

Reprinted from

Life Sciences Vol. 3, pp. 795-801, 1964. Pergamon Press, Inc. Printed in the United States.

ACTION DU MYLERAN ET DU DEMI - MYLERAN (E.M.S.) SUR
LA MUTATION DE RESISTANCE A LA STREPTOMYCINE DE E. COLI K 12.

W.G. Verly, H. Barbason^(x), A. Petitpas-Dewandre et P. Fredericq.

Université de Liège, Département de Biochimie, Laboratoire
des Isotopes et Département de Bactériologie.

(Received 26 May 1964)

Nous avons voulu comparer l'action, sur la mutation de résistance à la streptomycine de *Escherichia coli* K 12, d'un agent alkylant monofonctionnel (le demi-myleran ou EMS = méthanesulfonate d'éthyle) et d'un agent alkylant bifonctionnel (le myleran ou 1,4-diméthanesulfonyl oxybutane).

La souche Y 20, dérivée de *E. coli* K 12, a été choisie parce qu'elle n'est pas lysogène; elle est normalement sensible à la streptomycine. La mutation étudiée permet aux cellules de se multiplier dans un milieu nutritif qui contient 50 µg de streptomycine par ml; on ne distingue pas les cellules devenues dépendantes de l'apport de l'antibiotique des cellules simplement résistantes : les deux classes sont comprises sous la dénomination de mutants résistants.

Les cultures utilisées dans nos expériences se sont développées 20 heures à 37° C dans un milieu nutritif liquide (a) et se trouvent en fin de croissance logarithmique. Les cellules récoltées sont mises dans une solution minérale tamponnée de pH 7.2 (b) à 37° C dans laquelle on fait barboter un courant d'air pendant 30 minutes : ce traitement a pour but d'épuiser les réserves alimentaires et d'arrêter les divisions cellulaires.

L'agent alkylant est dissous dans la solution minérale tamponnée (b). Après une exposition de la durée choisie, les cellules de *E. coli* sont lavées 5 fois; la suspension est alors diluée en série de 10 en 10 fois à l'aide de la solution minérale tamponnée (b). Les concentrations 10^{-0} (environ 10^8 cellules par ml), 10^{-1} et 10^{-2} sont utilisées pour recher-

(x) Boursier de l'Institut Interuniversitaire des Sciences Nucléaires.

cher les mutants, tandis que les concentrations 10^{-6} et 10^{-7} servent à dénombrer les cellules survivantes.

A 1 ml des différentes dilutions testées, on ajoute 5 ml de milieu gélosé nutritif (c) et l'on coule en sandwich entre deux autres couches du même milieu, en boîtes de Petri. De la sorte la streptomycine peut être appliquée à temps variable après avoir remis les cellules en milieu nutritif, en déposant sur la gélose une rondelle de papier filtre imbibée d'une solution de l'antibiotique. L'incubation se fait à 37°C et les clones sont comptés une semaine plus tard.

Action du demi-myleran, agent monofonctionnel.

Dans ces expériences, on a utilisé un traitement par l'EMS 0.1 M pendant 1 heure à 37°C . Nous nous intéresserons d'abord au rapport R du nombre des cellules donnant des clones résistants au nombre total de cellules survivant au traitement.

La figure 1 montre que si on applique la streptomycine immédiatement après avoir remis les cellules dans un milieu nutritif et coulé la gélose, le nombre de clones résistants est quasi nul, et que ce nombre augmente avec le temps qui sépare les deux traitements pour atteindre une valeur maximum et stable à partir de la 6ème heure.

Le délai nécessaire pour atteindre ce plateau augmente si les cellules se trouvent dans un milieu plus pauvre où elles se multiplient moins rapidement. Un séjour prolongé à 37°C dans la solution minérale tamponnée (b) après le traitement par l'EMS ne raccourcit pas le temps requis après l'introduction de la gélose nutritive pour atteindre le plateau.

