

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE. — *Synthèse in vitro de l'ADN sur une matrice d'ARN par une transcriptase d'Escherichia coli*. Note (*) de M. Mirko Beljanski, présentée par M. Pierre Lépine.

Sur une matrice d'ARN, une transcriptase isolée et partiellement purifiée à partir de bactéries d'*E. coli* polymérise *in vitro* les désoxyribonucléoside-5'-triphosphates en ADN complémentaire.

Des travaux récents [(¹) à (⁴)] ont confirmé l'hypothèse de Temin (⁵) selon laquelle une transcriptase serait capable de synthétiser sur le modèle d'un ARN viral (ARN des virus oncogènes) un ADN capable de s'intégrer dans le génome cellulaire, provoquant ainsi la transformation des cellules. Une telle transcriptase semble faire partie des virus eux-mêmes ; celle du virus de la myéloblastose aviaire peut de plus copier « l'ARN messager » de l'hémoglobine en ADN complémentaire (⁶). Signalons enfin que l'ADN polymérase dépendante de l'ADN purifiée d'*E. coli* utiliserait certains polyribonucléotides pour synthétiser des désoxyribopolymères [(⁷), (⁸)].

Nous avons cherché les conditions permettant de mettre en évidence l'existence d'une transcriptase de l'ARN en ADN chez *E. coli* K 12 Hfr car ces bactéries possèdent des ARN transformants capables de provoquer chez les bactéries de diverses espèces l'apparition de nouvelles propriétés physiologiques et biochimiques stables, telle, chez *Agrobacterium tumefaciens*, la perte du pouvoir oncogène (⁹). Les résultats de ces recherches sont résumés ci-dessous.

La polymérisation *in vitro* des désoxyribonucléoside-5'-triphosphates (d-XTP) peut être détectée lorsqu'après centrifugation des extraits bactériens (105 000 g) le surnageant est débarrassé des ARN endogènes et utilisé comme source d'enzyme. Après passage de celui-ci sur colonne de DEAE (élution : tampon Tris 10⁻² M, KCl : 0-0,5 M) ou « Sephadex G 200 », l'activité de l'enzyme devient alors strictement dépendante de la présence de l'ARN actif.

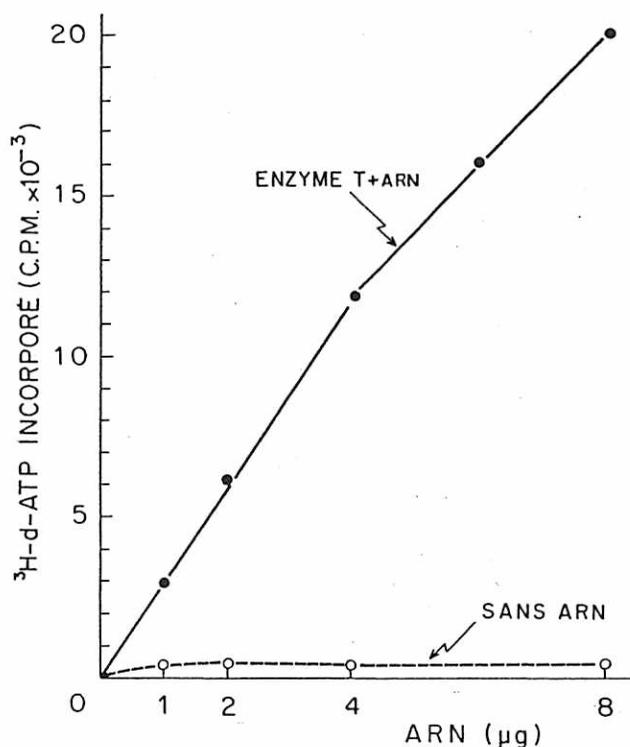
Le milieu d'incubation contient par 0,2 ml : MgCl₂, 2 μM, tampon Tris-HCl, 30 μM (pH 7,65) ; chaque d-XTP, 5 nmoles + d-ATP ³H ou d-TTP ³H (100 000 cpm) ; ARN, 4 μg ; fraction DEAE (enzyme), 30-40 μg. Incubation 20 mn (sauf indication) à 37°. La réaction est arrêtée par l'acide trichloracétique (ATC, 10 % conc. finale) ; après 10 mn à 0°, l'entraîneur (albumine du sérum) est ajouté et le mélange filtré sur filtre Whatman GF/C, lavé avec l'ATC, séché et la radioactivité déterminée dans le spectrophotomètre Packard. Les résultats sont exprimés soit en cpm soit en pmoles de ³H-nucléotide incorporé.

