

## INDUCTEURS ET INHIBITEURS SPÉCIFIQUES DANS LA BIOSYNTHÈSE D'UN ENZYME

### La $\beta$ -galactosidase d'*Escherichia coli*

JACQUES MONOD

*Institut Pasteur, Paris*

L'adaptation enzymatique a été le plus souvent définie comme « la formation induite d'un enzyme sous l'influence de son substrat ». Mais la signification qu'il convenait d'attribuer à cette expression « formation d'un enzyme » demeurait incertaine. On avait démontré que la synthèse de co-enzymes ou de transporteurs ne pouvait pas rendre compte du phénomène, et qu'il s'agissait donc bien de l'apparition d'une protéine active. Tant que cette protéine n'était définie que par son activité, il était difficile d'affirmer que l'adaptation correspondait à une biosynthèse, et surtout tout espoir d'arriver à identifier un ou des stades antérieurs de cette synthèse était vain. Les travaux récents de Cohn & Torriani<sup>1, 2</sup> sur la  $\beta$ -galactosidase adaptative d'*Escherichia coli* ont apporté à ces problèmes une contribution très importante. Il faut rappeler que cette hydrolase, spécifique de la configuration  $\beta$ -galactosidique, est un enzyme typiquement adaptatif dont dépend l'attaque du lactose chez *E. coli*. L'enzyme a pu être isolé à partir de bactéries cultivées sur lactose, et obtenu à un état hautement purifié. Cohn & Torriani ont démontré que les cellules adaptées possèdent un antigène spécifique (Gz) que les cellules non adaptées ne contiennent qu'à l'état de traces. Ils ont pu d'autre part identifier cet antigène à l'enzyme. L'analyse immunochimique révèle en outre que les cellules non adaptées contiennent un autre antigène (Pz) présentant avec l'antigène-enzyme (Gz) des réactions croisées très accentuées. Or, l'antigène Pz existe également chez les bactéries adaptées, mais en quantités très notablement inférieures à celles que l'on trouve chez les bactéries non adaptées. L'adaptation au lactose se traduit donc par la synthèse d'un antigène spécifique (Gz) qui est la galactosidase, et par la disparition partielle d'un autre antigène (Pz) très proche du premier par sa spécificité. Il est donc possible que Pz représente, au moins en partie, un précurseur de la galactosidase.

La caractérisation physique de Pz et Gz, actuellement en cours, permettra peut-être de se faire une idée plus précise de ce qui les distingue et des transformations que supposerait le passage de l'un à l'autre.

Mais pour comprendre la nature de la réaction d'adaptation, il ne suffit pas d'identifier et de caractériser la protéine formée ainsi que son ou ses précurseurs. Il faut encore expliquer le mécanisme de l'action inductrice

spécifique du substrat. On a beaucoup spéculé à ce sujet. Réduites à l'essentiel, les hypothèses possibles se ramènent à trois.

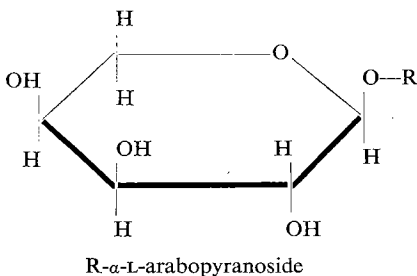
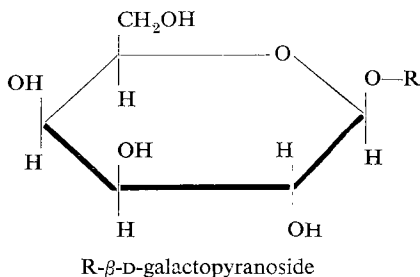
1) *Hypothèse « fonctionnelle »*. La synthèse de l'enzyme serait liée à son activité (Dubos,<sup>3</sup> Hinshelwood<sup>5</sup>).

2) *Hypothèse « d'équilibre »*. La synthèse de l'enzyme serait limitée par un équilibre dynamique. Celui-ci serait rompu lorsque l'enzyme se trouverait engagé dans un complexe spécifique (Yudkin,<sup>15</sup> Spiegelman,<sup>14</sup> Monod<sup>8</sup>).

