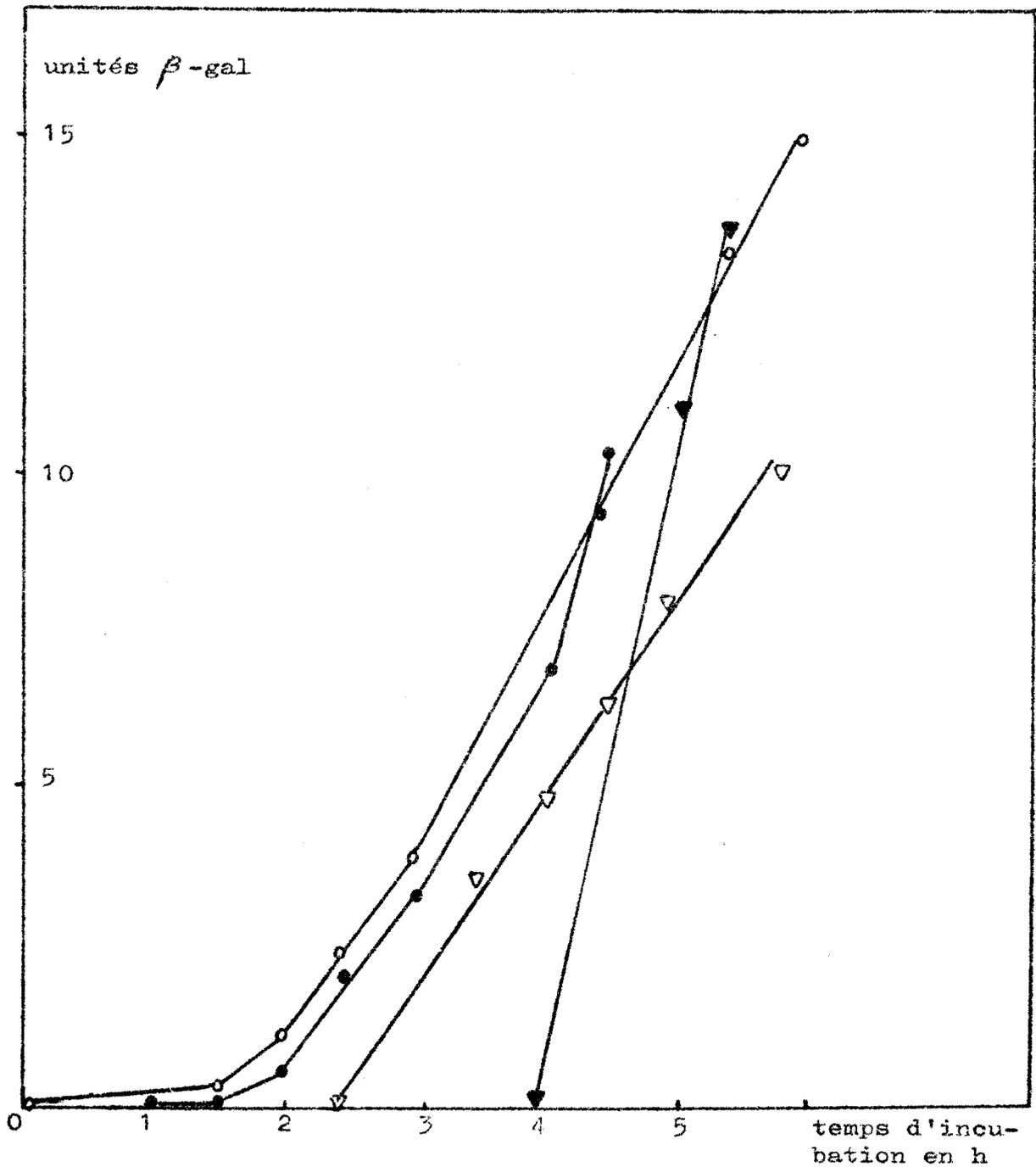
En résumé, il y aurait au cours de la préparation P1 une dégradation de structures très labiles dont la restauration, à partir de l'information contenue dans les particules, demanderait 1 h 30 min à 2 h 30 min. Ces structures rétablies, le P1 s'est fragilisé. Ceci confirme l'activité de la DNase sur les particules après 2 h 30 min d'incubation. Elles su-

Si l'on conserve une nuit à 0°C un système préalablement incubé 1 h 30 min, on s'aperçoit que lors de sa réincubation la durée de la phase de latence n'est que de 30 min inférieure à celle obtenue avec un système témoin ayant séjourné directement une nuit à 0°C et incubé ensuite.



bissent durant cette dernière une modification (accompagnée d'une incorporation d'acides aminés marqués) les rendant sensibles à la désoxyribonucléase. Cette phase de préparation qui rend possible, à notre avis la synthèse des RNA messagers, permet la formation ultérieure de protéines spécifiques contrairement aux systèmes non spécifiques pour lesquels on n'observe pas de phase de latence (149). Il est possible, en effet, de situer exactement le moment où la synthèse des RNA messagers commence ; sur l'expérience de la figure 42, on voit que l'inducteur quel que soit le moment de son addition, ne permet pas à la synthèse de débiter avant 1 h 30 min, mais une fois ce délai dépassé, l'addition d'IPTG est suivie instantanément de la synthèse de la β -galactosidase. Ceci prouve que sous l'influence de l'inducteur le mRNA est synthétisé immédiatement, par conséquent, le RNA messenger pour une raison qui nous est inconnue, ne peut se former avant la fin de la phase de latence non spécifique. Par contre, la synthèse protéique, c'est-à-dire l'addition des acides aminés les uns aux autres par les polyosomes préexistants, peut se faire puisque une certaine incorporation d'acides aminés a lieu. L'action de la puromycine nous confirme cette hypothèse. Ajoutée dès les premiers temps de l'incubation, elle élimine des ribosomes les chaînes en cours de formation ce qui, en empêchant la restructuration et la

Influence du moment de l'addition de l'inducteur sur la synthèse de la β -galactosidase.



Cinétique de la synthèse de la β -galactosidase, l'inducteur étant ajouté :

- après 1 h d'incubation
- ◻—◻ après 2 h 30 min d'incubation
- ◼—◼ après 4 h d'incubation
- dès le départ de l'incubation

synthèse du mRNA se traduirait par la disparition d'une incorporation importante après la phase de latence. Par contre, après la synthèse du mRNA, les polysomes sont extrêmement nombreux et si l'antibiotique ajouté à ce moment là chasse les chaînes peptidiques en cours d'élaboration, la quantité de puromycine n'est pas assez importante pour qu'elle puisse se fixer un grand nombre de fois sur chaque chaîne en cours. Ceci expliquerait pourquoi, dans ces conditions, la puromycine est plus active sur l'incorporation.

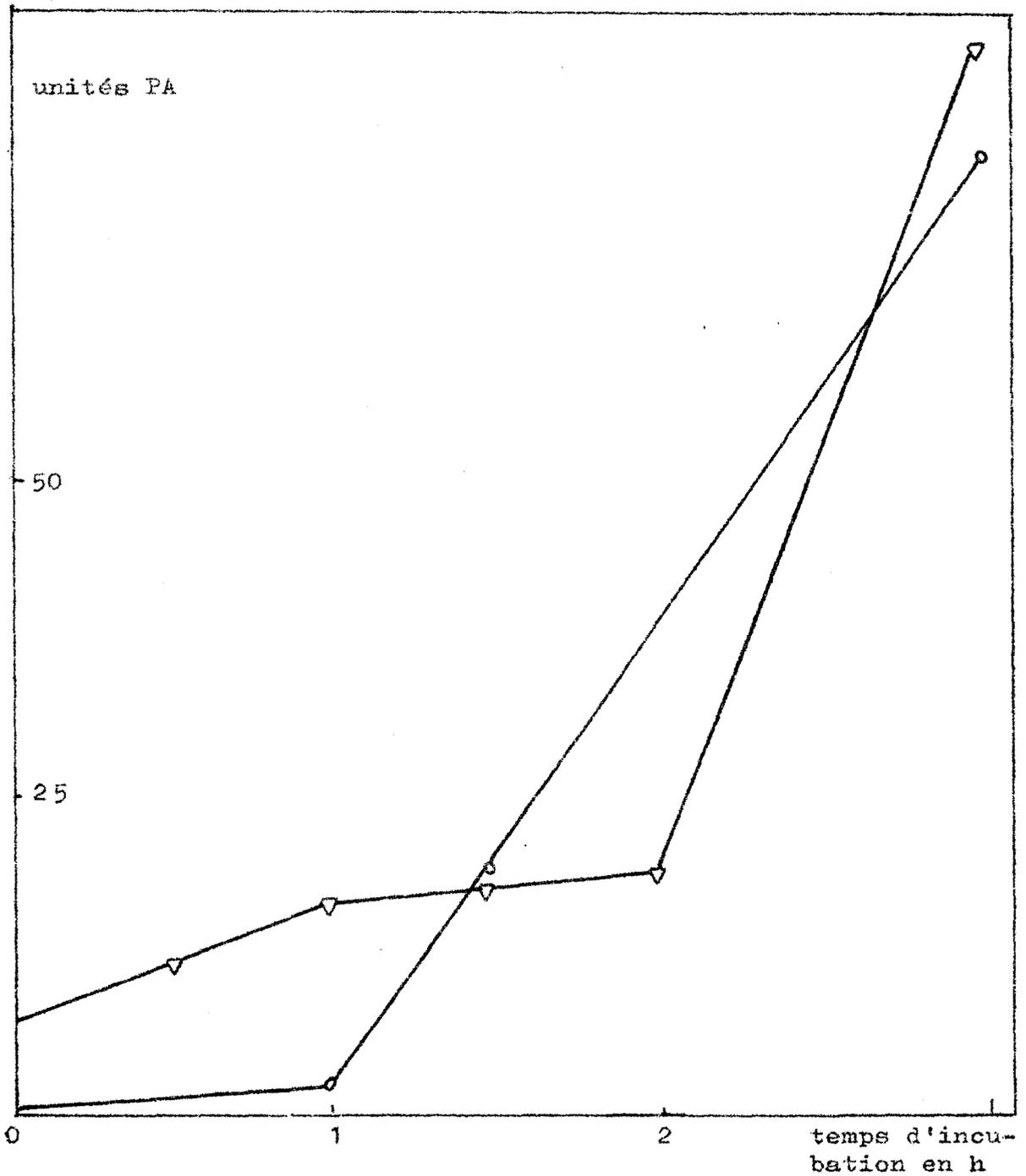
2 . La phase de latence spécifique de la phosphatase alcaline

