

50376  
1975  
213

50376  
1975  
213

# THESE

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES

DE L'UNIVERSITE DE LILLE

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES

par

Alain MUCCHIELLI

**Evaluation toxicologique des produits formés au  
cours de l'irradiation gamma ( $^{60}\text{Co}$ ) de l'amidon.  
Influence sur la croissance et le métabolisme bactériens.**

soutenue le 1<sup>er</sup> Octobre 1975 devant la Commission d'Examen :

MM. J. GUILLAUME

P. GUERIN DE MONTGAREUIL

J. MOUTSCHEN

R. BUTTIAUX

J. MONTREUIL

DOYENS HONORAIRES DE L'Ancienne Faculté des Sciences

MM. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU

PROFESSEURS HONORAIRES Des Anciennes Facultés de Droit  
et Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS,  
DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET,  
KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, MM. LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE,  
MAZET, MICHEL, NORMANT, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, SAVART, WATERLOT, WIEMAN,  
ZAMANSKI.

PRESIDENTS HONORAIRES DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

R. DEFRETIN, M. PARREAU

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. LOMBARD

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BLAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Appliquée
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORSIN Pierre	Paléontologie
M. DECUYPER Marcel	Géométrie
M. DELATRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Michel	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HEUBEL Joseph	Chimie minérale
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LEBRUN André	Electronique
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M. LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M. MONTARIOLO Frédéric	Chimie Appliquée

M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. POUZET Pierre	Analyse Numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
M. SCHILTZ René	Physique Atomique et Moléculaire
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M. VAILLANT Jean	Analyse
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BODARD Marcel	Biologie Végétale
M. BOILLET Pierre	Physique Atomique et Moléculaire
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M. CAPURON Alfred	Biologie Animale
M. DEPREZ Gilbert	Physique Théorique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LACOSTE Louis	Biologie Végétale
Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. MAES Serge	Physique Atomique et Moléculaire
Mlle MARQUET Simone	Probabilités
M. MIGEON Michel	Chimie Physique
M. MONTEL Marc	Physique du Solide
M. PANET Marius	Electrotechnique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés d'Enseignement)

M. ADAM Michel	Sciences Economiques
M. ANDRE Charles	Sciences Economiques
M. ANGRAND Jean-Pierre	Géographie
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie Animale
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M. BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M. COQUERY Jean-Marie	Psycho-Physiologie
M. COULON Jean	Electrotechnique
Mlle DACCHARI Monique	Géographie
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des Entreprises
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie

M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DRIEUX Baudouin	Informatique
M. DUEE Gérard	Géologie Appliquée
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
Mme EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. FONTAINE Jacques-Marie	Electronique
M. FOURNET Bernard	Biochimie
M. FROELICH Daniel	Chimie Physique
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GUIGOU Jean-Louis	Sciences Economiques
M. GUILLAUME Henri	Sciences Economiques
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
Mle KOSMANN Yvette	Géométrie
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités
M. LAURENT François	Automatique
Mle LEGRAND Denise	Algèbre
Mle LEGRAND Solange	Algèbre
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean-Marie	Chimie Appliquée
M. LEROY Yves	Electronique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MONTUELLE Bernard	Biologie Appliquée
M. NICOLE Jacques	Chimie Appliquée
P. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PECQUE Marcel	Chimie Physique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. POVY Lucien	Automatique
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psycho-Physiologie
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie Organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. THERY Pierre	Electronique
M. TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M. TREANTON Jean-René	Sociologie
M. VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M. VILLETTE Michel	Mécanique
M. WERNIER Georges	Informatique
M. WATERLOT Michel	Géologie Générale
M. YVON Jean-Pierre	Analyse Numérique
Mme ZINN JUSTIN Nicole	Algèbre.

A mes parents

A ma femme

"Repoussant le stérile vertige de l'infini, sourd au silence effrayant des espaces, l'Homme s'efforcera de devenir aussi incosmique que l'Univers est inhumain ; farouchement replié sur lui-même, il se consacrera humblement, terrestrement, humainement à la réalisation de ses desseins chétifs où il feindra de prêter le même sérieux que s'il visait à des fins éternelles".

Jean ROSTAND

Ce travail a été effectué au Centre d'Etudes Nucléaires de Cadarache (Commissariat à l'Energie Atomique) dans le Service de Radioagronomie (Département de Biologie) dirigé par Monsieur GUERIN DE MONTGAREUIL que je remercie de son hospitalité, de sa confiance et pour l'honneur qu'il me fait de participer au jury de ma thèse.

J'exprime ma reconnaissance à Monsieur le Professeur GUILLAUME de l'Institut Pasteur de Lille qui a bien voulu patronner cette étude et accepter la présidence du jury.

Il m'est agréable d'exprimer ma gratitude à Monsieur le Professeur BUTTIAUX qui s'est toujours intéressé à mes travaux et qui m'honore de sa présence dans cette Commission d'examen.

A Monsieur le Professeur MOUTSCHEN de l'Université de Liège, je désire exprimer toute ma reconnaissance pour l'avantage qu'il m'accorde en acceptant de juger ces recherches.

J'adresse mes vifs remerciements à Monsieur le Professeur MONTREUIL d'avoir accepté de participer à ce jury.

Je me dois de remercier tout particulièrement Monsieur L. SAINT LEBE pour l'aide inestimable qu'il m'a apportée à tous les points de vue. Il ne m'a jamais mesuré ses conseils, ses suggestions et ses critiques et je tiens à reconnaître l'atmosphère stimulante qui règne au sein de son équipe.

Je tiens à associer à ces remerciements Jeanne et Robert FRETTON et Jacques NICOLI qui, successivement, par leur aide efficace et leur esprit de franche camaraderie ont grandement contribué à mener à bien une partie de ces expériences.

Que ma vive reconnaissance soit acquise à Jean LARDAPIDE pour son aide patiente et son dévouement constant ainsi qu'à Jean-Paul GAILLARD pour sa collaboration technique efficiente.

Je voudrais enfin remercier tout le personnel du Service de Radioagronomie et en particulier le Secrétariat, le Groupe de Documentation et les Services Techniques dont le bon vouloir et la gentillesse dévouée ont beaucoup simplifié le déroulement de ces recherches.

Une partie de ces travaux a fait l'objet de publications suivantes :

- 1 - L. SAINT LEBE, A. MUCCHIELLI, P. LEROY et H. BEERENS  
"Etudes préliminaires de la microflore de l'amidon de maïs avant et après irradiation" in "Radiation Preservation of Food" pp. 155-164 - Proceedings of a Symposium AIEA/FAO held in Bombay, 13-17 novembre 1972.
- 2 - L. SAINT LEBE, G. BERGER, A. MUCCHIELLI et B. COQUET  
"Evaluation toxicologique de l'amidon de maïs" in "Radiation Preservation of Food" pp. 727-740 - Proceedings of a Symposium AIEA/FAO held in Bombay, 13-17 novembre 1972.
- 3 - A. MUCCHIELLI et L. SAINT LEBE  
"Physiological behavior of *Escherichia coli* in the presence of irradiated starch extracts. Influence of irradiation conditions", European J. Applied Microbiol. (accepté pour publication).
- 4 - A. MUCCHIELLI  
"Physiological behavior of *Escherichia coli* cultured in the presence of irradiated starch extracts. Lethality and influence of starch characteristics".  
(En préparation).
- 5 - A. MUCCHIELLI et J. FRETTON  
"Physiological behavior of *E.Coli* cultured in the presence of irradiated starch extracts. Influence of irradiated starch treatment and culture techniques".  
(En préparation).

## SOMMAIRE

	Pages
INTRODUCTION GENERALE .....	1
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE .....	4
PROCARYOTES .....	4
EUCARYOTES UNICELLULAIRES .....	5
CULTURES DE TISSUS .....	5
DROSOPHILES .....	6
RATS ET SOURIS .....	7
HOMMES .....	8
MATERIEL ET METHODES .....	9
MICRO-ORGANISMES .....	9
MILIEUX DE CULTURE .....	10
AMIDON .....	12
IRRADIATION .....	12
EXTRACTION DES PRODUITS DE RADIOLYSE .....	12
CULTURES .....	13
TECHNIQUES PARTICULIERES .....	13
JUSTIFICATION ET CHOIX DES TECHNIQUES ET DES PARAMETRES DE MESURE .....	15
MODE D'ACTION DES EXTRAITS D'AMIDON IRRADIE SUR LA CROISSANCE DES MICRO-ORGANISMES .....	18
RESULTATS EXPERIMENTAUX .....	18
Influence des conditions d'irradiation .....	18
Influence des caractéristiques de l'amidon .....	21
Influence des traitements de l'amidon après irradiation .....	22
Influence du genre de micro-organisme, du nombre de germes et du milieu de culture .....	24
ANALYSE DES RESULTATS .....	28

	Pages
ROLE DE L'EAU OXYGENEE ET DES PEROXYDES ORGANIQUES .....	32
RESULTATS EXPERIMENTAUX .....	32
Action des ions ferreux .....	32
Action de la catalase .....	34
Dosage de la réductone .....	35
Action de la peroxydase .....	35
Action de la serumalbumine .....	36
Ultrafiltration .....	36
Reconstitution d'un extrait d'amidon irradié .....	36
CONCLUSION .....	38
 MODE D'ACTION DU PEROXYDE D'HYDROGENE ET DES EXTRAITS D'AMIDON IRRADIE SUR <u>E. COLI</u> .....	 39
MODE D'ACTION DU PEROXYDE D'HYDROGENE ET DES EXTRAITS D'AMIDON IRRADIE SUR L'ADN .....	 41
Mutagénèse .....	41
Induction de phages .....	42
Etude de la létalité en fonction de la concentration en eau oxygénée ....	42
Résistance aux produits de radiolyse et à l'eau oxygénée .....	44
MODE D'ACTION DU PEROXYDE D'HYDROGENE SUR CERTAINS INTERMEDIAIRES METABOLIQUES	44
Rôle de la cystéine, du glutathion et de l'acide lipoïque .....	45
Rôle des acides $\alpha$ -cétoglutarique et pyruvique .....	46
 CONCLUSIONS GENERALES .....	 49
 BIBLIOGRAPHIE .....	 51

## INTRODUCTION GENERALE

La radurisation est une technique nouvelle qui consiste à utiliser les rayonnements ionisants pour stériliser des substances destinées à l'alimentation humaine ou animale. Cependant un certain nombre de problèmes physiologiques et de facteurs psychologiques liés à l'énergie nucléaire ont obligé les chercheurs en ce domaine à entamer des travaux ayant pour but de démontrer l'innocuité des composés radiolytiques néoformés [63, 64, 129, 130].

Les études toxicologiques sont en général entreprises par le biais d'expériences de nutrition animale et complétées par l'identification et le dosage des produits de radiolyse et par l'analyse de leurs effets sur un micro-organisme constituant un test biologique simple et d'emploi rapide.

C'est dans cet esprit et suivant ces méthodes qu'a commencé au Service de Radio-agronomie une série de recherches sur le comportement sous irradiation d'un polysaccharide naturel bien connu, l'amidon, qui a le triple avantage d'être un composé alimentaire très répandu, la substance de réserve par excellence des végétaux et un modèle chimique relativement simple [166].

Outre la toxicologie, les différents volets de l'étude concernent les domaines suivants : microbiologie, technologie, économie. En microbiologie, l'objectif est de définir les doses d'irradiation permettant d'obtenir une diminution réelle du nombre de germes polluants initiaux [45, 46, 72, 73, 168]. En technologie, l'expérimentation a pour but d'évaluer par le biais de micro-fabrications au laboratoire l'incidence de l'irradiation sur les techniques de fabrication : tenue au froid, au chaud, viscosité etc... L'économie et la technologie de l'irradiation pourront être précisées grâce à l'étude et à la réalisation d'un irradiateur pilote.

La toxicologie constitue la partie la plus difficile mais aussi la plus longue : le travail de base consiste en des essais d'histologie et de physiopathologie sur rats et sur souris. Cette démarche est complétée par l'identification et le dosage des produits de radiolyse par diverses techniques : chromatographie sur couche mince, en phase gazeuse, sur colonne, spectrométrie de masse, colorimétrie, marquage des carbones des résidus glucoses du polysaccharide [6, 13 à 18, 43, 127]. Parallèlement à une dépolymérisation de la chaîne amyliacée, des résidus à un ou plusieurs carbones se forment au cours de l'irradiation (Tableau 1).

TABLEAU 1

PRODUITS DE RADIOLYSE DE L'AMIDON  
ETAT D'AVANCEMENT DES RECHERCHES LE 2 FEVRIER 1975

PRODUITS IDENTIFIES	CONCENTRATION EN µg/g Mrad irradiation sous oxygène, teneur en eau de l'amidon 12-13 %
ALDEHYDES	
Formaldéhyde	20
Acétaldéhyde	40
Acétone	2 (jusqu'à 800 krad)
Malonaldéhyde	2 (au-delà de 2 Mrad)
Glycolaldéhyde	9
Glyoxal	1,5 à 2
Glycéraldéhyde + dihydroxyacétone	2,5 - 3
Hydroxyméthylfurfural	1
Méthylglyoxal	0,25
Diacétyl	< 0,1
Acétoïne	< 0,1
Furfural	< 0,4
ACIDES	
Formique	120
Acétique	< 1,8
Glyoxilique	traces
Lactique	"
Pyruvique	"
Glycolique	"
Malique	1,3
Oxalique	1,4
Uroniques	< 3
ESTERS	
Formate de méthyle	traces
Gluconolactone	en cours de détermination
ALCOOLS	
Ethylique	variable, présent dans les échantil- lons témoins
Méthylique	2,8
SUCRES	
Glucose	5,8
Maltose	9,8
Polymères > maltose	non déterminés
Galactose	" "
Mannose	0,1
Fructose	non déterminé
Ribose	0,6
Xylose	0,4
Arabinose	non déterminé
Erythrose	1,2

Il faut ajouter à cette liste le peroxyde d'hydrogène qui apparaît à partir de 100 krad lorsque tout l'anhydride sulfureux initialement présent a été oxydé. De 100 à 400 krad, sa concentration augmente proportionnellement à la dose à raison de 6,6 µg

par 100 krad puis la courbe s'infléchit (fig. 1). Au-delà de 1 Mrad, les résultats ne sont plus reproductibles ce qui peut être imputé à une décomposition rapide du peroxyde.

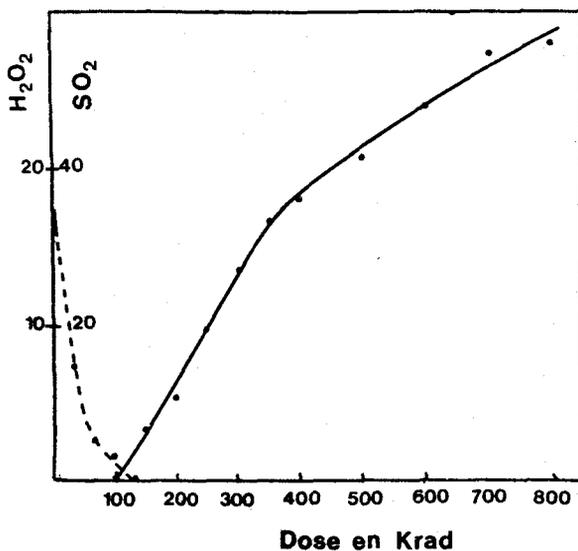


Figure 1 - Formation de peroxyde d'hydrogène et disparition de l'anhydride sulfureux en fonction de la dose. Amidon à 13,75 % d'humidité, irradié en présence d'air, à la température ordinaire [17].

— µg de peroxyde d'hydrogène par gramme d'amidon.  
.... µg d'anhydride sulfureux par gramme d'amidon.

En ce qui nous concerne, nous avons essayé de répondre aux trois questions suivantes : l'amidon irradié est-il toxique pour un micro-organisme ? Quelles molécules radioformées sont plus particulièrement dangereuses et à quel niveau agissent-elles ?

A cet effet, nous avons entrepris une étude systématique du phénomène en sériant les différents paramètres pour lesquels ont été enregistrées des anomalies de croissance. A partir de là, l'analyse des résultats nous a permis de supposer que le peroxyde d'hydrogène était le principal produit toxique, hypothèse que nous avons confirmée avant de conclure sur le rôle et le mécanisme d'action de cette molécule.

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

L'objectif est ici de résumer d'une manière critique les effets physiologiques de diverses substances irradiées, quel que soit le système biologique utilisé, en prenant pour base et pour modèle les études bibliographiques déjà réalisées [12, 97, 170].

### A. - PROCARYOTES

Il nous faut éliminer tout d'abord les expériences pour lesquelles les produits irradiés servant de milieux de culture aux micro-organismes sont extrêmement complexes et variables : plants de tabac [92], tubercules de pommes de terre (résultats différents selon le stade de germination : [50, 104]), aliments [116].

Les premières expériences à partir de milieux simples reproduisent avec de l'eau oxygénée l'effet inhibiteur de solutions de sucrose irradiées sur *Staphylococcus aureus*. Bien que criticable, cette méthode a néanmoins permis d'impliquer cet oxydant comme principal responsable de la toxicité enregistrée [191, 192, 206]. C'est seulement par l'utilisation de la catalase, enzyme réduisant le peroxyde d'hydrogène, que les chercheurs ont vérifié cette hypothèse [132]. Il faut citer ici les travaux de SCHUBERT et WATSON [175 à 179, 202] qui ont observé que les composés toxiques formés dans des solutions de sucrose irradiées pouvaient être des hydroxyalkylperoxydes (ROOH) ou des dialkylperoxydes (ROOR) dérivés de l'interaction du peroxyde d'hydrogène radiolytique avec des composés carbonylés issus du sucrose. La croissance de *Salmonella typhimurium* est ainsi inhibée par des solutions aqueuses de sucrose irradiées sous oxygène et à un degré moindre lorsque l'irradiation se fait sous hélium. D'après les auteurs, dans le premier cas ce sont les dialkylperoxydes résistant à la catalase qui se forment préférentiellement tandis que dans le second cas seuls les hydroxyalkylperoxydes, plus sensibles à l'enzyme, sont formés. Ils montrent d'autre part que  $RO_2H$  peut se transformer en ROOR sous l'action de la chaleur ce qui rendrait compte de la haute toxicité des solutions irradiées puis chauffées ainsi que la faible activité de la catalase sur ces solutions. Ils observent le même effet inhibiteur sur *S. typhimurium* lorsqu'ils ajoutent du peroxyde d'hydrogène à d'autres composés carbonyliques présents dans les solutions de sucrose irradiées : formaldéhyde, glycéraldéhyde, glycolaldéhyde, dihydroxyacétone. Le degré d'inhibition est fonction du rapport des concentrations de l'eau oxygénée et des composés carbonyliques; aucune toxicité ne se manifeste si l'on mélange le peroxyde d'hydrogène avec des composés voisins : formiate, acétate, glycolate. C'est la présence simultanée de ces composés dans le milieu irradié qui rendrait compte de la formation des peroxydes organiques complexes.

En ce qui concerne les autres travaux en ce domaine, les résultats globaux font apparaître un effet toxique (inhibition de croissance) ou mutagénique (augmentation du taux de mutation ou de réversion) des milieux de culture plus ou moins complexes, irradiés aux rayons ultraviolets, X ou gamma [11, 22, 23, 34, 36, 186, 187]. Ceci se traduit par des modifications dans les synthèses de l'ADN, des ARN et des protéines [74, 158]. C'est souvent au niveau de la définition du ou des produits en cause que les conclusions des auteurs divergent pour ne s'accorder que sur le peroxyde d'hydrogène.

Avant de terminer ce paragraphe, il faut citer les quelques expériences qui ont permis de conclure à une non-toxicité ou même à un effet stimulateur des substrats irradiés. Hormis les travaux de A. LWOFF et coll. [118] puis de BUGYAKI et coll. [27] qui ont montré que les milieux peptonés irradiés n'induisent pas la production de bactériophages chez les bactéries lysogènes, ces études se présentent le plus souvent comme des cas spéciaux : dilution excessive du milieu entraînant une dilution concomitante des produits toxiques, attente trop importante entre l'irradiation et les expériences ce qui peut laisser le temps à des composés fragiles de disparaître [77], étude d'un milieu complexe et mal défini dans le temps (pommes de terre sur une année) [49] ou mesure de la germination des spores, formes très résistantes des cellules bactériennes [99]. Notons aussi les résultats contradictoires de BANDIERA et coll. en fonction des souches d'*Escherichia coli* utilisées [8].