On sait que la réaction entre l'ADN et l'EMS se produit principalement au niveau du N-7 de la guanine et du N-3 de l'adénine (1); ces bases alkylées sont ensuite lentement hydrolysées. Selon Freese (2), ce serait cette dépurination qui constituerait l'amorce de la mutation. Le délai nécessaire pour révéler les mutants entre le traitement par l'EMS et l'application de la streptomycine, pourrait s'expliquer par l'obligation d'attendre la dépurination. Toutefois, comme un séjour à 37°C dans un milieu minéral (où il n'y a pas de multiplication cellulaire) n'a aucune efficacité, on en déduit que le délai ne dépend pas de cette cause chimique. D'ailleurs il faut plusieurs centaines d'heures à 37°C (1) pour que l'ADN traité par l'EMS perde la moitié de ses bases alkylées,

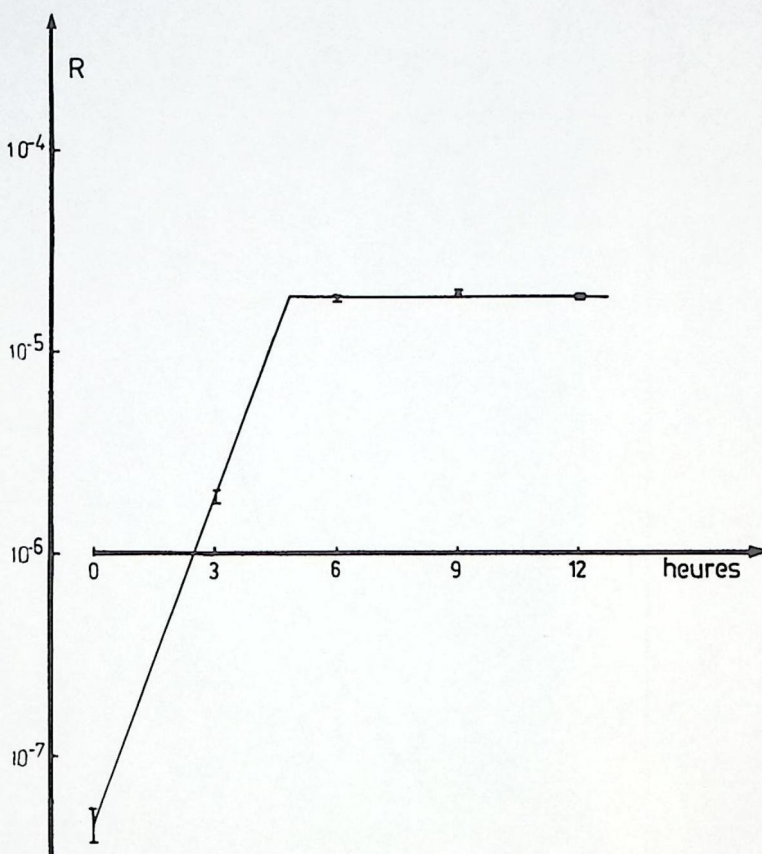


FIGURE 1

Nombre de clones résistants à la streptomycine en fonction du temps séparant l'introduction dans un milieu nutritif à 37° C des cellules traitées par l'EMS du moment de l'application de l'antibiotique. R = clones résistants / cellules survivantes.

alors qu'ici l'effet biologique maximum s'observe après un délai de 6 heures.

Nous préférons prendre comme base de notre discussion la théorie de Brookes et Lawley (3) suivant laquelle c'est l'alkylation du N-7 de la guanine qui constitue la promutation : deux divisions successives du génome suffisent pour accomplir la transition mutagène. Il faut ensuite attendre que le génotype transformé s'exprime dans le phénotype : ceci consisterait à remplacer les ribosomes sensibles à la streptomycine par des ribosomes résistants (4).

De plus les cellules de *E.coli* sont haploïdes mais le plus souvent plurinucléées. Il semblerait que la bactérie ne puisse se multiplier et donner, en milieu solide, un clone en présence de streptomycine que

