

ANNALES  
DE  
L'INSTITUT PASTEUR

**SHOWDOMYCINE ET BIOSYNTHÈSE D'ARN  
NON COMPLÉMENTAIRES DE L'ADN. - I (\*)**

par M. BELJANSKI, P. BOURGAREL et M<sup>me</sup> M. BELJANSKI (\*\*)

(Service de Biochimie Cellulaire, Institut Pasteur)

SUMMARY

Showdomycin, even at concentrations which do not affect bacterial growth, causes in *E. coli*, *B. cereus* and *A. faecalis*, a massive biosynthesis of rapidly labelled RNAs, which are no longer complementary to DNA. In addition in *E. coli*, the more thoroughly investigated organism, even non-inhibitory concentrations of the antibiotic provoke the synthesis of ribosomal 23 S RNA with a base ratio very different (excess of A and G nucleotides), from that of 16 S RNA and 4 S RNA. A similar change in RNA composition is observed in a showdomycin resistant mutant of *E. coli*, the growth rate of which is not lower than that of the wild type. RNA polymerase DNA dependent from the mutant has a very reduced specific activity; polynucleotide phosphorylase from the same mutant has new properties. Polynucleotide phosphorylase could *in vivo* be responsible for the synthesis of the modified RNAs.

INTRODUCTION

Les gènes qui, chez les bactéries, gouvernent la biosynthèse des ARN ribosomiques [1, 2, 3] et des ARN de transfert [4, 4, 5] sont généralement considérés comme distincts des gènes responsables de la biosynthèse des ARN messagers [6, 7] et de la régulation de l'information génétique [8, 9]. Tous les types d'ARN seraient synthétisés *in vivo* par l'ARN polymérase sur le modèle de l'ADN [1, 10, 11] en respectant la complémen-

(\*) Ce travail a bénéficié de l'aide du Commissariat à l'Énergie Atomique, du Centre National de la Recherche Scientifique, de la Délégation à la Recherche Scientifique et Technique.

(\*\*) Manuscrit reçu le 17 juillet 1969.

tarité des bases. Dans les espèces étudiées [12, 28], les ARN ribosomiques de diverses origines ont pratiquement la même composition en bases, alors que le rapport des bases des ARN « messagers » varie selon les espèces. Les ARN « messagers » possèdent deux caractéristiques aisément contrôlables : a) le rapport des bases G + C/A + U identique à celui des nucléotides constituant l'ADN homologue (G + C/A + T); b) les ARN « messagers » s'hybrident avec l'ADN homologue [3, 7].

En poursuivant nos recherches sur la biosynthèse des chaînes polypeptidiques, synthèse qui dépend de certains ARN [13], nous avons mis en évidence qu'un nucléoside naturel, la showdomycine [17] fait apparaître chez plusieurs espèces bactériennes une large fraction (80 p. 100) d'ARN à marquage rapide, qui, d'après les deux critères cités, ne serait pas la copie de l'ADN. Toutefois une faible fraction (20 p. 100) reste normale et caractéristique de chaque espèce. De plus, la showdomycine permet chez *Escherichia coli* la synthèse de l'ARN ribosomique 23 S, dont le rapport des bases diffère nettement de celui de l'ARN 16 S et de l'ARN 4 S. Le phénomène observé en présence de showdomycine s'observe également chez un mutant d'*E. coli* résistant à cet antibiotique et cultivé en son absence. Deux notes préliminaires ont été publiées à ce sujet [14, 19].

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

PRODUITS UTILISÉS (1). —  $H_3PO_4$  marqué au  $^{32}P$  et showdomycine- $^3H$  ( $1\mu C/\mu mole$ ): Commissariat à l'Énergie atomique; showdomycine fournie aimablement par le Dr K. Takeda, *Shionagi Research Laboratory, Osaka, Japon*, et *Pabst Company, U.S.A.*; ATP, UTP, ADP, UDP: Duchapt-Caron, Montrouge, France; CTP, GTP, CDP, GDP: *Pabst Company*; acrylamide A x 330: *Matheson Coleman and Bell, Norwood (Cincinnati) Ohio*; N, N'-méthylène-bisacrylamide (Bis): *Canal Industrial Corporation, Rockeville, Md., U.S.A.*;  $^{14}C$ -uracile et  $^{14}C$ -adénine (Act. sp. 10 mc/mM et 20 mc/mM): *Commissariat à l'Énergie Atomique*;  $^{14}C$ -ribonucléoside-5' diphosphates (activité spécifique de 21-240 mc/mM), et  $^{14}C$ -ribonucléoside-5'-triphosphates (activité spécifique de 21-244 mc/mM), Poly A-G (1,6: 1,0) *Schwarz Bioresearch Inc.*; thymidine-2- $^{14}C$ , (act. sp. 33 mc/mM.) *C.E.N. SCK, Mol, Belgique*; sodium lauryl sulfate pur, *Serlabo, Paris*; saccharose, *Kuhlmann, Paris*.

SOUCHES BACTÉRIENNES. — Les bactéries *Escherichia coli* HFr H (Hayes) ont été cultivées à 37° C en milieu synthétique [15], *Bacillus cereus* en ce même milieu additionné de 0,5 p. 100 d'extrait de levures et *Alcaligenes faecalis* n° 8750 à 32° en milieu « trypticase » Difco [16]. Les bactéries ont été prélevées en phase exponentielle de croissance.

SHOWDOMYCINE ET CROISSANCE DES BACTÉRIES. — En milieu synthétique, 1-3  $\mu g$  d'antibiotique/ml n'affectent pas la croissance ( $10^7$  bactéries/ml au départ) tandis que 5-10  $\mu g$ /ml l'arrêtent temporairement. En milieux riches (*A. faecalis*, *B. cereus* ou *E. coli*), des doses supérieures à 10  $\mu g$ /ml sont nécessaires pour arrêter la

### (1) Abréviations :

ARN, acide ribonucléique; ADN, acide déoxyribonucléique; TCA, acide trichloroacétique; ATP, UTP, CTP, GTP: adénine-, uridine-, cytidine-, guanosine-triphosphates; ADP, UDP, CDP, GDP: adénine-, uridine-, cytidine-, guanosine-diphosphates (X = base). Sh, showdomycine; RNase, ribonucléase pancréatique; DNase, déoxyribonucléase; SSC, *Standard Saline Citrate* [21].

croissance, car certaines substances à groupes SH agissent comme antagonistes de l'action de la showdomycine [47].

LES RIBOSOMES ont été isolés selon la méthode de Nirenberg [48], dialysés contre du tampon tris  $10^{-2}$ M pH 7,6 contenant du  $MgCl_2$   $10^{-4}$ M et du mercaptoéthanol  $10^{-3}$ M, puis séparés sur gradient de saccharose (5 à 20 p. 100 dans ce même tampon) pendant 2 h à 39 000 t/mn dans le rotor Spinco SW<sub>39</sub>, afin de vérifier la présence de particules 50 S et 30 S.

LE MUTANT-SH D'*E. coli* résistant à la showdomycine a été isolé par une technique décrite ailleurs [49].

ACCROISSEMENT DU TAUX D'ADN CHEZ *E. coli*. — Les bactéries normales (500 ml) et les bactéries (500 ml) incubées préalablement pendant 40 mn en présence de 10  $\mu$ g de showdomycine/ml (croissance arrêtée) ont été marquées avec la thymidine  $^{14}C$  (0,15  $\mu$ c/ml) pendant 10 mn à 37°. L'ADN fut isolé et purifié [24]. La radioactivité a été déterminée dans le *Packard scintillation spectrometer*. Après hydrolyse d'1 mg d'ADN, les nucléotides ont été séparés et analysés [22]. La quantité d'ADN a été déterminée à 260 m $\mu$  ainsi que par réaction colorimétrique [23]. L'ADN non marqué des bactéries mutantes-sh a été isolé et analysé par la même méthode.