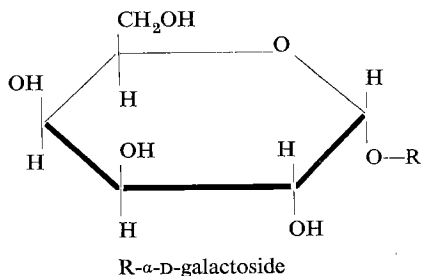
3) *Hypothèse « formatrice »*. L'inducteur dans la synthèse de l'enzyme jouerait un rôle organisateur ou formateur. Il entrerait pour cela en combinaison (transitoire) avec un précurseur de l'enzyme (Monod,<sup>7</sup> Northrop et al.,<sup>11</sup> Emerson<sup>4</sup>).

Ces trois hypothèses conduisent chacune à une conclusion différente concernant les relations entre la spécificité enzymatique et la spécificité inductrice. En effet, si la première hypothèse était exacte, seuls les substrats de l'enzyme pourraient en induire la formation. Dans la deuxième hypothèse, l'activité inductrice serait liée seulement à l'affinité de l'inducteur pour l'enzyme. Enfin, dans la troisième hypothèse, ni l'affinité pour l'enzyme, ni la qualité de substrat de l'enzyme, ne seraient des propriétés nécessaires ou suffisantes pour qu'un corps soit doué d'inductivité.

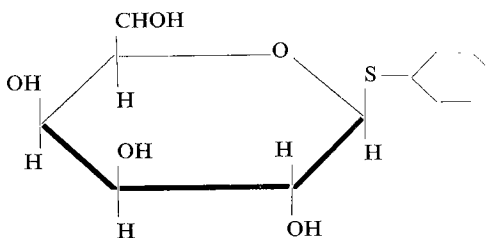
Les propriétés spécifiques de la  $\beta$ -galactosidase se prêtent particulièrement bien à la vérification de ces conséquences des hypothèses. L'enzyme est spécifique de la configuration  $\beta$ -D-galactopyranosidique, mais présente une activité et une affinité notables envers les homologues inférieurs, à savoir les  $\alpha$ -L-arabopyranosides :



Il est au contraire dénué de toute espèce d'activité sur les  $\alpha$ -galactosides :



L'étude d'une série de galactosides et d'autres dérivés du galactose, d'une part *in vitro* en tant que substrats ou inhibiteurs spécifiques de l'enzyme, d'autre part *in vivo* en tant qu'inducteurs, conduit à la conclusion que l'inductivité est liée strictement à la présence d'un radical galactoside intact, libre ou en liaison  $\alpha$  ou  $\beta$ , mais que, en revanche, l'inductivité n'est en rien dépendante soit de l'utilisation métabolique de l'inducteur, soit de sa propriété de substrat de l'enzyme, soit de son affinité pour l'enzyme. Mention particulière doit être faite ici d'un corps dont les propriétés se sont montrées particulièrement utiles : le phényl- $\beta$ -D-thiogalactoside :



Ce thiogalactoside est un inhibiteur compétitif très actif de la galactosidase. Il est également actif *in vivo* comme inhibiteur de la croissance, mais uniquement lorsque celle-ci a lieu aux dépens d'un  $\beta$ -galactoside. Il y a donc là un exemple (on en connaît fort peu) où l'inhibition *in vivo* peut être comparée directement et quantitativement à l'activité *in vitro* sur un enzyme isolé. Le thiophénylgalactoside, malgré sa haute affinité pour l'enzyme, ne possède aucune activité inductrice. En revanche, le mélibiose, dénué de toute affinité pour l'enzyme, est un inducteur très puissant (Monod, Cohen-Bazire & Cohn<sup>10</sup>).

\* \* \*

Ces résultats, confirmés par beaucoup d'autres, sont incompatibles aussi bien avec l'hypothèse « fonctionnelle » qu'avec l'hypothèse « d'équi-

libre ». L'une et l'autre supposaient que l'effet primaire de l'inducteur résultait de sa combinaison avec l'enzyme: C'est cela précisément que l'expérience dément. Quelles pourraient donc être la ou les réactions auxquelles participerait l'inducteur ? Les belles recherches de Pollock <sup>12, 13</sup> sur la pénicillinase ouvrent de nouvelles perspectives dans ce domaine. Pollock a réussi à démontrer pour la première fois que l'inducteur (en l'occurrence la pénicilline) se trouve engagé dans les cellules, dans une combinaison qui est la véritable forme active. Il n'est pas vain d'espérer arriver à identifier un tel inducteur intracellulaire. Les données recueillies sur les inducteurs de la  $\beta$ -galactosidase suggèrent que l'inducteur pourrait être un dérivé commun formé à partir des divers galactosides actifs. Mais les observations montrent aussi que ce « métabolisme d'induction » doit être d'un ordre extraordinairement faible.