Cette phase nous semblait correspondre à un retard dans la synthèse du mRNA de la phosphatase. En effet, si l'on réalise des incubations avec des bactéries provenant de cultures faites en absence de phosphate (figure 43) on réduit la phase totale de latence, par rapport à celles cultivées en présence de phosphate, de 2 h à 1 h.

Avec le P1, la phase de latence est réduite elle aussi de 4 h à 2 h si l'on a cultivé préalablement les cellules en absence de PO_4^{3+} , cela semble être la preuve que les 2 heures complémentaires correspondent à la synthèse du RNA messenger de la phosphatase alcaline (figure 44). Cependant, si l'on examine les courbes d'incorporation, on constate le même décalage. La

Figure 43

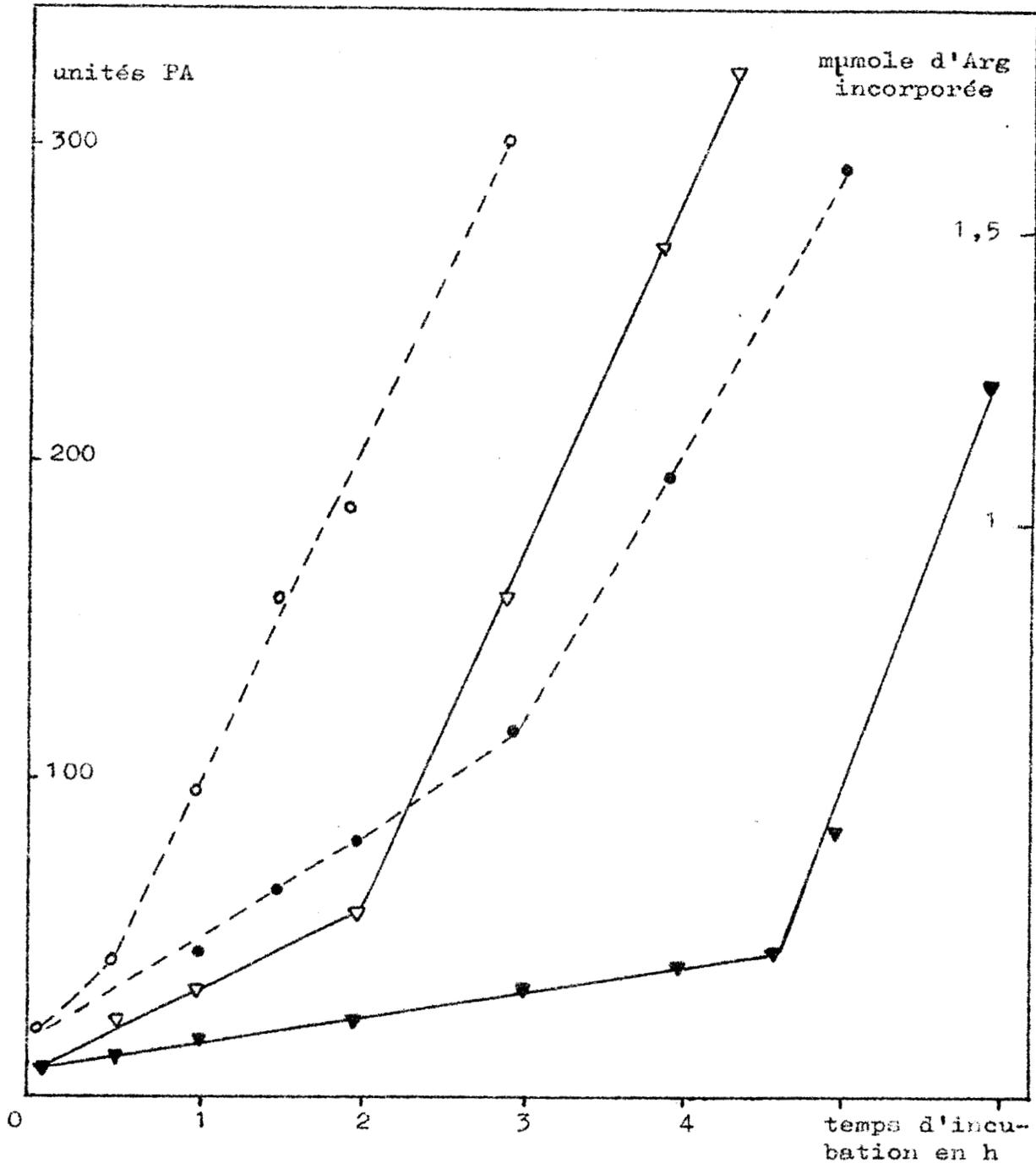
Cinétiques de la synthèse de la phosphatase par des bactéries préalablement cultivées en présence ou en absence d'ions PO_4^{3+} .



- ▷—▷ Cinétique de la synthèse de la phosphatase à partir de bactéries cultivées en présence d'ions PO_4^{3+} .
- Cinétique de la synthèse de la phosphatase à partir de bactéries cultivées en absence d'ions PO_4^{3+} .

Figure 44

Cinétiques de la synthèse de la phosphatase et de l'incorporation de l'arginine marquée par des particules P1 préparées à partir de bactéries cultivées en présence ou en absence d'ions PO_4^{3+} .



P1 préparé à partir d'une culture avec phosphate :

●---● Cinétique de l'incorporation de l'Arg ^{14}C

▲---▲ Cinétique de la synthèse de la phosphatase

P1 préparé à partir d'une culture sans phosphate :

○---○ Cinétique de l'incorporation de l'Arg ^{14}C

△---△ Cinétique de la synthèse de la phosphatase

synthèse plus rapide des peptides par les particules provenant de souches cultivées en absence de PO_4^{3+} peut s'expliquer, selon Grunberg Manago (68), par l'action du PO_4^{3+} résiduel de la préparation, sur la polynucléotide phosphorylase, dans le sens d'une dégradation des polyribonucléotides en ribonucléosides diphosphates, et comme l'a montré Cohen (30), cette réaction provoque le passage rapide du mRNA aux 5' ribonucléotides dans des extraits acellulaires d'E. coli. Ceci explique pourquoi le fait de cultiver les bactéries en présence de phosphate provoque un ralentissement très net de l'incorporation des acides aminés dans des polypeptides, et un retard de la synthèse de la phosphatase alcaline ; cette expérience ne permet donc pas d'attribuer l'allongement de la phase de latence à la synthèse du mRNA spécifique de cette enzyme.

L'étude de l'action de l'actinomycine permet de montrer qu'en réalité le RNA messenger de la phosphatase est synthétisé en même temps que les autres RNA messagers, c'est-à-dire au moment où peut débiter la synthèse de la β -galactosidase ou celle des peptides marqués.

En effet, l'actinomycine ajoutée aussitôt après la fin de la phase de latence non spécifique n'a plus aucune activité inhibitrice, le messenger de la phosphatase alcaline est

donc présent dès ce moment. La synthèse du mRNA doit donc être très rapide car l'addition de DNase au moment de la fin de la phase de latence non spécifique inhibe partiellement la synthèse enzymatique. Le mRNA de la phosphatase alcaline se forme donc au moment même où l'incorporation des acides aminés devient importante et où la synthèse de la β -galactosidase induite a lieu.