#### B. - EUCARYOTES UNICELLULAIRES

Le taux de croissance de *Saccharomyces cerevisiae* diminue dans le cas de cultures en solution aqueuse de sucrose ou de gélatine irradiée aux rayons U.V., inhibition attribuée à la formation de substances toxiques non volatiles [153, 205]. Pour certains auteurs, il s'agit de peroxyde d'hydrogène, compte tenu du parallèle qui peut être fait entre son activité cytotoxique et celle de substrats irradiés sur *Neurospora* [47, 89, 201], démarche déjà rencontrée et critiquée à propos des cellules procaryotes. Ce sont à nouveau des expériences basées sur l'action enzymatique de la catalase qui ont permis de confirmer ce point de vue sur des systèmes tels que des Protozoaires [24, 196] ou des spermatozoïdes d'oursin et de néréis [9, 58 à 60].

Seuls M.L. FIELDS et coll. sur *Aspergillus oryzae* [62], M. BANDIERA et coll. sur *A. nidulans* [8] et H. IIZUKA et coll. [86] sur *Saccharomyces cerevisiae* signalent une activation de croissance due principalement à des sucres irradiés au cobalt 60.

#### C. - CULTURES DE TISSUS

Il s'agit là d'un domaine particulier puisque les organismes utilisés se situent au carrefour de systèmes simples (bactéries, unicellulaires) en contact direct avec le milieu toxique et de ceux, beaucoup plus complexes (drosophiles, organismes supérieurs) pourvus d'une barrière de détoxification telle que l'appareil digestif. Chez les premiers,

les effets sont la plupart du temps très importants tandis que chez les seconds ils deviennent quasiment nuls.

#### 1. - Tissus végétaux

A côté d'effets activateurs généralement observés pour des irradiations à faible dose ou avec des substrats irradiés mais stockés avant expérience, les résultats globaux indiquent une nette activité toxique des sucres traités par rayonnements ionisants : inhibitions de croissance de jeunes pousses, de méristèmes isolés, de tissus tumoraux ou normaux, embryonnaires ou non [53, 84, 90, 105, 119, 121, 122, 137, 145, 169, 171]. Les aberrations et les cassures chromosomiques, les retards de phase dans la méiose ou les mitoses, l'apparition de micronucléi ou la polyploïdie sont aussi des anomalies fréquemment rencontrées [37, 38, 93, 95, 98, 140, 141, 193].

#### 2. - Tissus animaux

Les résultats sont similaires à ceux obtenus sur cellules végétales : inhibition d'étalement et de croissance de fibroblastes de poulets ou de cellules cancéreuses de souris, inhibition des mitoses de leucocytes et de lymphocytes humains [21, 85, 94, 115, 182, 183], fragmentation de chromosomes, formation de micronucléi [83] etc...

BERRY [21] a démontré que le composé toxique n'est pas dans son cas le peroxyde d'hydrogène car la catalase est sans action sur l'inhibition de croissance occasionnée par le fructose ou le dextrose irradié. Il attribue la toxicité au glyoxal ce qui engagea une polémique autour de ce produit. En effet, STEWARD et coll. avaient suggéré que l'oxydation du formaldéhyde en acide formique était responsable de la cytotoxicité observée dans son système [190] mais HILLS et BERRY [83] montrèrent que le formiate de sodium n'exerçait aucun effet cytotoxique même aux concentrations 10 fois plus élevées que celles utilisées par STEWARD et que, de plus, le glyoxal peut être converti en acide oxalique comme le formaldéhyde est converti en acide formique. L'acide oxalique étant lui-même très toxique, le glyoxal est seul en cause en ce qui concerne la toxicité. Cependant l'incertitude demeure car la concentration de glyoxal dans les solutions de sucres irradiées est en réalité beaucoup plus faible que celle mentionnée par ces auteurs [75] et aussi parce que les deux groupes de chercheurs ne travaillaient pas sur le même système biologique.

#### D. - DROSOPHILES

Les effets mutagènes de substances irradiées (sucrose, DNA etc...) ont été étudiés sur *Drosophila melanogaster* par le biais de mutations liées au sexe ou autosomales létales. Les expériences de M.S. SWAMINATHAN et coll. [194] qui ont augmenté le taux de mutation d'un facteur 4 avec du milieu de culture irradié, ont été répétées sans succès par d'autres auteurs [97]. En général, les résultats indiquent des augmentations du nombre de mutants assez faibles ce que les chercheurs ont tenté d'expliquer par des varia-

tions du taux de catalase dans la cavité abdominale de l'insecte [96, 138, 160]. En effet, après les travaux de SOBELS [184, 185] montrant que la catalase des drosophiles annule l'activité mutagénique des peroxydes organiques, ces derniers sont généralement impliqués dans la toxicité des substrats irradiés sur drosophile. Il est cependant possible de mettre aussi en cause les changements métaboliques du milieu irradié dans le tractus digestif de l'insecte [35].

#### E. - RATS ET SOURIS

En ce qui concerne ces animaux supérieurs, nous laisserons de côté les expériences qui concluent à l'innocuité des rations alimentaires irradiées, y compris celles où les lésions observées ne sont pas statistiquement caractéristiques du traitement [28, 41, 81, 82, 87, 88, 103, 125, 152, 154, 158, 159, 162, 197]. Nous limiterons notre étude à quelques cas particuliers dignes d'intérêt bien que portant sur un nombre de travaux beaucoup plus restreint.

Ainsi pour L. BUGYAKI et coll. [26], les rations contenant 50 % de farine de blé irradiée à 5 Mrad provoquent chez les souris C57BL adultes une augmentation de la fréquence des tumeurs mammaires, des altérations significatives des chromosomes en méiose (figures de translocation, ponts chromosomiques) ainsi qu'une mortalité plus élevée des souriceaux. Cependant l'augmentation des cancers reste faible et n'est pas significative compte tenu de leur fréquence spontanée élevée.

J. MOUTSCHEN et M. MOUTSCHEN-DAHMEN [139] observent une multiplication par un facteur 2 à 3 des fréquences de morts intra-utérins lorsque les animaux de la lignée parentale sont soumis tous deux à un régime irradié à 5 Mrad. L'accroissement ne porte en fait que sur la classe des embryons qui meurent avant implantation.

L. EHRENBERG et coll. [54] notent une baisse de 15 à 20 % du nombre de lymphocytes dans le sang circulant chez des rats nourris avec des rations synthétiques irradiées de 3 à 9 Mrad ( $\gamma$   $^{60}\text{Co}$ ). L'effet est comparable à celui d'une irradiation corporelle de 20 rads ou d'une exposition chronique de 1 rad par jour. LÖFROTH et coll. [116] confirment ces résultats aussi bien avec une ration synthétique qu'avec de l'eau irradiée à 6 Mrad. Les extraits de produits irradiés ne renferment ni formaldéhyde ni peroxyde mais par contre, des acides et des composés oxydés peuvent y être dosés. D'autre part, un apport d'acide folique fait diminuer la chute du taux de lymphocytes.

Un cas intéressant est signalé par A.K. DE et al. [144] qui suivent l'action *in vitro* et *in vivo* des solutions de sucrose irradiées (500 krad -  $^{60}\text{Co}$ ) sur les systèmes enzymatiques du rat. La fraction toxique inhibe l'oxydation succinique et la phosphorylation dans les mitochondries du foie. Les synthèses de DNA, de lipides, et de protéines sont également diminuées sans doute par manque d'ATP. Il faut enfin noter que pour P. FOURNIER et M. FORESTIER [65], l'irradiation des rations données aux rats carencés en calcium est bénéfique puisque les signes de rachitisme disparaissent rapidement sous l'effet de l'ingestion de glucose irradié.

Il convient d'ajouter que les résultats provisoires des essais de toxicité et de reproduction effectués sur des rats nourris avec des rations crues ou cuites contenant 62 % d'amidon irradié à 300 et 600 krad ( $\gamma$  du  $^{60}\text{Co}$ ) ne font pas apparaître de manifestations d'ordre toxicologique imputables à l'irradiation [167].

#### F. - HOMMES

Deux expériences de nutrition humaine ont été réalisées sur des volontaires aux Etats-Unis. Ni l'une, ni l'autre n'a fait apparaître d'effets toxiques quelles que soient les caractéristiques étudiées [146, 147].

En conclusion, il est tout d'abord possible de constater que plus les systèmes biologiques utilisés sont complexes, moins les substrats irradiés ont d'effet toxique sur eux, résultat attendu du fait des barrières de détoxification des organismes supérieurs.

D'autre part, il faut surtout signaler le manque de définition de certaines conditions expérimentales, parfois très différentes d'un auteur à l'autre : conclure à la toxicité ou à l'innocuité d'un composé irradié donné ne peut se faire que sur des expériences suffisamment précises pour éviter les confusions entre un véritable effet toxique et un artefact dû à un paramètre mal contrôlé (pH, atmosphère, concentration etc...).

Enfin l'unanimité n'est pas encore réalisée sur l'identité des produits responsables des phénomènes observés : glyoxal, formaldéhyde, acides organiques, radicaux libres et peroxydes y sont tour à tour impliqués. Cependant ces derniers, et notamment le peroxyde d'hydrogène, sont les plus cités et les mieux caractérisés.

## MATERIEL ET METHODES

### A. - MICRO-ORGANISMES

Les expériences ont été réalisées avec les souches suivantes :

- *Escherichia coli* A224 prototrophe, souche "Monod" de la Collection de l'Institut Pasteur;
- *E. coli* K12 322 HfrH  $\lambda^-$  B<sub>1</sub><sup>-</sup>, don de M. le Professeur BELAISH\* (CNRS, Marseille);
- *E. coli* K12 AB1157 F<sub>1</sub><sup>-</sup>  $\lambda^-$  B<sub>1</sub><sup>-</sup> Lac<sup>-</sup> Ara<sup>-</sup> Xyl<sup>-</sup> Gal<sup>-</sup> Thr<sup>-</sup> Leu<sup>-</sup> Pro<sup>-</sup> His<sup>-</sup> Arg<sup>-</sup> Str<sup>R</sup>, don de M. le Professeur GUILLAUME\* (Institut Pasteur, Lille);
- *E. coli* KMBL ou GY140 F<sub>1</sub><sup>-</sup>  $\lambda^+$  Lac<sup>+</sup> Mal<sup>-</sup>  $\lambda^R$  uvr A16 su I;
- *E. coli* GY521 F<sup>-</sup> Thr<sub>4</sub> Leu<sub>8</sub> Thi<sub>1</sub> Lac<sub>y<sub>1</sub></sub> Gal<sup>+</sup> Mal<sup>+</sup> ton A Str 2049 sup.II.

Ces dernières souches utilisées pour des expériences d'induction de phages nous ont été données par M. le Professeur DEVORET\* (CNRS, Gif-sur-Yvette).

- *Bacillus subtilis* prototrophe, don de M.J. VELLARD\* (CERTIA, Lille);
- *Pseudomonas putida* 128 prototrophe de la "National Collection of Marine Bacteria" (Aberdeen);
- *Lactobacillus plantarum* IM 1810;
- *Streptococcus faecalis* IM 1807;
- *Enterobacter* sp. atypique, souche isolée sur souris OF<sub>1</sub> aux Oncins (1970);

Ces trois dernières souches nous ont été données par le Docteur COQUET\* de l'Institut Mérieux (IFFA-CREDO, les Oncins)

- *Saccharomyces cerevisiae* prototrophe;
- *S. cerevisiae* mutant "petites colonies" ;

Ces deux souches de levure nous ont été données par le Docteur M. MURGIER\* (CNRS, Marseille)

- Phage  $\lambda$  induit de la souche d' *E. coli* KMBL21

---

\* Je remercie ici ces personnes pour la gentillesse avec laquelle elles m'ont fait don de ces souches.

B. - MILIEUX DE CULTURE : COMPOSITION

1 - Milieu M63 pour *E.coli*

Le milieu de base est le suivant :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$  : 14,7 g ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 3 g ;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  : 1 g ;  $\text{NaCl}$  : 5 g ;  $\text{CaCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$  : 0,015 g ;  $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$  : 0,25 g ; D (+) glucose : 4 g ;  $\text{H}_2\text{O}$  tridistillée : 1 l. A ce milieu sont rajoutés, le cas échéant, les composés suivants pour les souches auxotrophes ou résistantes : Vitamine  $\text{B}_1$  (chlorhydrate de thiamine) :  $10^{-6}$  g ; DL-thréonine :  $75 \cdot 10^{-6}$  g ; DL-leucine :  $60 \cdot 10^{-6}$  g ; L-Histidine :  $20 \cdot 10^{-6}$  g ; L-Arginine :  $60 \cdot 10^{-6}$  g ; L-Proline :  $30 \cdot 10^{-6}$  g ; Streptomycine :  $10^{-4}$  g. Le pH final de ce milieu est de 7.

2 - Milieux pour l'induction des phages

— Milieu BT :  $\text{NaCl}$  : 5 g ; Bactotryptone Difco : 5 g ; Nutrient Broth Difco : 3 g ;  $\text{H}_2\text{O}$  tridistillée : 1 l.

— Milieu BT-TU : Thymines 2 g/l : 20 ml ; Uracile 2 mg/l : 20 ml ; milieu BT ci-dessus : 1 l.

— Agar mou : Agar-agar : 7,5 g ;  $\text{H}_2\text{O}$  tridistillée : 1 l.

— Milieu GT Str : Bactopeptone Difco : 8 g ; Bacto tryptone Difco : 5 g ;  $\text{NaCl}$  : 5 g ; Agar-agar : 15 g ; Streptomycine à 100 g/l : 2 ml ;  $\text{H}_2\text{O}$  tridistillée : 1 l.

3 - Milieu de dilution (pH 7)

Les tubes à dilution sont remplis avec 9 ml de la solution suivante :  $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12\text{H}_2\text{O}$  : 14,7 g ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 3 g ;  $\text{NaCl}$  : 1 g ;  $\text{H}_2\text{O}$  tridistillée : 1 l.

4 - Milieu de comptage

Les populations bactériennes sont comptées sur le milieu "Standart I Nutrient Agar" Merck de composition suivante : Bactopeptone : 15,6 g ; Extrait de levure : 2,8 g ;  $\text{NaCl}$  : 5,6 g ; D(+) glucose : 1 g ; Agar-agar : 12 g ;  $\text{H}_2\text{O}$  tridistillée : 1 l.

5 - Milieu de sélection des révertants

Les révertants pour les marqueurs His, Arg, Leu et Thr sont sélectionnés sur boîtes de Petri avec un milieu M63 dont la concentration en amino acide étudié est 100 fois plus faible que la concentration normale et auquel on ajoute 12 g/l d'agar-agar.

6 - Milieu EMB Agar pour les mutants lac<sup>-</sup>

Sa composition est la suivante : Bactopeptone Difco : 10 g ; Lactose : 5 g ; Saccharose : 5 g ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 2 g ; Agar-agar : 13,5 g ; Eosine Y : 0,4 g ; Bleu de méthylène : 0,065 g.

7 - Milieu pour *E. subtilis*

Le milieu mis au point au laboratoire est : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 2,7 g ; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 7 g ; Citrate de sodium : 0,5 g ; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 1,3 g ; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O : 0,25 g ; Extrait de levure "Merck" : 1,5 g ; glucose : 1 g ; H<sub>2</sub>O tridistillée : 1 l (pH final: 7,2).

8 - Milieu pour *L. plantarum*

Le milieu mis au point au laboratoire est : Extrait de levure "Merck" : 6 g ; Bactotryptone Difco : 5 g ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 2 g ; Tween 80 (Polysorbate 80) : 0,1 g ; D(+) glucose : 5 g ; H<sub>2</sub>O tridistillée : 1 l (pH final : 6,5).

9 - Milieu pour *S. faecalis*

Le milieu de pH 6,9 mis au point au laboratoire est : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 4 g ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 1,5 g ; NaCl : 5 g ; Bactotryptone Difco : 10 g ; Glycérol : 100 g ; Glucose : 5 g ; H<sub>2</sub>O tridistillée : 1 l.

10 - Milieu pour *Enterobacter*

Le milieu mis au point au laboratoire a pour composition : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> : 0,6 g ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 0,4 g ; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 2 g ; NaCl : 2 g ; Glucose : 3 g ; H<sub>2</sub>O tridistillée : 1 l. Son pH final est de 6,7.

11 - Milieu pour *S. cerevisiae*

Il comprend : KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 10 g ; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O : 1,2 g ; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O : 0,5 g ; Bactotryptone Difco : 0,5 g ; Extrait de levure "Merck" : 1,5 g ; H<sub>2</sub>O tridistillée : 1 l. Les concentrations en D(+) glucose sont respectivement de 1 g/l et de 3 g/l pour les souches normale et "petites colonies". Le pH est ajusté à 5,8. Pour les précultures, ce même milieu est complété par de la terramycine à 1 g/l afin d'éviter les contaminations bactériennes.

12 - Milieu de conservation des souches

Les couches sont conservées au réfrigérateur en tubes étanches, bouchés à vis, dans le milieu suivant : Nutrient Broth Difco : 8 g ; Agar-agar : 7,6 g ;

Thymine à 2 mg/ml : 40 ml ; H<sub>2</sub>O tridistillée : 1 l.

13 - Milieu de culture ; stérilisation

Tous les milieux liquides sont en général stérilisés par passage sur filtre "Millipore" de 0,25  $\mu$  et les milieux solides par autoclavage à 120°C. Cependant lorsque les constituants de ces derniers sont susceptibles d'être dégradés par la chaleur (Vitamine B1 par exemple), on ajoute, avant de couler les boîtes de Pétri, la fraction fragile, deux fois plus concentrée, préalablement filtrée sur Millipore de 0,25  $\mu$ , à de l'agar-agar double concentration stérilisé seul à l'autoclave.

C. - AMIDON

Le polysaccharide, fourni par les Etablissements Roquette (Lille) et toujours utilisé à une humidité de  $13,0 \pm 0,5$  % peut subir le cas échéant deux types de prétraitements avant irradiation :

- Un lavage par 4 agitations successives de 1h30 d'une suspension de 250 g d'amidon dans 500 ml d'eau distillée puis séchage doux jusqu'à la teneur en eau initiale.
- Une délipidation sur Soxhlet par 3 extractions à reflux de 4 h dans l'alcool, l'éther puis à nouveau l'alcool suivies d'un lavage analogue au précédent.

D. - IRRADIATION : MOYENS ET TECHNIQUES\*

L'amidon est irradié de 2 façons différentes selon la quantité utilisée : par lots de 10 g dans les tubes à essais en Pyrex de 20 x 200 mm fermés, avec une source de 2 000 Ci de Cobalt 60 (<sup>60</sup>Co) qui délivre un débit de dose de  $90 \pm 2,5$  krad/h; par lots de 100 g ou plus dans les boîtes cylindriques en aluminium de 60 x 200 mm fermés, avec une source de 12 000 Ci de <sup>60</sup>Co qui délivre un débit de dose variable généralement fixé à  $180 \pm 5$  krad/h.

E. - EXTRACTION DES PRODUITS DE RADIOLYSE

Les substances solubles formées au cours de l'irradiation sont extraites et stérilisées par passage, sur verre fritté puis sur filtre "Millipore" de 0,45  $\mu$  équipé d'un préfiltre, d'une suspension de n g d'amidon dans 2 n ml d'eau tridistillée.

---

\*Je remercie MM. DANIEL et SAUBIN pour leur collaboration technique efficace en ce qui concerne la manipulation de ces moyens d'irradiation.

F. - CULTURES

Quel que soit le mode d'extraction, le milieu de culture est toujours reconstitué à partir des solutions concentrées afin d'obtenir les concentrations adéquates des divers composants puisensemencé à partir d'une préculture en phase exponentielle de croissance de telle sorte que la concentration bactérienne finale soit d'environ  $10^6$  bactéries/ml.

