

GÉNÉTIQUE MICROBIENNE. — *ARN transformants porteurs de caractères héréditaires chez Escherichia coli showdomycino-résistant.* Note (*) de M. Mirko Beljanski, M^{me} Monique Beljanski et M. Pierre Bourgarel, présentée par M. Jacques Tréfouël.

Des ARN particuliers sécrétés par les mutants showdomycino-résistants d'*E. coli* transforment toute une population de bactéries sauvages en descendants stables exprimant les caractères des mutants.

Nous démontrons que des ARN « transformants » sont excrétés par des mutants qui ont la particularité de synthétiser les ARN intracellulaires riches en bases puriques (1). Les ARN excrétés transforment irréversiblement les bactéries sauvages en descendants qui pour l'essentiel ne se distinguent plus des mutants dont proviennent ces ARN à potentiel génétique.

ISOLEMENT ET PURIFICATION DES ARN TRANSFORMANTS. — Les bactéries, sauvages ou mutantes Sho-R d'*E. coli* (1) sont cultivées en milieu synthétique (2) en l'absence totale de showdomycine. Les ARN transformants proviennent du milieu de culture des mutants (10 litres) après centrifugation à grande vitesse. Le surnageant additionné de 2 volumes d'alcool est laissé une nuit à 4°. Après centrifugation, le précipité est dialysé, les ARN purifiés à l'aide de phénol (3) et de chloroforme, traités par la DNase, déprotéinisés, précipités par l'alcool et dialysés (rendement 200-300 µg). Les ARN sont alors séparés par électrophorèse sur gel d'acrylamide, sélectionnés et élués en présence de 4 SSC (3) à 4° (24 h), puis dialysés. Le pouvoir transformant des ARN fut déterminé sur une population de bactéries sauvages.

TRANSFORMATION PAR LES ARN ET TEST DE CONTRÔLE. — La transformation par les ARN actifs est contrôlée par la modification (rapport ribose/ultraviolet) des ARN intracellulaires, modification caractéristique des mutants Sho-R (3) ainsi que des bactéries transformées.

Les bactéries sauvages en phase exponentielle de croissance sont centrifugées et réincubées à 37° (2.10⁷ bactéries/ml) dans 5 ml de milieu synthétique neuf, glucosé, contenant 0,1 à 3 µg d'ARN transformant. Après le temps de deux générations environ les bactéries collectées sont lavées 3 fois avec 10 ml de TCA à 10 %, les ARN endogènes extraits à 100° (20 mn) en présence de 2 ml de TCA à 5 %. Après centrifugation on détermine sur une partie du surnageant la quantité de ribose des ARN à l'aide d'orcinol (4) et sur l'autre l'absorption à 260 nm. Le rapport arbitraire : [Divisions lues à 670 nm (ribose)]/[Divisions lues à 260 nm (absorbance)] fait savoir si les bactéries sont transformées, et synthétisent les ARN intracellulaires riches en AMP et GMP (3) comme les bactéries Sho-R (1). Les protéines ribosomiques et enzymatiques des « transformés » sont analysées comme précédemment décrit (1).

RÉSULTATS. — Les ARN endogènes du mutant M 500 Sho-R sont sans effet sur les bactéries sauvages alors que les ARN excrétés par ce même mutant conduisent

à l'apparition des « transformés » chez lesquels le rapport ribose/ultraviolet se trouve fortement augmenté (tableau I). De tous les ARN excrétés, seuls ceux ayant des masses moléculaires comprises entre 5,5 et 6,5 S (fig. 1) sont transformants. Pour un temps déterminé et pour une quantité donnée de bactéries, la transformation est fonction de la concentration en ARN actifs (fig. 2). La RNase pancréatique détruit leur potentiel génétique. Par contre, la DNase est sans effet.