TABLEAU I. — Quantité de ³H d-ATP incorporé dans le produit macromoléculaire en 20 mn dans diverses conditions

pmoles		pmoles		Inhibition (%)
Milieu complet	411	Milieu complet	418	—
— ARN transformant ..	< 1	+ DNase, 5 μg	< 1	99
— MgCl ₂	< 2	+ RNase, 20 μg sans préinc.	230	40
— d-GTP	136	+ RNase, 20 μg, préinc.	43	90
— d-CTP	125	+ showdomycine, 50 μg	105	75
— d-GTP, d-CTP, d-TTP.	< 1	+ showdomycine, 50 μg (enzyme M).	420	0

TABLEAU II. — *Activité de la transcriptase de l'ARN en ADN en présence de diverses matrices*

	pmoles de $^3\text{Hd-ATP}$ et de $^3\text{H d-TTP}$ incorporés (20 mn)	
Milieu complet avec ARN transformant du mutant M 500	402	656
Milieu complet avec ARN excrété par <i>E. coli</i> sauvage	392	400
Milieu complet avec ARN 23 S + 16 S d' <i>E. coli</i>	< 1	< 1
Milieu complet avec ARN transfert total d' <i>E. coli</i>	< 1	< 1
Milieu complet avec ARN 5,5 S d' <i>A. faecalis</i>	145	136
Milieu complet avec Poly AG + poly UC	< 1	< 1
Milieu complet avec ARN viral (myéloblastose aviaire)	< 2	—
Milieu complet avec ADN d' <i>E. coli</i> sauvage	98	—
Milieu complet avec ADN (prétraité par la RNase) d' <i>E. coli</i> sauvage...	2	—

Fig. 1. — Enzyme d'*E. coli* sauvage incubé 20mn sans et avec ARN transformant du mutant M 500

Le tableau I montre que la présence simultanée des 4 d-XTP est indispensable à l'incorporation maximale de d-ATP- ^3H dans le produit acido-précipitable. L'absence d'un des quatre d-XTP se traduit par une diminution considérable de produit- ^3H synthétisé alors qu'un seul d-XTP- ^3H ne semble pas être polymérisé.

Les divers types d'ARN, dont les ARN transformants, ont été purifiés comme précédemment décrit⁽⁹⁾. Ces derniers ne contiennent pas d'ADN⁽¹⁰⁾. Par contre les ADN étaient toujours contaminés par de l'ARN. Parmi les matrices utilisées (tableau II) les ARN excrétés d'*E. coli* sauvage et l'ARN transformant du mutant M 500⁽⁹⁾ sont les meilleurs pour la transcriptase. De plus un ARN particulier 5,5 S d'*Alcaligenes faecalis*⁽¹¹⁾, ARN enrichi en ARN « messenger », est actif dans la polymérisation des d-XTP. La faible activité que semble présenter l'ADN disparaît après

traitement de celui-ci par la RNase. Ni l'ARN ribosomique ni l'ARN 4 S de ces mêmes bactéries, ni les poly AG + poly UC ne sont transcrits dans ces mêmes conditions. La préincubation de l'ARN modèle en présence de RNase (chauffée) conduit à une diminution considérable de l'incorporation du d-ATP-³H. La DNase ne permet pas la synthèse du désoxyribopolymère (tableau I). La showdomycine, antibiotique d'origine naturelle, inhibe fortement (tableau I) l'activité de la transcriptase des bactéries sauvages et non celle des bactéries showdomycino-résistantes.

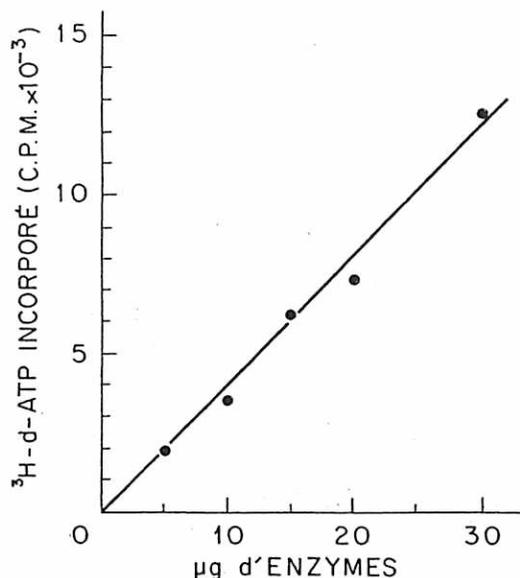


Fig. 2. — Enzyme d'*E. coli* sauvage incubé 20 mn avec 4 µg d'ARN transformant du mutant M 500

Les figures 1 et 2 illustrent la proportionnalité existant entre la quantité de polymère synthétisé et les concentrations, d'une part en ARN et d'autre part en enzyme. La synthèse du polymère, strictement dépendante de l'ARN, est linéaire en fonction du temps.