G. - TECHNIQUES PARTICULIERES

1 - Détermination de la teneur en eau de l'amidon

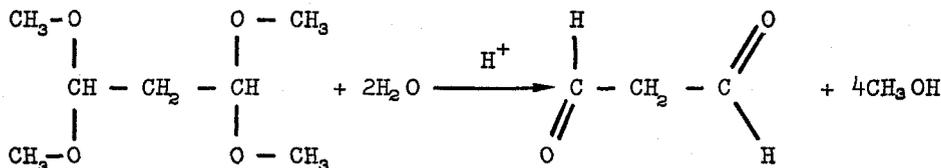
5 g d'amidon sont séchés dans une capsule Chopin tarée, à  $130^{\circ}\text{C}$  pendant 4 h (poids constant) puis pesés. La différence exprimant la teneur en eau est rapportée à 100 g d'amidon.

2 - Dosage des réductones et de l'eau oxygénée

Les réductones (acides dicétoguloniques, aldéhyde énoaltartronique, acide ascorbique) sont dosées par le 2,6-dichlorophénol indophénol [1 et 161].

Le peroxyde d'hydrogène et, dans une certaine mesure, ses dérivés supérieurs (peroxydes organiques) sont dosés par le sulfate de titane ou par le thiocyanate d'ammonium [52].

3 - Hydrolyse du diacétal de l'aldéhyde malonique



Le diacétal est hydrolysé 30 mn à  $30^{\circ}\text{C}$  avec HCl 0,6 M.

4 - Ultrafiltration

L'appareil comprend une cellule d'ultrafiltration Amicon et une membrane Diaflo Amicon UMO5 au travers de laquelle est filtré sous pression (4 bars d'argon) l'extrait d'amidon irradié. Au pH utilisé, cette membrane retient 20 % des molécules de poids moléculaire supérieur à 200, 70 % de celles de poids moléculaire supérieur à 300 et 95 % de celles de masse moléculaire supérieure à 1 000.

## 5 - Enzymes

### a. *Catalase*

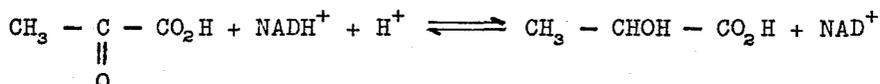
La préparation utilisée est une catalase bactérienne de *Micrococcus lyso-deikticus* réduisant 2 000 µM de peroxyde d'hydrogène par mn et mg et testée par la méthode de titration iodométrique [39].

### b. *Peroxydase*

L'enzyme est extrait du raifort et utilisé avec du NADH comme coenzyme. Son activité est de 140 unités purpurogalline [35].

### c. *Lactate deshydrogénase*

Cet enzyme catalyse la réaction :



et permet de doser la quantité d'acide pyruvique se trouvant dans un mélange réactionnel par mesure de la disparition du NADH<sup>+</sup> à 340 mµ [39].

## 6 - Induction de phages

### a. *Comptage des phages*

A partir d'une culture de la souche lysogène GY140 sur milieu BT (avec ou sans extrait d'amidon irradié), il faut effectuer une dilution appropriée, en prendre 0,1 ml et le mélanger avec 0,3 ml de la culture de la souche indicatrice GY521. Ce tube est abandonné sans agitation à 37°C pendant 20 mn puis complété avec 2,5 ml d'agar mou et étalé sur une boîte de Pétri contenant du milieu GT-Str. Ce dernier milieu élimine les bactéries GY140 Str<sup>S</sup> qui n'auraient pas été lysées. Ces boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 h.

### b. *Induction de phages*

A partir d'une préculture "overnight" de GY140 lysogène dans du milieu BT, on effectue une dilution au 50ème dans du tampon stérile. A partir de cette dilution, 1 ml sert àensemencer 100 ml de BTU (avec ou sans extrait d'amidon irradié) qui sont ensuite incubés à 37°C. On prélève des parties aliquotes à différents intervalles de temps pour compter les bactéries ou pour compter les phages libres.

## 7 - Mutagenèse

Des parties aliquotes de culture en phase exponentielle de croissance, avec ou sans agent supposé mutagène, sont prélevées et étalées sur des boîtes de

Pétri contenant du milieu M63 solide avec tous les aminoacides sauf celui pour lequel on cherche la réversion. Ce dernier est seulement ajouté à l'état de traces (environ  $10^{-2}$   $\mu\text{g}/\text{l}$ ) : les révertants apparaissent comme de grosses colonies sur un fond de petites colonies. Ces mutants sont vérifiés par la méthode des répliques sur velours de LEDERBERG et coll. [113].

Les révertants Lac<sup>+</sup> sont caractérisés sur milieu "EMB Agar".

#### H. - JUSTIFICATION ET CHOIX DES TECHNIQUES ET DES PARAMETRES DE MESURE

Notre travail va consister à suivre la croissance de nombreuses cultures bactériennes en présence d'extraits d'amidon irradié dans diverses conditions et de la comparer à celle de témoins : il s'agit donc de choisir une technique rapide et un paramètre caractéristique et facilement mesurable. Notre choix s'est porté sur deux méthodes complémentaires : soit la néphélométrie avec des cultures de 8 ml dans des cuves thermorégulées à 30°C ou 37°C d'un biophotomètre Bonet-Maury modifié de telle manière qu'un bullage d'oxygène ou d'air constant soit maintenu en cours de croissance (fig. 2); soit des séries de comptages sur boîtes de Pétri à partir de cultures de 100 ml agitées, placées dans un bain-marie à 30°C ou 37°C.

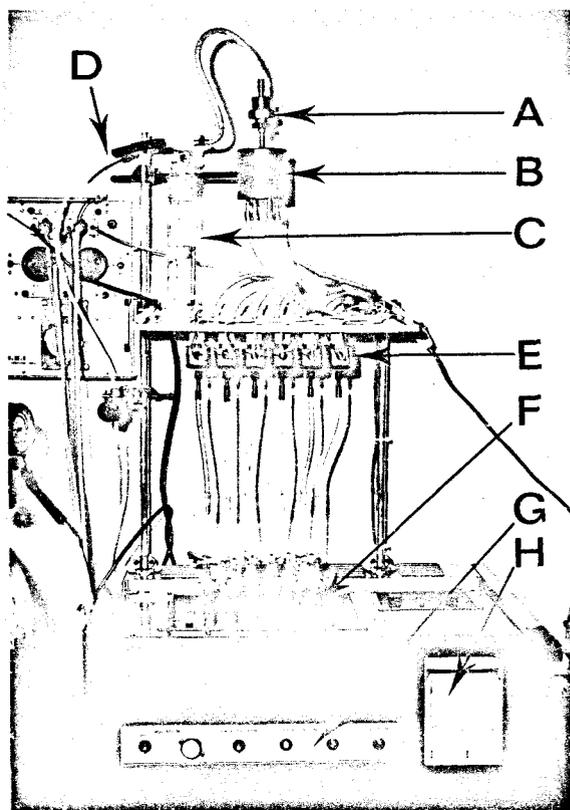


Figure 2 - Biophotomètre Bonet-Maury modifié :

- |                                       |                      |
|---------------------------------------|----------------------|
| A : filtre Millipore "in line"        | E : électrovannes    |
| B : répartiteur de pression           | F : cuves de culture |
| C : saturateur en eau                 | G : biophotomètre    |
| D : arrivée d'air ou d'O <sub>2</sub> | H : enregistreur     |

Parmi les trois phases principales de la croissance bactérienne — latence, croissance exponentielle et maximum stationnaire — notre choix s'est porté sur la première. En général lorsqu'un milieu estensemencé à partir d'une préculture en phase exponentielle et cultivée dans les mêmes conditions physico-chimiques, il est possible d'observer une croissance exponentielle immédiate. Cependant, dans certains cas, une période transitoire appelée phase de latence peut s'écouler avant que s'établisse un taux de croissance constant [134]. Cette latence représente le temps nécessaire soit à la synthèse des enzymes inductibles (adaptation), soit au développement des mutants favorisés par le nouveau milieu (sélection), soit enfin à la restauration des systèmes enzymatiques altérés par le vieillissement de la préculture. En turbidimétrie, elle peut aussi être due à une diminution du nombre de bactéries viables, l'appareil enregistrant à la ligne de base des densités optiques, un palier d'autant plus long que le taux de mortalité est plus élevé.

La phase exponentielle est définie au moment où le temps de division bactérienne devient constant pour certaines conditions de pH, de température ou de concentration des métabolites. Cependant, dans le cas qui nous préoccupe, les taux de croissance des bactéries cultivées en présence d'extraits d'amidon irradié ne sont pas strictement identiques à ceux des témoins (glucose ou amidon non irradié) et parfois même différents d'une dose à l'autre. Une explication plausible est la compétition entre les produits de radiolyse toxiques et les vitamines ou les aminoacides contenus dans l'amidon, compétition dépendant des concentrations propres de ces produits qui sont elles-mêmes variables. Il nous a donc paru inopportun de prendre comme critère de mesure un paramètre aussi mal défini.

Enfin, la phase stationnaire qui correspond à un épuisement du facteur de croissance n'a pas été retenue car la seule information qu'elle peut apporter se situe au niveau de l'action de métabolites issus de l'amidon, irradié ou non sur la faible augmentation de la croissance totale. Même dans ce cas, le problème ne pourrait être traité sous l'angle du rendement pondéral ou moléculaire que si la totalité des produits de radiolyse était identifiée et dosée.

En conclusion, parmi toutes les méthodes de mesure, les techniques de néphélométrie assorties de numérations sur boîtes de Pétri sont les plus adaptées à notre problème et, parmi les paramètres de croissance mesurables et relativement stables, le plus représentatif est ce que nous désignerons dans ce cadre de recherche comme une phase de latence. Celle-ci est reliée à une diminution de la population bactérienne initiale mesurée par comptage ce qui permet d'employer, tout au moins dans un but de simplification, les latences comme un moyen d'évaluer la létalité (fig. 3 et 4). Par définition, ce temps de latence sera mesuré graphiquement pour une densité optique moitié de celle de la phase stationnaire par rapport à un témoin pour lequel l'extrait est remplacé par un volume égal de milieu de culture.

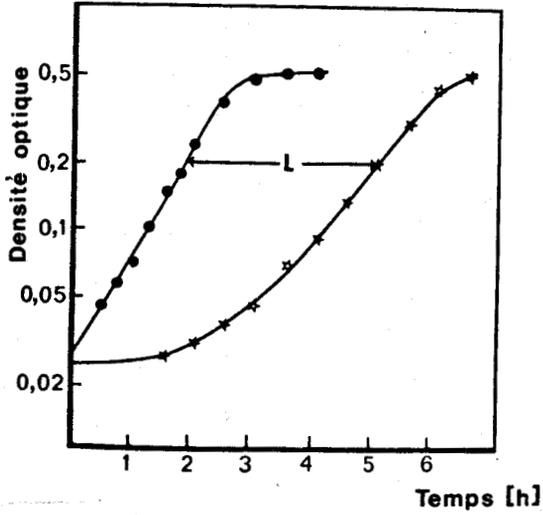


Figure 3 - Définition de l'augmentation de la phase de latence L à partir des courbes de croissance d'*E. coli* dans un milieu glucosé (●) et dans un extrait irradié à 1 Mrad (☆).

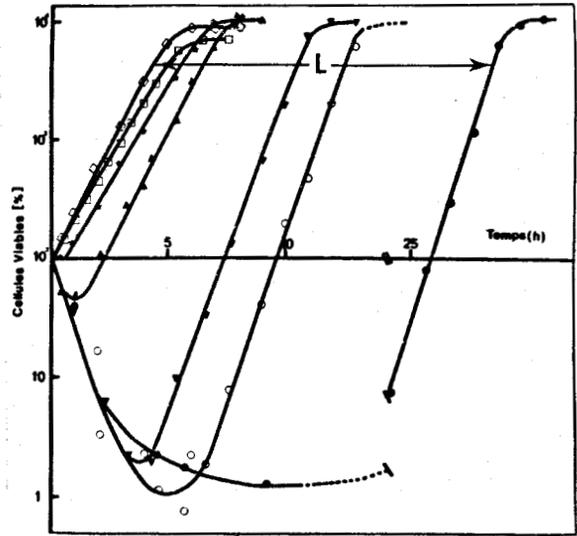


Figure 4 - Effet bactéricide d'un extrait d'amidon irradié à

- |               |                    |
|---------------|--------------------|
| 0,75 Mrad (▲) | 0,50 Mrad (★)      |
| 1 Mrad (▼)    | 0 Mrad (◇)         |
| 1,5 Mrad (○)  | Témoin glucose (□) |
| 2 Mrad (●)    |                    |

L = latence

## MODE D'ACTION DES EXTRAITS D'AMIDON IRRADIE SUR LA CROISSANCE DES MICRO-ORGANISMES

L'objectif est ici d'étudier les paramètres qui conditionnent la toxicité des extraits d'amidon irradié. Nous analyserons dans un premier temps le comportement physiologique des micro-organismes cultivés en présence de ces extraits lorsqu'on fait varier les conditions d'irradiation, les caractéristiques de l'amidon, les traitements physico-chimiques qu'il subit après irradiation et les méthodes de culture. Dans une seconde étape et pour une même série de variables, nous comparerons les courbes de formation des divers produits de radiolyse dosés au laboratoire et les courbes de latence rapportées ici afin de caractériser un ou plusieurs composés cytotoxiques.

### A. - RESULTATS EXPERIMENTAUX

#### 1 - Influence des conditions d'irradiation

##### a. *Dose*

De zéro à 1 Mrad, le temps de latence croît proportionnellement à la dose avec un léger infléchissement des points pour 1 Mrad; au-delà la forme générale de la courbe est exponentielle et la reproductibilité des expériences décroît fortement surtout à 2 Mrad (fig. 5).

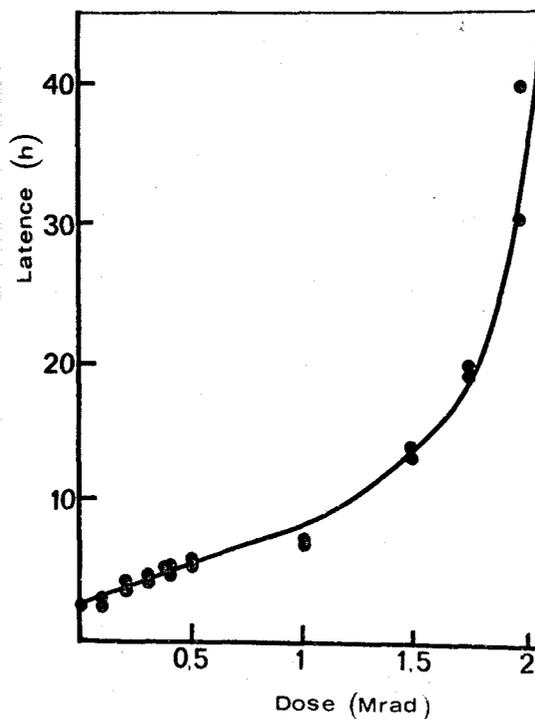


Figure 5 - Relation entre le temps de latence et la dose d'irradiation.

b. *Débit de dose*

Les irradiations ont été effectuées à la dose de 1,75 Mrad où la réponse des croissances bactériennes vis-à-vis des extraits d'amidon irradié est très sensible. Malgré la faible reproductibilité, il est possible de conclure que les temps de latence diminuent quand le débit de dose augmente (fig. 6).

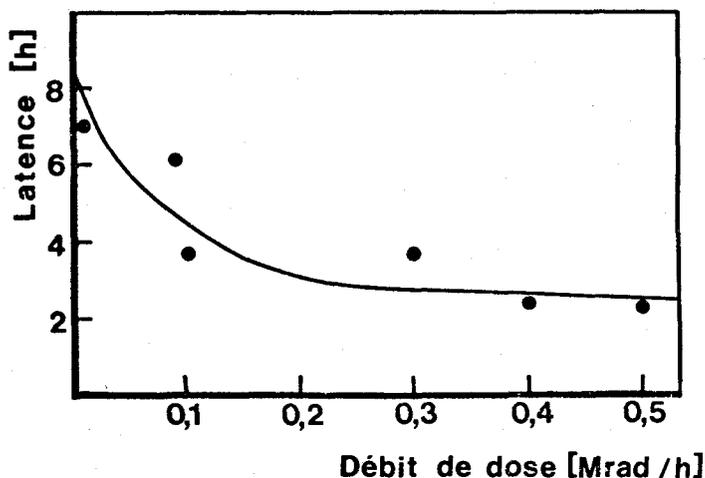


Figure 6 - Variations des latences bactériennes en fonction du débit de dose.

c. *Composition de l'atmosphère*

Avant d'être irradié à la dose de 1,75 Mrad, l'amidon est soit balayé pendant 15 mn par un flux constant du gaz utilisé, soit placé sous vide (20 mm de mercure pendant 15 mn).

Le temps de latence est pratiquement nul lorsque l'irradiation est effectuée en présence d'azote, de gaz carbonique ou sous vide; il est de l'ordre de 10 h pour une atmosphère d'oxygène soit le double de celui enregistré pour l'air (fig. 7). Il faut ajouter que le volume d'air présent dans le tube au moment de l'irradiation ainsi que le tassement de l'amidon qui détermine la quantité d'air intergranulaire, ont une grande influence sur l'action physiologique de l'extrait. Il s'agit là de l'un des nombreux paramètres, peu contrôlables, qui conditionnent la reproductibilité des résultats.

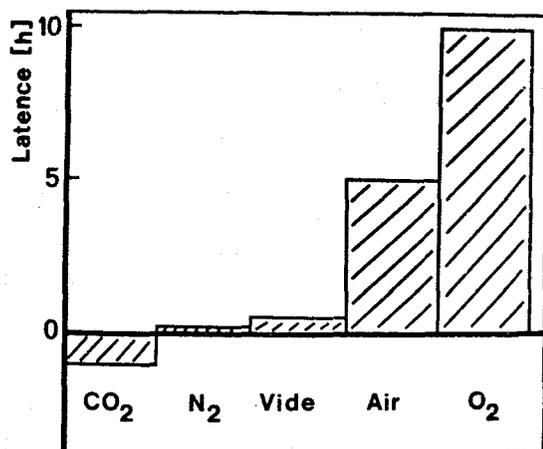


Figure 7 - Effet de la composition de l'atmosphère d'irradiation sur l'allongement des temps de latence.

d. *Température d'irradiation*

Les irradiations à la dose de 1,75 Mrad sont effectuées avec une source de 2 000 Ci de <sup>60</sup>Co thermorégulée entre -80°C et 60°C.

L'influence de la température d'irradiation sur les temps de latence apparaît à partir de 10°C et devient très importante entre 10 et 50°C (fig.8): c'est pour les températures dites ambiantes que la pente de la courbe est la plus forte.

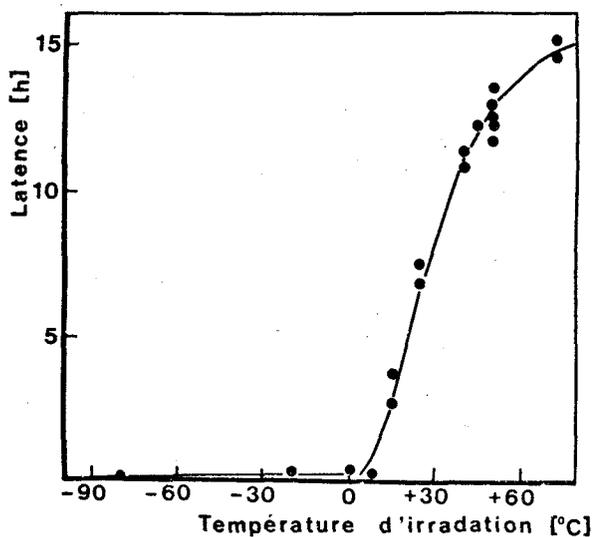


Figure 8 - Effet de la température d'irradiation sur l'augmentation des temps de latence.

## 2 - Influence des caractéristiques de l'amidon

### a. *Teneur en eau*

Les temps de latence augmentent avec la teneur en eau à partir d'une valeur voisine de 10 %, et ceci d'autant plus que la dose est plus élevée (fig. 9).