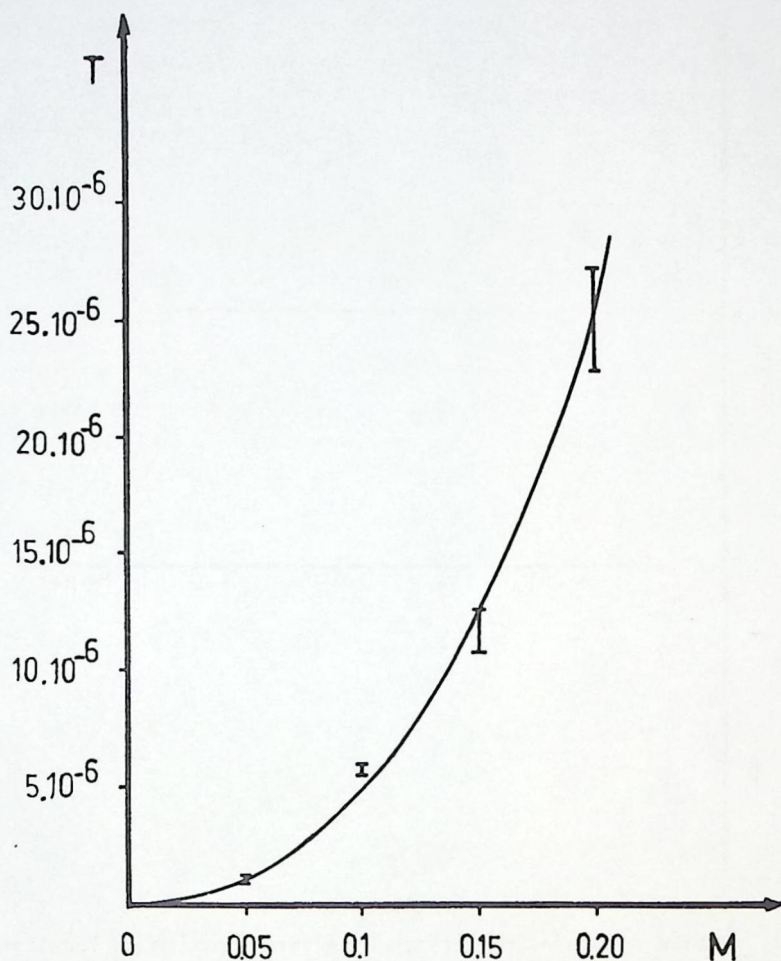


FIGURE 2.

Taux de mutation T en fonction de la concentration de l'EMS. La traitement se fait à 37° C et dure 1 heure.

si tous ses noyaux sont résistants (voir aussi Ephrussi-Taylor [5]). Après action de l'EMS, la probabilité d'avoir par cellule plus d'un noyau contenant une promutation sous la forme de 7-éthyl-guanine en un point sensible du locus compétent, est pratiquement nulle. Le délai nécessaire entre le traitement par l'EMS et l'application de la streptomycine pour observer un nombre maximum de mutations, délai qui diminue lorsque le rythme des mitoses s'accroît, représente surtout un temps de ségrégation nucléaire : pour que le clone dérivant de la cellule porteuse de la promutation soit classé comme résistant, il faut qu'il contienne au moins une cellule qui ne renferme que des noyaux résistants.

Si on attend 6 heures avant d'appliquer la streptomycine dans les conditions expérimentales qui ont été décrites précédemment, le test biologique dénombre les noyaux porteurs d'une promutation. Il semble donc correct d'appeler 'taux de mutation' T la fraction de noyaux promutée. On a expérimentalement :

$$T = \frac{\text{clones résistants}}{\text{cellules survivantes} \times \text{nombre moyen de noyaux par cellule}}$$

en faisant l'hypothèse qu'il n'y a aucune corrélation entre le survie et la mutation.

La figure 2 montre la relation entre la concentration de l'EMS et le taux de mutation ainsi calculé. Les cellules sont encore traitées 1 heure dans un milieu minéral tamponné de pH 7.2 (b) avant d'être lavées et introduites dans une gélose nutritive; la streptomycine est appliquée après 6 heures d'incubation à 37° C et la lecture se fait une semaine plus tard.

Action du myleran, agent bifonctionnel.

Le myleran, par contre, n'a aucun effet mutagène. Un traitement de 24 heures à 37° C dans une solution contenant 200 mg/litre ne provoque aucune mutation, ni aucune létalité chez E.coli Y 20. On pourrait se demander si la coque du bacille empêche la pénétration du myleran.