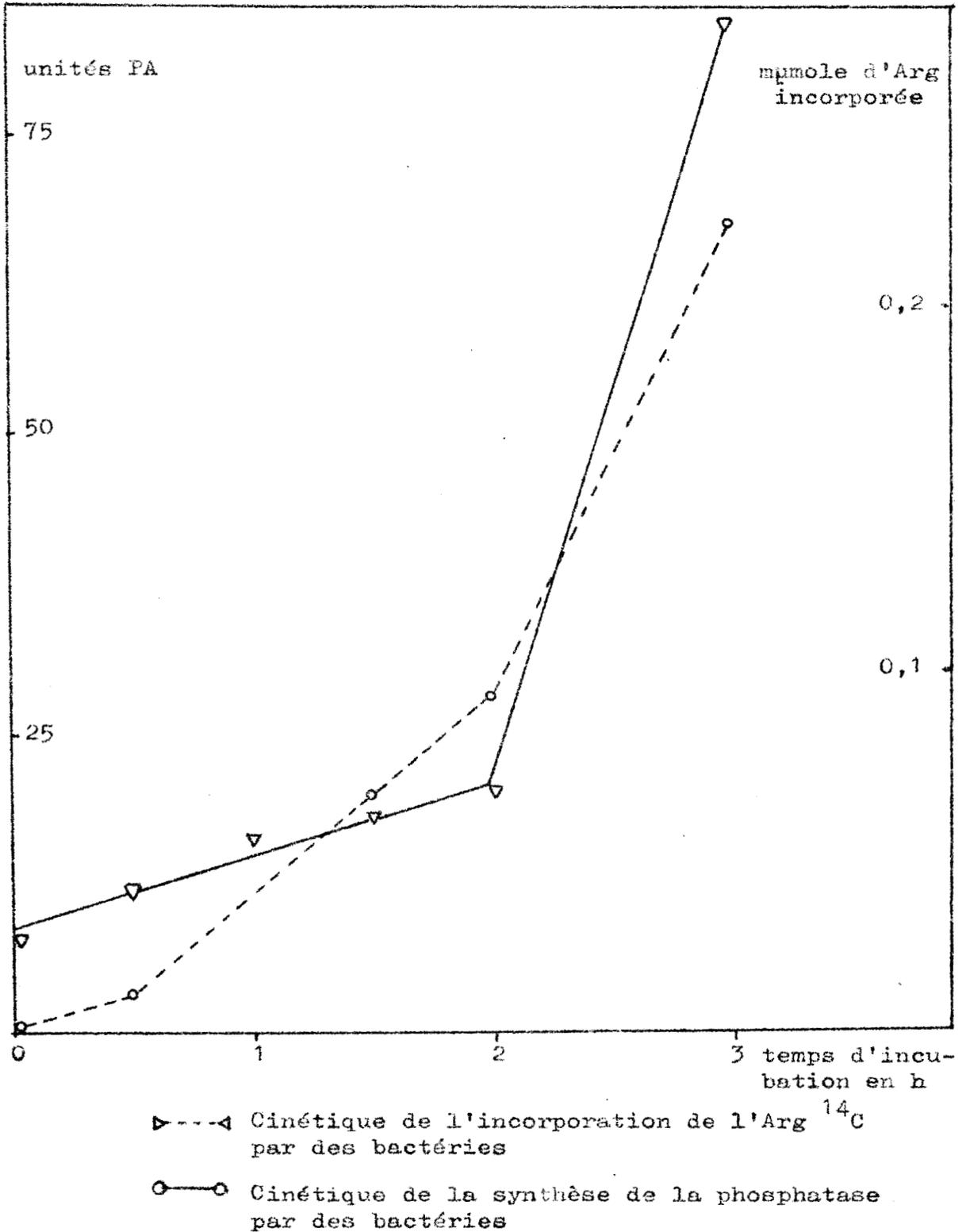
Comment peut-on expliquer la phase de latence complémentaire d'une heure environ avant le début de la synthèse de la phosphatase alcaline, si le mRNA correspondant est déjà présent ? Il semble exclu d'envisager dans le cas de notre expérimentation in vitro, une répression au niveau de la transcription. Il reste donc l'hypothèse d'une répression à un stade ultérieur, par un répresseur qui est détruit au cours de l'incubation. L'hypothèse la plus simple serait que ce répresseur soit le phosphate minéral lui-même, selon le modèle décrit par Manson : les ions PO_4^{3-} restés dans la préparation bloquent les ions Zn^{2+} , et inhibent ainsi la dimérisation conduisant à la molécule active. Cependant, l'addition de zinc ne diminue pas la durée de la phase de latence.

Par ailleurs, si les ions Zn^{2+} sont combinés au phosphate, on ne comprend pas comment, une heure plus tard, il y aurait suffisamment de zinc libre pour permettre la synthèse.

Nous n'avons pu trouver aucun argument en faveur d'une autre hypothèse valable, il reste seulement que la traduction du RNA messenger est inhibé par un facteur que nous n'avons pu identifier, facteur qui disparaît au cours de l'incubation.

Ce phénomène de répression particulier à la phosphatase alcaline n'est pas le fait uniquement de préparations acellulaires. La figure 45 montre que chez les bactéries on trouve le même décalage entre la synthèse peptidique et l'apparition de l'activité phosphatasique. La régulation de la synthèse de cette enzyme postérieurement à la transcription, semble donc être un phénomène général, surajouté à la régulation au niveau de la transcription elle-même.

L'inégalité des temps de latence de la synthèse protéique et de la synthèse de la phosphatase se retrouve lorsqu'on remplace la fraction P1 par des bactéries.



DISCUSSION ET CONCLUSIONS GÉNÉRALES

La cinétique de la synthèse de la phosphatase alcaline par la fraction P1 d'E. coli, est caractérisée par une phase de latence particulièrement longue dans nos propres conditions expérimentales. Plusieurs hypothèses ont été envisagées pour en expliquer la cause :

La première était que l'enzyme ne pouvait être mise en évidence, bien qu'existant, durant la phase de latence. Malgré une augmentation de la perméabilité des particules au cours de leur incubation, comme il en résulte du mode d'action de la DNase, aucun artifice technique n'a permis de révéler la présence d'une enzyme active intraparticulaire durant cette période. La présence de monomères semble pouvoir être exclue, car l'addition d'ions Zn^{2+} au système, ne modifie ni la phase de latence, ni l'importance de la synthèse enzymatique.

Une deuxième hypothèse a pour origine la constatation que les sphéroplastes, contrairement aux bactéries, présentent une phase de latence semblable à celle des préparations P1. Des sphéroplastes étant toujours présents dans les préparations P1, il fallait déterminer quel était leur rôle, par rapport aux particules subcellulaires, dans la synthèse de la phosphatase alcaline. Si le pouvoir de synthèse des préparations

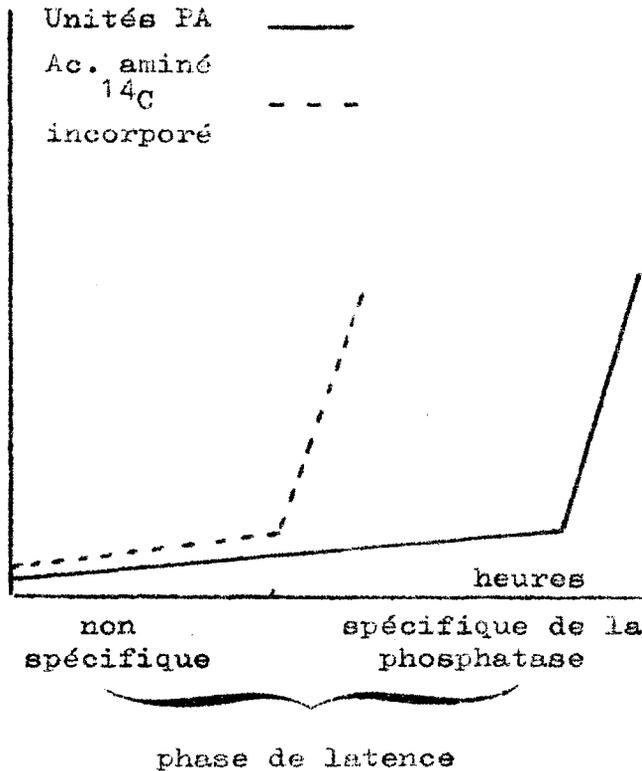
P1 ramené au nombre de cellules intactes numérables en microscopie à contraste de phase est très variable, il devient par contre proportionnel au nombre de sphéroplastes viables évalué en milieu solide. Cependant, on constate que la lyse des sphéroplastes, au cours de l'incubation, conduit après quelques temps, à une préparation acellulaire. Il faut remarquer, de plus, que les débris résultant de cette lyse n'ont pas la structure fermée des particules provenant de la lyse des mêmes sphéroplastes par un détergent non ionique. L'étude de la synthèse en fonction de la lyse permet d'éliminer l'hypothèse qui attribuait la synthèse aux cellules viables ; en effet, une préparation P1 après quelques heures d'incubation, possède encore la moitié de son activité biosynthétisante initiale alors qu'elle ne contient pratiquement plus de cellules viables. On peut même dire, que dans nos conditions expérimentales la synthèse protidique par des sphéroplastes ne peut être réalisée, car dès les premières minutes d'incubation la majeure partie de la préparation est lysée. La comparaison du pouvoir de synthèse des préparations P1 avec celui des sphéroplastes n'a dans ce cas aucun sens.

Cependant, avant d'affirmer que les particules acellulaires sont bien responsables de la synthèse "in vitro" de la phosphatase alcaline, il fallait éliminer certaines objections : d'une part nous avons montré que la masse cytoplasmique des cel-

lules demeurées viables n'augmentait pas dans des proportions pouvant expliquer une activité de synthèse considérablement accrue ; d'autre part, la proportionnalité de la quantité d'enzyme synthétisée par rapport à la concentration en fraction P1 a été démontrée. Enfin la synthèse de précurseurs par les sphéroplastes avant leur lyse, un mRNA par exemple, permettant aux particules de terminer des chaînes peptidiques, ne saurait être envisagée, il est en effet indiscutable que la synthèse du RNA messager spécifique de la phosphatase n'intervient généralement qu'après plus de deux heures d'incubation. A ce moment toutes les cellules viables ont pratiquement disparu.