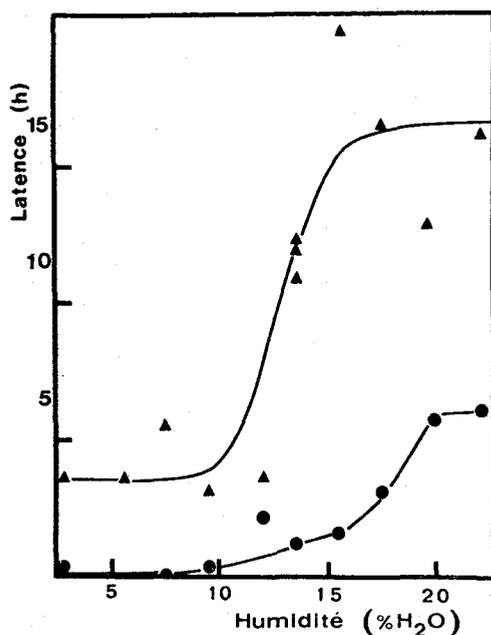


Figure 9 - Effet de l'humidité de l'amidon sur l'augmentation des phases de latence.

▲ : 1,75 Mrad

● : 0,50 Mrad

### b. *Nature et composition*

L'origine des amidons (maïs, froment, pomme de terre, manioc), leur date de fabrication (numéro du lot) et surtout leur traitement chimique (estérification, étherification, oxydation) ont une influence sur les latences mesurées. Il est par conséquent nécessaire de conserver un même lot d'amidon au cours d'une série de travaux afin d'améliorer la reproductibilité des résultats.

D'autre part, afin d'évaluer la toxicité des produits formés à partir de la fraction lipidique de l'amidon (par exemple, des peroxydes à longue chaîne) on a comparé la létalité exercée par un extrait d'amidon délipidé irradié à celle d'un extrait d'amidon lavé irradié. Il n'y a aucune différence entre ces deux extraits ce qui permet de conclure que les résidus lipidiques ne sont pas en cause dans l'effet bactéricide.

### 3 - Influence des traitements de l'amidon après irradiation

#### a. *Température de stockage*

La toxicité d'un amidon irradié à 1,5 Mrad et stocké à  $-50^{\circ}\text{C}$ ,  $5^{\circ}\text{C}$  et  $37^{\circ}\text{C}$  diminue d'autant plus rapidement que la température est plus élevée : à  $37^{\circ}\text{C}$ , la létalité disparaît entre le 2ème et le 7ème jour alors qu'il faut attendre 86 jours pour obtenir le même effet à  $5^{\circ}\text{C}$  ou  $-50^{\circ}\text{C}$  (fig. 10) ; après 56 jours de conservation l'activité bactéricide a diminué de moitié à  $5^{\circ}\text{C}$  mais reste inchangée à  $-50^{\circ}\text{C}$ . Il est possible de conclure que les produits de radiolyse en cause disparaissent rapidement surtout aux températures voisines ou supérieures à la température ambiante.

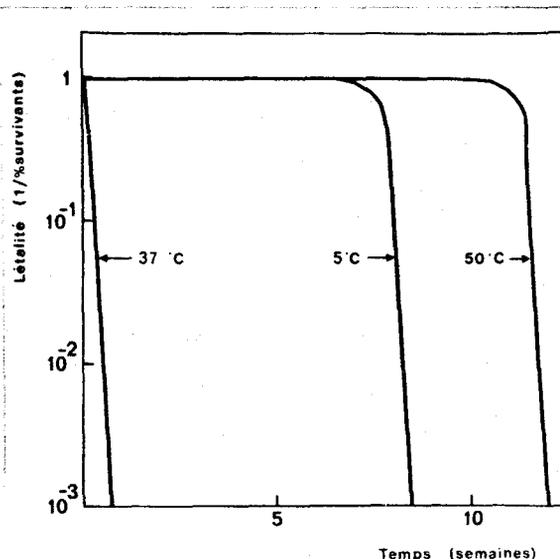


Figure 10 - Diminution de la létalité bactérienne en fonction du temps de stockage de l'amidon irradié à différentes températures. (La létalité est mesurée comme l'inverse du pourcentage de survivants dans une culture de 4 h).

#### b. *Autoclavage*

L'effet bactéricide d'un amidon irradié à 1,5 Mrad puis autoclavé à  $120^{\circ}\text{C}$  diminue rapidement pour des traitements thermiques allant de 5 à 30 mn. Au-delà, les temps de latence augmentent pour atteindre le niveau initial après 90 mn à  $120^{\circ}\text{C}$  (fig. 11) : les composés formés sous l'action de la chaleur à partir de la chaîne amyliacée affaiblie par l'irradiation ou à partir des molécules néoformées sont aussi toxiques que les produits de radiolyse initiaux. D'autre part, il n'y a pas de différence entre les témoins autoclavés ou non, ou entre l'amidon irradié et l'amidon autoclavé puis irradié.

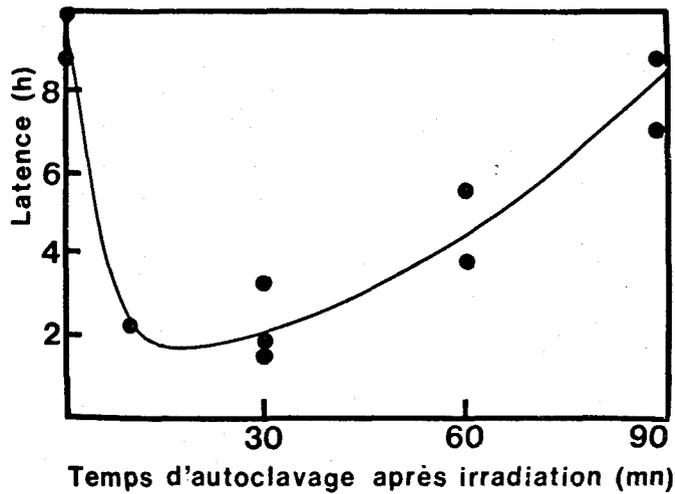


Figure 11 - Effet d'un autoclavage de l'amidon irradié sur les temps de latence.

c. Techniques d'extraction des produits de radiolyse

La toxicité des extraits d'amidon irradié ne dépend pas des conditions d'extraction : durée, composition de l'atmosphère (air, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>), nature du solvant (eau, tampon, milieu de culture sans vitamine ni glucose). Par contre, elle est très fortement diminuée par des traces d'ions ferreux (fig. 12).

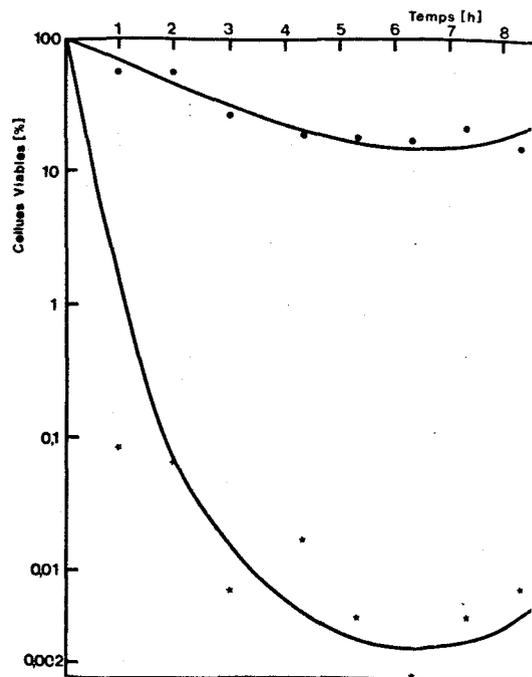


Figure 12 - Différence de létalité induite par des extraits d'amidon (irradié à 1,50 Mrad) dans un milieu contenant 10<sup>-2</sup> mM de FeSO<sub>4</sub> (●) ou dans de l'eau distillée (★).

d. Conditions de conservation de l'extrait

Les extraits aqueux conservés 24 h à 37°C, 5°C et -50°C ne perdent pas leur pouvoir bactéricide initial sauf dans le cas d'une extraction en présence d'ions ferreux. Un stockage de 24 h à 5°C à des pH extrêmes (fig.13) ou une ébullition de 5 à 15 mn détruisent irréversiblement les composés toxiques : ces derniers sont donc instables aux pH inférieurs à 3 ou supérieurs à 8 et thermolabiles.

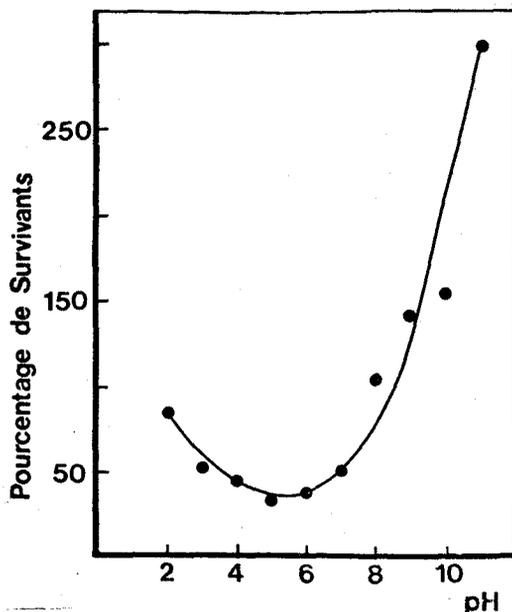


Figure 13 - Variation du taux de survivants après une heure de culture en fonction du pH de conservation d'un extrait d'amidon irradié à 1,5 Mrad. (Pour cette expérience, des extraits d'amidon irradié amenés au pH désiré sont abandonnés 24 h à 4°C puis ramenés à pH 7 avant de servir de milieu de base pour une culture bactérienne).

4 - Influence du genre de micro-organisme, du nombre de germes et du milieu de culture

a. Bactéries

En ce qui concerne *E.coli* , la létalité diminue lorsque la population initiale augmente, probablement par simple compétition stoechiométrique avec les molécules toxiques du milieu (fig. 14).

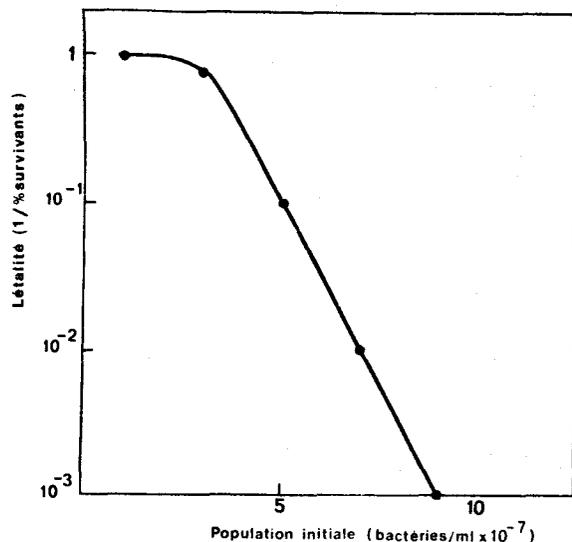


Figure 14 - Diminution de la létalité par variation du volume de l'ensemencement.

De l'extrait de levure (2,8 g/l) ou du bouillon peptoné (8 g/l) annulent l'activité bactéricide des produits de radiolyse vis-à-vis d' *E.coli* (fig. 15). La comparaison des latences de divers micro-organismes est rendue ambiguë par cette détoxification car la réaction entre le milieu de culture et les produits de radiolyse nous empêche de faire la part de ce qui est dû à la bactérie et de ce qui est dû au milieu lui-même.

C'est ainsi que pour *Bacillus subtilis* le temps de latence est une fonction linéaire de la dose d'irradiation (fig. 15) et l'effet bactéricide est total à 10 Mrad. Ce bacille paraît donc plus résistant aux produits de radiolyse qu' *E.coli* cultivé dans le milieu minimum M63 mais plus sensible que cette dernière bactérie en présence d'extrait de levure.

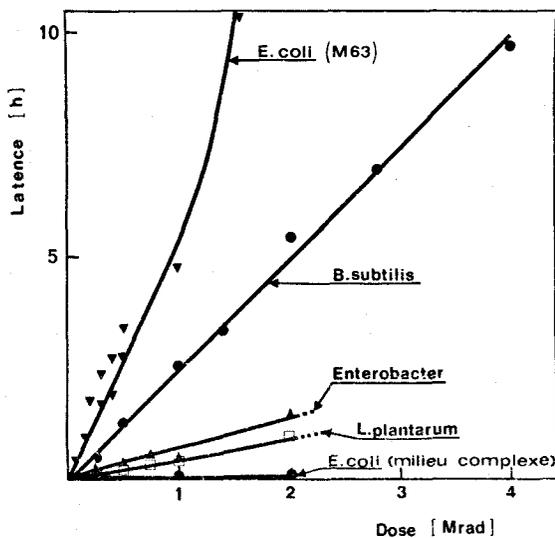


Figure 15 - Relation entre le temps de latence et la dose d'irradiation pour différentes bactéries.

Notons d'autre part qu'après coloration de Gram de *B. subtilis* cultivé en présence d'extraits d'amidon irradié, aucune forme monstrueuse ni pléomorphisme du bacille n'a été détecté et que le milieu toxique ne favorise pas la sporulation.

Par ailleurs, il était intéressant de connaître le comportement d'une microflore intestinale sortie de son biotope naturel et cultivée en présence de produits radiolytiques. Nous avons utilisé à cette fin des souches servant à l'ensemencement de rats axéniques servant aux essais de toxicité de l'amidon irradié : *Lactobacillus plantarum* présente de faibles latences qui croissent avec la dose d'irradiation jusqu'à 2 Mrad (fig. 15); pour *Enterobacter*, souche prototrophe, l'effet toxique augmente de façon linéaire avec la dose d'irradiation jusqu'à 2 Mrad; la croissance de *Streptococcus faecalis* n'est pas affectée aux doses inférieures ou égales à 2 Mrad.

L'extrapolation de ces résultats obtenus *in vitro* au comportement de ces bactéries dans le tube digestif des rats nourris avec de l'amidon irradié à 300 et 600 krad paraît hasardeuse : le chyme qui les contient est en effet très différent des milieux de culture utilisés ici.

#### b. Levures

Le choix des levures a été principalement motivé par le fait qu'il s'agit là de procaryotes qui possèdent par définition un système membranaire entourant le noyau, les mitochondries, sites des enzymes respiratoires, et différents micro-organites. Nous avons choisi deux souches de *Saccharomyces cerevisiae* : une souche sauvage et un mutant "petites colonies", anaérobie obligatoire par déficience respiratoire, qui a la particularité d'être incapable d'utiliser l'oxygène et qui doit donc dégrader le glucose par voie purement fermentative.

Dans le cas des levures, la toxicité des extraits d'amidon irradié ne se traduit pas par la mort des micro-organismes mais par la diminution du taux de croissance : lorsque la dose croît, le temps de doublement de la population augmente d'une quantité beaucoup plus importante pour la souche sauvage aérobie que pour la souche mutante "petites colonies". En d'autres termes, pour une dose d'irradiation donnée, la vitesse de croissance de la souche sauvage diminue plus rapidement que celle de la souche mutante : la première est plus sensible aux produits toxiques que la seconde.

En posant :

$t$  : temps de doublement de la levure cultivée en présence d'extraits d'amidon irradié à la dose  $D$ ,

$t_0$  : temps de doublement de la levure pour la dose 0,

$T = t - t_0$ , accroissement du temps de doublement lorsque la dose passe

de 0 à D, et en portant log T en fonction de la dose D, nous obtenons pour chaque souche une courbe caractéristique dont la seconde partie est linéaire (fig. 16).

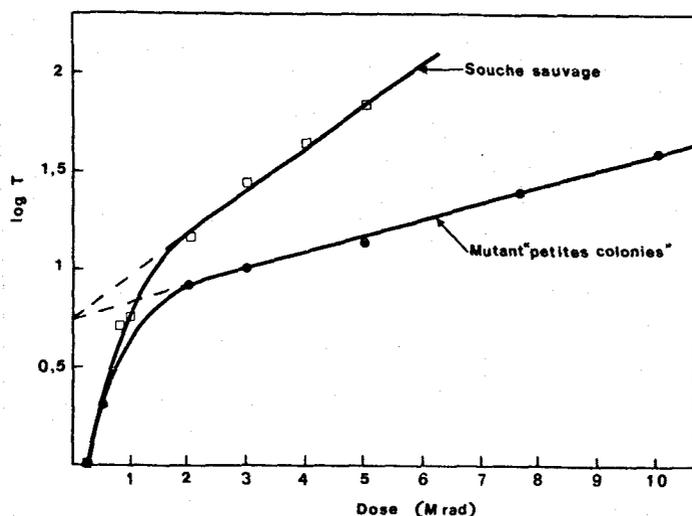


Figure 16 - Courbe de log T en fonction de la dose d'irradiation pour les 2 souches de levure utilisée.

Nous pouvons écrire d'après SCHUBERT [174] pour la partie droite de la courbe :

$$dT = \lambda T dD$$

où dD est l'accroissement de dose d'irradiation provoquant une augmentation dT de T et  $\lambda$  une constante de proportionnalité fonction de la souche utilisée. En intégrant nous obtenons :

$$T/T_0 = e^{\lambda D}$$

ou

$$\log T = \frac{\lambda}{2,303} D + \log T_0$$

avec  $T_0$  : valeur de T pour une dose nulle. La courbe réelle de T en fonction de la dose D ne répond à cette loi qu'à partir de la dose de 2 Mrad (fig. 16).  $T_0$  devient alors la valeur de T trouvée par extrapolation de la partie droite de la courbe pour une dose nulle. On constate que  $T_0$  est identique pour les 2 souches de levures (fig. 16) et égal à 5,6 mn. De la même manière on obtient  $\lambda_s$  pour la souche sauvage égal à  $0,435 \text{ Mrad}^{-1}$  et  $\lambda_p$  pour la souche "petites colonies" égal à  $0,191 \text{ Mrad}^{-1}$  : la souche aérobie est plus affectée que les produits de radiolyse toxiques que les mutants à déficience respiratoire.

B. - ANALYSE DES RESULTATS

Nous avons comparé les courbes de dosage des différents produits de radiolyse établies en fonction des divers paramètres par G. BERGER et coll. au laboratoire et les courbes de latence bactérienne obtenues dans les mêmes conditions (13 à 18).

En ne considérant tout d'abord que les variations de la dose d'irradiation, nous observons que l'acidité totale des extraits d'amidon irradié (fig. 17) et les latences (fig. 5) suivent des lois voisines alors que les autres composés radiolytiques dosés jusqu'à présent augmentent de façon linéaire jusqu'à 2 Mrad, sauf l'eau oxygénée dont le dosage n'est plus reproductible à partir de 800 krad.

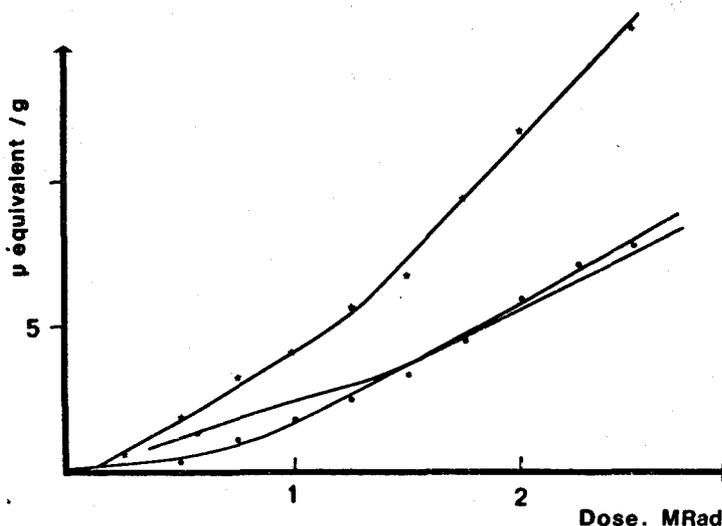


Figure 17 - Acidité libre (— ● —), esters (— — —), et acidité totale (— ★ —) libérée en milieu basique, en fonction de la dose d'irradiation. Humidité 13 %. Irradiation sous oxygène.

Si l'on examine le paramètre température d'irradiation, seules les courbes de dosage des acides (fig. 18) et du peroxyde d'hydrogène (fig. 19) présentent quelque similitude avec la figure 8. La quantité d'aldéhyde malonique décroît avec la température d'irradiation, celle de l'aldéhyde formique devient stationnaire à partir de 20°C et les concentrations d'acétaldéhyde, d'acétone et de méthanol ne varient pas de façon significative entre 0 et 50°C — sauf celle de l'acétone qui augmente faiblement.