\* \* \*

En tout cas, toutes ces observations tendent à accorder une place de plus en plus grande à l'inducteur dans la synthèse de l'enzyme.

Or on sait d'autre part qu'un certain nombre de mutations conditionnent spécifiquement la synthèse de la galactosidase. De plus, la tendance moderne est d'attribuer une influence directrice spécifique aux gènes dans la synthèse des enzymes. Les observations récemment faites (Lederberg <sup>6</sup> et Monod & Cohn <sup>9</sup>) sur quelques souches « lactose negative » d'*E. coli* ont montré que ces souches, contrairement à ce qu'on avait pu croire antérieurement, synthétisent la galactosidase en présence de certains galactosides, quoiqu'elles n'en produisent pas avec d'autres, tels que le lactose. De plus, grâce aux propriétés spécifiques et antigéniques absolument caractéristiques de cet enzyme, on peut affirmer que la galactosidase des souches « lactose negative » est identique à celle que synthétisent les souches « lactose positive ». En outre, certains mutants restent capables de former de la galactosidase en présence de certains inducteurs alors qu'ils ont perdu toute réactivité en présence de certains autres. On exprimerait les résultats de la façon la plus adéquate en disant que ces gènes paraissent contrôler le « métabolisme d'induction » plutôt que conditionner d'une façon absolue la synthèse de l'enzyme.

\* \* \*

Il est plus que probable que beaucoup de ces conclusions et de ces suggestions devront être très profondément modifiées, dans un avenir proche. L'important, c'est que l'existence de ces phénomènes d'induction enzymatique, aujourd'hui mieux connus, mieux définis, mesurables avec précision, nous offre le moyen d'expérimenter directement sur les conditions et le mécanisme de la biosynthèse d'une protéine spécifique.

## SUMMARY

It is agreed at the present time that the formation of an adaptive enzyme under the influence of its substrate corresponds to the appearance of an active protein. Recent work on the adaptive  $\beta$ -galactosidase of *Escherichia coli* has made an important contribution to the study of the various stages of this synthesis. Adaptation to lactose is accompanied by the synthesis of a specific antigen (Gz), galactosidase, combined with the disappearance of another antigen (Pz), very closely related, as far as specificity is concerned, to the former, and which preponderates in the non-adapted bacteria and may be considered, at least in part, as a precursor of the Gz antigen-enzyme. Three main hypotheses have been put forward to explain the mechanism of the specific action of the substrate. Each of these hypotheses leads to a different conclusion concerning the relationship between enzymatic specificity and inductive specificity. The study of adaptive  $\beta$ -galactosidase has shown that even substances towards which the enzyme exhibits no activity may play an inductive role and that inductivity is dependent on the presence of an intact galactoside radical, either free or with an  $\alpha$  or  $\beta$  linkage. Phenyl- $\beta$ -D-thiogalactoside is a very active competitive inhibitor of galactosidase and a growth inhibitor *in vivo*, when such growth takes place at the expense of a  $\beta$ -galactoside. In spite of its strong affinity for the enzyme, this inhibitor has no inductive power. On the other hand, melibiose, although without any affinity for the enzyme, is a powerful inductor.

These results, confirmed by recent research on penicillin, support the "formative" hypothesis according to which the inductor combines with a precursor of the enzyme.

