

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE. — *Synthèse chez les bactéries d'ARN nouveaux n'étant pas la copie de l'ADN.* Note (*) de M. Mirko Beljanski, M^{me} Monique Beljanski, MM. Pierre Bourgarel et Jean Chassagne, présentée par M. Jacques Tréfourl.

La showdomycine, un nucléoside naturel, permet chez *B. cereus*, *E. coli* et *Alcaligenes f.* la synthèse des ARN à marquage rapide n'étant pas la copie de l'ADN. Un mutant d'*E. coli*, résistant à cet antibiotique synthétise des ARN dont la composition en base est bouleversée, et certaines enzymes à activités modifiées.

Au cours de nos recherches sur la biosynthèse des chaînes peptidiques nous avons montré (1) que la showdomycine [(2), (3)] permettait chez *E. coli* (croissance temporairement arrêtée) la synthèse de l'ARN à marquage rapide et de l'ARN ribosomique 23 S dont la composition en bases $G + A/C + U = 2$, diffère de celle de l'ADN ($G + A/C + T = 1$) isolé à partir de ces mêmes bactéries.

Les faits présentés ici montrent que la showdomycine à faible dose fait apparaître chez plusieurs espèces bactériennes des ARN à marquage rapide (ARN-mr) nouveaux, et par son effet mutagène puissant transforme irréversiblement les bactéries d'*E. coli*, leur conférant de nouvelles propriétés.

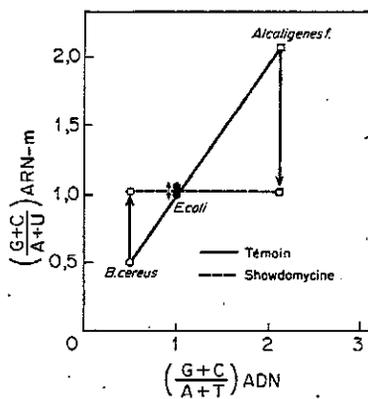


Fig. 1

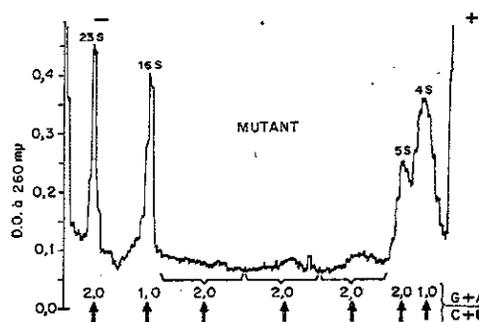


Fig. 2

Fig. 1. — Rapport des bases G + C/A + U des ARN à marquage rapide chez les bactéries normales et celles en présence de showdomycine

Fig. 2. — Les ARN séparés par électrophorèse sur gel d'acrylamide (3,7 %)

I. Les ARN-mr des bactéries (*B. cereus*, *E. coli*, *Alcaligenes f.*) en phase exponentielle de croissance (10^7 bactéries/ml) ont été marqués au ^{32}P pendant 60 s dans des milieux pauvres en phosphates (4) mais renfermant 2-6- μg de showdomycine/ml, 10 mn avant et pendant le marquage. Les méthodes d'isolement, de séparation des ARN et l'analyse des ribonucléotides ont été décrites (1). L'électrophorèse sur gel d'acrylamide (5) permet une fine séparation des ARN dont la position est détectée à l'aide d'ultraviolets (4).

La figure 1 montre la composition en bases G + C/A + U des ARN-mr des bactéries normales de *B. cereus* (0,5), *E. coli* (1,0) et *Alcaligenes f.* (2,0). En présence de showdomycine ces espèces bactériennes synthétisent environ 80 % d'ARN-mr dans lesquels $G + C/A + U = 1$ (fig. 1) et $G + A/C + U = 2$ ($G = A$; $C = U$). 15 à 30 % d'ARN de ce type possèdent le rapport G + C/A + U caractéristique de chaque espèce. La showdomycine, qui n'est pas incorporée dans les ARN (moins de une molécule de showdomycine-³H pour 12 000 nucléotides) n'affecte pas la croissance, modifie le statut de la régulation et impose la synthèse des ARN nouveaux. Les ARN-mr (*E. coli*) synthétisés soit en présence de showdomycine soit chez le mutant résistant à cet antibiotique s'hybrident faiblement par rapport à l'ARN-mr témoin (tableau I), avec l'ADN homologue qui provient soit de bactéries normales, soit mutantes. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par l'analyse chimique.

TABLEAU I
Hybride ADN-ARN-mr (messenger)

ARN ³² P (origine)	ADN témoin ou mutant-sh	Matériel ³² P fixé sur le filtre CPM	Pourcentage de matériel ³² P fixé sur l'ADN
Témoin	+	8 340	27
Témoin + ARN rib.	+	8 240	27
Témoin (cultivé avec showdomycine).	+	1 820	8,2
Mutant-sh.	+	2 020	8,4
Mutant + ARN rib.	+	2 045	8,5

Hybridation pendant 7 h à 66° (4) ARN/ADN = 6,3.