MARQUAGE ET ISOLEMENT DES ARN. — Les bactéries normales d'*E. coli*, de *B. cereus* et d'*A. faecalis*, ainsi que les bactéries mutantes-sh d'*E. coli* ont été prélevées en phase exponentielle de croissance. Les bactéries traitées par la showdomycine (3  $\mu$ g ou 10  $\mu$ g/ml) ont été prélevées 40 mn après addition d'antibiotique. Après centrifugation, les bactéries ont été reprises dans du tampon tris  $10^{-2}$ M pH 7,6 contenant 1/5 de milieu neuf approprié. Pour les bactéries traitées par la showdomycine, le milieu contenait (dans cette deuxième phase) 2-10  $\mu$ g de showdomycine/ml, avant et pendant le marquage des ARN (37°). Après 1 mn de contact avec le  $^{32}P$ , les bactéries étaient filtrées à 0° C et lavées avec du tampon tris  $10^{-2}$ M pH 7,6 contenant du  $MgCl_2$   $10^{-2}$ M, puis resuspendues dans ce même tampon (20-50 ml). Après la lyse des bactéries à la température du laboratoire en présence de lauryl sulfate de sodium (2 p. 100 conc. finale) et de bentonite (0,2 p. 100 conc. finale), un volume égal de phénol saturé avec du tampon tris  $10^{-2}$ M pH 7,6 contenant du  $MgCl_2$   $10^{-2}$ M était ajouté, et le mélange agité à 4° pendant 20 mn. Après centrifugation à 10 000 g pendant 10 mn, la phase aqueuse contenant les ARN était séparée et gardée à 4°. La phase phénolique était extraite une deuxième fois. Les phases aqueuses ont été réunies et les ARN précipités par un volume double d'alcool à 95°. Les ARN redissous dans du tampon tris ont été traités par la DNase (5  $\mu$ g/ml), puis plusieurs fois par le phénol, enfin précipités par l'alcool et dialysés pendant 18 h contre de l'eau distillée additionnée de KCl 0,15 M. Les ARN ribosomiques ont été également isolés à partir de ribosomes (50 S + 30 S) à l'aide de phénol, comme décrit ci-dessus. Les différents types d'ARN ont été séparés, soit sur gradient de saccharose (5-20 p. 100 dissous dans du tampon tris  $10^{-2}$ M pH 7,3 contenant du  $MgCl_2$   $10^{-3}$ M et du NaCl 0,1 M), soit par précipitation à l'aide de  $SO_4(NH_4)_2$  [24], puis analysés. L'ARN (1 à 2 mg) a été hydrolysé par KOH 0,5 M pendant 18 h à 37°. Son pH ayant été ramené à 6,0 à l'aide de HCOOH 4 N, l'hydrolysate était déposé sur colonne de Dowex X 1-2, 200-400 mesh (15 cm  $\times$  1 cm). Après adsorption des nucléotides, la colonne était lavée avec un volume double d'eau distillée puis les nucléotides élués par un gradient linéaire d'acide formique (0-4 N) sous la pression de 0,2 à 0,5 kg. Des fractions de 2 à 4 ml ont été recueillies; puis la nature et la concentration des nucléotides ont été déterminées par leur absorption à 260 m $\mu$  et 280 m $\mu$ .

Les nucléotides- $^{32}P$  des ARN-mr (de  $10^4$  à  $10^5$  cpm totaux) contenus dans 1 mg d'ARN total ont été séparés par la même méthode et leur pureté vérifiée par

électrophorèse sur papier [43]. La radioactivité a été déterminée dans un spectrophotomètre à scintillation Packard.

**SÉPARATION DES ARN SUR GEL D'ACRYLAMIDE.** — Les ARN totaux (marqués ou non au  $^{32}\text{P}$ ) ont été séparés sur gel d'acrylamide (3,7 p. 100) [25]; courant appliqué: 3 mA/tube pendant 1 h 30. La position des bandes d'ARN a été déterminée par leur absorption à 260 m $\mu$ , en plaçant le gel d'acrylamide dans une cuve en quartz déplaçable devant un spectrophotomètre Carry à enregistreur automatique. Un centimètre du papier enregistreur correspond à 2,8 mm du gel d'acrylamide. Sur le gel découpé, les fractions d'ARN ont été éluées, soit par chauffage à 100° pendant 2 h (échantillon de gel placé dans 2 ml de liquide 2  $\times$  SSC), soit par action du KOH N pendant 24 h à 37° (nucléotides).

**LA DEMI-VIE DES ARN A MARQUAGE RAPIDE** a été déterminée chez les bactéries témoins d'*E. coli*, chez celles qui avaient été traitées par la showdomycine (40 mn), ainsi que chez les bactéries mutantes-sh. Cinq ml de culture bactérienne (10<sup>6</sup> bactéries/ml) ont été additionnés d'adénine  $^{14}\text{C}$  (2  $\times$  10<sup>4</sup> cpm, conc. 3  $\times$  10<sup>-6</sup> M) pour les bactéries témoins ou mutantes et 2  $\times$  10<sup>5</sup> cpm pour les bactéries préalablement incubées en présence de showdomycine (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pendant 40 mn). Après 60 s d'agitation à 37°, de l'adénine  $^{12}\text{C}$  fut ajoutée (conc. 2  $\times$  10<sup>-3</sup> M). Les échantillons (0,5 ml) ont été prélevés après 30, 60, 80, 90 et 120 s, additionnés de TCA pour une concentration finale de 5 p. 100, filtrés sur millipores, lavés, séchés et la radioactivité déterminée. La demi-vie a été calculée ( $t_{1/2} = 0,693/k$ ), en se basant sur les données obtenues après 30 s ou 60 s.

**DÉGRADATION DE L'ARN DES RIBOSOMES 50 S PAR LA RNase.** — Les bactéries normales d'*E. coli* et les bactéries préalablement incubées en présence de showdomycine (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) pendant 40 mn ont été marquées avec l'adénine  $^{14}\text{C}$  (0,04  $\mu\text{C}/\text{ml}$ ) pendant 20 mn. Les ribosomes ont été isolés, dialysés et séparés sur gradient de saccharose. Les ribosomes 50 S ont été précipités par  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  (40 p. 100 de saturation) puis dialysés (voir isolement des ribosomes). 1 mg de ribosomes 50 S (5  $\times$  10<sup>-4</sup> cpm) a été traité par la RNase dans les conditions suivantes: 0,1 ml de tampon tris 10<sup>-2</sup> M pH 7,6, RNase pancréatique (concentrations et temps indiqués fig. 5). Volume final 1 ml, température 24°. Les échantillons (0,2 ml) ont été prélevés à des temps différents. Le matériel non dégradé a été précipité avec du TCA à 5 p. 100 et la radioactivité du surnageant (oligonucléotides) a été déterminée.

**« Turnover » DE L'ARN 23 S (*E. coli*) EN PRÉSENCE DE SHOWDOMYCINE.** — Les bactéries normales en phase exponentielle de croissance (2 l de culture) ont été marquées à 37° pendant 20 mn avec de l'adénine  $^{14}\text{C}$  (10<sup>-5</sup> M), puis la culture divisée en 4 parties: *partie A*, les ribosomes ont été immédiatement isolés, comme décrit précédemment. On ajoute à la *partie B*, de l'adénine  $^{12}\text{C}$  (2  $\times$  10<sup>-2</sup> M), à la *partie C*, 10  $\mu\text{g}$  de showdomycine/ml, et à la *partie D*, 10  $\mu\text{g}$  de showdomycine ainsi que l'adénine  $^{12}\text{C}$  (2  $\times$  10<sup>-2</sup> M). Après agitation à 37° pendant 20 mn, les ribosomes ont été isolés à partir des parties B, C et D, et séparés à 4° C sur gradient de saccharose (5-20 p. 100) en 50 S et 30 S (conc. en Mg 10<sup>-4</sup> M). Les fractions du gradient ont été précipitées par le TCA à 10 p. 100 (conc. finale), lavées au TCA à 5 p. 100 puis la radioactivité déterminée.

**L'EFFET HYPERCHROMIQUE** des ARN (10-20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de tampon phosphate 10<sup>-3</sup> M pH 7,0 contenant du NaCl 0,1 M) a été déterminé en U.V. (différentes longueurs d'ondes), avant et 15 mn après addition de KOH 0,1 N (conc. finale). Les ARN 23 S des bactéries normales et mutantes-sh ont été également chauffés à 100° pendant 10 mn (tampon phosphate 10<sup>-3</sup> M contenant 100  $\mu\text{g}$  d'ARN/ml).

**HYBRIDATION.** — Les hybrides ADN-ARN (*E. coli*) ont été formés en utilisant les filtres [26] (millipores Schleicher et Schnell-Bac.T-Filex, type B 6) pour immo-

biliser l'ADN. L'ADN (100  $\mu\text{g/ml}$ ) a été d'abord gardé à 100° pendant 10 mn dans une solution de 0,1 SSC, puis rapidement refroidi ; après addition de NaOH (0,1 M), la solution fut laissée 10 mn à la température du laboratoire. Le pH de la solution a été ramené à 7,0 avec HCl dilué, et la concentration en sels ramenée à  $2 \times \text{SSC}$ . L'ADN ainsi dénaturé est déposé sur des filtres (5  $\mu\text{g}$  d'ADN/filtre). Pour l'hybridation, chaque flacon à bouchon contient : 5 ml de  $2 \times \text{SSC}$ , le filtre porteur d'ADN et de l'ARN- $^{32}\text{P}$  (concentrations indiquées dans la légende de la figure 7). L'ARN- $^{32}\text{P}$ -mr (200  $\text{cpm}/1 \mu\text{g}$ ) a été utilisé. Les flacons sont portés à 66° pendant les temps indiqués dans la légende de la figure 7. Les filtres, lavés avec 50 ml de  $2 \times \text{SSC}$ , ont été mis dans 5 ml de  $2 \times \text{SSC}$ , puis traités 1 h à la température du laboratoire par la ribonucléase (préalablement chauffée à 100° pendant 10 mn), puis lavés à nouveau avec 100 ml de  $2 \times \text{SSC}$ , séchés et la radioactivité mesurée par le spectrophotomètre à scintillation (2).

PURIFICATION PARTIELLE DE L'ARN POLYMÉRASE DE *E. coli*. — Cet enzyme a été partiellement purifié et son activité déterminée dans les conditions décrites [27]. L'ADN des bactéries témoins (T), l'ADN des bactéries mutantes-sh (M) et l'ADN du thymus de veau ont été utilisés pour la mesure de l'activité de cet enzyme, avec pratiquement la même efficacité.