Ayant éliminé les possibilités d'artefact et démontré la réalité de la synthèse "in vitro" par les préparations P1, nous avons tenté de déterminer ce qui se passait durant la phase de latence. Celle-ci, que nous avons schématisé ci-après, peut se diviser en deux parties :

- La première correspond à une période d'attente, non spécifique de la phosphatase alcaline, durant laquelle il y a une certaine incorporation des acides aminés marqués dans les polypeptides précipitables au TCA ; à la fin de cette période, l'incorporation augmente considérablement pour garder ensuite un taux constant, dès cet instant, la β -galactosidase induite est, elle aussi, synthétisée. La synthèse des mRNA ne peut



s'effectuer dans cette phase de latence non spécifique puisque l'addition de l'inducteur avant la fin de cette phase n'a aucune influence sur le moment de la synthèse de la β -galactosidase et que dans nos conditions expérimentales les mRNA sont stables. Cette phase de latence nécessite la possibilité d'une synthèse protidique, puisqu'elle est allongée de toute la période

durant laquelle on ne fournit pas à la préparation P1 les acides aminés indispensables. Enfin, durant cette période, des modifications morphologiques des particules P1 ont lieu. Tout ceci nous suggère que cette phase d'attente correspond à une synthèse, par des polysomes préexistants, de protéines constitutives de la cellule, altérées au cours de nos préparations. Elles joueraient un rôle dans la synthèse des mRNA et dans la structure des particules. Il ne s'agit pas dans le cas présent, de la polymérase qui est toujours abondante dans nos préparations.

La deuxième partie de la phase de latence spécifique de la phosphatase ne correspond pas à un retard dans la synthèse

du mRNA transcripteur de cette enzyme, qui pourrait être due à la persistance de phosphate dans nos préparations. En effet, l'étude de l'action des inhibiteurs permet de démontrer que les mRNA de la phosphatase sont formés en même temps que ceux qui provoquent l'incorporation importante des acides aminés et la synthèse de la β -galactosidase induite. Il faut donc admettre qu'il existe deux types de régulation pour la phosphatase alcaline :

1°) Selon le schéma de Jacob et Monod, une régulation au niveau de la transcription du DNA en mRNA puisque, pour que l'enzyme soit synthétisée, le mRNA doit se former lorsque les particules proviennent de cultures réprimées par le phosphate. Dans ce cas, la synthèse de la phosphatase par la préparation P1 est bien une synthèse "in vitro" et "de novo".

2°) Un système de blocage de la traduction du RNA messenger, car celui-ci bien que présent et stable, ne s'exprime en protéines actives qu'après une heure de latence. Nous n'avons pu déterminer le mécanisme de cette régulation à une étape ultérieure au RNA messenger. Cette difficulté de la phosphatase à s'exprimer n'est pas particulière à la préparation P1, on la met également en évidence dans la cellule bactérienne.

P L A N C H E S



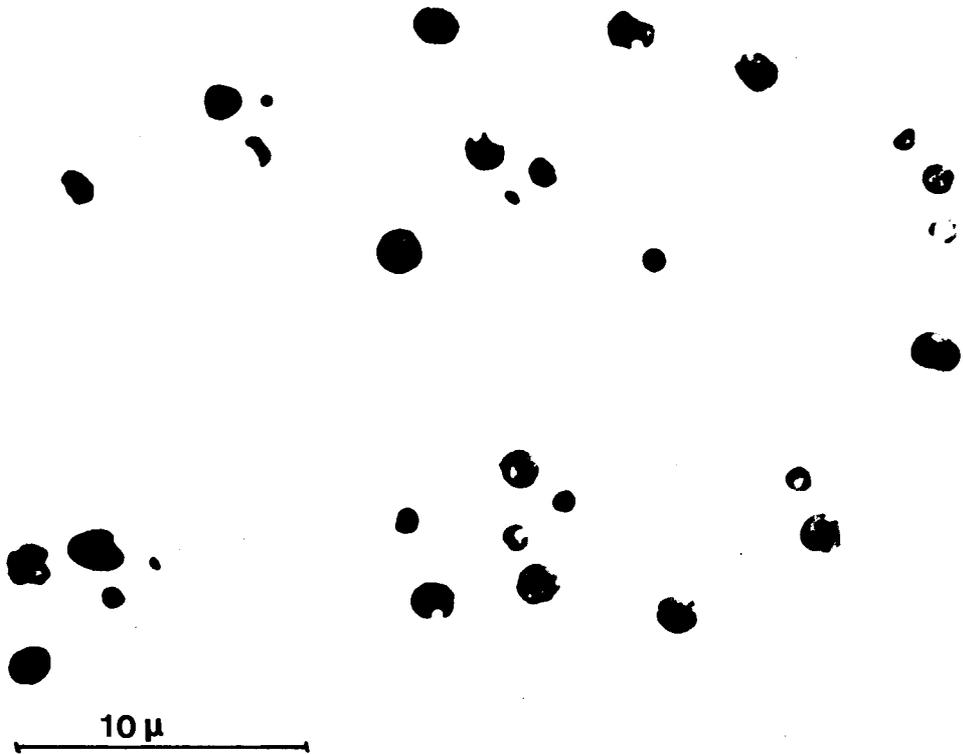
PLANCHE 1

Préparations observées en contraste de phase.

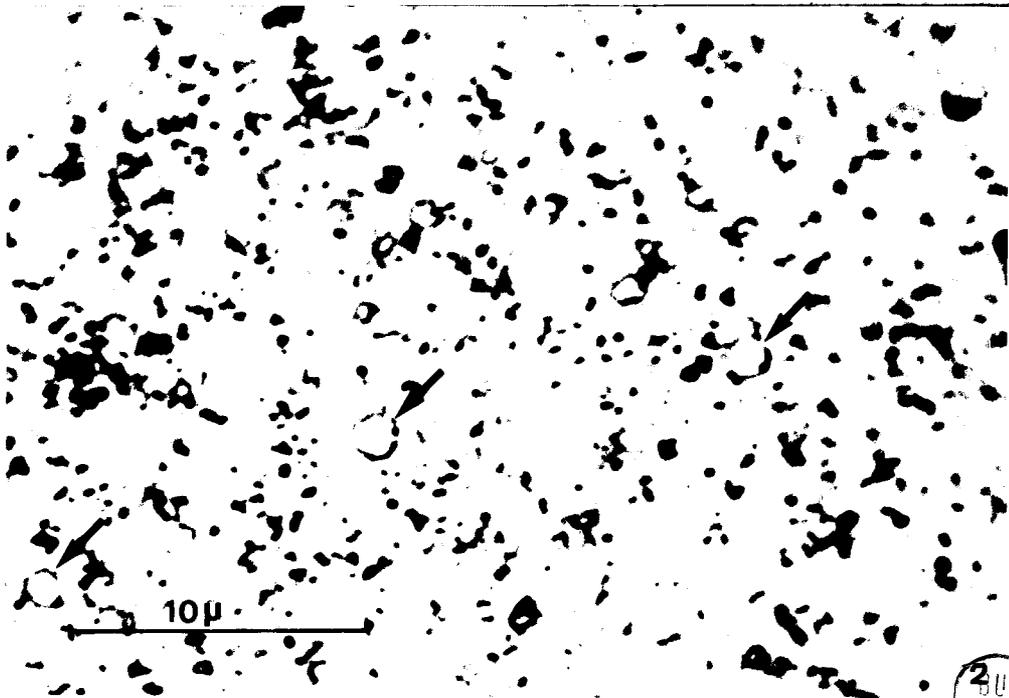
Fig. 1 - Sphéroplastés d'*E. coli* K10 Arg⁻4 en fin de transformation dans le milieu SP2 additionné de pénicilline, de saccharose et de magnésium.(X 4200).

Fig. 2 - Fraction F1. Les sphéroplastés de la préparation précédente ont été lysés à la digitonine. Les particules obtenues, après lavage, sont reprises dans un volume 100 fois plus petit que le volume initial de la suspension de sphéroplastés. Les membranes sont en général fractionnées en petites particules. Remarquer (flèches) la présence de quelques membranes intactes.(X 4200).

Planche 1



1



2
BUS
LILLE

PLANCHES 2, 3 et 4

Préparations observées en microscopie électronique.

Les préparations ont été fixées selon la technique Ryter et Kellenberger (185) et incluses dans l'épon selon Luft (121). Les coupes ont été effectuées à l'ultramicrotome Porter-Blum ou L.K.B., contrastées à l'hydroxyde de plomb selon Karnowsky (104) et examinées au microscope Hitachi HU - 11A.

PLANCHE 2

Divers stades de la préparation des particules
P1 (76, 77).

Fig. 1 - Bactéries en cours de transformation dans le milieu SP2 additionné de pénicilline. Noter l'aspect "en oreilles de lapin" de la cellule désignée par la flèche.(X 17000).

Fig. 2 - Sphéroplaste en suspension dans le milieu I à 0°C : on remarque qu'il est contenu dans deux enveloppes.(X 35000).

Fig. 3 - Sphéroplaste immédiatement après la lyse par la digitonine : on ne rencontre que peu de granulations dans les fibres de DNA ; les amas de ribosomes ne commencent qu'à se disperser.(X 30000).

Fig. 4 - Particules P1 : les fragments de parois et de membranes en s'enroulant ont donné au P1 son aspect caractéristique. Une structure organisée (flèche) semble s'édifier à certains niveaux.

Planche 2



2



PLANCHE 3

Evolution des sphéroplastes durant leur incubation (44).

Fig. 1 - Sphéroplastes dans le milieu SP2 à la fin de la période de transformation.(X 7000).

