

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE. — *Transcription par la polynucléotide phosphorylase de l'ARN associé à l'ADN d'Escherichia coli.* Note (*) de MM. **Michel Plawecki** et **Mirko Beljanski**, transmise par M. Didier Bertrand.

La polynucléotide phosphorylase partiellement purifiée à partir d'*Escherichia coli* possède la propriété de copier spécifiquement deux fractions d'ARN dont l'une se trouve associée à l'ADN.

Il est bien établi que la polynucléotide phosphorylase (PNPase) est capable de synthétiser *in vitro* des homo- et des hétéro-polymères à partir de ribonucléoside-5'-diphosphates (XDP) (1). Dans le polymère AGUC synthétisé la composition en bases reflète le rapport de chacun des XDP qu'on lui fournit (2). La nature du polymère ne semblait pas être influencée par les ARN exogènes (3). Le rôle physiologique de cette enzyme n'a pas encore été précisé malgré de très nombreuses études réalisées depuis sa découverte [(4), (5)].

Récemment nous avons mis en évidence que les bactéries mutantes d'*E. coli* résistant à la showdomycine synthétisent des ARN riches en nucléotides à bases puriques, donc non complémentaires de l'ADN (6). Or, extraite de ces mêmes bactéries, la PNPase synthétise à partir d'un mélange équimolaire de 4 XDP, un poly AGUC dans lequel les nucléotides à bases puriques sont en quantité double par rapport aux nucléotides pyrimidiques (6).

Nous montrons ici qu'*in vitro* la PNPase des bactéries sauvages utilise comme matrice un ARN porté par l'ADN (épisode à ARN) de ces mêmes bactéries ainsi que l'ARN transformant excrété par les bactéries showdomycino-résistantes. Les caractéristiques de ces ARN ont été précédemment décrites [(7), (8)].

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — La PNPase utilisée a été purifiée à partir des bactéries sauvages ou mutantes ; elle possède une activité de 50 (6) et 200 fois supérieure à celle de l'extrait brut.

Conditions d'incubation. — Le milieu réactionnel contient : Tris-HCl pH 8,1 200 µg ; MgCl₂ 5 µg ; nucléoside-5'-diphosphate 0,5 µM (2.10⁵ CPM) de chaque ; ADN 40 µg ; DNase 20 µg. Enzyme 200 µg. Volume = 0,40 ml. Incubation à 34° pendant les temps indiqués. La réaction est arrêtée par addition de TCA à 10 % (conc. finale).

ARN-épisode associé à l'ADN des bactéries sauvages ou mutantes. — Pour que la fraction d'ARN portée par l'ADN soit *in vitro* accessible à la PNPase, il faut que l'ADN ne contienne pas plus que 5-10 % d'ARN (8). Liés à l'ADN ou détachés de celui-ci (8) ces ARN particuliers sont utilisés comme matrice par la PNPase.

L'ARN transformant excrété dans le milieu de culture par les mutants showdomycino-résistants (7) peut être utilisé comme matrice par la PNPase. Cet ARN ainsi que l'ARN-épisode possède le rapport des bases G + A/C + U ≠ 2.

Analyse du polymère AGUC (^{14}C). — Le polymère synthétisé par la PNPase sans et avec matrice à ARN exogène est précipité par le TCA, lavé plusieurs fois avec ce même acide, hydrolysé et les nucléotides- ^{14}C séparés (⁹).

Les nucléotides- ^{32}P contenus dans la PNPase partiellement purifiée ont été analysés par la même méthode.