PURIFICATION PARTIELLE DE LA POLYNUCLÉOTIDE PHOSPHORYLASE A PARTIR D'*E. coli*. — Après broyage (20 à 30 g poids humide), en présence de poudre d'alumine, le broyat était repris dans 50 ml de tampon tris ( $10^{-2}$  M pH 7,6, contenant du  $\text{MgCl}_2$   $10^{-4}$  M). Après centrifugation à 30 000 g pendant 15 mn le surnageant était traité par la DNase (2  $\mu\text{g/ml}$ ) puis recentrifugé à 30 000 g à 4° pendant 30 mn. Les ribosomes étaient séparés du surnageant par centrifugation (rotor 40, Spinco L) pendant 2 h à 105 000 g. Au surnageant recentrifugé à 105 000 g pendant 14 h, du  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  était ajouté pour 50 p. 100 de saturation. Le précipité, recueilli par centrifugation, a été dialysé 16 h à 4° contre le même tampon contenant  $10^{-3}$  M de mercaptoéthanol, et passé sur Sephadex G-200 équilibré avec le même tampon. La polynucléotide phosphorylase apparaît régulièrement au début de l'éluion des protéines avec ce tampon. Les fractions actives ont été précipitées par  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  (50 p. 100 de saturation) et le précipité dialysé pendant 14 h à 0° contre le tampon tris utilisé pour l'éluion. L'activité de l'enzyme était déterminée en suivant l'incorporation du substrat  $^{14}\text{C}$  dans le matériel acido-précipitable (voir légende du tableau XII).

SYNTHÈSE DU POLYMÈRE AGUC. — Le milieu d'incubation contient en  $\mu\text{moles}$  : tampon tris pH 8,1, 150 ;  $\text{MgCl}_2$ , 5,0 ; chaque nucléoside diphosphate, 3,0 (100 000  $\text{cpm}$ ) ; enzyme fraction Sephadex G-200, 2 mg ; volume final, 1 ml. Température, 37°. Temps d'incubation, 1 h. Précipitation par deux volumes d'alcool à 95°. Le précipité recueilli par centrifugation est lavé avec du TCA 5 p. 100, dissous dans 1 ml d'eau distillée contenant du KCl 0,1 M, et dialysé pendant 24 h. Le rapport des nucléotides a été déterminé selon le procédé décrit pour les ARN.

## RÉSULTATS

### I. — EFFET DE LA SHOWDOMYCINE SUR LA CROISSANCE BACTÉRIENNE

La showdomycine dont la structure ressemble à celle de la pseudo-uridine (fig. 1) arrête la croissance de nombreuses espèces bactériennes [33]. Nous avons montré que la croissance d'*E. coli* ( $10^7$  bactéries au départ) cultivé

(2) La radioactivité de l'ARN  $^{32}\text{P}$ , qui précipite en présence de TCA, a été prise en considération et représente 70 p. 100 de la radioactivité totale.

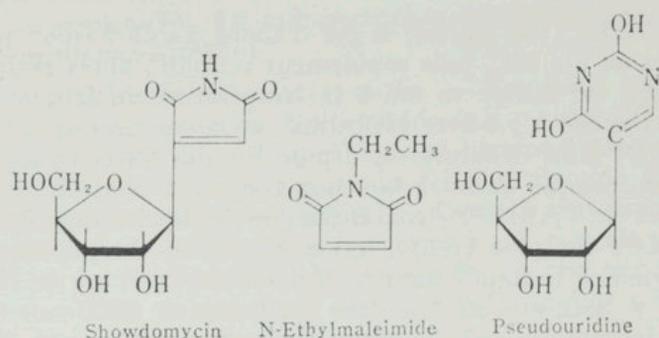


FIG. 1. — Formules chimiques de la showdomycine, du N-éthylmaleimide et de la pseudo-uridine.

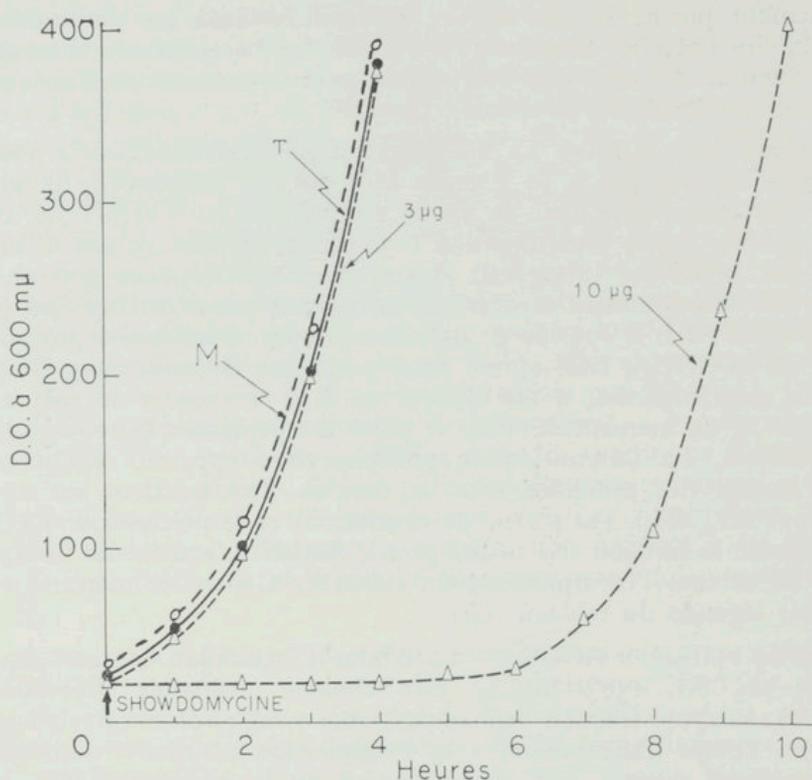


FIG. 2. — Croissance en milieu synthétique des bactéries témoins (T) (*E. coli*) en l'absence et en présence de showdomycine (3 μg et 10 μg/ml) et croissance des bactéries mutantes-sh (M) en l'absence d'antibiotique.

en milieu synthétique n'est pas affectée par 1-3 μg de showdomycine/ml. En revanche, 10 μg/ml arrêtent la croissance (fig. 2), qui reprend spontanément après plusieurs heures à 37°. Elle reprend plus rapidement en présence de substances à groupements sulfhydryles ou de nucléosides [17]. En milieu riche, des doses supérieures à celles que nous avons indiquées sont indispensables pour ralentir ou arrêter temporairement la croissance. Pour des raisons économiques, la plupart de nos expériences ont été réalisées avec des bactéries (*E. coli*) cultivées en milieu synthétique.

II. — SYNTHÈSE DE L'ADN CHEZ *E. coli* EN PRÉSENCE DE SHOWDOMYCINE

L'ADN des bactéries témoins, et de celles préalablement incubées 40 mn en présence de showdomycine (10 µg/ml, croissance arrêtée), a été marqué avec la thymidine <sup>14</sup>C pendant 10 mn à 37°. La quantité de thymidine <sup>14</sup>C incorporée dans l'ADN isolé et purifié à partir des deux types de bactéries est pratiquement la même (tableau I). L'accroissement de l'ADN de bactéries

TABLEAU I. — <sup>14</sup>C-thymidine incorporée dans l'ADN des bactéries témoins (T) de bactéries traitées par la showdomycine (Sh) et des bactéries mutantes-sh (M) (*E. coli*).

SOURCE D'ADN	CPM/1 mg d'ADN
T	33,120
Sh	30,240
M	32,870

La radioactivité de l'ADN contenant de la thymidine <sup>14</sup>C a été déterminée après isolement et purification.

en présence de showdomycine (40 mn) est de 10 à 15 p. 100 par rapport à la quantité d'ADN présente au moment de l'addition de showdomycine. L'antibiotique n'empêche donc pas la synthèse *in vivo* de l'ADN. *In vitro*, la showdomycine n'affecte pas l'activité de l'ADN-polymérase. La composition en bases de l'ADN des bactéries incubées en présence de showdomycine (croissance arrêtée) [tableau II], et celle des bactéries mutantes-sh, est identique à celle de l'ADN des bactéries témoins.

TABLEAU II. — Nucléotides de l'ADN des bactéries témoins (T), de bactéries traitées par la showdomycine (Sh) et des bactéries mutantes-sh (M) (*E. coli*).

NUCLÉOTIDES	MOLES POUR 100 MOLES DE NUCLÉOTIDES IDENTIFIÉS		
	T	Sh	M
A	24,5	24,5	25,0
G	24,5	25,0	24,4
C	23,3	26,0	25,1
T	26,2	26,0	25,6
G+C/A+T	0,96	1,00	0,97
G+A/C+T	0,99	0,95	0,97

L'ADN purifié (1 mg) a été hydrolysé par HClO<sub>4</sub> à 100° selon la méthode de Wyatt [22]. Après séparation des produits d'hydrolyse par chromatographie sur papier Whatman n° 1 (solvant: isopropanol - HCl - H<sub>2</sub>O (170 : 41 : 250 v/v), la concentration de chaque nucléotide a été déterminée à 260 mµ.

### III. — INCORPORATION DE L'URACILE <sup>14</sup>C ET DE L'ADÉNINGE <sup>14</sup>C EN PRÉSENCE DE SHOWDOMYCINE

Les cellules d'*E. coli* (croissance arrêtée) incorporent les bases <sup>14</sup>C exogènes dans le matériel acido-précipitable. La quantité d'uracile <sup>14</sup>C et d'adénine <sup>14</sup>C incorporée en 10 mn par ces bactéries est respectivement 20 et 35 p. 100 de celle qu'on trouve chez les bactéries normales. L'accroissement des ARN totaux chez les bactéries mises en présence de showdomycine pendant 40 mn est de 20 à 30 p. 100 (fig. 3). La distribution de la radioactivité dans les ARN séparés sur gradient de saccharose (fig. 4), montre que tous les ARN sont synthétisés en présence de showdomycine.