Fig. 2 - Sphéroplastes en suspension dans le milieu I à 0°C.(X 7000).

Fig. 3 - Sphéroplastes dans le milieu d'incubation pour la synthèse de la phosphatase alcaline.(X 7000).

Fig. 4 - Sphéroplastes après 2 h 30 min d'incubation à 30°C. De nombreuses cellules se sont lysées et le volume des sphéroplastes résiduels n'a pas varié.(X 7000).

Planche 3

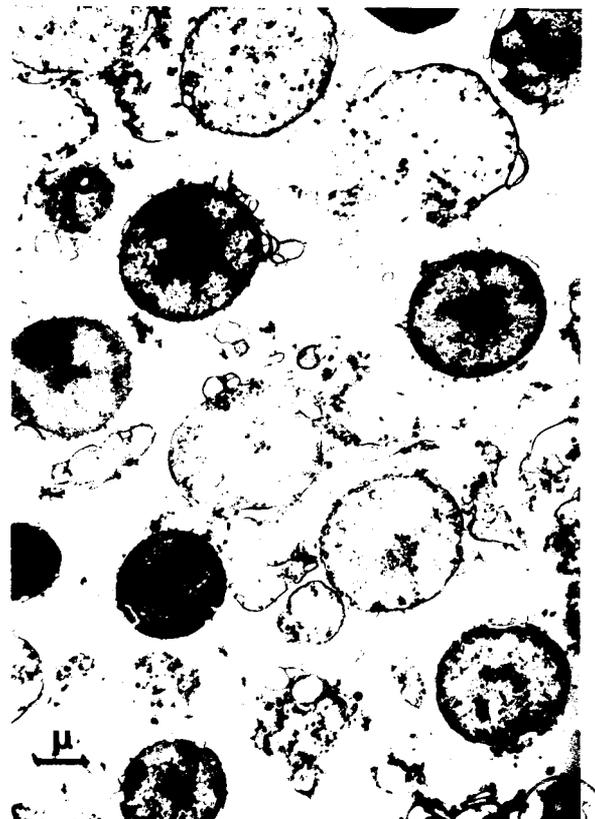
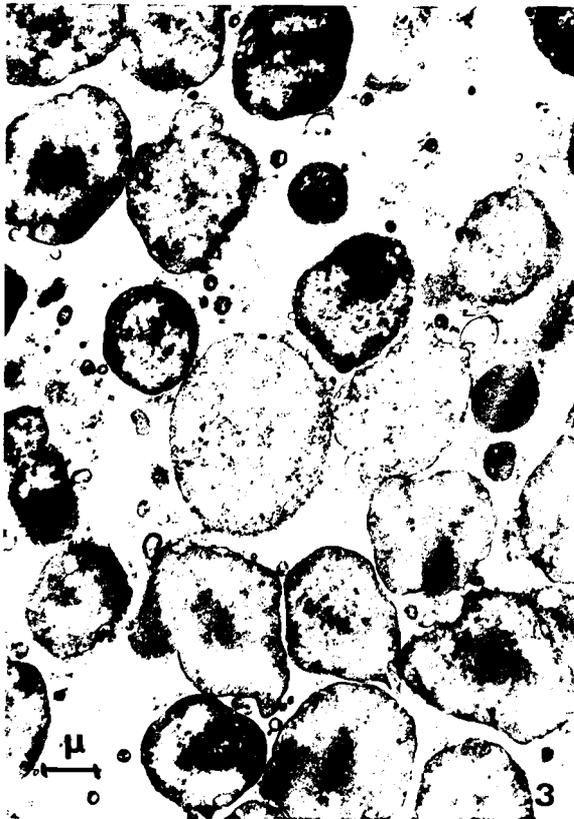
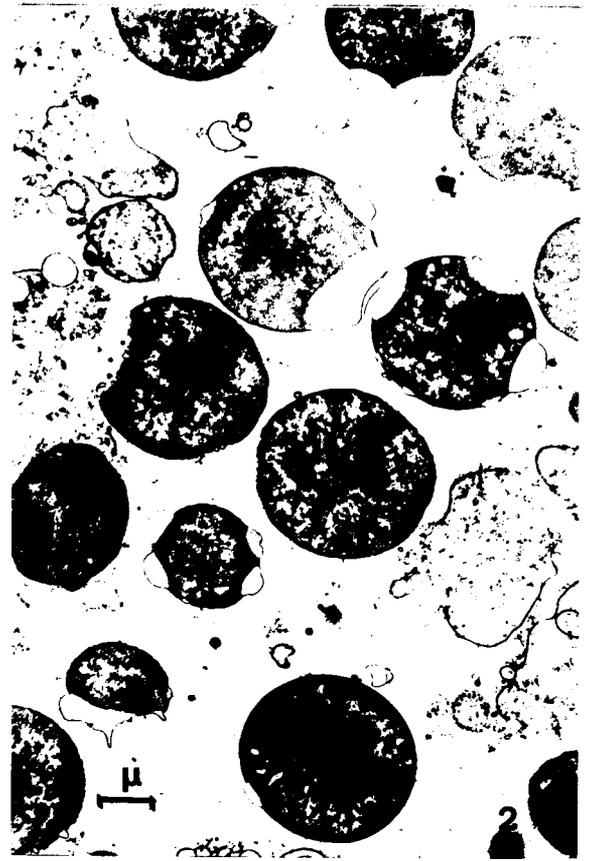
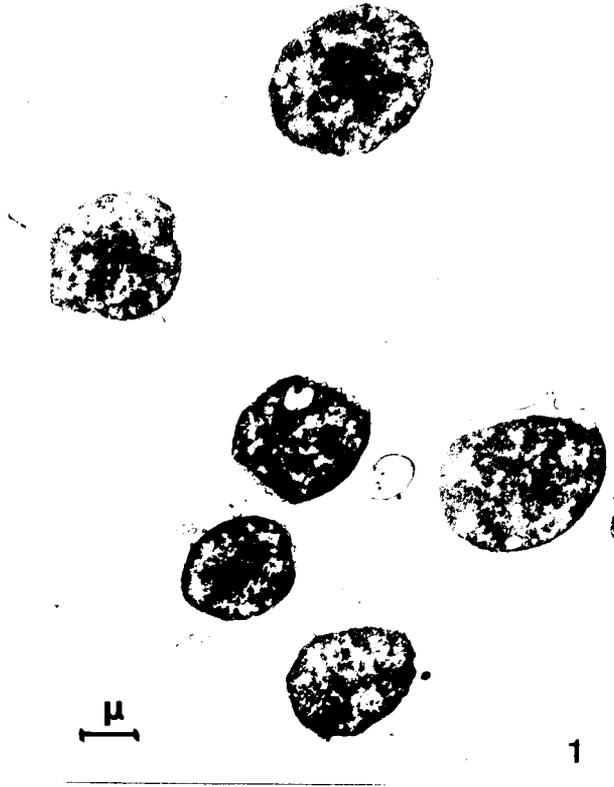


PLANCHE 4

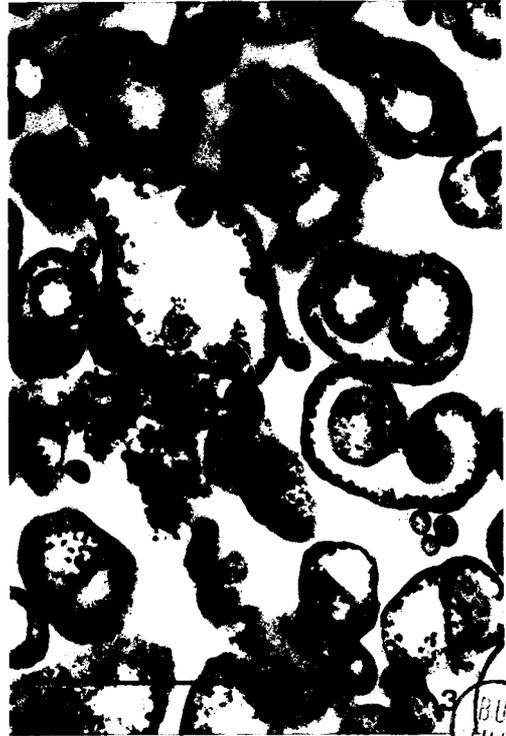
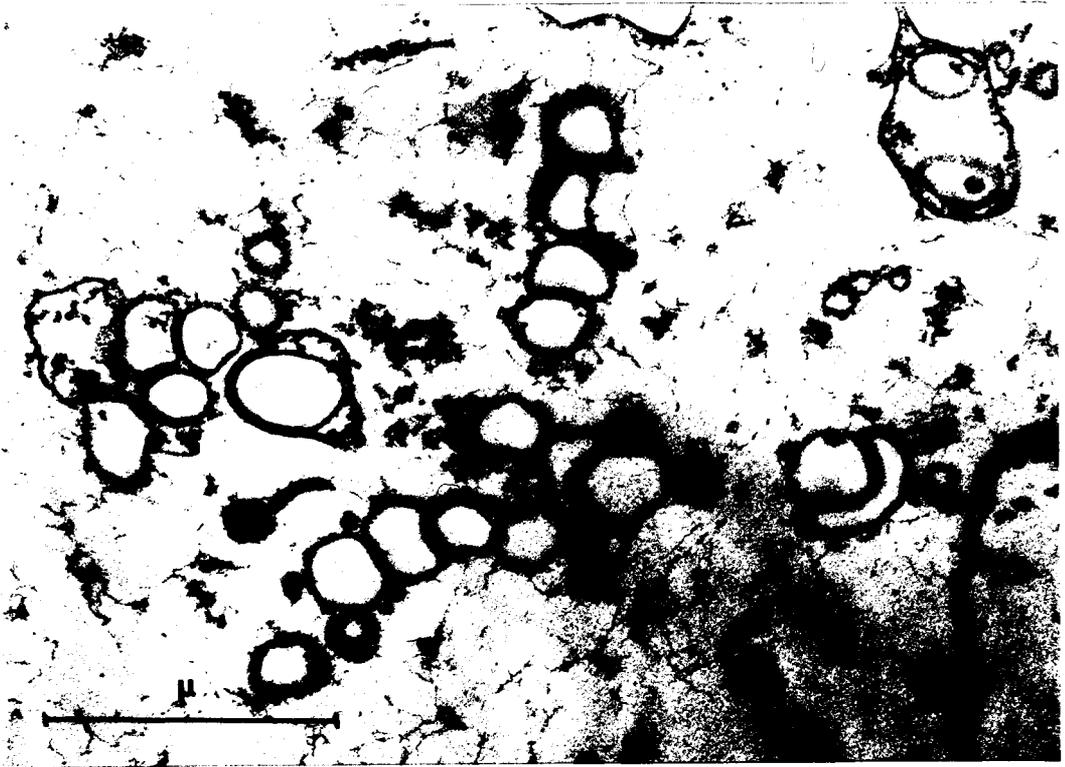
Action de la DNase et de l'incubation
sur les particules P1.

