

63

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE. — Séparation de la transcriptase inverse de l'ADN polymérase ADN dépendante. Analyse de l'ADN synthétisé sur le modèle de l'ARN transformant. Note (*) de M. Mirko Beljanski, présentée par M. Pierre Lépine.

La transcriptase inverse d'*E. coli*, physiquement séparée de l'ADN polymérase ADN dépendante, synthétise *in vitro*, sur le modèle de l'ARN transformant, un ADN. Cet ADN est complémentaire de l'ARN et possède une masse moléculaire identique.

Nous avons brièvement décrit l'existence d'une enzyme présente dans le surnageant $105\,000 \times g$ d'*E. coli* qui, en présence des 4 désoxy ribonucléoside-5'-triphosphates (d-XTP) et d'un ARN transformant [(1), (2)] synthétise un produit acido-précipitable possédant les caractéristiques de l'ADN (3).

Nous démontrons ici que la transcriptase inverse, aisément séparable de l'ADN polymérase ADN dépendante chez *E. coli* sauvage ou mutant sho-R (1), se trouve sous 2 formes : libre et associée à un ARN. L'ADN synthétisé par la transcriptase inverse a été analysé.

Les extraits des bactéries sont préparés comme décrit (2). Les débris cellulaires et les ribosomes sont éliminés soit par centrifugation à $105\,000 \times g$ soit par précipitation à l'aide de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (28 %) (pH maintenu à 7,4). Les protéines du surnageant sont précipitées par $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (50 %), dialysées, adsorbées sur colonne de « DEAE » cellulose (0,90 mEq/g) puis éluées par un gradient linéaire : Tris-HCl 10^{-2} M (pH 7,3) — Tris-HCl 10^{-2} M (pH 7,3) + KCl 0,5 M + MgCl_2 10^{-4} M + mercaptoéthanol 10^{-3} M. La polymérisation des 4 d-XTP- ^3H fut recherchée dans chacune des fractions (prise 0,05 ml) en l'absence et en présence d'ARN transformant et d'ADN de thymus, utilisés séparément.

Le milieu d'incubation (0,2 ml) contenait : Tris-HCl 10^{-2} M (pH 7,65) : 25 μMoles ; MgCl_2 : 2 μMoles ; d-ATP, d-TTP, d-CTP, d- ^3H -GTP, 50 000 cpm : 5 nMoles de chacun. ARN transformant ou ADN de thymus : 2 μg . Incubation à 36° pendant 20 mn. La radioactivité du matériel acido-précipitable lavé est déterminée à l'aide d'un compteur à scintillation.

RÉSULTATS. — La figure 1 montre les fractions de la colonne de DEAE cellulose contenant les enzymes qui polymérisent les d-XTP.

Région I : Transcriptase inverse liée à l'ARN. — L'activité endogène de cette enzyme (fig. 1, région I) est très forte (tableau I). Elle dépend d'un ARN associé à l'enzyme elle-même ; l'activité disparaît en présence de RNase ne contenant pas de DNase. L'addition d'ARN ou d'ADN exogène est sans effet sur cette transcriptase inverse qui présente certaines analogies avec celle isolée des cellules normales d'embryons de Poulet (4).

Région II : La transcriptase inverse libre est essentiellement présente dans les fractions de la région II qui chevauchent en partie avec celles de la région III. En

TABLEAU I. — *Activité de la transcriptase inverse des bactéries mutantes E. coli M 500 Sho-R (pmoles de d-XTP-³H incorporés en 20 mn ; 60 µg de protéines)*

Enzyme liée à l'ARN		Enzyme libre	
Milieu complet	330	Milieu complet	222
Milieu + RNase pancréatique (30 µg) ..	92	Milieu — ARN transformant	< 1
Milieu + RNase T ₁ (20 µg)	11	Milieu — ARN de la transcriptase liée	< 1
Milieu + ARN transformant (2 µg)	321	Milieu — d-CTP, d-TTP, d-ATP	< 2
Milieu + ADN de thymus (2 µg)	326	Milieu + RNase pancréatique et T ₁ (20 µg de chaque)	23
Milieu + rifampicine 20 µg	164	Milieu + rifampicine 20 µg	80
Milieu + N-déméthylrifampicine 20 µg ..	172	Milieu + N-déméthylrifampicine 20 µg	89
Milieu + actinomycine D 2,5 µg	145	Milieu + actinomycine D 2,5 µg	110