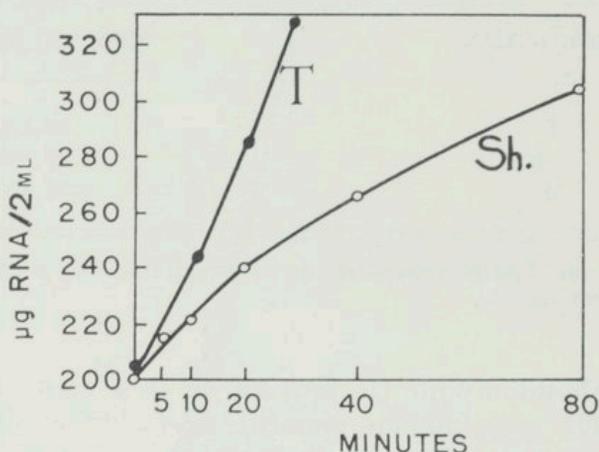


FIG. 3. — Accroissement de la teneur en ARN des bactéries en absence (T) et en présence (Sh) de 10 µg de showdomycine/ml.

Au temps 0 (addition de showdomycine à une partie de la culture, 10<sup>7</sup> bactéries/ml) et à des intervalles indiqués, 2 ml de culture sont prélevés et les bactéries sédimentées sont lavées deux fois avec du TCA à 5 p. 100, puis les ARN extraits (2 ml de TCA à 5 p. 100) à 100° pendant 20 mn. La quantité d'ARN a été déterminée par la réaction à l'orcinol [20]. L'accroissement d'ARN (totaux) est exprimé en µg d'ARN par prise de 2 ml.

### IV. — EN PRÉSENCE DE SHOWDOMYCINE L'ARN 23 S CONTIENT EN EXCÈS LES NUCLÉOTIDES A ET G

Le profil des ARN ribosomiques, isolés à partir des bactéries témoins et de celles à croissance arrêtée par la showdomycine, puis séparés sur gradient de saccharose (fig. 4), ne permet pas de soupçonner des différences. Cependant, lorsque les ARN ribosomiques (23 S et 16 S), précipités et lavés au TCA 5 p. 100, sont dosés par la réaction à l'orcinol, une intensité de couleur caractéristique du ribose mais anormalement forte par rapport à l'absorption dans l'U.V. apparaît dans l'ARN 23 S isolé à partir des bactéries incubées en présence de showdomycine; ce fait suggère une composition en bases modifiée. En effet, dans le dosage colorimétrique de l'ARN, c'est essentiellement le ribose des nucléotides puriques qui réagit avec l'orcinol [20]. L'analyse de chaque type d'ARN ribosomique après hydrolyse alcaline a

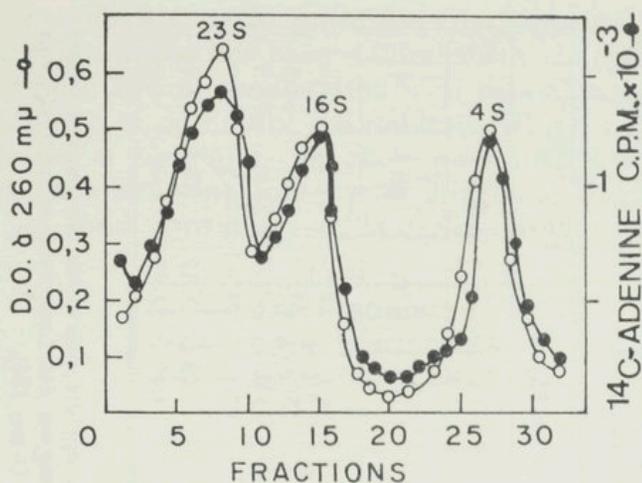


FIG. 4. — Les bactéries normales d'*E. coli* ont été d'abord incubées en présence de 10  $\mu\text{g}$  de showdomycine/ml pendant 40 mn, puis marquées avec l'adénine  $^{14}\text{C}$  (0,04  $\mu\text{C}/\text{ml}$ ) pendant 10 mn. Les ARN totaux ont été extraits à l'aide de phénol puis séparés sur gradient de saccharose (voir MÉTHODES) par ultra-centrifugation pendant 16 h à 105 000 t/mn dans le rotor SW<sub>25</sub> (Spinco). Les fractions ont été collectées puis la densité optique (○—○) et la radioactivité (●—●) ont été déterminées.

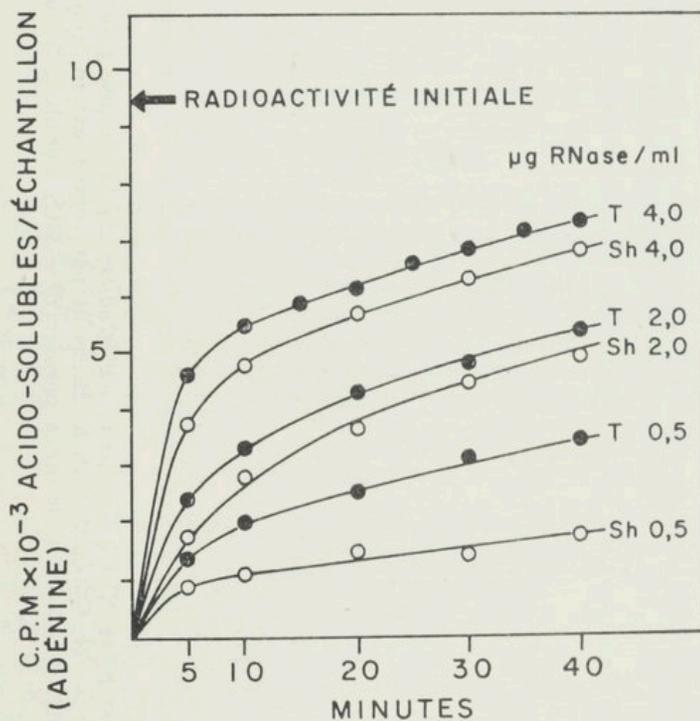


FIG. 5. — Dégradation de l'ARN contenu dans les ribosomes 50 S (*E. coli*) par différentes concentrations de RNase (voir MÉTHODES). Après traitement par la RNase la radioactivité du matériel non précipitable par le TCA à 5 p. 100 a été déterminée. Ribosomes témoins : ●—●; ribosomes des bactéries traitées par 10  $\mu\text{g}$  de showdomycine/ml : ○—○.

TABLEAU III. — Nucléotides dans les ARN provenant des bactéries témoins (T), des bactéries témoins traitées par la showdomycine (Sh), et des bactéries du mutant-sh (M) (*E. coli*).

	MOLES PAR 100 MOLES DE NUCLÉOTIDES IDENTIFIÉS															
	ARN 23 S				ARN 16 S				ARN 5 S				ARN 4 S			
	T	Sh 3 µg	Sh 10 µg	M	T	Sh	M	T	Sh	M	T	Sh	M	T	Sh	M
A	25,5	31,4	31,6	30,8	23,6	25	24,5	18,7	—	32,1	22	20,8	21,0			
G	28,0	34,8	34,0	35,0	27,0	26,7	27,6	34,2	—	35,6	29	30,0	31,5			
C	24,0	17,3	18,0	18,0	24,0	24,0	24,6	28,8	—	15,8	28	27,0	28,3			
U	23,0	15,0	14,0	16,2	24,0	23,5	23,4	17,0	—	17,4	20	20,5	20,0			
G+C/A+U	1,06	1,10	1,01	1,12	1,00	1,00	1,05	1,78	—	1,03	1,37	1,40	1,44			
G+A/C+U	1,01	2,00	1,96	1,92	1,00	1,00	1,05	1,06	—	2,00	1,00	1,00	1,06			

Les ARN 23 S, 16 S et 4 S, séparés sur gradient de saccharose 5-20 p. 100 (voir MÉTHODES), ont été précipités par deux volumes d'alcool à 95°, à — 20° C pendant 16 h. Recueilli par centrifugation, chaque type d'ARN (1-2 mg) a été hydrolysé et analysé (voir MÉTHODES). L'ARN 5 S a été isolé après passage de l'ARN soluble 4 S sur colonne de Sephadex G-200 [34].

montré que seul l'ARN 23 S provenant des bactéries traitées par la showdomycine a le rapport des bases radicalement changé ( $G + A/C + U = 2,0$ ). En revanche aucune modification n'est décelable dans le rapport des bases de l'ARN 16 S et de l'ARN 4 S (tableau III) [ $G + A/C + U = 1,0$ ]. Les nucléotides A et G trouvés en excès dans l'ARN 23 S des bactéries traitées par la showdomycine font partie intégrante de cet ARN, comme le montrent les faits suivants: 1° la radioactivité de l'adénine  $^{14}\text{C}$  (ou