Present data concerning  $\beta$ -galactosidase inductors suggest that the inductor could be a common derivative formed from various active galactosides. On the other hand, the present tendency is to attribute to the genes a specific directive influence in enzyme synthesis. It would appear, according to experiments carried out on the

## RÉSUMÉ

On admet actuellement que la formation d'un enzyme adaptatif sous l'influence de son substrat correspond à l'apparition d'une protéine active. Les travaux récents sur la  $\beta$ -galactosidase adaptative d'*Escherichia coli* ont apporté une contribution importante à l'étude des stades de cette synthèse. L'adaptation au lactose se traduit par la synthèse d'un antigène spécifique (Gz), la galactosidase, et par la disparition d'un autre antigène (Pz), très proche du précédent par sa spécificité, qui se trouve en quantité prépondérante dans les bactéries non adaptées et peut être considéré, en partie du moins, comme un précurseur de l'antigène-enzyme Gz. Trois hypothèses ont été avancées pour expliquer le mécanisme de l'action spécifique exercée par le substrat; chacune d'elles conduit à des conclusions différentes concernant les relations entre la spécificité enzymatique et la spécificité inductrice. L'étude de la  $\beta$ -galactosidase adaptative a montré que même des substances envers lesquelles l'enzyme est dénué d'activité peuvent jouer le rôle d'inducteur et que l'inductivité est liée strictement à la présence d'un radical galactoside intact, libre ou en liaison  $\alpha$  ou  $\beta$ . Le phényl- $\beta$ -D-thiogalactoside est un inhibiteur compétitif très actif de la galactosidase et un inhibiteur *in vivo* de la croissance, lorsque celle-ci a lieu aux dépens d'un  $\beta$ -galactoside. Malgré sa haute affinité pour l'enzyme, cet inhibiteur ne possède aucune activité inductrice. En revanche, le mélibiose, dénué de toute affinité pour l'enzyme, est un inducteur puissant.

Ces résultats, appuyés par ceux de recherches récentes sur la pénicilline, viennent à l'appui de l'hypothèse « formatrice », selon laquelle l'inducteur entrerait en combinaison avec un précurseur de l'enzyme. Les données actuelles sur les inducteurs de la  $\beta$ -galactosidase suggèrent que l'inducteur pourrait être un dérivé commun formé à partir de divers galactosides actifs. D'autre part, la tendance actuelle est d'attribuer aux gènes une influence directrice spécifique dans la synthèse des enzymes. Il semblerait, d'après

synthesis of galactosidase with "lactose negative" and "lactose positive" strains, that the genes control "inductive metabolism" rather than that they govern absolutely the synthesis of the enzyme.

les expériences faites sur la synthèse de la galactosidase par les souches « lactose negative » et « lactose positive », que les gènes contrôlent le « métabolisme d'induction » plutôt qu'ils ne conditionnent de façon absolue la synthèse de l'enzyme.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Cohn, M. & Torriani, A. M. (1952) *Biochim. biophys. Acta, Amst.* (sous presse)
2. Cohn, M. & Torriani, A. M. (1952) *J. Immunol.* (sous presse)
3. Dubos, R. J. (1940) *Bact. Rev.* **4**, 1
4. Emerson, S. (1945) *Ann. Mo. bot. Gdn*, **32**, 243
5. Hinshelwood, C. N. (1946) *The chemical kinetics of the bacterial cell*, Oxford
6. Lederberg, J. (1948) *Rec. Genet. Soc. Amer.* No. 17, p. 46
7. Monod, J. (1943) *Ann. Inst. Pasteur*, **69**, 179
8. Monod, J. (1947) *Growth*, **11**, 223
9. Monod, J. & Cohn, M. (1952) Dans : Nord, F. F. éd. *Advances in enzymology and related subjects of biochemistry*, New York, **13** (sous presse)
10. Monod, J., Cohen-Bazire, G. & Cohn, M. (1951) *Biochim. biophys. Acta, Amst.* **7**, 585
11. Northrop, J. H., Kunitz, M. & Herriot, R. M. (1948) *Crystalline enzymes*, 2nd ed., New York (Columbia Biological Series, No. 12)
12. Pollock, M. R. (1950) *Brit. J. exp. Path.* **31**, 739
13. Pollock, M. R. & Perret, C. J. (1951) *Brit. J. exp. Path.* **32**, 387
14. Spiegelman, S. (1950) *Modern aspects of enzymatic adaptation*. Dans : Summer, J. B. & Myrbäck, K., éd. *The enzymes: chemistry and mechanism of action*, New York, **1**, 267
15. Yudkin, J. (1938) *Biol. Rev.* **13**, 93