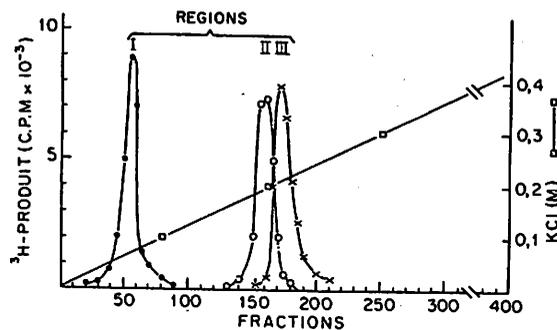


Fig. 1. — Éluat des protéines d'*E. coli* M 500 sho-R (colonne DEAE cellulose). Région I : transcriptase inverse liée ; région II : transcriptase inverse libre ; région III : ADN polymérase ADN dépendante.

présence des 4 d-XTP, l'activité endogène de la transcriptase inverse libre (région II) est très faible. L'addition d'un ARN transformant ou de l'ARN isolé à partir de la transcriptase inverse I (tableau I) permet la synthèse d'ADN. La RNase pancréatique et T₁ détruisent la matrice et l'activité ne s'exprime plus. La rifampicine et la N-déméthylrifampicine (6) inhibent l'activité des transcriptases inverses (tableau I) sans pour autant affecter celle de l'ADN polymérase ADN dépendante (7). Par contre, l'actinomycine D inhibe l'activité de ces 2 enzymes.

Région III : ADN polymérase ADN dépendante. — L'éluat de cette région contient essentiellement l'ADN polymérase ADN dépendante et une certaine activité de la transcriptase inverse libre due au chevauchement des courbes (régions II et III).

Nature de l'ARN lié à la transcriptase inverse I. — Détaché de la transcriptase inverse (région I) par des procédés classiques (2) l'ARN ne contient pas d'ADN (tableau II). Sa composition en nucléotides est proche de celle de l'ARN transformant ou épisomal (1) (tableau III) contenant les bases puriques en excès et ayant

TABLEAU II. — Analyse de l'ARN lié à la transcriptase inverse (région I)

	Dosage			Réaction à la diphénylamine (ADN)
	260/280 nm	par absorption à 260 nm	par ribose	
ARN purifié .	2,11	406 µg	501 µg	non détectable

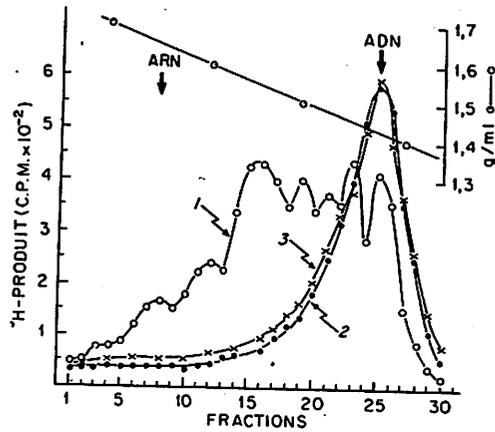


Fig. 2. — Synthèse *in vitro* à 68° d'un hybride : 1. Hybride ADN-³H-ARN-transformant ; pas d'hybride formé entre l'ADN-³H et l'ARN ribosomique d'*E. coli* sho-R, 2 ni avec l'ADN 3

une masse moléculaire d'environ 6 S. La transcriptase inverse libre peut utiliser cet ARN comme matrice pour synthétiser l'ADN (tableau I).