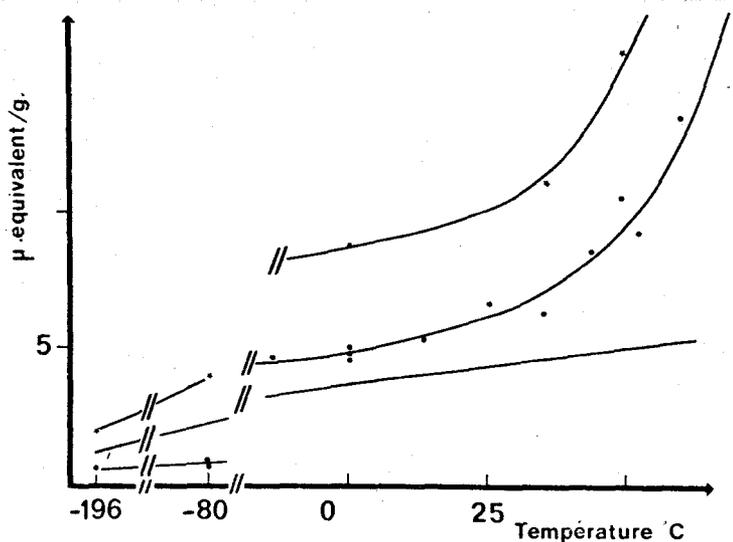


Figure 18 - Acidité libre (— ● —), acidité totale libérée en milieu alcalin (— ★ —) et esters (— —), en fonction de la température d'irradiation. Dose d'irradiation 2 Mrad. Irradiation sous oxygène.

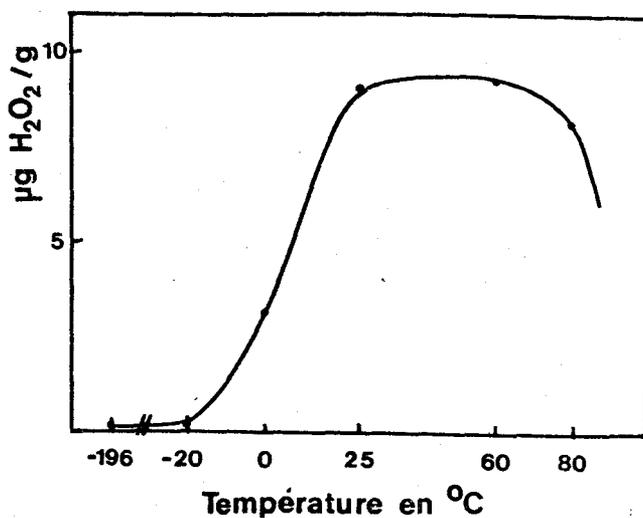


Figure 19 - Influence de la température d'irradiation sur la quantité de peroxyde d'hydrogène formé.

La présence d'oxygène au moment de l'irradiation favorise la formation de peroxyde d'hydrogène, d'acides libres et, dans une moindre mesure, celle des esters. Il est intéressant de constater que dans ces conditions les phases de latence augmentent aussi avec la teneur en oxygène de l'atmosphère d'irradiation (fig. 7).

Lorsque la teneur en eau de l'amidon augmente, l'acidité totale diminue alors que la quantité d'eau oxygénée et les latences augmentent (fig. 9 et 20). Ces dernières ne sont donc pas imputables aux acides radioformés.

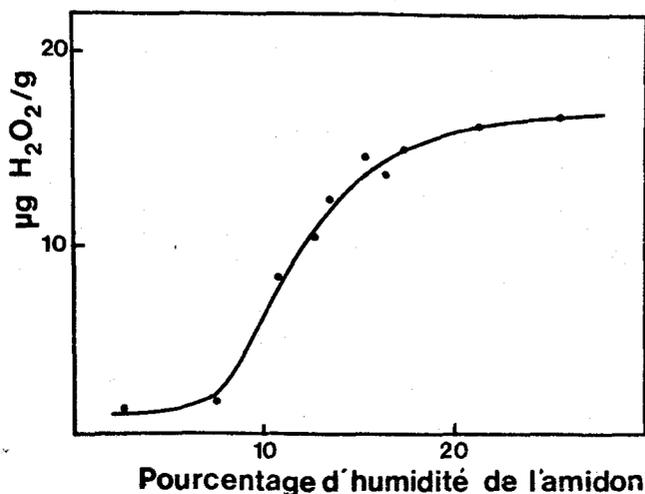
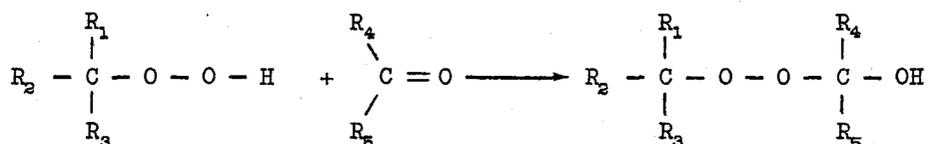


Figure 20 - Influence de l'humidité de l'amidon sur la quantité totale de peroxyde d'hydrogène formé au cours de l'irradiation (300 krad).

Cette conclusion est confirmée par les études en fonction de la température et du temps de stockage : si les acides totaux sont quasiment stables, les peroxydes diminuent d'autant plus vite que la température de stockage est plus élevée, tout comme l'effet létal mesuré (fig. 10).

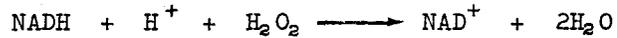
De plus, les produits toxiques sont thermolabiles, aussi bien à l'intérieur de l'amidon lui-même (fig. 11) que dans l'extrait porté à ébullition, caractéristiques qu'ils partagent avec l'eau oxygénée et les peroxydes organiques. Enfin, l'instabilité aux pH extrêmes est aussi commune aux peroxydes et aux produits de radiolyse toxiques.

Nous avons vu, par ailleurs, que l'effet bactéricide d'un amidon irradié puis autoclavé passe par un minimum pour un temps de 30 mn d'autoclavage puis qu'il croît régulièrement pour atteindre le niveau initial pour 90 mn à 120°C (fig. 11). Ces résultats corroborent ceux de J. SCHUBERT et J.A. WATSON [178] qui observent qu'un choc thermique de longue durée augmente considérablement l'activité bactéricide des solutions de sucrose irradiées. D'après ces auteurs, cette augmentation serait due à la transformation par la chaleur des hydroperoxydes formés par l'interaction du peroxyde d'hydrogène radiolytique avec des composés carbonylés de dégradation, en dialkylperoxydes selon le schéma :



malgré l'instabilité de certains de ces peroxydes aux pH physiologiques [124].

Nous expliquons enfin la résistance particulière de *S. faecalis* par le fait que cette bactérie compense l'absence de catalase par l'association fonctionnelle de deux enzymes flaviniques, une NADH<sub>2</sub>-oxydase et une NADH<sub>2</sub>-peroxydase et réduit l'eau oxygénée selon :



Ces observations sur les phénomènes respiratoires corroborent les résultats obtenus avec les deux souches de levure où nous avons vu que le mutant anaérobie obligatoire était le plus résistant aux produits de radiolyse toxiques.

En conclusion, l'étude comparative des dosages chimiques et des courbes de latence bactérienne montre que le peroxyde d'hydrogène, seul ou en synergie avec d'autres produits de radiolyse mineurs, est le principal responsable de la toxicité mesurée. Nous allons maintenant essayer de confirmer cette hypothèse.

## ROLE DE L'EAU OXYGENEE ET DES PEROXYDES ORGANIQUES

Au vu des expériences précédentes, les peroxydes issus de la formation de radicaux libres à partir de l'amidon, de l'eau et de l'oxygène de l'air paraissent être les principaux responsables de la létalité et des latences bactériennes. Nous pouvons cependant penser que d'autres produits de radiolyse, encore inconnus, peuvent répondre aux mêmes caractéristiques générales et donc induire les mêmes effets antibiotiques. Les expériences qui suivent ont pour but de lever cette incertitude.

Dans une première série, nous essayerons d'éliminer l'eau oxygénée ou ses proches homologues supérieurs des extraits d'amidon irradié en utilisant les ions ferreux ou des enzymes connus pour leur activité peroxydasique : la catalase et la peroxydase. Si les peroxydes sont les principaux produits toxiques, ces agents réducteurs seront efficaces et les extraits ainsi traités perdront tout pouvoir bactéricide. Dans le cas contraire, il nous faudra orienter les recherches sur d'autres composés radiolytiques.

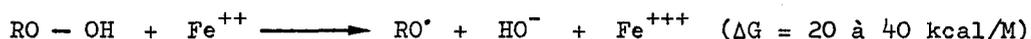
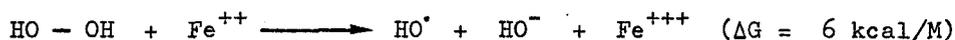
Afin de définir le rôle de certains peroxydes organiques de haut poids moléculaire, des expériences seront réalisées après ultrafiltration des extraits d'amidon irradié.

Enfin nous reconstituerons artificiellement un extrait d'amidon irradié à 1 Mrad à partir des produits purs du commerce pour mettre en évidence celui ou ceux qui sont plus particulièrement toxiques pour *E.coli* et pour comparer la létalité observée à celle obtenue avec de véritables extraits.

### A. - RESULTATS EXPERIMENTAUX

#### 1. - Action des ions ferreux

L'action des ions métalliques est liée à une chaîne d'oxydo-réduction procédant par l'intermédiaire de radicaux libres [76, 200] et initiée par des réactions du type :



LATARJET et coll. [112] constatent que des concentrations de  $10^{-11}$  M/l d'ions ferreux suffisent pour catalyser l'oxydation de l'hydroquinone. D'après ces auteurs,

"this explains the variability observed among daily experiments on DNA when the purity of water and the clearliness of glassware were not strictly controlled" [110].

Dans un premier temps, nous avons extrait les produits de radiolyse avec un milieu contenant  $10^{-2}$  M/l de sulfate ferreux et nous avons observé que de tels extraits sont moins toxiques que ceux obtenus dans les conditions habituelles.

Une autre série d'expériences a été menée comme suit :

- extraction des produits de radiolyse avec un milieu de culture sans sulfate ferreux,
- addition au temps 0 de sulfate ferreux afin d'avoir une concentration finale de  $10^{-2}$  M/l,
- agitation au bain-marie thermorégulé à 30°C,
- ensemencement successif d'heure en heure à partir d'une préculture différente, en phase exponentielle, de manière à obtenir les mêmes populations initiales.

Il apparaît que ces cultures perdent progressivement leurs propriétés bactéricides alors que nous n'observons rien de semblable si la même expérience est effectuée sans ions  $Fe^{++}$  (fig. 17).

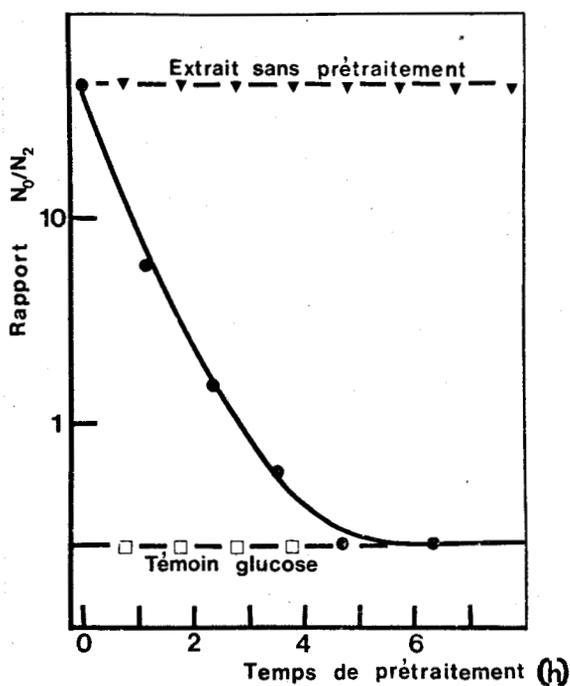


Figure 17 - Diminution de la toxicité des extraits d'amidon irradié en fonction du temps de prétraitement au sulfate ferreux avant ensemencement.

Dans les deux cas, le produit toxique a été réduit par les ions métalliques ce qui nous conduit à penser qu'il s'agit bien de peroxydes.

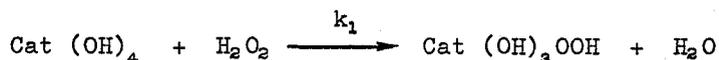
2. - Action de la catalase

Cet enzyme catalyse la réaction :



Il peut aussi utiliser comme substrats des peroxydes de poids moléculaire plus élevé que l'eau oxygénée, par exemple MeOOH et EtOOH.

La constante de vitesse  $k_1$  est de  $6 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  pour la réaction :



Elle passe à  $8,5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  pour MeOOH et à  $2 \cdot 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  pour EtOOH [7].

Au cours de nos expériences, nous avons ajouté, 15 mn avant ensemencement, des concentrations croissantes de catalase à des extraits d'amidon irradié préalablement tamponnés : l'effet létal des produits de radiolyse diminue progressivement lorsque les concentrations d'enzyme augmentent (fig. 18). Ce phénomène varie cependant d'une manière considérable d'une expérience à l'autre et toute une gamme de réponses peut être enregistrée. Néanmoins, l'effet global reste qualitativement analogue : disparition de la létalité par action de la catalase sur les composés radiolytiques qui peuvent dès lors être identifiés comme des peroxydes.

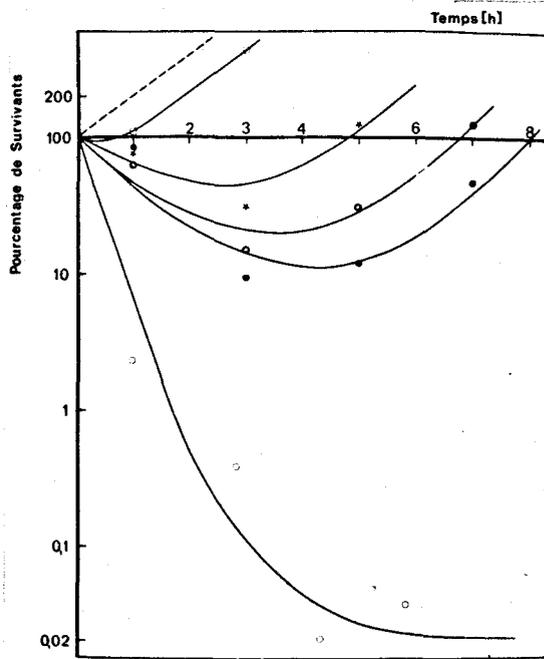


Figure 18 - Action de la catalase sur l'effet létal d'extraits d'amidon lavé irradié à 1,5 Mrad. L'enzyme est employé aux concentrations suivantes :

- 0 µg/ml
- 0,5 µg/ml
- ⊗ 10 µg/ml
- ★ 50 µg/ml
- 100 µg/ml

en pointillé : témoin glucose.

Nous attribuons le manque de reproductibilité à la formation éventuelle de peroxydes organiques plus complexes, formés secondairement à partir de l'eau oxygénée, et pour lesquels l'enzyme a moins d'affinité, comme nous le montre l'examen des constantes de vitesse.

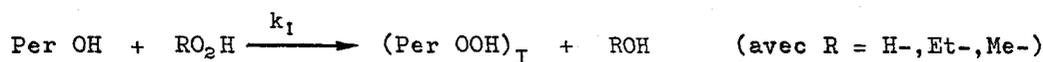
### 3. - Dosage de la réductone

Certains auteurs ont montré que l'aldéhyde énol-tartronique, une "réductone" de formule CHO-CO-CO<sub>2</sub>H, est toxique pour des bactéries irradiées et que cette toxicité est très nettement diminuée par la catalase [2, 31].

Afin d'éliminer cette hypothèse et, malgré la coexistence peu probable d'un agent aussi oxydant que le peroxyde d'hydrogène et d'un réducteur tel que la "réductone", nous avons dosé ce produit [1, 158]. Ces dosages révèlent des quantités de "réductone", acide ascorbique et autres agents réducteurs de ce type, inférieures à 3 µg par ml d'extrait d'amidon irradié à 1,50 Mrad. Cette concentration, statistiquement non significative, est très différente du taux actif sur *E.coli* K12 : 1 mg/ml environ.

### 4. - Action de la peroxydase

Cet enzyme, tout comme la catalase, est capable de décomposer le peroxyde d'hydrogène mais a plus d'affinité pour les peroxydes complexes comme le montre le tableau des constantes de vitesse de la réaction :



Substrat	Valeur de $k_1$ en $\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	9.10 <sup>8</sup>
Me OOH	15.10 <sup>6</sup>
Et OOH	3,6.10 <sup>6</sup>

Dans nos expériences, nous avons utilisé la peroxydase du raifort à la concentration de 100 µg/ml avec de l'ascorbate de sodium (100 µM/ml) ou du NADH (50 µM/ml) dans les mêmes conditions que la catalase : après traitement, les extraits d'amidon irradié à 1,5 Mrad ne sont plus toxiques pour *E.coli*

La reproductibilité des expériences est ici meilleure que dans le cas de la catalase ce que nous imputons à la plus grande affinité de la peroxydase vis-à-vis de peroxydes de masse moléculaire élevée.

Ces expériences nous montrent que le peroxyde d'hydrogène et ses proches homologues supérieurs sont impliqués dans la toxicité des extraits d'amidon irradié.

5. - Action de la serumalbumine

Afin de montrer que la détoxification obtenue avec les enzymes n'est pas due à une action protectrice de la structure protéique (groupement - SH etc...), nous avons ajouté à des extraits d'amidon irradié à 1,5 Mrad des concentrations de serumalbumine identiques à celles de la catalase et de la peroxydase : la protéine n'exerce aucune protection vis-à-vis des produits toxiques et l'activité réductrice de la catalase et de la peroxydase est bien le fait de leurs propriétés enzymatiques.

6. - Ultrafiltration

Ces expériences où les extraits d'amidon irradié sont préalablement filtrés sur une ultramembrane avant leur ensemencement, ont été effectués avec *S. cerevisiae* dont le taux de croissance est modifié par les produits de radiolyse. Avec de tels extraits, il n'est pas possible de noter une variation significative de la vitesse de croissance par rapport à des extraits d'amidon irradié non traités.

Il apparaît donc que le ralentissement de la croissance de la levure est dû à des molécules très petites du type  $H_2O_2$  ou ses proches homologues supérieurs moins facilement dégradables par la catalase mais de toutes façons, de poids moléculaire inférieur à 300.

7. - Reconstitution d'un extrait d'amidon irradié

Nous avons ici reconstitué artificiellement un extrait d'amidon irradié à 1 Mrad à partir des produits purs de commerce et des concentrations données par l'analyse chimique [12 à 18, 127, 128].

TABLEAU 2

COMPOSITION DE L'EXTRAIT D'AMIDON IRRADIE (1 Mrad) RECONSTITUE

Produits	µg/ml	Produits	µg/ml
Peroxyde d'hydrogène .	5	Mannose .....	0,23
Formaldéhyde .....	9,23	Xylose .....	2,67
Acétone .....	0,70	Ribose .....	5,69
Acide formique .....	32,38	Erythrose .....	6,29
Acétaldéhyde .....	6,86	Galactose .....	5,68
Malonaldéhyde .....	0,65	Maltose .....	12,69
Méthanol .....	1,71	Glucose .....	52,69

Nous avons testé au point de vue toxicité toutes les combinaisons possibles des 7 derniers sucres indissociés et des 7 premiers composés seuls ou en mélange.

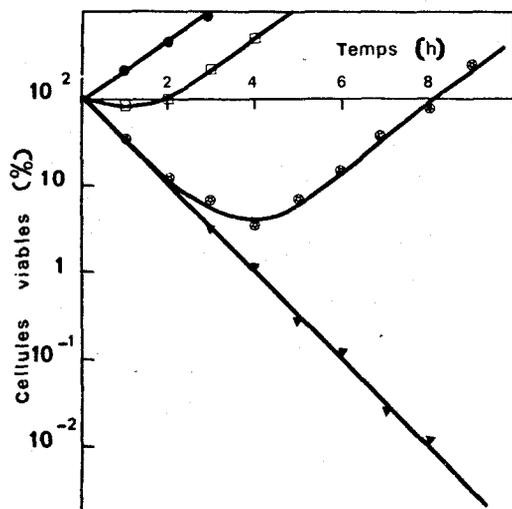


Figure 20 - Comparaison de la toxicité d'extraits d'amidon irradié à 1 Mrad et des différents produits de radiolyse du tableau 2.