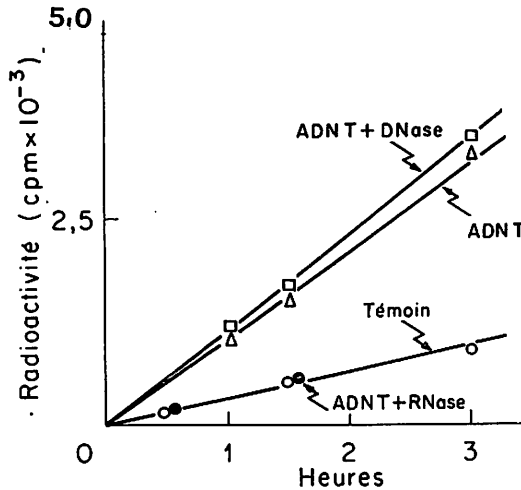


Fig. 1

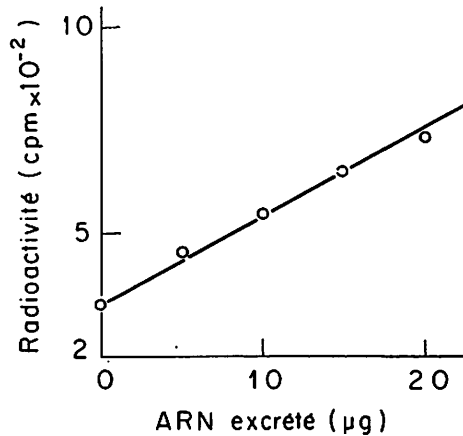


Fig. 2

Fig. 1. — Stimulation (variant selon la préparation d'ADN) de la synthèse du poly AGUC par l'ARN-épisode (T) en présence et en absence de DNase ou de RNase.

Fig. 2. — Stimulation de la synthèse du poly AGUC par l'ARN transformant excreté par les bactéries showdomycino-résistantes. Incubation 2 h à 34°.

RÉSULTATS. — 1. *Synthèse in vitro du polymère AGUC en l'absence de matrice exogène.* — En présence d'un mélange équimolaire de XDP la PNPase purifiée à partir de bactéries sauvages *E. coli* synthétise un AGUC dont le rapport $G + A/C + U \neq 1$ (tableau III). Par contre, la PNPase isolée cette fois des bactéries showdomycino-résistantes synthétise dans les mêmes conditions un AGUC dans lequel les nucléotides à bases puriques sont en quantité double (⁶).

TABLEAU I

Action des différents ARN sur la synthèse du poly AGUC par la PNPase

Enzyme et ADN des bactéries sauvages	µmoles des 4 XDP incorporés en 30 mn	µmoles de CDP incorporé en 30 mn	µmoles de XTP incorporés en 10 mn	Enzyme	µmoles des 4 XDP incorporés en 30 mn	
					ARN ribosomiques	
					T	M
Enzyme (E)	2,80	272	0,70	Enzyme	3,02	3,02
E + ADN T, 20 µg.....	—	194	0,25	E + ARN, 10 µg	3,02	3,50
E + ADN T, 20 µg + DNase	5,60	178	—	E + ARN, 20 µg	3,36	3,42
E + ADN T, 20 µg + RNase.....	3,31	—	—	E + ARN, 30 µg	3,50	3,48

Ces résultats nous ont conduits à analyser les ribonucléotides (^{32}P) présents dans les PNPases utilisées. Le rapport des bases G + A/C + U trouvé dans l'enzyme provenant des bactéries sauvages est égal à 1,0 alors que celui des bactéries mutantes a un rapport d'environ 2 (tableau II). Ces observations nous ont suggéré que certains ARN dont le rapport des bases G + A/C + U est modifié pourraient être utilisés comme matrice par la PNPase.

TABLEAU II

Rapport des bases de l'ARN-épisode des bactéries sauvages (T)
et des nucléotides présents dans la PNPase

Nucléotides	Moles pour 100 moles de nucléotides- ^{32}P analysés				
	ARN-épisode			PNPase	
	Prep. I	Prep. II	Prep. III	T	M
A	29,7	30,0	31,2	23,4	25,7
G	35,2	30,8	36,0	26,7	39,7
C	17,6	20,0	16,8	21,5	17,8
U	17,5	19,5	16,0	28,4	16,8
G + A/C + U ...	1,86	1,55	2,04	1,01	1,89

2. *Synthèse du polymère AGUC en présence de matrice exogène.* — L'ARN, riche en nucléotides puriques porté par « l'ADN très purifié » (ADN T) ⁽⁸⁾ ainsi que l'ARN excrété par les bactéries mutantes ⁽⁷⁾ stimulent fortement *in vitro* l'activité de la PNPase (bactéries sauvages) à condition que les 4 XDP soient présents (fig. 1 et 2) ; aucune stimulation n'est observée lorsque un seul XDP est utilisé (tableau I). L'effet des ARN actifs se maintient au cours de la purification de la PNPase (tableau IV). La stimulation proportionnelle à la concentration en ARN actifs (fig. 2) est supprimée par la RNase tandis que la DNase ne la ralentit pas (fig. 1). Aucune stimulation n'est obtenue en présence des ARN ribosomiques provenant tant des bactéries sauvages d'*E. coli* (G + A/C + U \neq 1) que des bactéries showdomycino-résistantes M 500 (G + A/C + U \neq 2) ⁽⁹⁾. La spécificité de la PNPase pour la fraction d'ARN portée par l'ADN semble être exclusivement partagée avec l'ARN transformant excrété ⁽⁷⁾ par les bactéries showdomycino-résistantes.