Pour répondre à cette question, on a utilisé du myleran tritié dans sa portion tétraméthylène (242 mC par millimole), puis isolé l'ADN de E.coli par la méthode au phénol (6) : l'ADN avait une activité de 11.700 désintégrations par minute par mg, prouvant ainsi que la paroi de E.coli n'est pas imperméable à cet agent alkylant bifonctionnel. Néanmoins, si on compare l'alkylation de l'ADN in situ dans la cellule à celle de l'ADN de E.coli, isolé et purifié, in vitro dans les mêmes conditions de concentration de myleran tritié et de durée d'exposition, on constate que l'ADN in situ réagit 16 fois moins. Une telle différence n'avait pas été observée chez l'algue Chlamydomonas. Il semble donc que la paroi du bacille, sans être totalement imperméable au myleran, restreint cependant considérablement son entrée dans le cytoplasme.

Le myleran peut réagir avec l'ADN de deux manières différentes (1) :

- 1) comme un agent monofonctionnel (voir EMS ci-avant);
- 2) en formant des ponts entre les hélices complémentaires de l'ADN.

A cause de la faible solubilité du myleran, la concentration utili-

sée dans nos expériences est seulement de 0.0008 M, de telle sorte que les effets biologiques des réactions du premier type (analogues aux réactions de l'EMS) n'apparaissent pas.

Nous avons précédemment conclu que l'action mutagène du myleran chez *Chlamydomonas eugametos* (7) était due au pontage des hélices complémentaires de la molécule d'ADN porteuse du locus génétique compétent. Pourquoi cet effet n'apparaît-il pas chez *E.coli* ?

Cairns (8) a montré que le noyau de *E.coli* ne contenait qu'une seule molécule bicaténaire d'ADN. S'il en est ainsi, un pont entre les deux chaînes ne peut être que létal pour le noyau : tout comme chez le bactériophage T2 ou T4 (3), il ne peut pas être mutagène. Mais l'inactivation du noyau n'entraîne pas nécessairement la mort de la cellule qui est le plus souvent plurinucléée : il se produit simplement une sélection nucléaire qui élimine le noyau contenant l'ADN ponté.

Résumé.

La méthanesulfonate d'éthyle provoque l'apparition de mutants résistants à la streptomycine chez *E.coli* K 12 (souche non lysogène Y 20). L'expression phénotypique de la mutation demande un délai qui dépend vraisemblablement : a) de la transition qui remplace G - C par A - T; b) d'une ségrégation chargée de ne laisser que des noyaux mutés dans une cellule; c) du remplacement des ribosomes sensibles par des ribosomes résistants.

Par contre, le myleran n'a aucun effet mutagène, ni létal. La réaction avec un seul filament de l'ADN est trop discrète pour être reconnue par le test biologique. La formation d'un pont entre les filaments est létale pour le noyau, mais pas pour la cellule qui est plurinucléée.

Description des milieux utilisés :

(a) Milieu nutritif liquide :

Bacto nutrient broth Difco	16
protéose peptone Difco	10
NaCl	4
glucose	0.5
eau	1000 gr.

(b) Solution minérale tamponnée = Bacto hemagglutination buffer Difco.

(c) Milieu nutritif gélosé (solide à 37° C) :

Bacto nutrient broth Difco	8
Bacto agar Difco	23
NaCl	4
eau	1000 gr.

Bibliographie.

- 1) P.D. Lawley et P. Brookes, Biochem.J., 89, 127 (1963).
- 2) E. Freese, dans Molecular Genetics, éd. J.H. Taylor, Academic Press, p. 207 (1963).
- 3) P. Brookes et P.D. Lawley, Biochem.J., 89, 138 (1963).
- 4) C.R. Spotts et R.Y. Stanier, Nature, 192, 633 (1961).
- 5) H. Ephrussi-Taylor, Nature, 196, 748 (1962).
- 6) J.S. Colter, R.A. Brown et K.A.O. Ellem, Bioch.Bioph.Acta, 55, 31 (1962).
- 7) W.G. Verly, A. Dewandre, J. Moutschen et M. Moutschen, J.Mol.Biol., 6, 175 (1963).
- 8) J. Cairns, J.Mol.Biol., 6, 208 (1963).

Ce travail a été effectué dans le cadre du contrat Euratom 022-62-10-BIOB et subsidié par le Fonds belge de la Recherche Scientifique Fondamentale Collective.