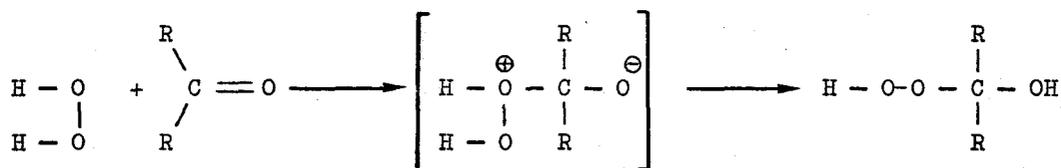
- : Témoin glucose et mélange de tous les composés sauf l'eau oxygénée et le formol.
- : Formol seul ou mélange de tous les composés sauf l'eau oxygénée.
- ⊛ : Extrait d'amidon irradié à 1 Mrad.
- ▼ : Eau oxygénée seule ou en mélange avec les autres composés du tableau 2 y compris le formaldéhyde.

La figure 20 fait apparaître les faits suivants :

- Tous les mélanges contenant le peroxyde d'hydrogène provoquent la même létalité que ce dernier.
- Tous les extraits artificiellement reconstitués où se trouve le formaldéhyde sans eau oxygénée ont le même pouvoir toxique que l'aldéhyde seul.
- Aucun composé autre que le peroxyde d'hydrogène et le formol n'est toxique.
- La toxicité provoquée par le peroxyde masque celle due au formaldéhyde.
- Le peroxyde d'hydrogène seul, à la concentration calculée équivalente à 1 Mrad, est beaucoup plus toxique que l'extrait d'amidon irradié à cette dose mais les deux courbes ont la même pente initiale ce qui permet d'établir une analogie entre l'eau oxygénée et le principal produit de radiolyse toxique. Nous pouvons supposer que dans le cas de l'extrait d'amidon irradié, l'action de l'eau oxygénée est compensée soit par un autre produit de radiolyse ne figurant pas sur la liste du tableau 2 (par exemple des dextrans pouvant réagir secondairement avec l'eau oxygénée), soit par un composé résiduel de l'amidon favorisant la croissance bactérienne (amino-acides, vitamines etc...), soit par les deux à la fois.

B. - CONCLUSION

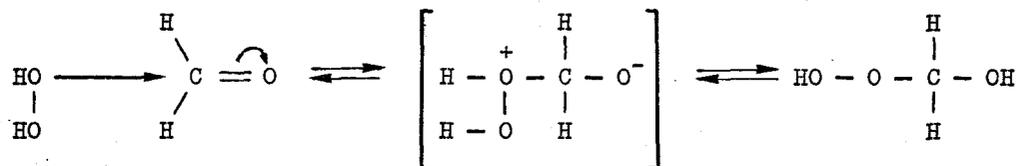
L'effet toxique des extraits d'amidon irradié est principalement dû au peroxyde d'hydrogène. Il est cependant possible que dans les extraits d'amidon irradié, une partie de cette eau oxygénée se combine avec des molécules organiques plus complexes, autres que celles étudiées jusqu'ici, pour donner des alkylhydroperoxydes (ROOH) ou des alkylperoxydes (ROOR) tout aussi toxiques pour la bactérie.



L'existence de ces peroxydes complexes fournit une explication aux différences de réactivité obtenues avec la catalase qui réduit le peroxyde d'hydrogène mais beaucoup plus difficilement ses homologues supérieurs. Les expériences d'ultrafiltration nous ont cependant montré que ces peroxydes complexes ne sont pas des sucres porteurs de groupes  $\text{HO}_2^-$ .

L'autre composé toxique présent dans ces extraits est le formaldéhyde bien connu pour son activité sur les groupements aminés des protéines et des acides nucléiques [57, 66 à 70, 146, 188]. Il faut, d'autre part, noter que LOVELESS, en étudiant l'activité radiomimétique d'un certain nombre d'agents estérifiants et alkylants sur *Vicia faba*, a suggéré que le formaldéhyde peut agir par l'intermédiaire de la formation d'un peroxyde organique à partir de l'eau oxygénée naturellement produite [117].

Cette hypothèse s'accorde avec les conclusions ci-dessus puisque les réactions en cause seraient alors :

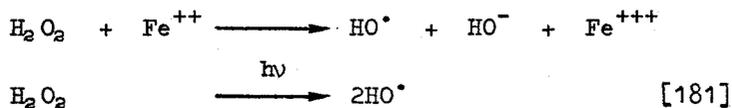


bien que ce dernier produit paraisse très instable aux pH physiologiques [124].

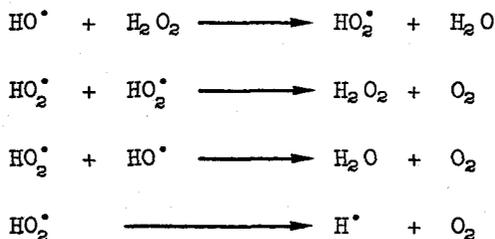
## MODE D'ACTION DU PEROXYDE D'HYDROGENE ET DES EXTRAITS D'AMIDON IRRADIE SUR E. COLI

Les extraits d'amidon irradié sont toxiques pour *E. coli* et nous avons montré que cette toxicité est principalement due au peroxyde d'hydrogène radioformé. Au niveau du métabolisme bactérien, de très nombreuses réactions peuvent être modifiées par l'oxydant puissant qu'est l'eau oxygénée.

Les réactions des peroxydes avec d'autres espèces chimiques sont de deux types : les réactions non radicalaires (substitutions nucléophiles d'ordre 2, réarrangements électroniques,  $\beta$ -éliminations, processus cycliques) et les réactions radicalaires. Pour ces dernières, il y a initiation de la chaîne de réaction soit par des ions métalliques, comme nous l'avons vu plus haut, soit par des rayons U.V. de longueurs d'onde inférieures à 380 nm.



La chaîne de réactions radicalaires ainsi initiée peut se propager en fonction de l'activité des espèces adjacentes.



Il faut noter que le radical  $\text{HO}_2^\bullet$  est relativement peu réactif en comparaison de  $\text{HO}^\bullet$  et que la réaction :



ne peut se produire que si la concentration en  $\text{H}_2\text{O}_2$  est importante. Ces réactions peuvent aller jusqu'à disparition complète de l'eau oxygénée et des radicaux formés.

Par ailleurs, des radicaux organiques peuvent réagir directement avec l'oxygène atmosphérique ou provenant d'une réaction radicalaire pour donner un radical peroxy-

organique :



Des réactions de ce type peuvent se réaliser lorsque des peroxydes se trouvent dans un contexte favorable à quantités de réactions ce qui est notamment le cas dans le milieu intracellulaire. Nous allons brièvement passer en revue la réactivité des sucres, des lipides, des acides nucléiques et des protéines vis-à-vis des peroxydes.

En ce qui concerne les polysaccharides, les auteurs observent des dépolymérisations (dextrane, cellulose, amidon) tandis que pour leurs monomères, les phénomènes notés sont des scissions de chaînes, des oxydations de résidus. Cependant l'interaction de  $\text{H}_2\text{O}_2$  avec les carbohydrates dépend de très nombreux facteurs tels que la température, la concentration, le pH, le temps de réaction et la présence de catalyseurs [25, 79, 80, 135, 136, 143].

Les interactions des lipides et des peroxydes sont extrêmement complexes pour deux raisons : tout d'abord les acides gras s'oxydent avec beaucoup de facilité par un mécanisme maintenant bien connu et d'où il ressort que l'initiation de la chaîne radicalaire dépend de la formation de radicaux libres résultant, selon le cas, d'un traitement thermique, d'une irradiation ou de la catalyse par des ions métalliques. Par la suite, ces acides gras peroxydés deviennent eux-mêmes des initiateurs de chaînes [19, 163 à 165, 204].

Les recherches concernant l'action des peroxydes sur les protéines ou leurs composants remontent à 1912. A cette époque, EFFRONT concluait que "par l'action de l'eau oxygénée en milieu alcalin sur les matières albuminoïdes et les acides aminés, on aboutit à une désamination intégrale" [51]. En fait, les résultats les plus souvent rencontrés font état d'une modification des résidus méthionine et des groupements thiols : les enzymes traités au peroxyde d'hydrogène perdent leur activité ou même se dénaturent. Les expériences à ce sujet sont nombreuses et divers systèmes protéiques ont été utilisés : Chymotrypsine de KOSHLAND - Trypsine et RNase par KASSER et par NEUMANN - Subtilisine - Lipoxigénase - Cytochrome C - etc... [9, 20, 48, 91, 100, 101, 123, 124, 131, 133, 142, 144, 155, 195, 203].

Enfin l'action des peroxydes sur les acides nucléiques se situe à deux niveaux : une dégradation du polymère et de ses constituants d'une part, une peroxydation de certaines bases à l'intérieur ou à l'extérieur du polymère d'autre part. La littérature à ce sujet est très importante et l'on peut en retenir des modes d'action généraux du peroxyde d'hydrogène sur le DNA [3, 4, 29, 30, 32, 33, 40, 42, 55, 56] :

— libération des 4 bases de l'ordre de 1 à 2 % (jamais des nucléosides) dans

l'ordre  $T > A > C > G$ , due à l'oxydation du désoxyribose par un radical libre [180, 181];

- rupture des liaisons phosphodiesters [156, 157];
- altération des bases pyrimidiques se traduisant par une diminution d'absorption;
- peroxydation de la liaison 5-6 des pyrimidines [106 à 112].

Parmi la multitude de sites susceptibles d'être affectés par le peroxyde d'hydrogène, nous avons choisi d'étudier l'ADN et les groupements thiols. L'ADN nous a paru important car il s'agit là de molécules de base liées à la vie cellulaire et dont nous essaierons de mettre en évidence des modifications (mutations, induction de phages). Les groupements thiols sont des fonctions réductrices — donc particulièrement sensibles à l'eau oxygénée — nécessaires au fonctionnement normal du métabolisme (respiration, formation d'ATP). Nous avons ainsi été amenés à nous intéresser à l'interaction entre le peroxyde d'hydrogène et des molécules capitales pour ce métabolisme : les acides  $\alpha$ -cétoniques et plus particulièrement l'acide pyruvique.

#### A. - MODE D'ACTION DU PEROXYDE D'HYDROGENE ET DES EXTRAITS D'AMIDON IRRADIE SUR L'ADN

L'hypothèse de travail consiste ici à rendre compte de la toxicité des extraits d'amidon irradié et plus particulièrement de l'eau oxygénée par une éventuelle dégradation de l'ADN. Nous avons vu, en effet, que le peroxyde d'hydrogène altère les différentes bases constituant cet ADN et il est possible de supposer que toute altération se traduira par une augmentation du taux de mutation ou peut-être par l'induction de prophages chez des bactéries lysogènes.

Nous avons, par ailleurs, comparé la létalité en fonction de la concentration de peroxyde à une courbe théorique dont nous avons fait l'analyse.

Enfin, nous avons essayé d'isoler des mutants résistants à l'eau oxygénée ou aux produits de radiolyse toxiques afin de repérer un éventuel site de résistance sur le chromosome bactérien et d'en effectuer l'analyse génétique.

#### 1. - Mutagénèse

Chez *E. coli* cultivé en présence d'extraits d'amidon irradié à 1 et 5 Mrad ou dans des milieux contenant 5 et 10  $\mu\text{g/ml}$  d'eau oxygénée, nous avons mesuré le taux de réversion pour les marqueurs : Thr, Leu, Arg, Pro, His, Lac. Nous observons qu'une irradiation de l'amidon à la dose de 1 Mrad ou que la présence de peroxyde d'hydrogène n'ont qu'une faible influence sur ce taux de réversion (augmentation d'un facteur de 2 à 3 pour les marqueurs Thr, Leu et Arg). Notons en passant que l'amidon irradié à 5 Mrad contient des produits mutagènes solubles agissant notamment au niveau du site Thr dont le taux de mutation spontanée est déjà très important (tableau 3).

TABLEAU 3

NOMBRE DE REVERTANTS ( $\times 10^8$ ) APPARAISSANT DANS UNE CULTURE EN PHASE EXPONENTIELLE DE *E. coli* CULTIVE EN PRESENCE DE DIFFERENTS COMPOSANTS

Marqueurs	TEMOIN	Amidon 1 Mrad	Amidon 5 Mrad	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5 µg/ml	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 10 µg/ml
Thr	60	110	2400	126	170
Leu	3	4	7	4	8
His	5	5	0	10	0
Arg	5	5	10	15	7
Pro	≠ 0	0	0	0	0
Lac	≠ 0	0	0	0	0

2. - Induction de phages chez une bactérie lysogène

L'activité inductrice de base est mesurée en mettant en présence d'une part la souche lysogène GY140 cultivée avec des extraits d'amidon irradié à 1 et 5 Mrad ou de l'eau oxygénée à 5 et 10 µg/ml et d'autre part une souche indicatrice GY521, puis est comparée à l'activité inductrice de base d'une culture témoin (voir "Matériel et méthodes").

Quelles que soient les conditions de culture, il n'y a aucune production de phages induits par les produits de radiolyse de l'amidon ou par le peroxyde d'hydrogène. De plus, le nombre de phages libres dans la culture décroît en présence d'extraits d'amidon irradié à 5 Mrad ce qui tendrait à montrer que les virus sont eux-mêmes affectés par ces produits de radiolyse.

Il apparaît donc que l'eau oxygénée ne va pas toucher les sites d'induction du prophage sur l'ADN bactérien : il est bien entendu difficile de conclure par là que le peroxyde d'hydrogène ne va pas modifier ce dernier. Cependant l'expérience rapportée ici, associée à la recherche de révertants, nous permet de penser que la macromolécule d'ADN n'est pas le site principal d'action du peroxyde.

3. - Etude de la létalité en fonction de la concentration en eau oxygénée

En admettant que l'ADN constitue une cible d'attaque pour H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un organisme ayant n cibles possibles est tué lorsque chacune de ses n cibles reçoit au moins un coup; c'est seulement lorsque toutes les n cibles sont touchées que l'organisme meurt. L'équation pour ce modèle est :

$$S/S_0 = 1 - (1 - e^{-\alpha C})^n$$

où S<sub>0</sub> est le nombre d'organismes avant l'action du produit, S le nombre d'organismes survivants après action du produit à la concentration C. α est une constante caractéristique de la taille de la cible. La courbe de survie de ce modèle est une sigmoïde :

pour obtenir n il faut procéder par extrapolation à C=0 de la partie droite de la courbe d'équation :

$$S/S_0 = n e^{-\alpha C}$$

Lorsque le DNA seul est touché, on obtient n=2 pour une bactérie (fig. 21).

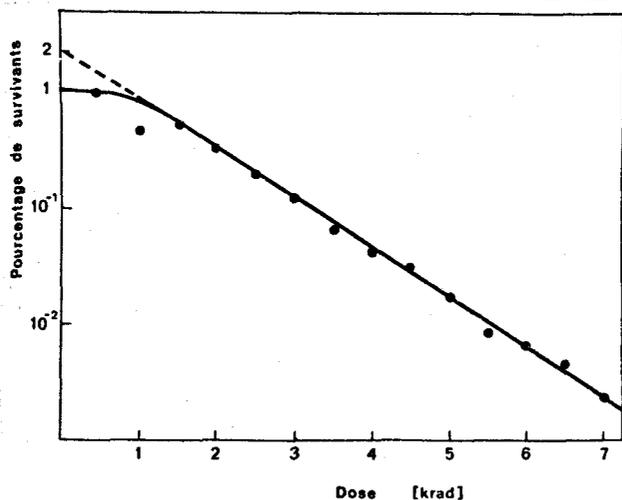


Figure 21 - Courbe de létalité de cellules bactériennes en fonction de la dose quand les deux molécules de DNA sont simultanément touchés. (La courbe théorique reste la même s'il s'agit d'un produit toxique employé à la concentration C).

La courbe obtenue pour des concentrations de peroxyde allant de 0 à 10  $\mu\text{g/ml}$  est très différente de la courbe ci-dessus proposée pour le DNA : elle est constituée d'une partie à pente importante suivie par une partie à pente moins élevée (fig. 22). Donc au regard de la théorie énoncée ci-dessus, ce ne sont pas les deux molécules de DNA qui sont affectées par l'eau oxygénée.

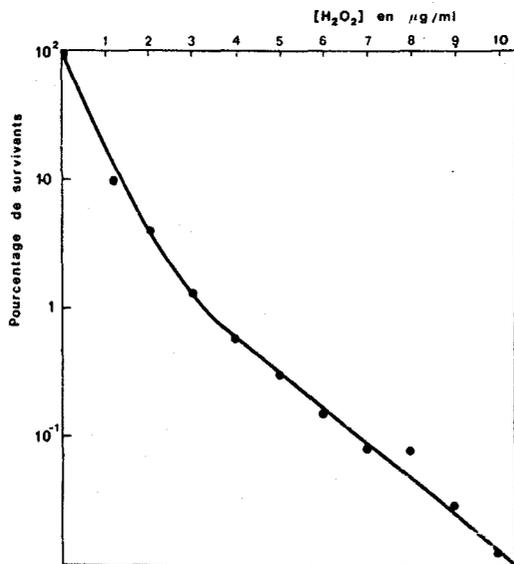


Figure 22 - Pourcentage de survivants dans une culture de 3 h en fonction de la concentration en eau oxygénée.

Ce type de courbe rappelle la situation décrite par POWERS et TOLMACH [150] avec des cellules de lymphomes de souris *in vivo* où la partie à pente élevée caractérise la mesure d'une population de cellules aérobies tandis que la partie à pente faible représente celle d'une petite fraction de cellules anaérobies.

#### 4. - Résistance aux produits de radiolyse et à l'eau oxygénée

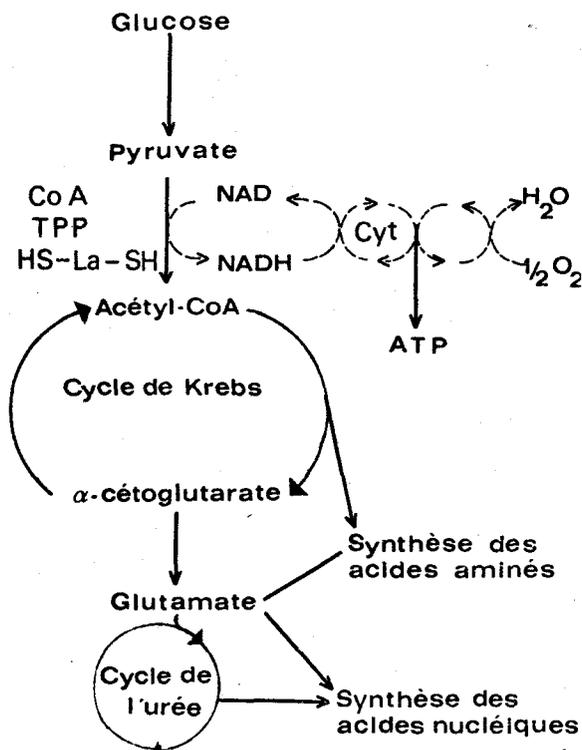
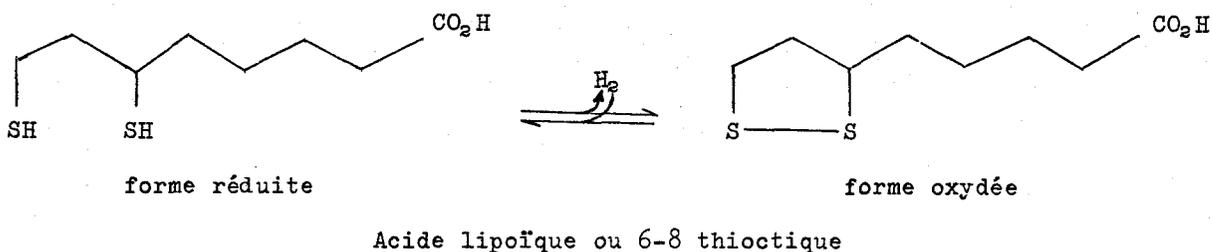
Le but de ces expériences est de trouver des mutants d'*E. coli* résistants aux produits de radiolyse toxiques de l'amidon irradié, c'est-à-dire des bactéries qui ne présentent plus les phénomènes de létalité observés auparavant. Les mutants éventuels, capables par un moyen ou par un autre de décomposer l'eau oxygénée, nous auraient permis de localiser sur le chromosome bactérien un site important pour l'explication du mécanisme de toxicité.