Complémentarité entre l'ADN-³H synthétisé et son modèle, l'ARN transformant d'*E. coli*. — L'ADN-³H a été synthétisé par la transcriptase inverse libre en utilisant l'ARN transformant excrété par les bactéries *E. coli* M'500 Sho-R (²). Après purification de l'ADN-³H, l'analyse (tableau III) montre que les nucléotides-³H constituant l'ADN-³H sont en rapport complémentaire avec l'ARN transformant. D'autre part, l'hybride synthétique formé par chauffage à 68° (³) de l'ADN-³H et de l'ARN transformant, sédimente sur gradient de Cs₂SO₄ dans la région de densité située entre l'ARN et l'ADN. Il s'agit de l'hybride ADN-³H-ARN (fig. 2). Par contre l'ADN-³H ne s'hybride ni avec l'ARN ribosomique ni avec l'ADN total d'*E. coli* M 500 Sho-R.

La masse moléculaire de l'ADN-³H synthétisé par la transcriptase inverse d'*E. coli* en présence d'ARN transformant a été déterminée sur gradient de saccharose après traitement de l'ADN-³H par la soude 0,3 M pendant 16 h à 24 °C. Le coefficient de sédimentation est d'environ 6 S, valeur identique à celle trouvée pour

TABLEAU III. — Rapport des bases de l'ARN transformant et de l'ADN synthétisé par la transcriptase inverse sur le modèle de l'ARN transformant

Nucléotide	moles pour 100 moles de nucléotides			
	ARN transformant	ARN lié à la transcriptase inverse	³ H-ADN synthétisé	ADN d' <i>E. coli</i>
A	31,1	32,5	17,3	24,5
G	33,0	36,0	18,8	24,8
C	18,0	16,0	30,8	24,6
U (T)	17,8	15,5	33,1	26,1
	$\frac{G+A}{C+U} = 1,76$	$\frac{G+A}{C+U} = 2,1$	$\frac{C+T}{G+A} = 1,74$	$\frac{C+T}{G+A} = 1,01$

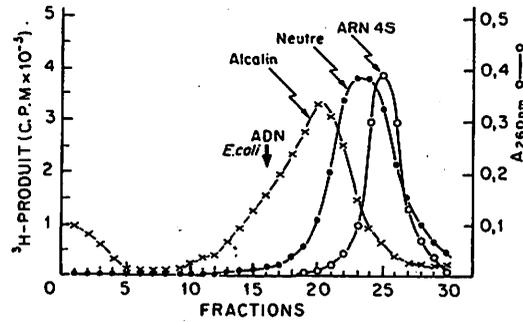


Fig. 3. — Profil de l'ADN-³H synthétisé par la transcriptase inverse libre. Gradient de saccharose (pH neutre et alcalin)

l'ARN transformant lui-même⁽²⁾, ce qui correspond à une masse moléculaire $1,6 \times 10^5$ (fig. 3).

Signalons qu'un ARN riche en purines vient d'être découvert comme étant indispensable pour la synthèse de l'ADN du phage $\Phi \times 174$ ⁽³⁾, ce qui trace une intéressante analogie de mécanisme avec nos résultats montrant l'existence chez *E. coli* d'ARN transformants riches en purines⁽⁴⁾ et d'une transcriptase inverse capable de transcrire ces ARN en ADN complémentaires.

(*) Séance du 19 février 1973.

(1) M. BELJANSKI et coll., *Comptes rendus*, 272, Série D, 1971, p. 2107 et 2736.

(2) M. BELJANSKI, P. MANGAULT et coll., *Proc. Nat. Acad. Sc. USA*, 69, 1972, p. 191.

(3) M. BELJANSKI, *Comptes rendus*, 274, Série D, 1972, p. 2801.

(4) C. Y. KANG et H. TEMIN, *Proc. Nat. Acad. Sc. USA*, 69, 1972, p. 1550.

(5) M. BELJANSKI et M. PLAWECKI, Academic Press (sous presse).

(6) N-déméthylrifampicine AF/ABDP cis L. 9254 nous a été fourni par Gruppo Lepetit, Milan.

(7) R. SCHERMAN et coll., *Proc. Nat. Acad. Sc., USA*, 69, 1972, p. 2691.

Service de Biochimie Cellulaire,
Institut Pasteur,
28, rue du Docteur-Roux, 75015 Paris.