

~~20~~ 22

EXTRAIT DES
ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

(Février 1956. — Tome 90.)

PHOTO-RESTAURATION DE BACTÉRIES
DÉPOURVUES DE PORPHYRINES
PAR
Raymond LATARJET et Mirko BELJANSKI



MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS
Libraires de l'Académie de Médecine
120, Boulevard Saint-Germain
PARIS

PHOTO-RESTAURATION DE BACTÉRIES DÉPOURVUES DE PORPHYRINES

par RAYMOND LATARJET et MIRKO BELJANSKI (*).

[*Services de Radiobiologie et de Biochimie cellulaire
de l'Institut Pasteur*] (**)

La photo-restauration de lésions cellulaires produites par les rayons UV est un phénomène très fréquent, dont le mécanisme reste encore inconnu. On ignore notamment quels sont les chromophores mis en jeu. Les rares spectres d'action obtenus à ce jour, dans des conditions expérimentales assez grossières (et qui semblent d'ailleurs différer d'une espèce cellulaire à une autre) ne permettent pas de se faire une opinion motivée sur la nature de ces chromophores. Toutefois, Kelner [1] a suggéré que le pigment photo-sensible, à l'origine du processus restaurateur, pourrait être, dans certains cas au moins, une porphyrine. L'observation que nous présentons ici exclut cette hypothèse dans le cas de la bactérie *Escherichia coli*. Elle montre que deux mutants incapables de synthétiser la proto-porphyrine et ses précurseurs porphyriniques sont aussi photo-restaurables que les souches sauvagées originelles.

SOUCHES BACTÉRIENNES.

A partir des souches B et ML d'*E. coli*, les mutants H incapables de synthétiser l'hémine ont été isolés selon le procédé décrit par Beljanski [2]. Ces mutants poussent en eau peptonée glucosée non aérée. Sur peptone gélosée à 37°, ils donnent en deux jours des petites colonies aisément dénombrables. Ils ne présentent pas trace décelable de catalase, de cytochromes, ni même de molécules à noyau porphyrinique. La lumière ne favorise pas leur croissance. Celle-ci est en revanche accélérée par la présence d'hémine; les enzymes respiratoires apparaissent alors, mais la culture ne recouvre pas pour autant toutes les propriétés de la souche d'origine.

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 6 octobre 1955.

(**) Ce travail a bénéficié de subventions de la « Jane Coffin Child Foundation » et de la « Rockefeller Foundation ».

Le contenu des bactéries en porphyrines éthéro-solubles a été déterminé par la méthode suivante : la poudre acétonique bactérienne (1,7 g) est mise en suspension dans 20 cm³ d'eau additionnée de 20 cm³ d'HCl concentré. On hydrolyse à reflux pendant trente minutes au bain-marie bouillant. Les porphyrines sont alors extraites à l'éther [3], puis à l'acide chlorhydrique normal. L'extrait chlorhydrique est abandonné pendant vingt-quatre heures à la température du laboratoire et à l'obscurité. L'expérience nous a montré qu'au cours de ce séjour, les porphyrines restent intactes, tandis que d'autres substances colorées (flavines

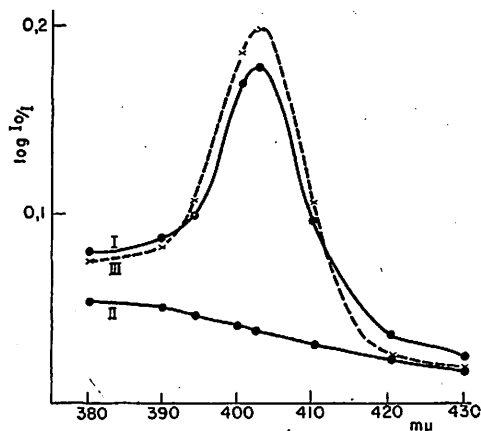


FIG. 1. — Spectres d'adsorption : I. Extrait de coli ML, souche normale ; II. Extrait de coli ML, mutant H ; III. Solution d'hématoporphyrine de référence.

par exemple) se détruisent. La solution est finalement examinée quant à ses spectres de fluorescence et d'absorption.

Pour rechercher la présence éventuelle d'uroporphyrine insoluble dans l'éther, nous avons utilisé la méthode de Rimington [4]. L'efficacité de cette méthode fut vérifiée sur des hydrolysats de mutants H additionnés d'uroporphyrine ou de méthyl-uroporphyrine.