En fait, des cultures successives d'*E. coli* dans des extraits d'amidon irradié à 1 et 5 Mrad ou en présence de peroxyde d'hydrogène à 5 et 10 µg/ml, ensemencées à partir de précultures effectuées dans les mêmes conditions ne font apparaître aucun mutant de résistance à ces produits. Nous avons obtenu les mêmes résultats avec *S. cerevisiae*

En conclusion de cette étude sur l'ADN bactérien, nous pensons que les extraits d'amidon irradié à 1 Mrad ou l'eau oxygénée à des concentrations équivalentes à cette dose ont une faible action sur la macromolécule. Cet effet est hors de proportion avec la létalité observée et ne rend pas compte de la toxicité observée auparavant. Cependant la dégradation du chromosome bactérien ne peut être considérée comme nulle surtout pour des doses d'irradiation plus élevées (Réversion Thr à 5 Mrad).

#### B. - MODE D'ACTION DU PEROXYDE D'HYDROGENE SUR CERTAINS INTERMEDIAIRES METABOLIQUES

Les nombreux travaux concernant l'oxydation des groupements thiols par le peroxyde d'hydrogène nous ont amenés à vérifier sur la cystéine, le glutathion et l'acide lipoïque (acide 6-8 thiocétique) les résultats signalés. L'intégrité des fonctions —SH est en effet primordiale pour le métabolisme cellulaire car de nombreux enzymes contiennent des radicaux —SH libres à leur centre actif ou comme facteur de structure. Au surplus, l'acide lipoïque, par son rôle de coenzyme au niveau du transfert de l'acétate actif du pyruvate au coenzyme A, est essentiel à la mise en oeuvre du cycle de KREBS, noeud vital de ce métabolisme et son blocage sous forme oxydée peut être fatal à la bactérie (fig. 23).



C'est en essayant de court-circuiter l'étape de formation de l'acétyl-coenzyme A que nous avons cultivé *E.coli* sur des milieux contenant de l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique et que nous avons mis en évidence un autre type de protection des bactéries contre l'effet toxique de l'eau oxygénée.

1. - Rôle de la cystéine, du glutathion et de l'acide lipoïque

Alors que la cystéine  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$  molaire ajoutée à un milieu de culture contenant de l'eau oxygénée à la concentration de 5 ou 10  $\mu\text{g/ml}$  n'offre aucune protection aux bactéries, le glutathion aux mêmes concentrations permet la croissance d'*E. coli* malgré le peroxyde. Il apparaît qu'en dépit de leur structure chimique voisine se traduisant par des potentiels d'oxydo-réduction analogues, ces deux réducteurs ont des réactivités différentes vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène.

Nous avons vérifié que cette protection contre les effets oxydants de l'eau oxygénée était due à une réaction *in vitro* dans le milieu de culture et non dans le cyto-

plasme bactérien. En effet, les dosages au thiocyanate d'ammonium et sulfate ferreux font apparaître une rapide disparition du peroxyde d'hydrogène en présence du glutathion et en l'absence des bactéries.

La réaction étudiée est donc :



Le même phénomène peut aussi s'observer avec l'acide lipofique employé à la concentration de  $10^{-4}$  M/l :

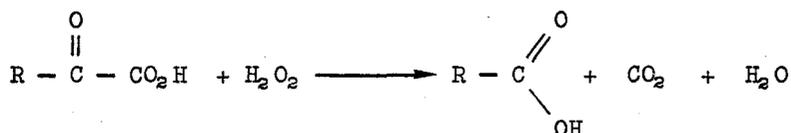


Cette réaction d'oxydoréduction qui a lieu en quelques minutes dans le milieu de culture consomme le peroxyde d'hydrogène ajouté ou produit par l'irradiation de l'amidon: il s'agit donc là d'une protection *in vitro* qui ne nous permet pas de faire une hypothèse sur le site d'action du peroxyde. Néanmoins il n'est pas interdit de supposer qu'une réaction mise en évidence dans le milieu de culture puisse également avoir lieu dans le système intracellulaire et par là bloquer certains métabolismes où les groupements thiols sont mis en jeu.

## 2. - Rôle des acides $\alpha$ -cétoglutarique et pyruvique

L'objectif est ici de vérifier que le peroxyde d'hydrogène bloque l'acide lipofique sous sa forme oxydée et empêche ainsi le passage de l'acétate actif du pyruvate au coenzyme A. Pour cela, nous avons cultivé des bactéries sur un intermédiaire métabolique situé après l'étape bloquée : les résultats font apparaître que des croissances d'*E. coli* en présence d'acide  $\alpha$ -cétoglutarique  $10^{-4}$  molaire et d'eau oxygénée à 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  se comportent comme des croissances témoins. Cependant les dosages d'eau oxygénée montrent qu'elle réagit directement sur l'acide  $\alpha$ -cétoglutarique *in vitro* avant de pénétrer dans la bactérie.

Le peroxyde d'hydrogène oxyde donc les acides  $\alpha$ -cétoniques par un mécanisme que nous décrirons comme une décarboxylation oxydative :



Nous avons observé les mêmes résultats avec un autre acide  $\alpha$ -cétonique bien connu, l'acide pyruvique. Le dosage simultané du peroxyde d'hydrogène par le thiocyanate d'ammonium et par le sulfate ferreux et de l'acide pyruvique par la lactate deshydrogénase dans un milieu contenant ces deux réactifs nous a apporté la preuve de la réaction directe *in vitro* du peroxyde sur l'acide  $\alpha$ -cétonique (fig. 24).

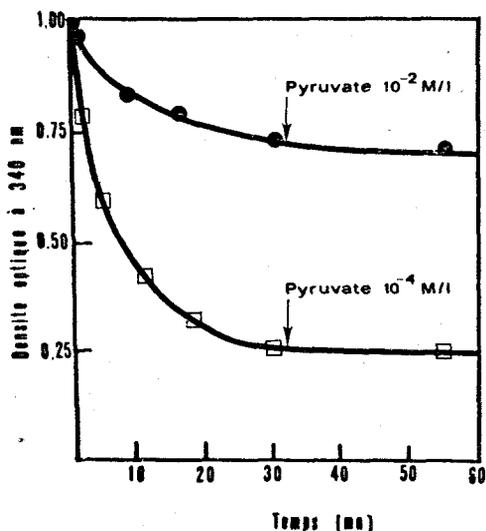


Figure 24 - Cinétique de disparition du pyruvate de sodium en présence d'eau oxygénée (3,6  $\mu$ M/ml).

Pour éviter cette réaction *in vitro*, nous avons cherché une technique qui permette au pyruvate de pénétrer dans la bactérie avant d'être oxydé par l'eau oxygénée, ou qui, en d'autres termes, n'autorise la réaction peroxyde-pyruvate qu'à l'intérieur du cytoplasme bactérien.

Pour cela, nous avons cultivé *E.coli* pendant plusieurs générations dans des milieux sans glucose et sans peroxyde, avec le pyruvate comme seule source de carbone et d'énergie. Ces bactéries, rapidement lavées deux fois dans du tampon froid et reprises sur un filtre "Millipore" ont servi à ensemercer des milieux de culture glucosés contenant des quantités croissantes d'eau oxygénée. En ce qui concerne les témoins, nous avons effectué les mêmes opérations à partir de bactéries cultivées uniquement sur du glucose. Les résultats montrent que les bactéries dont le pool de pyruvate a été artificiellement augmenté par des précultures continues en présence de ce produit ont une plus grande résistance vis-à-vis de l'eau oxygénée que les bactéries témoins (fig. 25).

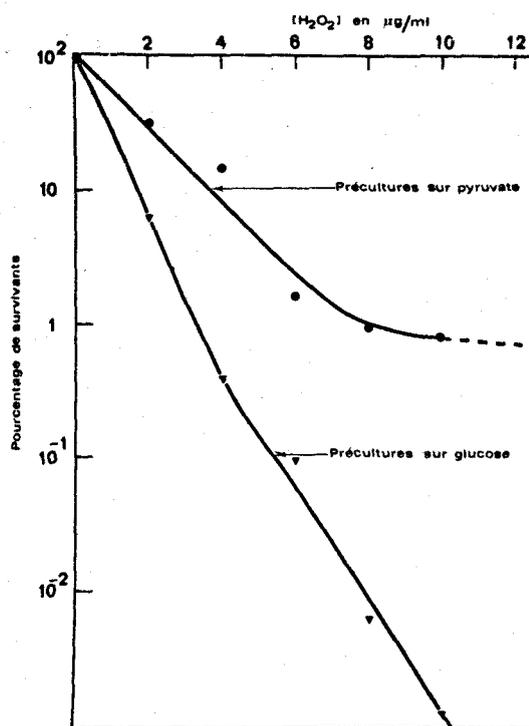


Figure 25 - Rapport du nombre de bactéries dans une culture contenant x µg/ml de peroxyde d'hydrogène au nombre de bactéries dans une culture contenant 0 µg/ml de ce produit après 3 h 30 de croissance en fonction de la concentration en peroxyde d'hydrogène.

La réaction que nous avons dosée *in vitro* se déroule aussi *in vivo* et l'eau oxygénée oxyde le pyruvate intracellulaire et le détruit irréversiblement.

En conclusion de cette étude sur l'interaction de certains intermédiaires du métabolisme bactérien et du peroxyde d'hydrogène nous avons montré que les groupements thiols et les acides α-cétoniques sont dégradés *in vitro* par l'eau oxygénée. Ces réactions qui se déroulent *in vitro* peuvent aussi s'effectuer *in vivo* comme le démontre l'expérience où le seul lieu possible de rencontre du pyruvate et du peroxyde est le cytoplasme bactérien. Dans ce cas il apparaît que l'ensemble glycolyse-cycle des acides tricarboxyliques est bloqué par décarboxylation oxydative de l'acide pyruvique et de l'acide α-cétoglutarique. Cette voie métabolique étant le noeud vital du métabolisme bactérien, toute perturbation peut entraîner un arrêt total de la vie cellulaire ce qui rend compte de la toxicité des extraits d'amidon irradié contenant ce peroxyde.

## CONCLUSIONS GÉNÉRALES

L'évaluation toxicologique représente une démarche essentielle dans toute recherche sur l'irradiation des denrées. Elle est abordée au Service de Radioagronomie sur l'exemple de l'amidon de maïs par des essais sur rats et souris et par des cultures bactériennes effectuées à partir d'extraits du polysaccharide irradié. Ce second volet de l'étude, rapporté ici, a été entrepris en raison de la facilité de manipulation d'un micro-organisme et de la rapidité des résultats acquis sur plusieurs générations.

Après avoir mis au point les techniques capables de mesurer les phases de latence ou la létalité d'*Escherichia coli* cultivée en présence de produits de radiolyse, nous avons pu, dans un premier temps, déterminer avec assez de précision les conditions pour lesquelles la toxicité des extraits d'amidon irradié était maximale ou minimale donc de maîtriser tous les paramètres influençant les résultats. Cette première partie a aussi permis de dégager, parmi les différents composés radiolytiques dosés au laboratoire, le peroxyde d'hydrogène comme principal produit toxique.

Nous avons vérifié l'hypothèse de l'activité bactéricide de l'eau oxygénée ou de ses proches homologues supérieurs par différentes techniques. Il faut toutefois souligner que le principal composé toxique n'est pas directement issu de la chaîne carbonée de l'amidon mais provient de la radiolyse de l'eau et de l'action de l'oxygène dissous ou de la coupure homolytique de cette eau par les radicaux libres radioformés. Il semble cependant possible que le peroxyde d'hydrogène forme avec d'autres molécules radiolytiques des peroxydes organiques carbonylés du type radioalkylperoxydes (ROOR) ou radioalkylhydroperoxydes (ROOH).

Enfin, et comme il faut s'y attendre de la part d'un oxydant aussi énergique que l'eau oxygénée, plusieurs sites intracellulaires peuvent être affectés par ce composé. Si l'ADN paraît relativement peu modifié — pas d'induction de phages, pas de mutations — d'autres molécules du type des acides  $\alpha$ -cétoniques intervenant dans le métabolisme bactérien sont complètement dégradées. Il en est de même pour certains groupements thiols qui, oxydés en pont disulfure, deviennent incapables d'assurer les cycles d'oxydo-réduction nécessaires au métabolisme.

A ce titre, un lieu d'action privilégié de l'eau oxygénée est constitué par l'ensemble glycolyse-cycle de Krebs qui se trouve bloqué non seulement par oxydation irréversible de l'acide lipoïque mais aussi par décarboxylation oxydative des deux principaux intermédiaires : les acides pyruvique et  $\alpha$ -cétoglutarique. Nous rappelons ici que

cette voie métabolique étant en quelque sorte le noeud vital du métabolisme bactérien tant au point de vue formation d'énergie (ATP à partir du  $\text{NADH}_2$  produit) qu'au point de vue synthèse des acides aminés et de certains acides nucléiques, toute perturbation peut entraîner un arrêt total de la vie cellulaire.

Le peroxyde d'hydrogène, principal produit de radiolyse toxique de l'amidon, possède donc une réactivité multisite, c'est-à-dire qu'il bloque le métabolisme cellulaire en de nombreux points vitaux dont les plus importants sont le cycle des acides tricarboxyliques et la glycolyse.

Toutefois, avant d'utiliser ces résultats pour d'autres organismes plus complexes, il est nécessaire de se rappeler que les bactéries sont des cellules baignant dans un milieu toxique et ne possédant pas toutes les étapes de détoxication que l'on trouve chez des êtres plus évolués. L'extrapolation globale de ces résultats aux organismes supérieurs est d'autant plus problématique qu'il arrive parfois qu'au contraire ces derniers transforment en substance toxique des produits sans action sur les bactéries. Les résultats que nous avons présentés ici peuvent cependant servir à orienter les futures recherches dans ce domaine.

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] AACC Methods 86-10 -  
"Cereal Laboratory Methods" - American Association Cereal Chemists Publs. (1962).
- [2] ALCANTARA-GOMEZ R., MAYR L.M., de SOUZA C.M. et CALDAS L.R. -  
Intern. J. Radiat. Biol., 18 (5), 4 (1970).
- [3] ALEXANDER P., LETT J.T., KOPP P. et ITZHAKI R. -  
Radiat. Res., 14, 363 (1961).
- [4] AMIRAGOVA M.I., SAVICH A.V. et SHAL'NOV M.I. -  
"Biological effects of ionizing radiations at the molecular level" - Symposium  
IAEA Vienne - International Publications Inc., 16, 221 (1962).
- [5] APPLEBY C.A., MORTON R.K. et SIMMONS D.H. -  
Biochem. J., 75, 72 (1960).
- [6] ATHANASSIADIS H., BERGER G. et MICHEL M. -  
Die Stärke, 25 (11), 361 (1973).
- [7] BARMAN T.E. -  
"Enzymes Handbook", Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New-York - Vol. 1 (1969).
- [8] BANDIERA M., MOPURGO G. et RICCI R. -  
Lincei. Rend. Sc. Fis. Mat. e Nat., XLII, 426 (1967).
- [9] BARRON G., DICKMAN S. et SINGER T.P. -  
Fed. Proc. 6 (11), 236 (1947).
- [10] BARRON E.S., FLOOD V. et GASDOVA B. -  
Biol. Bull. 97, 51 (1949).
- [11] BAUMGARTNER J.G. -  
J. Bacteriol., 30, 75 (1936).
- [12] BERGER G. -  
"Les études d'innocuité relatives aux aliments amylacés et aux sucres irradiés".  
Rapp. CEA/BIB 178 (1970).
- [13] BERGER A., AGNEL J.P. et SAINT LEBE L. -  
Die Stärke, 25 (6), 203 (1973).
- [14] BERGER G., ROSTAN-WOODHOUSE D. et SAINT LEBE L. -  
C.R. Acad. Sc. Paris, 273, 1064 (1971).
- [15] BERGER G. et SAINT LEBE L. -  
C.R. Acad. Sc. Paris, 268, 2620 (1969).
- [16] BERGER G. et SAINT LEBE L. -  
C.R. Acad. Sc. Paris, 271, 552 (1970).
- [17] BERGER G. et SAINT LEBE L. -  
C.R. Acad. Sc. Paris, 272, 1455 (1971).

- [18] BERGER G., SAINT LEBE L. et AGNEL J.P. -  
Die Stärke, 26 (5), 185 (1974).
- [19] BERNHEIM F. -  
Radiat. Res., Supp. 3, 17 (1963).
- [20] BERNHEIM F. et DIXON M. -  
Biochem. J., 22, 113 (1928).
- [21] BERRY R.J., HILLS P.R. et TRILLWOOD A. -  
Intern. J. Radiat. Biol., 9, 559 (1965).
- [22] BLANK I.H. et ARNOLD W. -  
J. Bacteriol., 30, 507 (1935).
- [23] BLANK I.H. et KERSTEN H. -  
J. Bacteriol., 30, 21 (1935).
- [24] BROWN M.G., LUCK J., SHEETS G. et TAYLOR C.V. -  
J. Gen. Physiol., 16, 397 (1933).
- [25] BRUZZESI M.R. et ZITO R. -  
Ital. J. Biochem., 16 (2), 136 (1967).
- [26] BUGYAKI L., DESCHREIDER A.R., MOUTSCHEN J., MOUTSCHEN-DAHMEN M., THIJS A. et  
LAFONTAINE A. -  
Atompraxis, 14, 112 (1966).
- [27] BUGYAKI L., LAFONTAINE A., MOUTSCHEN-DAHMEN J. et MOUTSCHEN-DAHMEN M. -  
Atompraxis, 9 (5), 194 (1963).
- [28] BURNS C.H., BROWNELL L.E. et ECKSTEIN H.C. -  
Fed. Proc., 15, 228 (1956).
- [29] BUTTER J.A.V. et CONNAY B.E. -  
Proc. Roy. Soc. London, B 141, 562 (1953).
- [30] CADET J. et TEOULE R. -  
Biochim. Biophys. Acta, 238, 826 (1971).
- [31] CALDAS L.R., HASSON-VOLOCH A., MAYR L.M. et ALCANTARA-GOMEZ R. -  
An. Acad. Brasil. Cienc., 40 (2), 243 (1968).
- [32] CAVALIERI L.F., FINSTON R. et ROSENBERG B.H. -  
Nature, 189, 833 (1961).
- [33] CHAGAS C., CALDAS L.R. et ELIAS C.A. -  
An. Acad. Brasil. Cienc., 29 (1), 39 (1957).
- [34] CHOPRA V.L. -  
Microbiol. Genetics Bull., 23, 8 (1965).
- [35] CHOPRA V.L. -  
Nautre, 208, 699 (1965).
- [36] CHOPRA V.L. -  
Mutation Res., 8, 25 (1969).
- [37] CHOPRA V.L., NATARAJAN A.T. et SWAMINATHAN M.S. -  
Radiat. Botany, 3, 1 (1963).
- [38] CHOPRA V.L. et SWAMINATHAN M.S. -  
Naturwissenschaften, 50, 374 (1963).
- [39] COLOWICK S.P. et KAPLAN N.O. -  
"Methods in Enzymology", Academic Press New-York, Vol. 11, 764 (1955).