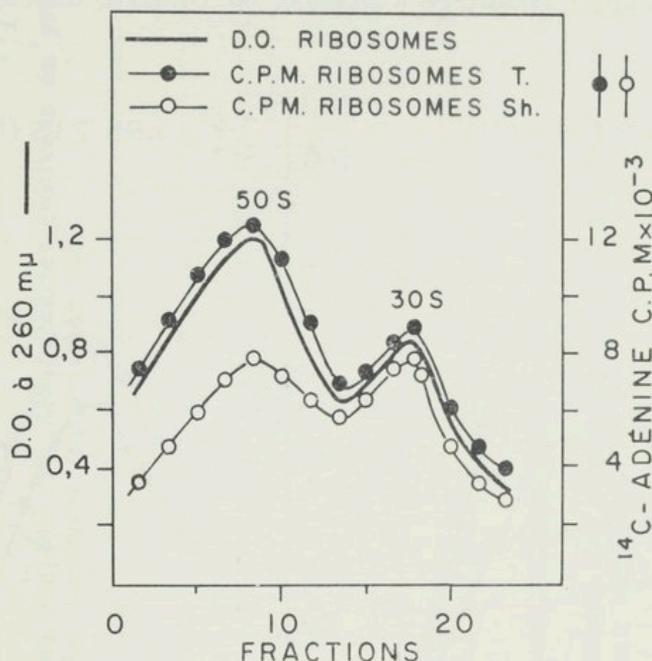


FIG. 6. — Les bactéries normales d'*E. coli* ont été marquées pendant 20 mn avec l'adénine  $^{14}\text{C}$ , puis la culture fut divisée en 4 parties avant l'addition d'adénine  $^{12}\text{C}$  en l'absence ou en présence de 10  $\mu\text{g}$  de showdomycine/ml (MÉTHODES). Les ribosomes 50 S et 30 S ont été séparés sur gradient de saccharose (5-20 p. 100) puis la densité optique et la radioactivité des fractions recueillies du gradient ont été déterminées. Densité optique des ribosomes T et Sh (sans adénine  $^{12}\text{C}$ ): —; radioactivité des ribosomes T après addition de l'adénine  $^{12}\text{C}$ : ●—●; radioactivité des ribosomes après addition de la showdomycine et de l'adénine  $^{12}\text{C}$ : ○—○.

uracile  $^{14}\text{C}$ ) incorporée dans l'ARN 23 S sédimente avec lui et suit la densité optique à 260  $m\mu$  (fig. 4); 2° l'ARN 23 S provenant des ribosomes 50 S de bactéries, tant normales qu'incubées en présence de showdomycine (fig. 5), est dégradable par la RNase. Les polymères A-G résistants à l'action de la RNase, les nucléotides A-G en excès dans l'ARN 23 S ne sont donc pas sous forme de polymères A-G; 3° en chassant l'adénine  $^{14}\text{C}$  incorporée, par l'adénine  $^{12}\text{C}$  exogène (MÉTHODES), on montre que l'ARN 23 S des bactéries soumises à l'action de la showdomycine subit un renouvellement (durée d'environ 20 mn) [fig. 6]. Rien de semblable ne se passe avec l'ARN 16 S faisant partie des ribosomes 30 S. Ces résultats suggèrent que le *turnover* a lieu dans l'ARN 23 S lui-même; il semble, en effet, peu probable qu'un polymère A-G subisse un tel renouvellement.

V. — HYPERCHROMICITÉ DE L'ARN 23 S MODIFIÉ CHEZ *E. coli*

L'ARN ribosomique 23 S modifié peut aussi être isolé à partir du mutant-sh, résistant à cet antibiotique. Il se distingue des autres ARN, non seulement par le rapport des bases ( $G + A/C + U = 2,0$ ), mais aussi par l'hyperchromicité. Si l'on compare le spectre en U.V. de l'ARN 23 S normal à celui de l'ARN 23 S du mutant-sh, les spectres étant pris à pH 7,0 et à pH 12, ainsi qu'après chauffage à pH 7,0, on constate une hyperchromicité

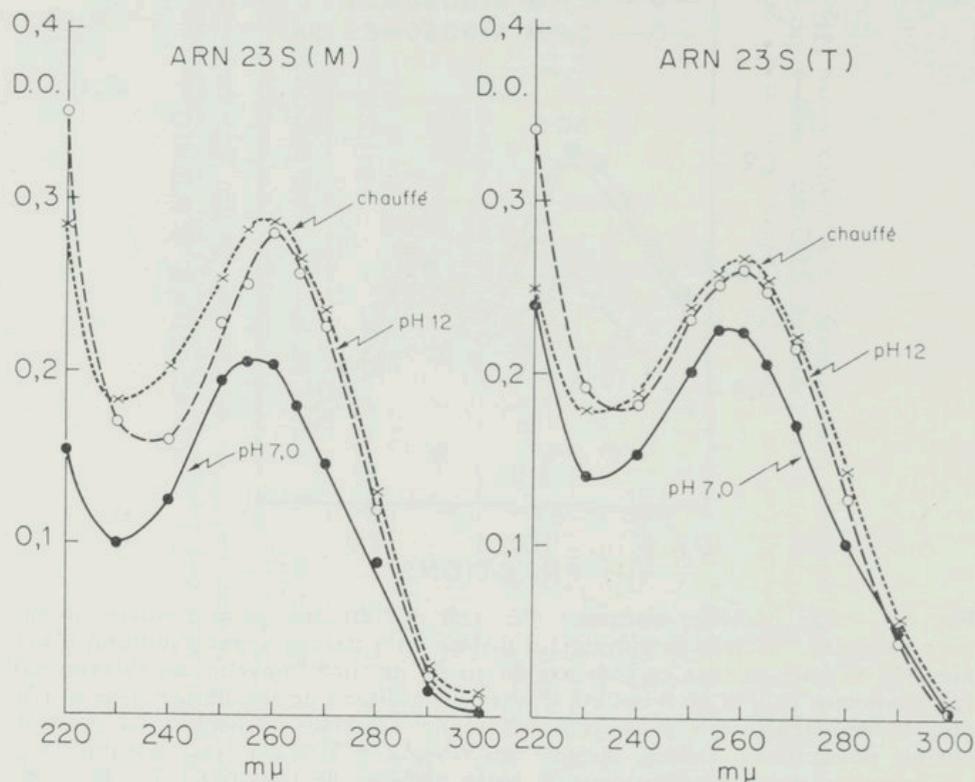


FIG. 7. — Hyperchromicité de l'ARN ribosomique 23 S (M) des bactéries mutantes-sh (*E. coli*) et celle de l'ARN ribosomique 23 S des bactéries témoins (T) déterminées dans les conditions décrites (MÉTHODES).

plus grande de l'ARN du mutant (fig. 6). Il en est de même pour l'ARN 23 S provenant des bactéries sauvages cultivées en présence de showdomycine (tableau IV). Le fait qu'en milieu alcalin le spectre de l'ARN 23 S du mutant-sh se déplace vers la droite (fig. 7) est précisément en accord avec le fait que cet ARN modifié possède en excès les nucléotides puriques ; le spectre en U. V. de ces derniers (et surtout celui du GMP) se déplace en milieu alcalin dans cette même direction. La forte hyperchromicité de l'ARN 23 S du mutant-sh observée après chauffage, mais sans déplacement du spectre (fig. 7), montre que cet ARN possède une structure secondaire beaucoup plus importante que celle des ARN ribosomiques normaux.

TABLEAU IV. — Hyperchromicité des ARN des bactéries témoins (T), des bactéries cultivées en présence de showdomycine (Sh) et des bactéries mutantes-sh (M).

ORIGINE DES ARN	ARN 23 S			ARN 16 S			ARN 4 S		
	sans KOH	+ KOH	% d'accroissement	sans KOH	+ KOH	% d'accroissement	sans KOH	+ KOH	% d'accroissement
T	0,24	0,30	25	0,24	0,31	25	0,24	0,31	20
Sh	0,21	0,32	52	0,24	0,31	25	0,22	0,27	22
M	0,28	0,40	43	0,24	0,30	27	0,23	0,28	22
Poly A-G	0,34	0,39	15	—	—	—	—	—	—

(Absorption déterminée à 260 m $\mu$ .)

L'hyperchromicité des ARN (10 à 15  $\mu$ g/ml) a été déterminée par l'absorption des ARN dans l'U.V. dans des conditions décrites (voir MÉTHODES).

VI. — EN PRÉSENCE DE SHOWDOMYCINE LES ARN A MARQUAGE RAPIDE D'*E. coli*, CONTIENNENT EN EXCÈS LES NUCLÉOTIDES A ET G.

Nous avons voulu vérifier si la modification de l'ARN à marquage rapide, observée en présence de doses de showdomycine affectant la croissance [14] se retrouvait également en présence de doses faibles ne l'affectant pas (fig. 2).

TABLEAU V. — Fractions de l'ARN à marquage rapide synthétisé par *E. coli* en présence de 3  $\mu\text{g}$  de showdomycine/ml.

FRACTIONS $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ % DE SATURATION	mg d'ARN / FRACTION	cpm / FRACTION	cpm % DES cpm TOTAUX	RAPPORT G+A/C+U
0 - 40	5,5	260 003	60,0	2,10
40 - 65	3,6	104 080	23,0	1,88
65 - 70	2,6	50 060	11,7	1,28
70 - 95	1,2	16 103	3,7	1,00

Les ARN totaux (14 mg) contenant les ARN à marquage rapide fractionnés à l'aide de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  (voir MÉTHODES) ont été dialysés puis la radioactivité et la quantité d'ARN de chaque fraction ont été déterminées. Rapport des bases G + A/C + U (voir tableau VII).