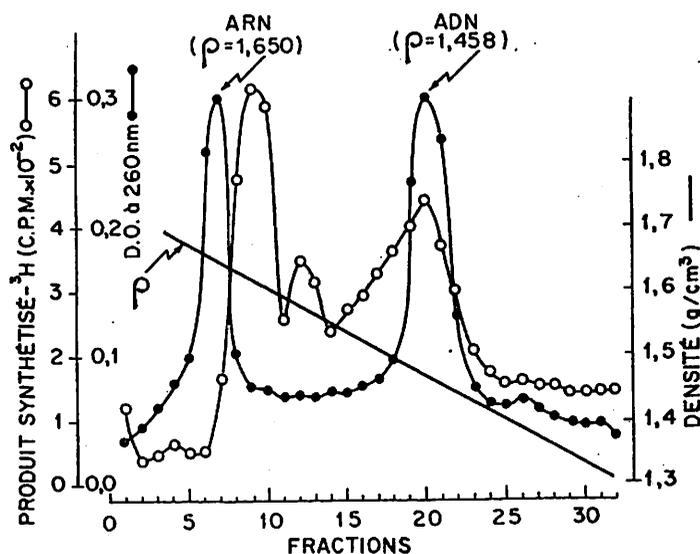
Le rapport entre la concentration en ions Mg^{++} et la quantité de polymère synthétisé doit être déterminé. Le Mn^{++} ne remplace que partiellement le Mg^{++} . Le pH optimal est 7,65 et la marge fort étroite.

Le polymère-³H synthétisé est dégradé par la DNase et pas du tout par la RNase ou KOH (tableau III). Après ultracentrifugation du polymère ³H sur gradient de densité (Cs_2SO_4) on trouve environ 25 % de radioactivité au niveau de l'ADN, marqueur libre ($p = 1,435$) alors que le reste (probablement hybride ARN-ADN-³H) occupe la région entre l'ADN et l'ARN marqueur (fig. 3).

Le désoxyribopolymère synthétisé est-il la copie complémentaire de l'ARN utilisé comme, matrice ? Le rapport A/U de l'ARN transformant d'*E. coli* est 1,57 et dans le désoxyribopolymère synthétisé en sa présence, le rapport T/A = 1,58 (moyenne) (tableau IV). Or en prenant comme modèle l'ARN 5,5 S d'*A. faecalis* dont le rapport A/U = 0,95 nous obtenons un désoxypolymère dans lequel le rapport

TABLEAU III. — Propriétés du ^3H désoxyribopolymère synthétisé en présence d'ARN transformant

Traitement	^3H désoxypolymère (CPM) acido- précipitable	%
Sans	1 230	100
Par RNase, 50 μg , 10 mn à 20°	1 197	99,5
Par DNase, 50 μg , 10 mn à 20°	250	20
Par pronase, 10 mn à 20°	1 226	100
Par KOH 0,3 M (30 mn à 80°)	1 210	100

Fig. 3. — Gradient de Cs_2SO_4 (densité 1,550 g/cm^3), pH 7,7 : désoxyribopolymère ^3H synthétisé en 30 mn, + ARN et ADN marqueurs. Centrifugation 60 h à 20 °C à 30 000 tr/mnTABLEAU IV. — Rapport A/U des ARN modèle(s) et du d-T/d-A du désoxypolymère ^3H synthétisé

Moles pour 100 moles de nucléotides	Rapport A/U	Rapport d-T/d-A du ^3H polymère			
ARN d' <i>E. coli</i> M ₅₀₀ : A = 29,0 ; G = 34,0 ; C = 19,0 ; U = 18,0	1,57	1,62 (exp. I)	1,54 (exp. II)	1,58 (exp. III)	
ARN 5,5 S d' <i>A. faecalis</i> : A = 16,2 ; G = 34,5 ; C = 32,0 ; U = 17,3	0,95	0,96	—	0,89	—

T/A = 0,94 (moyenne) (tableau IV). Ces résultats et ceux illustrés par la figure 3 nous permettent de considérer que l'ADN synthétisé par une transcriptase bactérienne pourrait bien être la copie complémentaire de l'ARN utilisé comme matrice.

(*) Séance du 24 avril 1972.

- (1) H. TEMIN et S. MIZUTANI, *Nature*, 226, 1970, p. 1211.
- (2) D. BALTIMORE, *Nature*, 226, 1970, p. 1209.
- (3) S. SPIEGELMAN et coll., *Nature*, 226, 1970, p. 563.
- (4) M. ROKUTANDA et coll., *Nature*, 227, 1970, p. 1026.
- (5) H. M. TEMIN, *Nat. Cancer. Inst. Monog.*, 17, 1964, p. 557.
- (6) J. ROSS et coll., *Nat. Ac. Sc. US*, 69, 1972, p. 264.
- (7) L. F. CAVALIERI et E. CAROLL, *Nature*, 232, 1971, p. 254.
- (8) J. D. KARKAS et coll., *Proc. Nat. Acad. Sc. US*, 69, 1972, p. 398.
- (9) M. BELJANSKI et coll., *Proc. Nat. Ac. Sc. US*, 69, 1972, p. 191.
- (10) M. BELJANSKI et coll., *Comptes rendus*, 272, Série D, 1971, p. 2107.
- (11) M. BELJANSKI et P. BOURGAREL, *Comptes rendus*, 266, Série D, 1968, p. 845.

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