II. Les bactéries mutantes d'*E. coli* Hfr H (Hayes) (inductibles pour la β -galactosidase) ont été obtenues soit après 2-3 passages successifs de bactéries normales en présence de showdomycine (4-10 μ g/ml), soit en agitant à 37° pendant 1 h une population bactérienne (10⁷ bactéries/ml) en milieu synthétique 63 (1) contenant du glucose additionné de 4-10 μ g d'antibiotique/ml, suivi d'étalement des bactéries sur boîte de Petri. De nombreuses colonies (pas de mortalité à cette dose) transférées en milieu liquide 63 montrent que ces bactéries ont une croissance normale et résistent à l'action de la showdomycine ; elles ne réversent pas et restent sensibles aux phages λ et T₄. Les ARN-mr de ces bactéries ont été marqués au ³²P (le taux de marquage ne diffère pas de celui des bactéries normales et la demi-vie est de 70 s dans les deux cas) puis isolés et analysés.

Les flèches (fig. 2) indiquent le rapport des bases des ARN ; chez les bactéries mutantes l'ARN 23 S, l'ARN à marquage rapide (région entre 16 S et 5 S) et l'ARN 5 S sont modifiés ($G + A/C + U = 2$; $G = A$, $C = U$), tandis que l'ARN 16 S et l'ARN 4 S ont un rapport $G + A/C + U = 1$, identique à celui de tous les ARN chez les bactéries normales d'*E. coli*.

III. Nos efforts ont porté sur l'identification de l'enzyme qui serait responsable de la synthèse des ARN modifiés. L'activité spécifique de l'ARN polymérase dépendante d'ADN (3) chez le mutant d'*E. coli* reste, au cours de la purification, réduite (15-30 %) comparée à celle des bactéries normales (tableau II). Chaque ribonucléoside-5'-triphosphate (¹⁴C) s'incorpore avec la même efficacité dans le matériel acido-précipitable. Par contre (tableau III), les bactéries mutantes contiennent une *polynucleotide phosphorylase* qui, contrairement à l'enzyme des bactéries normales,

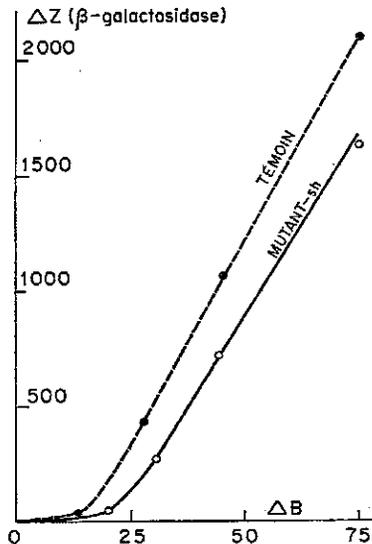


Fig. 3. — Synthèse induite par l'IPTG de la β-galactosidase chez les bactéries normales et mutantes-sh

TABLEAU II

Activité de l'ARN polymérase dépendante d'ADN (7)

Fractions	Protéines (mg)	Unités	Activité spécifique (unités/mg)	
			Témoin	Mutant-sh
1. Extrait brut.	460	2 760	6	(1,2)
2. Fraction (F ₃).	5,5	1 947	354	(63)

Unité = μMole de 1 XTP polymérisé par 1 mg d'enzyme en 10 mn à 37°.

polymérise *in vitro* deux fois plus efficacement l'ADP et le GDP que le CDP et l'UDP ; il en est de même pour cet enzyme synthétisé chez la souche normale additionnée de showdomycine. A partir d'ADP, CDP, GDP et UDP en concentration équimolaire la *polynucleotide phosphorylase* du mutant-sh synthétise *in vitro* un « AGUC » dans lequel les bases puriques sont en quantité double :

TABLEAU III

Activité de la polynucléotide phosphorylase (*)

Fractions	Protéines (mg)	Unités	Activité spécifique (unités/mg)			
			Témoin		Mutant-sh	
			ADP	CDP	ADP	CDP
1. Extrait brut	295	17,04	(0,037)	(0,040)	0,058	0,040
2. SO ₄ (NH ₄) ₂	20	14,42	(0,410)	—	0,73	—
3. « Sephadex G-200 ».	4,2	11,00	(1,10)	(1,14)	2,44	1,20

Unité = μ Mole de 1 XDP polymérisé par 1 mg d'enzyme en 30 mn à 37°.

G + A/C + U = 1,56 (témoin : G + A/C + U = 0,74). La showdomycine inhibe *in vitro* l'activité de l'ARN polymérase des bactéries normales mais non celle des bactéries mutantes (*). Elle n'agit pas *in vitro* sur la polynucléotide phosphorylase qui *in vivo* pourrait synthétiser des ARN nouveaux.

Peut-on imaginer que la quantité d'ARN messenger « normal » (15-30 %) dont disposent les bactéries mutantes peut permettre la biosynthèse active des protéines, synthétiser efficacement une enzyme induite (fig. 3), et assurer la croissance normale sans participation des ARN-mr nouveaux qui ne sont pas la copie de l'ADN.

(*) Séance du 23 juin 1969.

(1) M. BELJANSKI et M. BELJANSKI, *Comptes rendus*, 267, Série D, 1968, p. 1058.(2) H. NISHIMURA et coll., *J. Antibiotics*, 17, Série A, 1964, p. 148.(3) Y. KOMATSU et K. TANAKA, *Agr. Biol. Chem.*, 32, 1968, p. 1021.

(4) M. BELJANSKI et coll. (en préparation).

(5) U. E. LOENING, *Biochem. J.*, 102, 1967, p. 251.

(6) Le Dr K. Takeda nous a fourni les échantillons de showdomycine.

(7) M. CHAMBERLIN et P. BERG, *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 48, 1962, p. 81.(Service de Biochimie Cellulaire, Institut Pasteur,
28, rue du Docteur-Roux, 75-Paris, 15^e.)