TABLEAU VI. — Fractions d'ARN à marquage rapide synthétisé par *E. coli* en présence de 10  $\mu\text{g}$  de showdomycine/ml.

FRACTIONS $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ % DE SATURATION	mg d'ARN / FRACTION	cpm / FRACTION	cpm % DES cpm TOTAUX	RAPPORT G+A/C+U
0 - 50	16	350 005	77	2,0
50 - 60	0,8	12 375	2,8	1,95
60 - 65	4,6	38 350	8,2	1,98
65 - 70	5,8	15 250	3,4	1,05
70 - 95	5,0	36 000	8,0	1,00

Les ARN totaux (33 mg) contenant les ARN à marquage rapide fractionnés à l'aide de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  (MÉTHODES) ont été dialysés puis la radioactivité et la quantité de chaque fraction ont été déterminées (rapport des bases, voir tableau VIII).

Les bactéries ont été mises 40 mn en contact avec la showdomycine (doses indiquées tableaux V et VI), les ARN-mr isolés, fractionnés à l'aide de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  puis analysés (voir MÉTHODES). Les résultats, très reproductibles, montrent qu'en présence de doses différentes de showdomycine (3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  et 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , tableaux VII et VIII) les bactéries d'*E. coli* synthétisent une très large fraction d'ARN-mr (80 p. 100) dont le rapport des bases est profondément modifié ( $G + A/C + U = 2,0$ ,  $G = A$ ;  $C = U$ ) et diffère de celui de l'ARN-mr des bactéries normales  $G + A/C + U = 1,0$ . Environ 15 à 30 p. 100 de l'ARN-mr synthétisé en présence de showdomycine possède le

TABLEAU VII. — Rapport des bases de l'ARN à marquage rapide synthétisé par *E. coli* en présence de 3  $\mu\text{g}$  de showdomycine/ml.

	MOLES POUR 100 MOLES DE NUCLÉOTIDES - $^{32}\text{P}$ ANALYSÉS			
	Fraction 0 - 40	Fraction 40 - 65	Fraction 65 - 70	Fraction 70 - 95
A	31,4	30,8	27,6	24,1
G	33,5	34,2	29,2	27,0
C	17,2	17,8	21,1	23,0
U	17,8	18,2	24,0	26,0
G+A/C+U	2,10	1,88	1,0	1,00
G+C/A+U	1,03	1,06	1,28	1,00

Le rapport des bases a été déterminé en analysant les nucléotides- $^{32}\text{P}$  de chaque fraction d'ARN après hydrolyse alcaline (MÉTHODES).

TABLEAU VIII. — Rapport des bases de l'ARN à marquage rapide synthétisé par *E. coli* en présence de 10  $\mu\text{g}$  de showdomycine/ml.

	FRACTIONS OBTENUES PAR $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ MOLES POUR 100 MOLES DE NUCLÉOTIDES - $^{32}\text{P}$ ANALYSÉS				
	Fraction 0 - 50	Fraction 50 - 60	Fraction 60 - 65	Fraction 65 - 70	Fraction 70 - 95
A	32,5	32,6	30,9	25,0	24,5
G	34,2	35,6	34,5	27,5	27,0
C	16,5	15,8	15,8	24,6	24,3
U	17,0	15,2	17,0	27,0	26,0
G+A/C+U	2,00	2,06	1,96	1,02	1,00
G+C/A+U	1,05	1,07	1,06	1,01	1,00

Le rapport des bases a été déterminé en analysant les nucléotides- $^{32}\text{P}$  de chaque fraction d'ARN après hydrolyse alcaline (MÉTHODES).

TABLEAU IX. — Demi-vie des ARN à marquage rapide des bactéries témoins (T), des bactéries témoins traitées par la showdomycine (Sh), et des bactéries mutantes-sh (M) (*E. coli*).

ARN A MARQUAGE RAPIDE	cpm/PRISE			
	+ $^{14}\text{C}$ adénine			Demi-vie (s)
	Temps 0	Temps 30 s	Temps 60 s	
T	2300	1696	894	70
Sh	2074	1548	845	73
M	2470	1760	878	74

Les bactéries en phase exponentielle de croissance ont été incubées pendant 60 s en présence d'adénine- $^{14}\text{C}$  puis l'adénine  $^{12}\text{C}$  fut ajoutée en excès. A des temps indiqués les échantillons ont été prélevés et leur radioactivité déterminée (MÉTHODES).

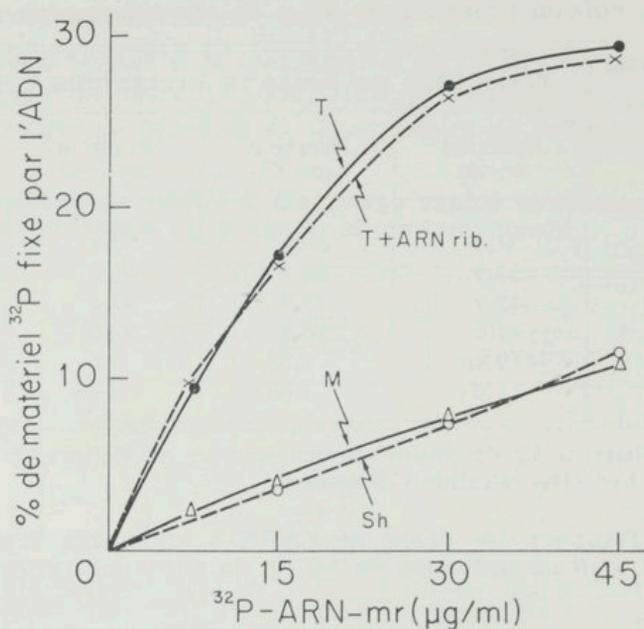


FIG. 8. — Hybridation ADN-ARN-mr ( $^{32}\text{P}$ ). Les hybrides ADN-ARN-mr ont été formés pendant 7 h à  $66^{\circ}$  dans un bain-marie. L'ADN des bactéries normales a été utilisé ( $5 \mu\text{g}/\text{filtre}$ ) et différentes concentrations d'ARN- $^{32}\text{P}$  contenu dans l'ARN total ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) isolé des bactéries témoins (T), des bactéries mutantes-sh (M) et des bactéries mises en présence de  $10 \mu\text{g}$  de showdomycine/ml (Sh);  $200 \mu\text{g}$  d'ARN ribosomique (ARNrib.) 23 S + 16 S, non marqués ont été utilisés.

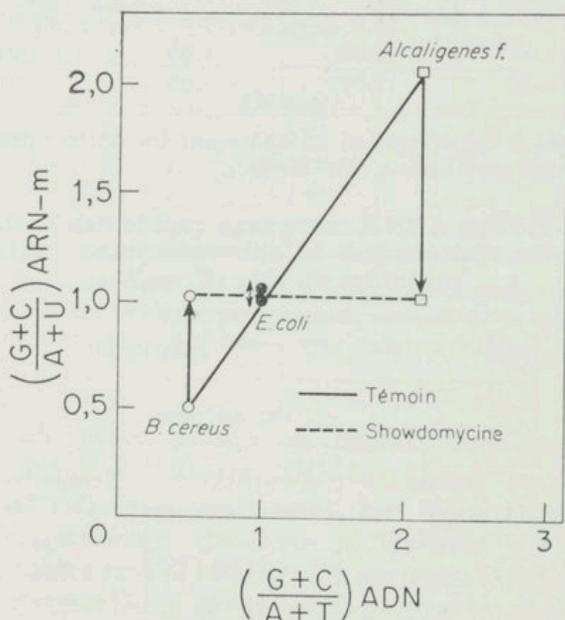


FIG. 9. — Rapport des bases complémentaires (G + C/A + U) des ARN à marquage rapide caractéristique des bactéries témoins et de bactéries préincubées avec des faibles doses de showdomycine n'affectant pas la croissance.

rapport des bases  $G + A/C + U = 1,0$  caractéristique d'*E. coli* normal. De plus, les temps de demi-vie des ARN-mr chez *E. coli* sont identiques pour les bactéries normales, les bactéries traitées par la showdomycine et les bactéries mutantes (tableau IX).

Précisons que la showdomycine ne s'incorpore pas dans les ARN (moins de 1 molécule de showdomycine-<sup>3</sup>H pour 12 000 nucléotides), aussi bien dans les ARN modifiés que dans ceux qui ne le sont pas.

#### VII. — HYBRIDATION ADN-ARN-mr (*E. coli*)

Les ARN à marquage rapide (*E. coli*) synthétisés par les bactéries témoins mises en présence de showdomycine, ainsi que par les bactéries résistantes à cet antibiotique, s'hybrident plus faiblement que l'ARN-mr témoin avec l'ADN homologue provenant des bactéries tant normales que mutantes-sh (fig. 8). Ces résultats sont en accord avec ceux de l'analyse chimique montrant que, dans les conditions décrites, environ 20 p. 100 de l'ARN à marquage rapide reste normal ( $G + A/C + U = 1,0$ ) chez les bactéries traitées par la showdomycine et chez les bactéries résistantes.