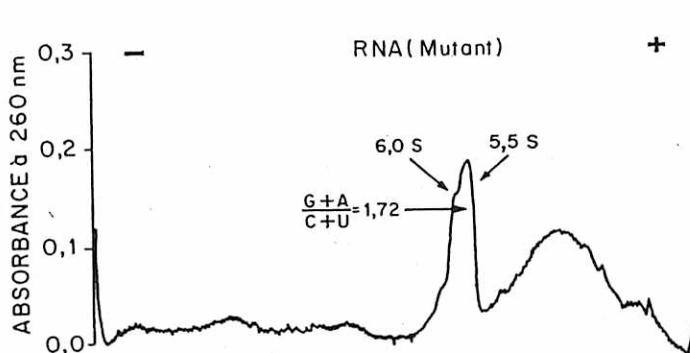


Fig. 1. — ARN purifiés du milieu de culture du mutant M 500 Sho-R séparés par électrophorèse sur gel d'acrylamide (4,5 %)

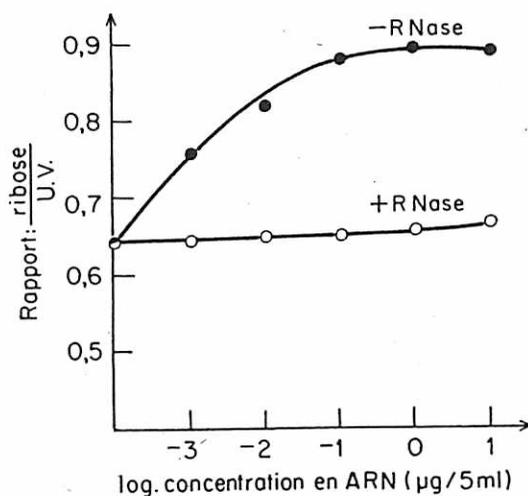


Fig. 2. — Effet de différentes concentrations en ARN à potentiel génétique sur la transformation d'*E. coli* Hfr sauvage

CARACTÈRES ÉTUDIÉS CHEZ LES TRANSFORMÉS. — 1. Les « transformés » présentent des clones homogènes qui ne réversent pas et qui, à leur tour sécrètent les ARN transformants ; 2. Les ARN endogènes (ribosomiques et l'ARN à marquage rapide) des transformés contiennent les bases puriques en excès (tableau II), comme les ARN endogènes des mutants Sho-R (¹) ; 3. La présence d'ARN intracellulaires modifiés se traduit chez les transformés par l'apparition des protéines ribosomiques altérées (fig. 3), modification précédemment observée chez les mutants Sho-R (¹) ; 4. La poly-nucléotide phosphorylase (PNPase) des transformés synthétise *in vitro* à partir de

quatre ribonucléoside-5'-diphosphates en quantité équimolaire un AGUC dans lequel les bases puriques sont en quantité double (tableau III), caractéristique très importante de la PNPase des mutants Sho-R⁽³⁾; 5. Le caractère « résistance à la showdomycine » n'est que très faiblement transmis.

TABLEAU I

Transformation des bactéries sauvages de différentes souches d'E. coli en présence d'ARN sécrétés par le mutant M 500 Sho-R d'E. coli Hfr (H)

Souches réceptrices	ARN transformant	Rapport ribose/ultraviolet	Différence (%)	ARN totaux endogènes (mutant M 500 Sho-R)	Rapport ribose/ultraviolet	Différence (%)
Hfr (H)	sans	0,64	—	sans	0,66	—
	+ 0,1 µg	0,90	40	+ 1 µg	0,67	1,5
	+ 2,0 µg	0,93	45	+ 10 µg	0,68	3,2
F ⁻ PA 3092 (*)	sans	0,60	—	sans	0,60	—
	+ 0,1 µg	0,62	3	+ 1 µg	0,62	3,0
	+ 2,0 µg	0,62	3	+ 10 µg	0,61	1,6
F ⁻ RV (8)	sans	0,67	—	sans	0,67	—
	+ 0,1 µg	0,89	32	+ 1 µg	0,69	3,0
	+ 2,0 µg	0,95	40	+ 10 µg	0,68	1,6

(*) Souches fournies par M. le Dr Y. Hirota, Institut Pasteur, Paris.

TABLEAU II

Rapport des bases des ARN ribosomiques et de l'ARN-m d'E. coli mutant M 500 Sho-R (M) et transformés (Tr)

Bases	Moles pour 100 moles de nucléotides analysés					
	ARN 23 S		ARN 16 S		ARN-m	
	M	Tr	M	Tr	M	Tr
A	31,0	31,3	32,0	29,5	31,3	29,8
G	34,3	35,3	35,0	36,3	34,5	34,6
C	17,7	16,6	16,7	17,8	16,8	17,9
U	16,1	16,3	16,3	16,4	17,4	17,6
G + A/C + U	1,96	1,98	2,01	1,93	1,93	1,80
G + C/A + U	1,10	1,09	1,07	1,15	1,05	1,08

Le rapport des bases chez les bactéries sauvages : G + A/C + U ≠ 1,13 (1).