Fig. 1 - Particules P1 dans le milieu I
à 0°C. Noter l'importance du DNA interstitiel.
(X 40000).

Fig. 2 - Particules P1 traitées par la
DNase (60 µg/ml) durant 1 heure. L'aspect général de
la préparation s'est modifié : les particules semblent
se distendre, le DNA interstitiel a disparu et des
granulations à l'intérieur des parois sont nettement
visibles.(X 20000).

Fig. 3 - Particules P1 après 2 h 30 min
d'incubation à 30°C. L'aspect général de la prépa-
ration est identique à celui de la fig. 2. A ce
stade les particules P1 deviendraient perméables à
la DNase.(X 40000).

Planche 4



BUS
ELLE

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ADAMS J.M. et CAPECCHI M.R.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1966, 55, 147
- 2 - ALLEN E.H. et SCHWEET R.S.
J. Biol. Chem., 1962, 237, 760
- 3 - ALLEN D.W. et ZAMECNIR P.C.
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 55, 865
- 4 - ARLINGHAUS R., FAVELUKES G. et SCHWEET R.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1963, 11, 92
- 5 - ARLINGHAUS R., SCHAEFFER J.S. et SCHWEET R.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1964, 51, 1291
- 6 - ARONSON A.I. et del VALLE M.R.
Biochem. Biophys. Acta, 1964, 87, 267
- 7 - ATTARDI G., NAONO S., GROS F., BUTTIN G. et JACOB F.
C.R. Acad. Sci., 1963, 256, 805
- 8 - ATTARDI G., NAONO S., ROUVIERE J., JACOB F. et GROS F.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1963, 26, 363
- 9 - AVERY O.T., Mc LEOD C.M. et Mc CARTY M.
J. Exp. Med., 1944, 79, 137
- 10 - BAKER B.R., JOSEPH J.P. et WILLIAMS J.H.
J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 1

- 11 - BARNETT W.E. et EPLER J.L.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1966, 55, 184
- 12 - BARONDES S.H. et NIREMBERG M.W.
Science, 1962, 138, 813
- 13 - BAUTZ E.K.F. et HALL B.D.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1962, 48, 401
- 14 - BEADLE G.W. et TATUM E.L.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1941, 27, 499
- 15 - BERG P.
J. Biol. Chem., 1956, 222, 1025
- 16 - BERG P.
Ann. Rev. Biochem., 1961, 30, 293
- 17 - BISHOP. D.H.L., ROCHE C. et NISMAN B.
Biochem. J., 1964, 90, 378
- 18 - BONNER J., HUANG R.C. et GILDEN R.V.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1963, 50, 893
- 19 - BOSCH L. et BLOEMENDAL H.
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 55, 865
- 20 - BRACHET J.
The nucléic acids, 1955, vol. II, Chargaff E. et Davidson J.N., Ed. Academic Press N.Y.
- 21 - BRACHET J.
Biochemical cytology, 1957, Academic Press Inc. Pub. N.Y.
- 22 - BRENNER S., JACOB F. et MESELSON M.
Nature, 1961, 190, 576

- 23 - BRESLER S.E., KRENEVA R.A., KUSHEV V.V. et MOSEVITSKU I.
J. Mol. Biol., 1964, 8, 79
- 24 - BURTON K.
Biochem. J., 1956, 62, 315
- 25 - CANTONI G.L., ISKIKURA H., RICHARDS H.H. et TANAKA K.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1963, 28, 123
- 26 - CASPERSSON J.
Cell Growth and cell Function, 1950, Norton Ed. N.Y.
- 27 - CHAMBERLIN M. et BERG P.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1962, 48, 81
- 28 - CHAMBERLIN M. et BERG P.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1963, 28, 67
- 29 - CHAPEVILLE F., LIPMANN F., Von EHRENSTEIN G., WEISBLUM B.,
RAY W.J. et BENZER S.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1962, 48, 1086
- 30 - COHEN S.
J. Chim. Phys., 1961, 58, 978
- 31 - COHEN R. et NISMAN B.
C.R. Acad. Sci., 1961, 252, 1063
- 32 - COHEN G.N. et RICKENBERG H.V.
Ann. Inst. Pasteur, 1956, 91, 693
- 33 - COHN M.
Bacteriolog. Rev., 1957, 21, 140
- 34 - COHN M., LENNOX E. et SPIEGELMAN S.
Biochim. Biophys. Acta, 1960, 39, 255

- 35 - COHN M. et MONOD J.
Biochim. Biophys. Acta, 1951, 7, 153
- 36 - CONTESSÉ G., NAONO S. et GROS F.
C.R. Acad. Sci., 1966, 263, 1007
- 37 - CRICK F.H.C.
J. Mol. Biol., 1966, 19, 548
- 38 - DALY M.M. et MIRSKY A.E.
J. Gen. Physiol., 1955, 38, 405
- 39 - Von Der DECKEN A. et HULTIN T.
Biochim. Biophys. Acta, 1960, 45, 139
- 40 - DERIEUX J.C.
Thèse Doctorat d'Etat en Pharmacie, Lille 1961
- 41 - DERIEUX J.C. et GUILLAUME J.
C.R. Acad. Sci., 1967, 264, 1941
- 42 - DERIEUX J.C., GUILLAUME J., MARTIN G., WATTEL F.
et LEFRANC G.
C.R. Acad. Sci., 1964, 259, 3663
- 43 - DERIEUX J.C., LEBLANC D. et HAN K.
Ann. Inst. Pasteur Lille, 1966, 17, 65
- 44 - DESCHAMPS F., DERIEUX J.C. et GUILLAUME J.
Ann. Inst. Pasteur Lille, 1966, 17, 43
- 45 - DINTZIS H.M.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1961, 47, 247
- 46 - DINTZIS H.M. et KNOFF P.M.
Informational Macromolécules, 1963, p.375, Vogel H.J.,
Bryson V. et Lampen J.O., Ed., Acad. Press N.Y.

- 47 - DOERFLER W., PALM P., ZILLIG W. et ALBERS M.
Biochim. Biophys. Acta, 1963; 76, 485
- 48 - ECHOLS H., GAREN A., GAREN S. et TORRIANI A.
J. Mol. Biol., 1961, 3, 425
- 49 - Von EHRENSTEIN G. et LIPMANN P.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1961, 47, 941
- 50 - EISENSTADT J.M., KAMEYAMA T. et NOVELLI G.D.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1962, 48, 652
- 51 - ENGSTRÖM I.
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 56, 606
- 52 - FAN D.P.
J. Mol. Biol., 1966, 16, 164
- 53 - FAN D.P., SCHLESINGER M.J., TORRIANI A., BARRETT K.J.
et LEVINTHAL C.
J. Mol. Biol., 1966, 15, 32
- 54 - FLAKS J.G., COX B.C., WITTING M.L. et WHITE J.R.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1962, 7, 390
- 55 - FRIEDBERG I. et AVIGAD G.
European J. Biochem., 1967, 1, 193
- 56 - GALLANT J. et SPOTTSWOOD T.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1964, 52, 1591
- 57 - GALLANT J. et STAPLETON R.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1963, 50, 348
- 58 - GAREN A. et ECHOLS H.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1962, 48, 1398

- 59 - GAREN A. et GAREN S.
J. Mol. Biol., 1963, 6, 433
- 60 - GAREN A. et LEVINTHAL C.
Biochim. Biophys. Acta, 1960, 38, 470
- 61 - GAREN A., LEVINTHAL C. et ROTHMAN F.
J. Chim. Phys., 1961, 58, 1068
- 62 - GHOSH H.P., SÖLL D. et KHORANA H.G.
J. Mol. Biol., 1967, 25, 275
- 63 - GIERER A.
J. Mol. Biol., 1963, 6, 148
- 64 - GILBERT W.
J. Mol. Biol., 1963, 6, 374
- 65 - GILBERT W. et MULLER - HILL B.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1966, 56, 1891
- 66 - GREEN M.H.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1964, 52, 1388
- 67 - GROS F., HIATT H., GILBERT W., KURLAND C.G.,
RISEBROUGH R.W. et WATSON J.D.
Nature, 1961, 190, 581
- 68 - GRUNBERG-MANAGO M.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1956, 38, 599
- 69 - GUARINO A.J., IBERSHOF M.L. et SWAIN R.
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 72, 62
- 70 - GUILLAUME J.
Thèse de Doctorat d'Etat es Sciences, Lille 1965