#### VIII. — EFFET DE LA SHOWDOMYCINE CHEZ DIFFÉRENTES BACTÉRIES

L'effet de la showdomycine est un phénomène général chez les bactéries : la figure 9 montre la composition en bases ( $G + C/A + U$ ) des ARN à marquage rapide des bactéries témoins de *B. cereus* (0,5) *E. coli* (1,0) et *A. faecalis* (2,0). En présence de faibles doses de showdomycine (croissance non arrêtée), ces espèces bactériennes synthétisent de l'ARN à marquage rapide dont une large fraction (80 p. 100) possède le rapport des bases  $G + A/C + U = 2,0$  ( $G = A$  ;  $C = U$  ; fig. 9 et 10). Le fractionnement de l'ARN-<sup>32</sup>P et l'analyse des fractions montrent que 15 à 30 p. 100 d'ARN-mr possèdent le rapport des bases caractéristiques de l'espèce. Ces résultats montrent que la showdomycine impose, chez toutes les espèces étudiées, la synthèse d'ARN qui ne sont plus complémentaires de l'ADN.

#### IX. — SYNTHÈSE D'ARN RICHES EN A ET G CHEZ UN MUTANT-SH D'*E. coli* RÉSISTANT A LA SHOWDOMYCINE

Le phénomène observé chez les bactéries normales en présence de showdomycine s'observe également chez les bactéries mutantes-sh résistantes à cet antibiotique. En effet, les ARN totaux provenant des bactéries normales et mutantes (cultures en l'absence d'antibiotique) ont été séparés soit sur gradient de saccharose (chaque type d'ARN a été précipité par l'alcool pour éliminer le saccharose), soit par électrophorèse sur gel d'acrylamide (et les fractions ont été analysées, fig. 11 et 12). Les flèches indiquent le rapport des bases ( $G + A/C + U$ ) des ARN. Chez les bactéries normales, ce rapport est égal à 1,0 ; 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 ont un rapport des bases très différent ( $G + A/C + U = 2,0$  ;  $G = A$  ;  $C = U$ ) alors que l'ARN 16 S et l'ARN 4 S ont un rapport  $G + A/C + U = 1$  identique à celui de tous

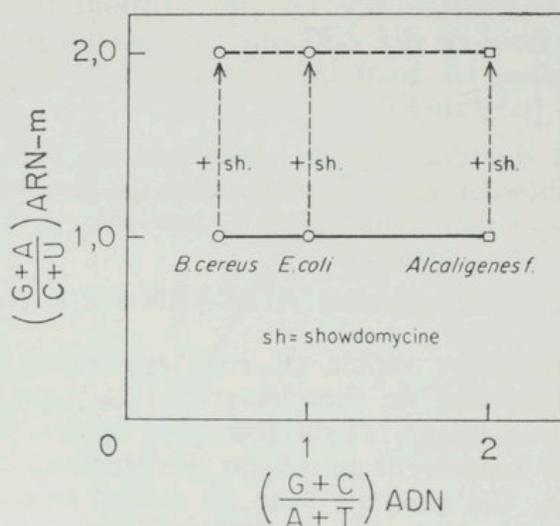


FIG. 10. — Rapport des bases puriques/pyrimidiques (G + A/C + U) des ARN à marquage rapide des bactéries normales et de bactéries préincubées avec de faibles doses de showdomycine n'affectant pas la croissance.

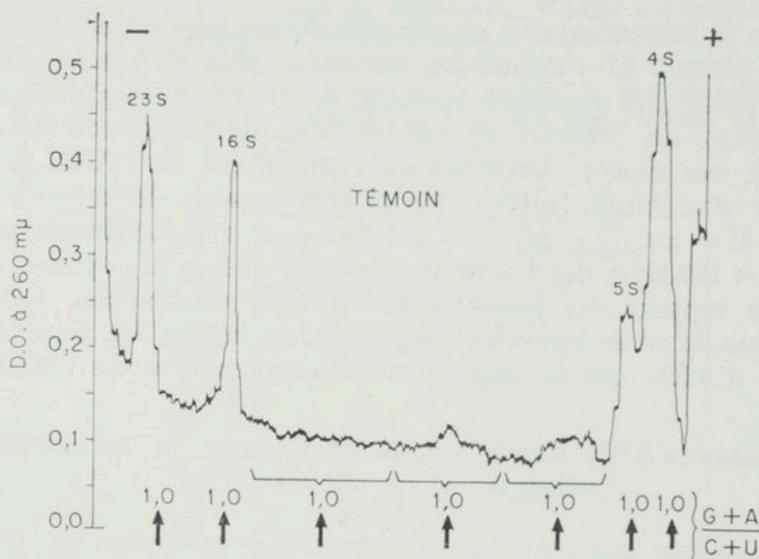


FIG. 11. — Les ARN des bactéries normales (*E. coli*) marqués au  $^{32}\text{P}$  pendant 60 mn ont été isolés sur gel d'acrylamide. Les flèches indiquent le rapport des bases (G + A/C + U) des fractions d'ARN analysées après dégradation par KOH.

les ARN des bactéries sauvages d'*E. coli*. L'ARN 23 S des bactéries mutantes-sh présente un effet hyperchromique (fig. 7) déjà observé chez le même ARN isolé à partir de bactéries normales traitées par la showdomycine (tableau IV). On constate que les bactéries résistantes cultivées en l'absence d'antibiotique, synthétisent les ARN modifiés, comme le font les bactéries

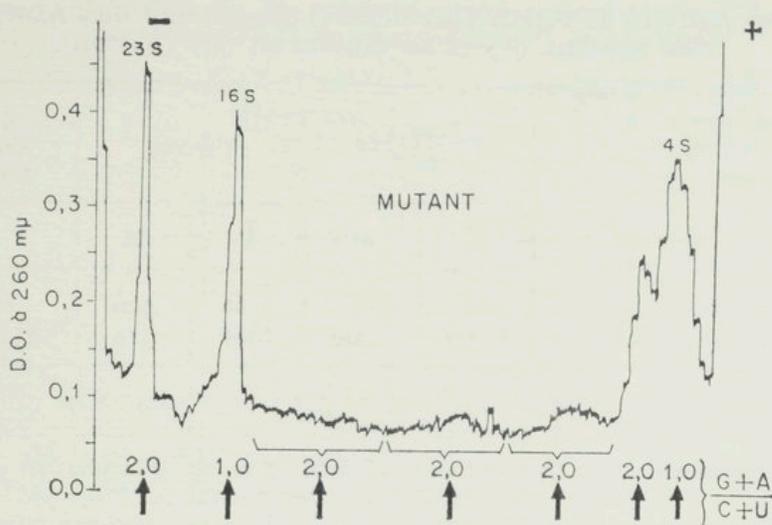


FIG. 12. — Les ARN des bactéries mutantes-sh (*E. coli*) ont été marqués au  $^{32}\text{P}$  pendant 60 mn isolés puis séparés sur gel d'acrylamide. Les flèches indiquent le rapport des bases (G + A/C + U) des fractions d'ARN analysées, après dégradation par KOH.

sensibles en présence de showdomycine. La résistance à l'antibiotique se traduit donc par l'apparition de certains types d'ARN « anormaux » dont l'ARN à marquage rapide.

#### X. — QUEL POURRAIT ÊTRE L'ENZYME RESPONSABLE DE LA BIOSYNTHESE DES ARN NOUVEAUX ?

Deux enzymes sont actuellement connus pour leur capacité de synthétiser des polyribonucléotides à partir d'un mélange de nucléoside-5'-triphosphates et de nucléoside-5'-diphosphates : l'ARN polymérase dépendante de l'ADN et la polynucléotide phosphorylase. Le prix de la showdomycine nous a empêché de purifier ces deux enzymes à partir de bactéries traitées par cet antibiotique. Après avoir rapidement constaté que les résultats obtenus à l'aide de showdomycine étaient identiques aux résultats obtenus avec les bactéries résistantes à cet antibiotique, nous avons purifié et étudié l'activité de ces deux enzymes à partir d'extraits des bactéries témoins et mutantes (*E. coli*) :

a) *L'ARN polymérase dépendante d'ADN* : Le tableau X, qui résume les étapes de purification de cet enzyme, montre que l'activité spécifique de l'ARN polymérase dépendante de l'ADN [27] est, chez les bactéries mutantes-sh, diminuée de 70 à 85 p. 100 comparée à l'activité de cet enzyme provenant de bactéries normales. Chaque ribonucléoside-5'-triphosphate s'incorpore cependant avec la même efficacité dans le matériel acido-précipitable. *In vitro*, la showdomycine inhibe fortement, bien qu'incomplètement, l'activité de l'ARN polymérase des bactéries témoins, mais elle n'inhibe pas celle des bactéries mutantes-sh (tableau XI). Rappelons qu'il est essentiel d'éviter

TABLEAU X. — **Activité de l'ARN polymérase, dépendante de l'ADN, des bactéries témoins (T) et du mutant-sh (M) (*E. coli*).**

	PROTÉINES (mg)		UNITÉS		ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE (unités/mg)	
	T	M	T	M	T	M
	1. Extrait brut .....	460	472	2760	566	6
2. Fraction (F <sub>3</sub> ) .....	5,5	5,0	1947	310	354	63

Unité = mμMole de 1 XTP <sup>14</sup>C polymérisé par 1 mg d'enzyme en 10 mn à 37°.