Les spectres d'absorption (fig. 1) montrent que l'extrait chlorhydrique des bactéries normales contient des porphyrines, avec leur maximum caractéristique à 403 $m\mu$, alors qu'aucune bande n'apparaît chez l'extrait du mutant H. La spectroscopie de fluorescence confirme ce fait : la bande caractéristique des porphyrines, centrée sur 590 $m\mu$, est nettement dessinée chez l'extrait des bactéries normales, mais n'est pas décelable dans l'extrait du mutant H.

Les spectres de fluorescence et les mesures d'activité catalytique permettent d'affirmer que, si les mutants H contiennent des noyaux porphyriniques, ce contenu est inférieur au 1/500 du contenu des bactéries normales.

IRRADIATIONS.

A chaque expérience, trois cultures étaient étudiées dans des conditions identiques : la souche sauvage, le mutant H correspondant, et ce dernier cultivé en présence d'hémine ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^3$). Ces bactéries poussaient sans aération en milieu synthétique 56 additionné de 1/20 d'eau peptonée à 1 p. 100.

Des cultures de trente-six heures étaient repiquées dans du milieu frais non aéré. Lorsque la densité de ces nouvelles cultures atteignait environ 10^8 germes/ cm^3 , on les diluait cinquante fois dans un tampon phosphate (milieu 56 sans sucre), et on les irradiait en couche mince (1 mm) constamment agitée. La source était une lampe germicide étalonnée [5]. Les doses utilisées varièrent de 500 à 2 000 ergs/ mm^2 . Aussitôt après l'irradiation, ces échantillons étaient dilués dix fois en tampon, puis illuminés pendant une à cinq minutes à 10 cm d'une lampe à vapeur de mercure à haute pression, de 500 watts, à enveloppe de verre. Les échantillons plongeait dans un bain refroidi qui empêchait tout échauffement. La composition spectrale de la lumière et les doses administrées ont été déjà indiquées [6]. Après l'illumination, on étalait sur peptone gélosée et on dénombrait les colonies après deux jours d'incubation à 37° .

RÉSULTATS.

1° Toutes les expériences montrent que la restaurabilité des mutants H est la même que celle des souches normales. Dans le cas du *coli* ML, qui est moins restaurable que le *coli* B, peut-être parce qu'il est colicinogène inductible, les trois cultures se comportent identiquement (fig. 2), tant à l'obscurité (même sensibilité aux UV) qu'après illumination de cinq minutes (même restaurabilité).

Avec le *coli* B, la situation apparaît un peu plus complexe (fig. 3) du fait que le mutant H résiste plus aux UV que le type sauvage. La sélection de ce mutant par de fortes doses de streptomycine [2] enrichit probablement la population en types B/r résistants aux radiations, dont il existe environ 1 p. 100 dans toute culture de B, et dont il semble exister plus de 10 p. 100 chez le mutant H. En effet, les résistances aux radiations et aux antibiotiques sont fréquemment couplées. Quoi qu'il en soit, la restaurabilité de ce mutant est aussi grande que celle des deux autres cultures.

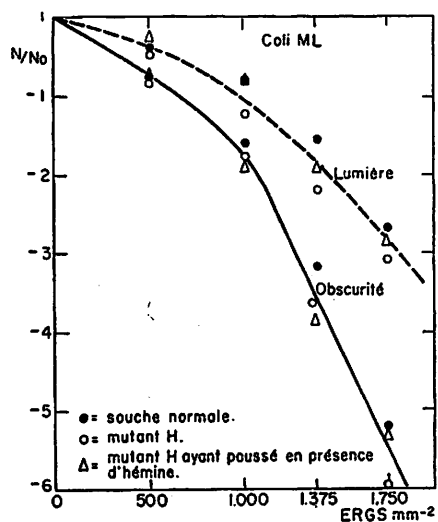


FIG. 2. — Courbe de survie de coli ML à l'obscurité (trait plein) et après photorestauration (pointillés).