- 71 - GUILLAUME J.
Thèse de Doctorat d'Etat es Sciences, Deuxième Mémoire
Lille 1965
- 72 - GUILLAUME J., DERIEUX J.C., JAKSEVAC J.R., DESCHAMPS F.
et MARTIN G.
Ann. Inst. Pasteur Lille, 1965, 16, 59
- 73 - GUILLAUME J., DERIEUX J.C., MARTIN G., CATSARAS M.
et SCHERPEREEL M.F.
C.R. Acad. Sci., 1964, 259, 3885
- 74 - GUILLAUME J., DERIEUX J.C. et OSTEUX R.
C.R. Acad. Sci., 1960, 251, 1942
- 75 - GUILLAUME J., DERIEUX J.C. et WATTEL F.
C.R. Acad. Sci., 1960, 250, 3900
- 76 - GUILLAUME J., DESCHAMPS F., PETITPREZ A., DERIEUX J.C.,
PELMONT J. et NISMAN B.
C.R. Acad. Sci., 1966, 262, 696
- 77 - GUILLAUME J., DESCHAMPS F., PETITPREZ A., DERIEUX J.C.,
VIVIER E. et NISMAN B.
Sixth International Congress for Electron Microscopy,
Kyoto 1966, p. 251
- 78 - GUILLAUME J., MARTIN G. et DERIEUX J.C.
Ann. Inst. Pasteur Lille, 1958-1959, 10, 159
- 79 - GUILLAUME J., MARTIN G. et DERIEUX J.C.
Film de 16 mm, longueur 160 m.
Présenté à la Société de Biologie, séance du 8.1.1960
- 80 - GUILLAUME J., PELMONT J., MANSON L.A. et NISMAN B.
C.R. Acad. Sci., 1964, 259, 2714

- 81 - HALL B.D. et SPIEGELMAN S.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1961, 47, 137
- 82 - HARDESTY B., MILLER R. et SCHWEET R.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1963, 50, 924
- 83 - HAYASHI M., HAYASHI M.N. et SPIEGELMAN S.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1964, 51, 351
- 84 - HAYASHI M., SPIEGELMAN S., FRANKLIN N.C. et LURIA S.E.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1963, 49, 729
- 85 - HERSHEY A.D.
J. Gen. Physiol., 1953, 37, 1
- 86 - HOAGLAND M.B.
Biochim. Biophys. Acta, 1955, 16, 228
- 87 - HOAGLAND M.B., STEPHENSON M.L., SCOTT J.F., HECHT L.I.
et ZAMECNIK P.
J. Biol. Chem., 1958, 231, 241
- 88 - HOGNESS D.S., COHN M. et MONOD J.
Biochim. Biophys. Acta, 1955, 16, 99
- 89 - HOLLEY R.W.
Scientific Amer., 1966, 214, 30
- 90 - HOLLEY R.W., APGAR J., EVERETT G.A., MADISON J.T.,
MARQUISEE M., MERRIL S.H., PENSWICK J.P. et ZAMIR A.
Science, 1965, 147, 1462
- 91 - HORIKOSHI K. et DOI R.H.
Fédération Proc., 1967, 26, 457

- 92 - HORIUCHI T., HORIUCHI S. et MIZUNO D.
Nature, 1959, 183, 1529
- 93 - HURWITZ J. et AUGUST J.T.
Progress in nucleic acid research, 1963, vol. I,
Academic Press, N.Y.
- 94 - HURWITZ J., BRESSLER A. et DIRINGER R.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1960, 3, 15
- 95 - HURWITZ J., FURTH J.J., ANDERS M. et EVANS A.
J. Biol. Chem., 1962, 237, 3752
- 96 - HURWITZ J., FURTH J.J., MALAMY M. et ALEXANDER M.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1962, 48, 1222
- 97 - JACOB F. et MONOD J.
C.R. Acad. Sci., 1959, 249, 1282
- 98 - JACOB F. et MONOD J.
J. Mol. Biol., 1961, 3, 318
- 99 - JACOB F., SUSSMAN R. et MONOD J.
C.R. Acad. Sci., 1962, 254, 4214
- 100 - KAJI A. et KAJI H.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 13, 186
- 101 - KAJI H., SUZUKA I. et KAJI A.
J. Mol. Biol., 1966, 18, 219
- 102 - KAMEYAMA T. et NOVELLI G.D.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1960, 2, 393
- 103 - KAMEYAMA T. et NOVELLI G.D.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1962, 48, 659

- 104 - KARNOWSKI M.J.
J. Biophys. Biochem. Cytol., 1961, 11, 729
- 105 - KATO I., HOMMA R., YAMAMOTO S. et KUROKAWA N.
Japan J. Med. Sci. Biol., 1963, 16, 55
- 106 - KEPES A. et BEGUIN S.
Biochem. Biophys. Acta, 1966, 123, 546
- 107 - KIHO Y. et RICH A.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1964, 51, 111
- 108 - KRUH J. et BORSOCK H.
J. Biol. Chem., 1956, 220, 905
- 109 - KRUH J., DREYFUS J.C. et SCHAPIRA G.
Biochim. Biophys. Acta, 1964, 87, 253
- 110 - KRUH J., DREYFUS J.C. et SCHAPIRA G.
Biochim. Biophys. Acta, 1964, 91, 494
- 111 - LAMFROM H. et KNOFF P.H.
J. Mol. Biol., 1965, 11, 589
- 112 - LAMFROM H., Mc LAUGHLIN C.S. et SARABHAI A.
J. Mol. Biol., 1966, 22, 355
- 113 - LENGYEL F., SPEYER J.F. et OCHOA S.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1961, 47, 1936
- 114 - LEVINE A. , DERIEUX J.C., PELMONT J., GUILLAUME J.
et NISMAN B.
En préparation
- 115 - LEVINthal C.
Brookhaven Symp. Biol., 1959, 12, 76

- 116 - LEVINTHAL C., SIGNER B.R. et FETHEROLF K.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1962, 48, 1230
- 117 - LIPMANN F.
Adv. Enzymol., 1941, 1, 99
- 118 - LIPMANN F.
Progress in Nucleic Acid Research, 1963, vol. I, p.135
Davidson J.N. et Cohn W.E. Ed., Academic Press N.Y.
- 119 - LITTLEFIELD J.W. et KELLER E.B.
J. Biol. Chem., 1957, 224, 13
- 120 - LOWRY O.H., ROSEBROUGH N.J., FARR A.L. et RANDALL R.J.
J. Biol. Chem., 1951, 193, 265
- 121 - LUFT J.H.
J. Biophys. Biochem. Cytol., 1961, 2, 409
- 122 - LURIA S.E.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1965, 18, 735
- 123 - MADISON J.T., EVERETT G.A. et KUNG H.
Science, 1966, 153, 531
- 124 - MAITRA U. et HURWITZ J.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1965, 54, 815
- 125 - MALAMY M.H. et HORECKER B.L.
Biochemistry, 1964, 3, 1889
- 126 - MALAMY M.H. et HORECKER B.L.
Biochemistry, 1964, 3, 1893
- 127 - MANSON L.A., PELMONT J. et NISMAN B.
C.R. Acad. Sci., 1964, 258, 6261

- 128 - MARCUS L., BRETHAUER R.K., HALVORSON H.O. et BROCK R.M.
Science, 1965, 147, 615
- 129 - MARKS P.A., BURKA E.R., CONNONI F.M., PERL W. et RIFKIND R.A.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1965, 53, 1437
- 130 - MARMUR J. et GREENSPAN C.M.
Science, 1963, 142, 387
- 131 - MARTIN R.G.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1963, 28, 357
- 132 - MATTHAEI J.H. et NIRENBERG M.W.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1961, 4, 404
- 133 - MATTHAEI J.H. et NIRENBERG M.W.
Federation Proc., 1961, 20, 391
- 134 - MATTHAEI J.H. et NIRENBERG M.W.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1961, 47, 1580
- 135 - MEJBAUM W.
Z. Physiol. Chem. Hoppe Seyler's, 1939, 258, 117
- 136 - MONOD J.
Exposés Annuels de Biochimie Médicale 17° série, 1955,
p.195, Masson, Paris
- 137 - MONOD J. et COHEN-BAZIRE G.
C.R. Acad. Sci., 1953, 236, 530
- 138 - MONOD J., COHEN-BAZIRE G. et COHN H.
Biochim. Biophys. Acta, 1951, 7, 585
- 139 - DANEO MOORE L., KOCUN F.J. et UMBREIT W.W.
Science, 1966, 154, 1350