TABLEAU III

Rapport des bases des polymères synthétisés par la PNPase des bactéries sauvages d'*E. coli*

	Moles par 100 moles de nucléotides- ^{14}C				
	A	G	C	U	G+A/C+U
Enzyme (E)	23,5	26,4	22,0	27,9	1,00
E + ADN T 1 h 30	26,2	34,7	23,8	15,4	1,55
E + ADN T + DNase 1 h 30 ..	29,2	35,0	24,5	14,1	1,66
E + ADN T + DNase 2 h 30 ..	27,8	35,0	22,6	14,6	1,69
E + ARN de l'ADN T 2 h	24,0	43,4	19,4	13,2	2,06

TABLEAU IV

Effet de l'ARN-épisode sur la synthèse du Poly AGUC

Etapes de purification de la PNPase T	PNPase : activité spécifique unités/mg/30 mn	% de stimulation
Extrait brut	0,023	—
Surnageant Spinco, SO ₄ (NH ₄) ₂	0,30	185
« Séphadex G 200 » . . .	1,11	270
Gradient saccharose . .	5,55	230

La composition en nucléotides du poly AGUC synthétisé par la PNPase des bactéries sauvages en présence soit de l'ARN-épisode porté par l'ADN soit de l'ARN excrété (tableaux III et II) est comparable à celle trouvée pour les ARN utilisés comme matrice. Il s'agit d'une transcription par identité et non par complémentarité. La copie ayant lieu en présence de DNase et la préparation de PNPase étant dépourvue d'activité de l'ARN polymérase dépendant de l'ADN (tableau I) la participation de cette dernière dans la réaction est définitivement exclue. Nos observations précédentes (6) ont montré que chez les bactéries sauvages incubées en présence de showdomycine ou chez les mutants résistants à cet antibiotique l'activité de l'ARN polymérase dépendante de l'ADN est diminuée alors que celle de la PNPase est modifiée ; cette dernière synthétise *in vitro* un AGUC riche en bases puriques. Les faits que nous avons présentés ici permettent de penser que la PNPase des bactéries sauvages peut utiliser, au moment de l'action de la showdomycine ou des ARN transformants, l'ARN-épisode dont la masse moléculaire *in vivo* pourrait être ajustée par le jeu de « ligases » afin de servir de matrice pour synthétiser la série d'ARN intracellulaires non complémentaires de l'ADN, caractéristique des bactéries mutantes.

(*) Séance du 26 juillet 1971.

(1) M. GRUNBERG-MANAGO, *Annual Review of Biochemistry*, 31, 1962, p. 305.

(2) M. GRUNBERG-MANAGO, P. J. ORTIZ et S. OCHOA, *Biochim. Biophys. Acta*, 20, 1956, p. 269.

(3) P. J. ORTIZ et S. OCHOA, *J. Biol. Chem.*, 234, 1959, p. 1208.

(4) M. GRUNBERG-MANAGO et S. OCHOA, *J. Am. Chem. Soc.*, 77, 1955, p. 3165.

(5) M. N. THANG, W. GRUSCHLBAUER, H. G. ZACHAU et M. GRUNBERG-MANAGO, *J. Mol. Biol.*, 26, 1967, p. 403.

(6) M. BELJANSKI, P. BOURGAREL et M^{me} M. BELJANSKI, *Ann. Inst. Pasteur*, 118, 1970, p. 253.

(7) M. BELJANSKI, M^{me} M. BELJANSKI et P. BOURGAREL, *Comptes rendus*, 272, Série D, 1971, p. 2107.

(8) M. BELJANSKI, M^{me} M. BELJANSKI et P. BOURGAREL, *Comptes rendus*, 272, Série D, 1971, p. 2736.

(9) M. BELJANSKI, P. BOURGAREL et M^{me} M. BELJANSKI, *Proc. Nat. Acad. Sc. USA*, 68, 1971, p. 491.

Institut Pasteur,
28, rue du Docteur-Roux, 75-Paris, 15^e.