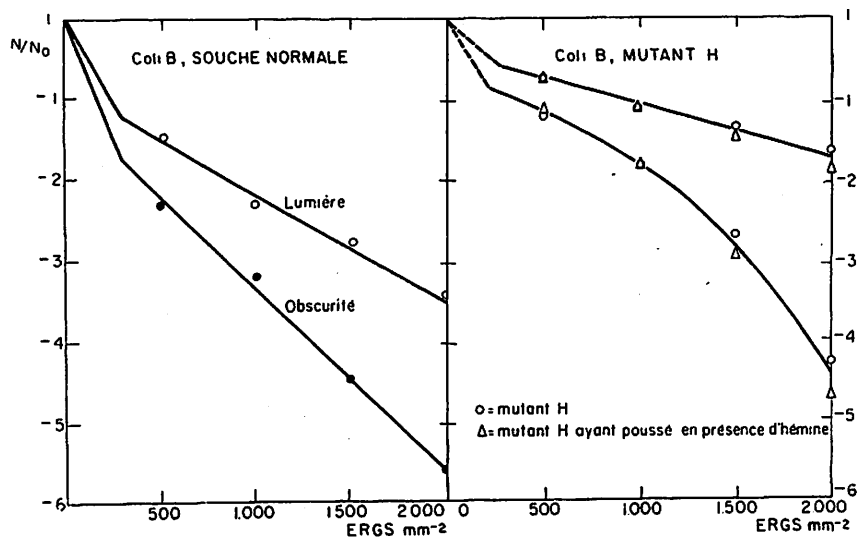


FIG. 3. — Courbes de survie de coli B à l'obscurité et après photorestauration. A gauche : souche normale ; à droite : mutant.

2° La dose d'illumination (cinq minutes) utilisée dans les expériences précédentes est élevée ; elle produit une restauration proche de la saturation. On peut se demander si les deux souches atteignent aussi aisément cette saturation, c'est-à-dire si le mutant H répond aussi bien que le type sauvage à de faibles doses de lumière. L'expérience répond par l'affirmative à cette question. Parfois même, le mutant H est plus rapidement restauré, ainsi qu'en témoigne le tableau I relatif à une expérience sur le *coli* ML irradié avec 1 300 ergs/mm² d'UV.

TABLEAU I.

| DURÉE DE L'ILLUMINATION | RAPPORT DES NOMBRES DE COLONIES Lumière/Obscurité | |
|-------------------------|--|----------|
| | Souche sauvage ML | Mutant H |
| 1 minute | 2 | 8 |
| 2 minutes | 5 | 15 |
| 3 minutes | 7 | 20 |
| 5 minutes | 16 | 28 |

CONCLUSION.

Les molécules à groupement porphyrrique n'influencent pas la photo-restaurabilité des bactéries *E. coli* étudiées. Ce fait entraîne deux conséquences, valables pour ces bactéries au moins :

a) Les porphyrines ne représentent pas, de manière appréciable, des chromophores mis en jeu dans la photo-restauration. Il conviendra de discuter de ce fait lorsqu'on sera en possession d'un spectre d'action suffisamment précis de la lumière sur *E. coli*.

b) Les enzymes à activités catalasiques et peroxydasiques n'interviennent pas non plus de manière décelable dans le processus de photo-restauration. Celui-ci reste encore indéterminé (Cf. [7]), mais nous pouvons dire qu'il ne concerne pas des lésions consécutives aux actions de peroxydes photo-formés. La photo-restauration semble donc procéder très différemment de la restauration par la catalase, laquelle consiste essentiellement en une action peroxydasique [8].

Ce travail a bénéficié de l'aide technique de M. Bernard Muel et de M^{lle} Gilberte Hierneaux. Nous les remercions bien sincèrement.

SUMMARY.

Molecules containing porphyrinic groups do not influence the photo-restoration of *E. coli* strains studied by the authors. In consequence, in the case of these strains :

a) The porphyrins do not appreciably act as chromophores in the photo-restoration process. This fact should be discussed as soon as a sufficiently precise action spectrum of light on *E. coli* will be available.

b) The catalase and peroxydase enzymes do not appreciably participate in the photo-restoration process, which remains indefinite. We can only state that this process does not apply to lesions due to the activity of photo-formed peroxydes. So it seems that photo-restoration is very different from restoration by catalase, which is an essentially peroxydase process.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] A. KELNER. *J. gen. Physiol.*, 1951, 34, 835.
- [2] M. BELJANSKI. *C. R. Acad. Sci.*, 1955, 240, 374.
- [3] P. SCHAEFFER. *Bioch. Biophys. Acta*, 1952, 9, 362.
- [4] C. RIMINGTON. *J. veter. Sci. anim. Ind.*, 1936, 7, 567.
- [5] R. LATARJET, P. MORENNE et R. BERGER. *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, 85, 174.
- [6] R. LATARJET et B. MILETIC. *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, 84, 205.
- [7] H. F. BLUM, G. M. LOOS, J. C. ROBINSON. *J. gen. Physiol.*, 1950, 34, 167.
- [8] R. LATARJET, L. R. CALDAS, B. MILETIC et P. MORENNE. *Brit. J. Radiol.*, 1954, 27, 54.