- 140 - MORRIS A., ARLINGHAUS R., FAVELUKES A. et SCHWEET R.S.
Biochem., 1963, 2, 1084
- 141 - MOSES V.
Biochem. J., 1967, 103, 650
- 142 - MUELLER G.C., Von ZAHN-ULLMAN S. et SCHAFER W.
J. Biol. Chem., 1960, 235, 660
- 143 - NAGATA Y., SHIBUYA I. et MARUO B.
J. Biochem., 1967, 61, 623
- 144 - NATHANS D. et LIPMAN F.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1961, 47, 497
- 145 - NATHANS D., NOTANI G., SCHWARTZ J.H. et ZINDER N.D.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1962, 48, 1424
- 146 - NEIDHARDT F.C.
Bacterio.reviews, 1966, 30, 701
- 147 - NIRENBERG M.W. et LEDER P.
Science, 1964, 145, 1399
- 148 - NIRENBERG M., LEDER P., BERNFIELD M., BRIMACOMBE R.,
TRUFIN J., ROTTMAN F. et O'NEAL C.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1965, 53, 1161
- 149 - NIRENBERG M.W. et MATTHAEI J.H.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1961, 47, 1588
- 150 - NISMAN B.
Biochim. et Biophys., 1959, 32, 19
- 151 - NISMAN B., BERGMANN F.H. et BERG P.
Biochim. et Biophys., 1957, 26, 639

- 152 - NISMAN B., COHEN R., KAYSER A., FUKUHARA H., DEMAILLY J., GENIN C. et GIRON D.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1961, 26, 145
- 153 - NISMAN B. et FUKUHARA H.
C.R. Acad. Sci., 1959, 249, 2240
- 154 - NISMAN B., FUKUHARA H., DEMAILLY J. et GENIN C.
Biochem. Biophys. Acta, 1962, 55, 704
- 155 - NISMAN B. et HIRSCH M.L.
Ann. Inst. Pasteur, 1958, 95, 615
- 156 - NISMAN B., KAYSER A., DEMAILLY J. et GENIN C.
C.R. Acad. Sci., 1961, 252, 2619
- 157 - NISMAN B., PELMONT J., BISHOP D., DEMAILLY J. et YAPO A.
Régulation chez les microorganismes,
Colloque de Marseille, 1963, Editions du CNRS
- 158 - NISMAN B., PELMONT J., DEMAILLY J. et YAPO A.
C.R. Acad. Sci., 1963, 256, 523
- 159 - NOLL H.
Science, 1966, 151, 1241
- 160 - NOLL H., STAEBELIN T. et WETTSTEIN F.O.
Nature, 1963, 198, 632
- 161 - NOVELLI G.D.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1958, 44, 86
- 162 - NOVELLI G.D., KAMEYAMA T. et EISENSTADT J.M.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1961, 26, 133
- 163 - OHTAKA Y. et SPIEGELMAN S.
Science, 1963, 142, 493

- 164 - OISHI M., TAKAHASHI H. et MARUO B.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1962, 8, 342
- 165 - PAPPENHEIMER A.M., MILLER P.A. et YONEDA M.
J. Gen. Microbiol., 1962, 28, 531
- 166 - PARDEE A.B. et PRESTIDGE L.
Biochim. Biophys. Acta, 1961, 49, 77
- 167 - PELMONT J.
Thèse de Doctorat d'Etat es Sciences, Paris 1967
- 168 - PENNAN S., SCHERRER K., BECKER Y. et DARNELL J.E.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1963, 49, 654
- 169 - PERRIN D., JACOB F. et MONOD J.
C.R. Acad. Sci., 1960, 251, 155
- 170 - PIGRETTI M.M. et MILSTEIN C.
Biochem. J., 1965, 94, 106
- 171 - PLOCKE D.J., LEVINthal C. et VALLEE B.L.
Biochemistry, 1962, 1, 373
- 172 - PLOTCH S. et LUKTON A.
Biochim. Biophys. Acta, 1965, 99, 181
- 173 - POLLOCK M.R.
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 76, 80
- 174 - RABINOVITZ M. et OLSON M.E.
Nature, 1958, 181, 1665
- 175 - REVEL M. et GROS F.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1966, 25, 124

- 176 - REVEL M. et GROS F.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1967, 27, 12
- 177 - REVEL M., HIATT H.H. et REVEL J.P.
Science, 1964, 146, 1311
- 178 - RICH A.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1960, 46, 1044
- 179 - RICH A., WARNER J.R. et GOODEMAN H.M.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1963, 28, 269
- 180 - RICKERBERG H.V.
Fédération Proc., 1967, 26, 678
- 181 - ROBERTS R.B., BRITTEN R.J. et Mc CARTHY B.J.
Molecular genetics, 1963, Part. I, Taylor J.H.
Ed., Academic Press N.Y. London
- 182 - ROTHMAN F. et BYRNE R.
J. Mol. Biol., 1963, 6, 330
- 183 - ROTMAN B. et SPIEGELMAN S.
J. Bacteriol., 1954, 68, 419
- 184 - RUECKERT R.R., ZILLIG W. et DOERFLER W.
J. Mol. Biol., 1962, 5, 10
- 185 - RYTER A. et KELLENBERGER E.
J. Nature Forsch., 1958, 13b, 597
- 186 - SCHAPIRA G., PARDIEU P., MALEKNIA N., DREYFUS C. et
KRUH J.
C.R. Acad. Sci., 1964, 258, 2221
- 187 - SCHLESINGER M.J.
J. Biol. Chem., 1965, 240, 4293

- 188 - SCHLESINGER M.J. et BARRETT K.
J. Biol. Chem., 1965, 240, 4284
- 189 - SCHLESINGER M.J. et LEVINTHAL C.
J. Mol. Biol., 1963, 7, 1
- 190 - SCHWARTZ J.H., CRBESTFIELD A.M. et LIPMANN F.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1963, 49, 722
- 191 - SCHWARTZ J.H. et LIPMANN F.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1961, 47, 1996
- 192 - SCHWEET R.S., LAMFROM H. et ALLEN F.H.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1958, 44, 1029
- 193 - SHIN P.H. et MOLDAVE K.
Federation Proc., 1967, 26, 285
- 194 - SIBATANI A., de KLOET S.R., ALLFREY V.G. et MIRSKY A.E.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1962, 48, 471
- 195 - SLAYTER H.S., WARNER J.R., RICH A. et HALL C.E.
J. Mol. Biol., 1963, 7, 652
- 196 - SÖLL D., OHTSUKA E., JONES D.S., LOHRMANN R., HAYATSU H.,
NISHIMURA S. et KHORANA H.G.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1965, 54, 1378
- 197 - SPENCER T. et HARRIS H.
Biochem. J., 1964, 91, 282
- 198 - SPIEGELMAN S.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1961, 26, 75
- 199 - SPIEGELMAN S. et HAYASHI H.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1963, 28, 161

- 200 - SPYRIDES G.J. et LIPMANN F.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1962, 48, 1977
- 201 - STABHELIN T., WETTSTEIN F.O., OURA H. et NOLL H.
Nature, 1964, 201, 264
- 202 - STENT G.S.
Science, 1964, 144, 816
- 203 - STENT G.S.
Proc. Roy. Soc. B., 1966, 164, 181
- 204 - STEVENS A.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1960, 3, 92
- 205 - THACH R.E., DEWEY K.F., BROWN J.C. et DOTY P.
Science, 1966, 153, 416
- 206 - TISSIERES A., SCHLESSINGER D. et GROS F.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1960, 46, 1450
- 207 - TOCCHINI-VALENTINI G.P., STODOLSKI M., AURISICCHIO A.,
SARNAT M., GRAZIOSI F., WEISS S.B. et GEIDUSCHEK E.P.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1963, 50, 935
- 208 - TONOMURA B. et RABINOWITZ J.C.
J. Mol. Biol., 1967, 24, 177
- 209 - TORRIANI A.
Biochim. Biophys. Acta, 1960, 38, 460
- 210 - VOLKIN E. et ASTRACHAN L.
Virology, 1956, 2, 146
- 211 - WARNER J.R.
Ph. D. Thesis, 1963, Massachusetts Institute of
Technology, Cambridge.

- 212 - WARNER J.R., KNOPP P.M. et RICH A.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1963, 49, 122
- 213 - WARNER J.R., RICH A. et HALL C.E.
Science, 1962, 138, 1399
- 214 - WARNER R.C., SAMUELS H.H., ABBOTT M.T. et KRAKOW J.S.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1963, 49, 533
- 215 - WEBER M.J. et De MOSS J.A.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1966, 55, 1224
- 216 - WEBSTER R.E., ENGELHARDT D.L. et ZINDER N.D.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1966, 55, 155
- 217 - WEISS S.B.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1960, 46, 1020
- 218 - WEISS S.B. et GLADSTONE L.
J. Amer. Chem. Soc., 1959, 81, 4108
- 219 - WEISS S.B. et NAKAMOTO T.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1961, 47, 1400
- 220 - WETTSTEIN F.O. et NOLL H.
J. Mol. Biol., 1965, 11, 35
- 221 - WHITELEY H.R. et GISHI M.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1963, 13, 6
- 222 - WOOD W.B. et BERG P.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1962, 48, 94
- 223 - YANKOPFSKY S.A. et SPIEGELMAN S.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1962, 48, 1466

- 224 - YARMOLINSKY M.B. et De la HABA G.
Proc. Nat. Acad. Sci. (US), 1959, 45, 1721
- 225 - YU C.T.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1966, (sous presse)
- 226 - YURA T., MARUSHIGE K. et IMAI M.
Biochim. Biophys. Acta., 1963, 76, 442
- 227 - ZALOKAR M.
Federation Proc., 1959, 18, 358
- 228 - ZALCKAR M.
Exeptl. cell. Res., 1960, 19, 114
- 229 - ZAMECNIK P.C. et KELLER E.B.
J. Biol. Chem., 1954, 209, 337