- [40] COX R.A., OVERAND W.G., PEACOCKE A.R. et WILSON S. -  
Proc. Roy. Soc. London, B 149, 513 (1958).
- [41] DAMMERS J., KAMPELMACHER E.H., EDEL W. et Van SCHOTHORST -  
"Food Irradiation", Symposium Karlsruhe, 159 (1966).
- [42] DANIELS M., SCHOELES G., WEISS J. et WHEELER C.M. -  
J. Chem. Soc., 226 (1957).
- [43] DAUPHIN J.F., ATHANASSIADIS H., BERGER G. et SAINT LEBE L.  
Die Stärke, 26 (1), 14 (1974).
- [44] DE A.H., AIYAR A.S. et SREENIVASAN A. -  
Radiat. Res., 37, 202 (1969).
- [45] DELATRE J.M., FRETTON J., FRETTON R. et BEERENS H. -  
Ann. Inst. Pasteur (1975) - sous presse -
- [46] DELATRE J.M., FRETTON J., FRETTON R. et BEERENS H. -  
J. Applied Microbiol. (1975) - sous presse -
- [47] DICKEY F.H., CLELAND G.H. et LOTZ C. -  
Proc. Natl. Acad. Sc. U.S., 35, 581 (1949).
- [48] DINESCU G. -  
Rev. Roumaine Bioch., 4 (7), 249 (1970).
- [49] DUPUY P. et MOCQUOT G. -  
Food Irradiation, 2, A17 (1962).
- [50] DUPUY P. et USCIATI M. -  
Radiat. Botany, 6, 499 (1966).
- [51] EFFRONT J. -  
C.R. Acad. Sc. Paris, 154, 1111 (1912).
- [52] EGERTON A.C., EVERETT A.J., MINKOFF G.S., RUDRAKANCHANA S. et SALOOJA K.C. -  
Anal. Chim. Acta, 10, 422 (1954).
- [53] EHRENBERG L. -  
Abhandl. Deut. Akad. Wiss. Berlin (Med.), 1, 124 (1960).
- [54] EHRENBERG L., LÖFROTH G. et EHRENBERG A. -  
Arkiv. Zool., 18, 195 (1965).
- [55] EKERT B. et MONIER R. -  
Ann. Inst. Pasteur, 92, 556 (1957).
- [56] EKERT B. et MONIER R. -  
Nature, 184, 58 (1959).
- [57] ENGLEBERG E. -  
J. Bacteriol., 63, 1 (1952).
- [58] EVANS T.C. -  
Biol. Bull., 83, 298 (1942).
- [59] EVANS T.C. -  
Biol. Bull., 92, 99 (1947).
- [60] EVANS T.C., SLAUGHTER J.G., LILLE E.P. et FAILLA G. -  
Radiology, 39, 663 (1942).
- [61] FERRANDO R., PANTALEON J. et FROMAGEOT D. -  
Ann. Nutr. Alim., 22, 25 (1968).
- [62] FIELDS M.L., AMMERMAN G.R. et DESROSIERS N.W. -  
Food Technol., 14 (7), 407 (1960).

- [63] Food Irradiation -  
Proc. Symposium IAEA-FAO, Karlsruhe (1966).
- [64] Food Irradiation -  
Proc. Symposium IAEA-FAO, Bombay (1972).
- [65] FOURNIER P. et FORESTIER M. -  
C.R. Acad. Sc. Paris, 258, 3728 (1966).
- [66] FRAENKEL-CONRAT H. -  
Biochim. Biophys. Acta, 15, 307 (1954).
- [67] FRAENKEL-CONRAT H. -  
Biochim. Biophys. Acta, 49, 163 (1961).
- [68] FRAENKEL-CONRAT H., COOPER M. et OLCOTT H.S. -  
J. Am. Chem. Soc., 67, 950 (1945).
- [69] FRAENKEL-CONRAT H. et OLCOTT H.S. -  
J. Am. Chem. Soc., 68, 34 (1946).
- [70] FRAENDL-CONRAT H. et OLCOTT H.S. -  
J. Biol. Chem., 174, 827 (1948).
- [71] FREEZE E.B., GERSON J., TABER H., RHAESE H.J. et FREEZE E. -  
Mutat. Res., 4, 517 (1967).
- [72] FRETTON R. et DELATTRE J.M. -  
Ann. Inst. Pasteur (1975) - sous presse -
- [73] FRETTON R., FRETTON J., DELATTRE J.M. et BEERENS H. -  
Die Stärke, 1, 4 (1975).
- [74] FREY H. et POLLARD E.C. -  
Radiat. Res., 28, 668 (1966).
- [75] GOTTLIEB I. et POLLARD E.C. -  
Radiat. Res., 28, 668 (1966).
- [76] HABER F. et WEISS J. -  
Proc. Roy. Soc. London, A 147, 332 (1934).
- [77] HABERMAN S. et ELLSWORTH L. -  
J. Bacteriol., 40, 483 (1940).
- [78] HAGEN U. -  
Biochim. Biophys. Acta, 134, 45 (1967).
- [79] HALLIWELL G. -  
Biochem. J., 95, 35 (1965).
- [80] HARADA K., RYOICHI H., MOTOMI O. et ISAMU U. -  
J. Food Hyg. Soc. Jap., 1 (1), 32 (1969).
- [81] HICKMAN J.R., GREENWOOD T., BULL J.O. et LEY F.S. -  
Fd. Cosmet. Toxicol., 2, 175 (1964).
- [82] HICKMAN J.R., Mc LEAN D.L. et LEY F.S. -  
Fd. Cosmet. Toxicol., 2, 15 (1964).
- [83] HILLS P.R. et BERRY R.J. -  
Nature, 215, 309 (1967).
- [84] HOLSTEN R.D., SUGII M. et STEWARD F.C. -  
Nature, 208, 850 (1965).
- [85] HUYPER C.M. et SMETS L.A. -  
Naturwissenschaften, 49, 21 (1962).

- [86] IIZUKA H., SHIBABE S. et ITO M. -  
Agr. Biol. Chem., 33 (4), 473 (1969).
- [87] JAARMA M. et HENRICSON B. -  
Acta Vet. Scand., 5, 238 (1964).
- [88] JAARMA M. et HENRICSON B. -  
Nutr. Dieta, 8, 296 (1966).
- [89] JENSEN K.A., KIRK I., KOLMARCK G. et WESTERGARD M. -  
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 10, 245 (1951).
- [90] JONARD R., MANANT P. et SCHAEVERBEKE-SACRE J. -  
Radiat. Botany, 10, 175 (1970).
- [91] KASSEL B. -  
Biochemistry, 3, 152 (1964).
- [92] KAUCHE G.A. et STUBBE H. -  
Naturwissenschaften, 23, 824 (1940).
- [93] KESAVAN P.C. et KAMRA O.P. -  
Proc. Intern. Barley Genetics 2nd (1969).
- [94] KESAVAN P.C. et SWAMINATHAN M.S. -  
Current Sci., 35, 403 (1966).
- [95] KESAVAN P.C. et SWAMINATHAN M.S. -  
Radiat. Botany, 7, 269 (1967).
- [96] KESAVAN P.C. et SWAMINATHAN M.S. -  
Indian J. Genetics, 29, 173 (1969).
- [97] KESAVAN P.C. et SWAMINATHAN M.S. -  
Radiat. Botany, 11, 253 (1971).
- [98] KESAVAN P.C., SWAMINATHAN M.S. et SHARMA R.P. -  
Radiat. Botany, 10, 199 (1970).
- [99] KISS I., FARKAS J., ANDASSY E. et BECASSY K. -  
Acta Microbiol. Pol., 17, 6 (1968).
- [100] KLEPPE K. -  
Biochemistry, 5 (1), 139 (1966).
- [101] KORNBERG A. -  
Methods in Enzymology, Academic Press, New York, Vol. 1, 441 (1955).
- [102] KOSHLAND D.E., STRUMEYER D.R. et RAY W.J. -  
Brookhaven Symp. Quant. Biol., 15, 101 (1962).
- [103] KRAYBILL H., READ M.S. et FRIEDEMANN T.E. -  
Fed. Proc., 15, 933 (1965).
- [104] KUZIN A.M. -  
Intern. J. Radiat. Biol., 6, 211 (1962).
- [105] KUZIN A.M., KRYUKOVA L.M., SAENKO M.N. et IAZYKOVA V.A. -  
Biofizika, 4, 350 (1959).
- [106] LATARJET R. -  
C.R. Acad. Sc. Paris, 235, 1701 (1952).
- [107] LATARJET R. -  
Current Topics in Radiat. Res. Quarterly, 8, 1 (1972).
- [108] LATARJET R. et CALDAS L.R. -  
J. Gen. Physiol., 35, 455 (1952).

- [109] LATARJET R., EKERT B., APELGOT S. et REBEYROTTE N. -  
J. Chim. Phys., 58, 1046 (1961).
- [110] LATARJET R., EKERT B. et DEMERSEMAN P. -  
Radiat. Res., Supp. 3, 247 (1963).
- [111] LATARJET R. et MILETIC L.R. -  
Ann. Inst. Pasteur, 84, 205 (1953).
- [112] LATARJET R., REBEYROTTE N. et DEMERSEMAN P. -  
Les peroxydes organiques en radiobiologie - Ed. Masson et Cie, Paris (1958).
- [113] LEDERBERG S. et LEDERBERG E.M. -  
J. Bacteriol., 63, 399 (1952).
- [114] LETT J.T. et ALEXANDER P. -  
Radiat. Res., 15, 159 (1961).
- [115] LEVINSON W. -  
Exptl. Cell Res., 43, 398 (1966).
- [116] LÖFROTH G., HANNGREN K., EHRENBERG L. et EHRENBERG A. -  
Arkiv. Zool., 18, 529 (1966).
- [117] LOVELESS A. -  
Nature, London, 167, 338 (1951).
- [118] LWOFF A., SIMINOVITCH L. et KELJGAARD N. -  
Ann. Inst. Pasteur, 76 (6), 81 (1950).
- [119] MA T.H. -  
Radiat. Botany, 8, 307 (1968).
- [120] MAC GARY V., SHIPMAN M.E. et BERNSTEIN L. -  
J. Amer. Diet. Ass., 32, 123 (1956).
- [121] MÄKINEN Y., UPADHYA M.D. et BREWBAJER J.L. -  
Nature, 214, 413 (1967).
- [122] MANANT P., SCHAEVERBEKE J. et JONARD R. -  
C.R. Acad. Sc. Paris, 268, 24 (1969).
- [123] MANN P.J.G. -  
Biochem. J., 59, 609 (1955).
- [124] MARKLUND S. -  
Eur. J. Biochem., 21, 348 (1971).
- [125] METTA V.C. et JOHNSON B.C. -  
J. Agri. Food Chem., 7, 131 (1959).
- [126] MELZER M.S. et TOMLINSON R.V. -  
Arch. Biochem. Biophys., 115, 226 (1966).
- [127] MICHEL J.P., RIGOUARD M., BERGER G. et SAINT LEBE L. -  
Die Stärke (1975) - sous presse -
- [128] MICHEL J.P., RIGOUARD M., BERGER G. et SAINT LEBE L. -  
Die Stärke (1975) - sous presse -
- [129] Microbiological problems in food preservation by irradiation.  
Proc. Panel IAEA-FAO, Vienne (1966).
- [130] Microbiological specifications and testing methods for irradiated foods.  
Tech. Report 104, IAEA-FAO, Vienne (1970).
- [131] MITSUDA H., YASUMOTO K. et YAMAMOTO A. -  
Agr. Biol. Chem., 31 (7), 853 (1967).

- [132] MOLIN N. et EHRENBERG L. -  
Intern. J. Radiat. Biol., 8, 223 (1964).
- [133] MONDOVI B., ROLILIO G., FINAZZI-AFRO A. et COSTA M.T. -  
Biochim. Biophys. Acta, 132, 521 (1967).
- [134] MONOD J. -  
Thèse de doctorat, Ed. Hermann, Paris (1942).
- [135] MOODY G.J. -  
Nature, 198 (4882), 781 (1963).
- [136] MOODY G.J. -  
Adv. Carb. Chem., 19, 149 (1964).
- [137] MOUTSCHEN J. et MATAGNE R. -  
Radiat. Botany, 5, 23 (1965).
- [138] MOUTSCHEN J. et MOUTSCHEN-DAHMEN M. -  
Communication personnelle.
- [139] MOUTSCHEN J. et MOUTSCHEN-DAHMEN M. -  
Rapport AIEA, R 348 F (1966).
- [140] NATARAJAN A.T. -  
Risö Report, 16, 39 (1960).
- [141] NATARAJAN A.T. et SWAMINATHAN M.S. -  
Indian J. Genet., 18, 220 (1958).
- [142] NEUMAN N.P., MOORE S. et STEIN W.H. -  
Biochemistry, 1, 68 (1962).
- [143] O'CALLA P.S., O'DONNELL Y.Y. et FEELEY T.M.D. -  
Proc. Chem. Soc., 68 (1962).
- [144] O'MALLEY B.W., MENGEL C.E., MERIWETHER W.D. et ZINKLE L.G. -  
Biochemistry, 5 (1), 40 (1966).
- [145] PENNINGTON S.N. et MELOAN L.E. -  
Radiat. Botany, 8, 354 (1968).
- [146] PHILLIPS C.R. -  
Bact. Rev., 16, 135 (1952).
- [147] PLOUGH I.C., BIERNAN E.L., LEVY L.M. et WITT N.P. -  
Fed. Proc., 19, 1052 (1960).
- [148] POLLARD E.C., EBERT M.J., MILLER C., KOLACZ K. et BARONE T.F. -  
Science, 147, 1045 (1965).
- [149] POLLARD E.C. et WELLER P.K. -  
Radiat. Res., 32, 417 (1967).
- [150] POWERS E.C. et TOLMACH L.J. -  
Nature, 197, 710 (1963).
- [151] PRIESS H. et ZILLIG W. -  
Z. Physiol. Chem., 342, 73 (1965).
- [152] PROCHAZKA Z. et CERNA J. -  
Cités par BERGER G., Réf. 12.
- [153] PROKS J. -  
Le lait, 13, 331 (1933).
- [154] READ M.S., KRAYBILL H.F. et WITT N.F. -  
J. Nutr., 65, 39 (1958).

- [155] REINWEIN D., RALL J.E. et DURRA H.A. -  
Endocrinology, 83, 1023 (1968).
- [156] RHAESE H.J. et FREEZE E. -  
Biochim. Biophys. Acta, 155, 476 (1968).
- [157] RHAESE H.J., FREEZE E. et MELZER M. -  
Biochim. Biophys. Acta, 155, 491 (1968).
- [158] RICHARDSON L.R. et BROCK R. -  
J. Nutr., 65, 353 (1958).
- [159] RICHARDSON L.R., RITCHEY S.J. et RIGDON R.H. -  
Fed. Proc., 19, 1023 (1960).
- [160] RINEHART R.R. et RATTY F.J. -  
Genetics, 52, 1119 (1965).
- [161] ROE J.H. -  
D. Glick's Methods in Biochemical Analysis, Interscience Publs. Inc., New York,  
1, 115 (1954).
- [162] ROSS M.A., TUCKER W.E. et HOOD H. -  
Cités par BERGER G., Réf. 12.
- [163] ROUBAL W.T. et TAPPEL A.L. -  
Arch. Biochem. Biophys., 113, 150 (1965).
- [164] ROUBAL W.T. et TAPPEL A.L. -  
Arch. Biochem. Pharmacol., 45 (4), 752 (1966).
- [165] ROUBAL W.T. et TAPPEL A.L. -  
Biochim. Biophys. Acta, 136, 402 (1967).
- [166] SAINT LEBE L. et BERGER G. -  
4ème Conf. Intern. sur l'utilisation de l'En. Nucl. Atom. à des fins pacifiques,  
Genève (1971).
- [167] SAINT LEBE L., BERGER G., MUCCHIELLI A. et COQUET B. -  
Proc. Symp. IAEA-FAO, Bombay, 727 (1972).
- [168] SAINT LEBE L., MUCCHIELLI A., LEROY P. et BEERENS H. -  
Proc. Symp. IAEA-FAO, Bombay, 155 (1972).
- [169] SAX K. -  
Radiat. Botany, 3, 179 (1963).
- [170] SCARASCIA-MUGNOZZA G.T., NATARAJAN A.T. et EHRENBERG L. -  
OECD Report SEN/IR (65) Paris, 15 (1965).
- [171] SCHAEVERBEKE-SACRE J., JONARD R. et MANANT P. -  
C.R. Acad. Sc. Paris, 266, 830 (1968).
- [172] SCHOLES G. -  
Progr. Biophys. Mol. Biol., 13, 59 (1963).
- [173] SCHOLES G., WEISS J. et WHEELER C.M. -  
Nature, 178, 157 (1956).
- [174] SCHUBERT J. -  
J. Gen. Microbiol., 64, 37 (1970).
- [175] SCHUBERT J. et SANDERS E.B. -  
Nature (New Biology), 223, 199 (1971).
- [176] SCHUBERT J. et WATSON J.A. -  
Radiat. Res., 35, 552 (1968).

- [177] SCHUBERT J. et WATSON J.A. -  
Radiat. Res., 37, 531 (1969).
- [178] SCHUBERT J. et WATSON J.A. -  
Radiat. Res., 39, 510 (1969).
- [179] SCHUBERT J., WATSON J.A. et WHITE P.R. -  
Intern. J. Radiat. Biol., 13, 485 (1967).
- [180] SCHWEITZ H. -  
Biopolymers, 8, 101 (1963).
- [181] SCHWEITZ H. -  
C.R. Acad. Sc. Paris, D 264, 1335 (1967).
- [182] SCOTT O.C.A., DISS C. et STURROK J. -  
Intern. J. Radiat. Biol., 10, 617 (1966).
- [183] SHAW N.W. et HAYES E. -  
Nature, 211, 1254 (1966).
- [184] SOBELS F.H. -  
Nature, 177, 979 (1956).
- [185] SOBELS F.H. -  
Radiat. Res., Supp. 3, 177 (1963).
- [186] SOMMERMEYER K. et MAGNUS H. -  
Intern. J. Radiat. Biol., 7 (1), 11 (1960).
- [187] SRIVASTAVA B.S. et KUMAR H.D. -  
Radiat. Botany, 9, 291 (1969).
- [188] STAEBELIN M. -  
Biochim. Biophys. Acta, 29, 410 (1958).
- [189] STAUFER C.E. et ETSON D. -  
J. Biol. Chem., 244 (19), 5333 (1969).
- [190] STEWARD F.C., HOLSTEN R.D. et SUGII M. -  
Nature, 213, 178 (1967).
- [191] STONE W.S., HAAS F., CLARK J.B. et WYSS O. -  
Proc. Natl. Acad. Sc. U.S., 34, 142 (1948).
- [192] STONE W.S., WYSS O. et CLARK J.B. -  
Proc. Natl. Acad. Sc. U.S., 33, 59 (1947).
- [193] SWAMINATHAN M.S., CHOPRA V.L. et BHASKARAN S. -  
Radiat. Res., 16, 182 (1962).
- [194] SWAMINATHAN M.S., NIRULA S., NATARAJAN A.T. et SHARMA R.P. -  
Science, 141, 637 (1963).
- [195] TABOR H. -  
J. Biol. Chem., 188, 125 (1951).
- [196] TAYLOR C.V., THOMAS J.O. et BROWN M.G. -  
Physiol. Zool., 6, 467 (1933).
- [197] TEPLYL J. et KLINE B.N. -  
Fed. Proc., 15, 927 (1956).
- [198] THOMAS C.A. et DOTY J. -  
J. Amer. Chem. Soc., 78, 1854 (1956).
- [199] TUCKER W.E. -  
Citée par BERGER G., R ef. 12.

- [200] URI N. -  
Chem. Rev., 50, 375 (1952).
- [201] WAGNER R.P., HADDOX C.H., FUERST R. et STONE R.S. -  
Genetics, 35, 237 (1950).
- [202] WATSON J.A. et SCHUBERT J. -  
Radiat. Res., 39, 554 (1969).
- [203] WERLE E. et PECHMANN E. -  
Liebigs Ann. Chemie, 562, 44 (1949).
- [204] WOOD J.D. et WATSON W.J. -  
Can. J. Physiol. Pharmacol., 45 (4), 752 (1967).
- [205] WOODROW J.W., BAILEY A.C. et FULMER E.T.  
Plant Physiol., 2, 171 (1927).
- [206] WYSS O., CLARK J.B., HASS F. et STONE W.S. -  
J. Bacteriol., 56, 51 (1948).
- [207] ZILLIG W. et PRIESS H. -  
Bull. Soc. Chim. Biol., 46 (1), 226 (1964).