TABLEAU III

Activité de la polynucléotide phosphorylase des bactéries témoins (T), mutantes M 500 Sho-R (M) et transformées (Tr) d'E. coli Hfr

	Activité spécifique (unités/mg de protéines)			Rapport G + A/C + U dans l'AGUC synthétisé <i>in vitro</i>		
	T	M	Tr	T	M	Tr
	1. Extrait brut	0,040	0,068	0,063	—	—
2. « Séphadex G 200 »...	1,17	2,48	2,36	0,80	1,64	1,74

La transformation par les ARN, que ceux-ci proviennent de souches mutantes Sho-R ♂ ou ♀, s'opère chez les bactéries de la même espèce, mâles, femelles ou neutres. La non-transformation de certaines souches (tableau I) peut être due soit à l'imperméabilité de la membrane, soit à la présence d'une RNase.

Les ARN sécrétés par les mutants d'*E. coli* (ML 30 Sho-R) font apparaître chez *Agrobacterium tumefaciens* B₆ des modifications, dont certaines au niveau de son pouvoir oncogène chez les plantes (5).

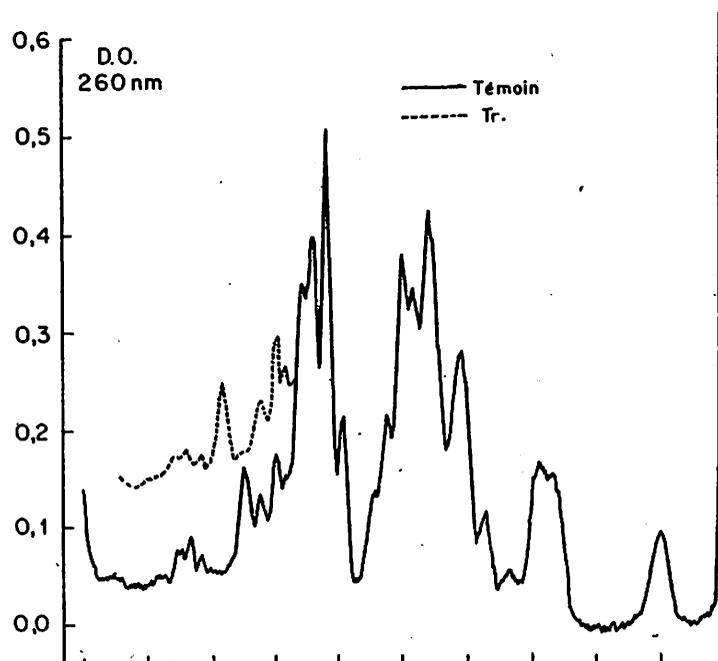


Fig. 3. — Tracés densitométriques des protéines ribosomiques 70 S.
Témoins = bactéries sauvages ; Tr = transformés par les ARN

En pénétrant les bactéries sauvages et apportant des informations du mutant dont ils proviennent, les ARN transformants pourraient s'associer à ce qui semble constituer un épisode à ARN (6). Un mécanisme de transcription serait alors mis en œuvre (7) permettant la synthèse des ARN dans lesquels les nucléotides à bases puriques sont en excès. Des ARN porteurs de caractères héréditaires sont à leur tour excrétés, ne laissant ainsi aucune chance au processus de réversion de se réaliser.

(*) Séance du 29 mars 1971.

(1) M. BELJANSKI, P. BOURGAREL et M^{me} M. BELJANSKI, *Proc. Natl. Acad. Sc. U. S.*, 68, 1971, p. 491.

(2) A. B. PARDEE, F. JACOB et J. MONOD, *J. Mol. Biol.*, 1, 1959, p. 165.

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

(4) M. BELJANSKI, *Ann. Inst. Pasteur*, 76, 1949, p. 451.

(5) M^{me} M. BELJANSKI, P. MANIGAULT et M. BELJANSKI (en préparation).

(6) M. BELJANSKI, M^{me} M. BELJANSKI et P. BOURGAREL (en préparation).

(7) M. PLAWECKI et M^{me} M. BELJANSKI (en préparation).

(Service de Biochimie Cellulaire, Institut Pasteur,
28, rue du Docteur-Roux, 75-Paris, 15^e.)