Pour la détermination de l'activité enzymatique le milieu d'incubation contient : tris pH 7,6, 200 μM; MnCl<sub>2</sub>, 0,05 μM; MgCl<sub>2</sub>, 0,2 μM; chaque XTP 0,1 μM dont un seul marqué au <sup>14</sup>C (50 000 à 100 000 cpm); ADN (des bactéries témoins ou mutantes-sh), 12 μg; enzyme d'extrait brut, 200 μg; enzyme purifié (F<sub>3</sub>), 20 μg. Volume final, 0,2 ml. Température, 37°. Temps, 10 mn. La réaction est arrêtée par le TCA à 5 p. 100 et le matériel acidoprécipitable est déposé sur le millipore, lavé au TCA, séché et la radioactivité déterminée.

TABLEAU XI. — **Inhibition par la showdomycine de l'activité de l'ARN polymérase dépendante de l'ADN (*E. coli*).**

SHOWDOMYCINE (μg/ml)	ENZYME (T)			ENZYME (M)		
	<sup>14</sup> C-ATP cpm	<sup>14</sup> C-CTP cpm	Inhibition %	<sup>14</sup> C-ATP cpm	<sup>14</sup> C-CTP cpm	Inhibition %
0	695	730	—	145	162	—
25	270	282	60	140	153	0
50	240	255	64	142	157	0

La showdomycine a été ajoutée au milieu d'incubation en même temps que la fraction enzymatique (F<sub>3</sub>, 20 μg) voir tableau X.

la présence de substances à groupes SH en excès pour tester l'effet de la showdomycine sur l'activité de cet enzyme.

b) *La polynucléotide phosphorylase* : Les bactéries mutantes-sh contiennent une polynucléotide phosphorylase qui, contrairement à l'enzyme des bactéries témoins, polymérise *in vitro* plus efficacement l'ADP et le GDP que le CDP et l'UDP (tableaux XII et XIII). Cette différence d'activité se maintient au cours de la purification de l'enzyme (tableau XII). A partir d'ADP, GDP, CDP et d'UDP en concentrations équimolaires, la polynucléotide phosphorylase, isolée à partir de bactéries mutantes-sh et purifiée, synthétise *in vitro* un polyribonucléotide, AGUC, dans lequel les bases puriques sont en quantité double (tableau XIII). La showdomycine n'agit pas *in vitro* sur l'activité de la polynucléotide phosphorylase isolée à partir de bactéries normales ou mutantes-sh.

TABLEAU XII. — Activité de la polynucléotide phosphorylase des bactéries témoins (T) et du mutant-sh (M) (*E. coli*).

	PROTÉINES (mg)		UNITÉS		ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE (unités/mg)			
	T	M	T	M	T		M	
					ADP	CDP	ADP	CDP
1. Extrait brut . . . . .	301	295	11,10	17,04	0,037	0,040	0,058	0,040
2. SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> . . . . .	18,5	20	7,40	14,42	0,410	—	0,73	—
3. Sephadex G-200 . . . . .	4,4	4,2	4,8	11,00	1,10	1,14	2,44	1,20

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

Le milieu d'incubation contient en  $\mu$ Moles : tampon tris pH 8,1, 100 ; MgCl<sub>2</sub>, 20 ; ADP-<sup>14</sup>C soit CDP-<sup>14</sup>C, 1,0 ( $2 \times 10^4$  cpm) ; enzyme extrait brut, 200  $\mu$ g ; enzyme purifié, 20  $\mu$ g. Volume final, 0,2 ml. Température, 34°. Temps, 30 mn. La réaction est arrêtée par TCA à 5 p. 100, le précipité lavé sur millipores et la radioactivité déterminée.

TABLEAU XIII. — Nucléotides du polymère « AGUC » synthétisé par la polynucléotide phosphorylase des bactéries témoins (T), des mêmes bactéries cultivées en présence de showdomycine (Sh) et des bactéries mutantes-sh (M) (*E. coli*).

NUCLÉOTIDES	MOLES PAR 100 MOLES DE NUCLÉOTIDES		
	T	Sh	M
A	30,6	33,6	40,8
G	11,9	34,0	20,8
C	30,2	16,3	20,1
U	27,2	16,2	19,1
G+A/C+U	0,73	2,07	1,56

Les polyribonucléotides AGUC ont été synthétisés par la polynucléotide phosphorylase ; fraction Sephadex G-200 (MÉTHODES).

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les faits présentés montrent clairement que, chez *E. coli*, *B. cereus* et *A. faecalis*, un nucléoside naturel, la showdomycine, utilisé à des doses affectant ou non la croissance, bouleverse profondément la composition en bases de certains ARN, sans modifier celle de l'ADN.

Par divers moyens, nous avons montré que la plus grande partie de l'ARN à marquage rapide est constituée d'ARN dans lesquels la complémentarité des bases n'est plus observée ( $G + A/C + U = 2,0$  ;  $G = A$ ,  $C = U$ ). La demi-vie de ces ARN n'est pas pour autant modifiée. La présence de faibles

quantités d'ARN « messenger » normal dans les bactéries mises en présence de showdomycine pourrait s'expliquer par l'inhibition de l'activité de l'ARN polymérase par cet antibiotique. En effet, la showdomycine inhibe *in vitro* l'activité de l'ARN polymérase dépendante de l'ADN.

Il est remarquable qu'en présence d'antibiotique, l'ARN ribosomique 23 S (faisant partie des ribosomes 50 S, indispensables à la physiologie des bactéries) possède un rapport des bases très modifié ( $G + A/C + U = 2,0$  au lieu de 1,0) et possède une structure secondaire extrêmement importante, due à la présence de bases puriques en excès. Dans ces mêmes conditions, ni l'ARN 16 S, ni l'ARN 4 S ne sont modifiés.

On attendrait que la modification profonde d'une très large fraction des ARN à marquage rapide, et de l'ARN ribosomique 23 S, dans des bactéries dont la croissance n'est pas arrêtée par de faibles doses de showdomycine, se traduise par une modification importante de la croissance bactérienne. Or, ceci n'est pas le cas. Doit-on alors penser que la faible quantité d'ARN « messenger » normal synthétisé par ces bactéries est suffisante pour assurer une croissance normale ? Il serait très intéressant de déterminer si l'ARN à marquage rapide modifié participe ou non à la biosynthèse de certaines protéines.

Le phénomène observé chez les bactéries (*E. coli*) traitées par la showdomycine s'observe également chez les bactéries mutantes-sh résistantes à l'antibiotique. Cultivées en son absence, les bactéries mutantes-sh, dont la croissance n'est pas modifiée par rapport à celle des bactéries sensibles, synthétisent des ARN modifiés : une très large fraction (80 p. 100) d'ARN à marquage rapide, l'ARN 23 S et l'ARN 5 S. Il est important de préciser que le taux d'ARN à marquage rapide des bactéries mutantes-sh, ainsi que la demi-vie de cet ARN, ne diffèrent pas de ceux des bactéries normales. On s'attendrait ici également à ce que la présence d'ARN profondément modifiés chez les bactéries mutantes-sh se traduise par une modification importante de la croissance, ce qui n'est pas le cas (fig. 2).

Nos observations, qui montrent que les bactéries mutantes-sh synthétisent à la fois l'ARN ribosomique 16 S normal et l'ARN ribosomique 23 S riche en purines, confirment, chez *E. coli*, l'existence d'origines différentes pour ces deux ARN [3]. De plus, l'ARN 5 S et l'ARN 23 S qui dans les bactéries mutantes ont le même rapport des bases ( $G + A/C + U = 2,0$ ) rapport très différent de celui de l'ARN 16 S ( $G + A/C + U = 1,0$ ), pourraient avoir une origine commune [29] et non pas distincte [30, 31].

Les ARN modifiés chez les bactéries mutantes-sh d'*E. coli* sont-ils synthétisés par un enzyme différent de l'ARN polymérase dépendante de l'ADN ?

Nos résultats montrent sans ambiguïté, que la polynucléotide phosphorylase, purifiée à partir d'extraits des bactéries mutantes-sh, synthétise *in vitro* des polyribonucléotides dont la composition en bases ( $G + A/C + U$ ) est identique à celle que nous trouvons pour certains ARN synthétisés *in vivo* par les bactéries normales mises en présence de showdomycine et par les bactéries mutantes-sh cultivées en l'absence de cet antibiotique. En revanche, les bactéries mutantes-sh, pauvres en ARN « messenger normal », possèdent une ARN polymérase dépendante de l'ADN, dont l'activité, dimi-

nuée de 70-85 p. 100, n'est pas changée vis-à-vis de chacun des ribonucléoside-5'-triphosphates. Il est difficile de concevoir que chez les bactéries mutantes-sh l'ARN polymérase, qui utilise l'ADN comme matrice, puisse synthétiser des ARN qui par leur composition en bases (bases puriques en excès) ne sont pas complémentaires de l'ADN.

### RÉSUMÉ

La showdomycine à doses n'affectant pas la croissance impose, chez *E. coli*, *B. cereus* et *A. faecalis*, la biosynthèse en masse d'ARN à marquage rapide non complémentaires de l'ADN. Chez *E. coli*, particulièrement étudié, cet antibiotique, à des doses affectant ou non la croissance, permet également la synthèse d'un ARN ribosomique 23 S, dont le rapport des bases diffère profondément (nucléotides A et G en excès) de celui des ARN 16 S et 4 S. Le même phénomène s'observe, en l'absence d'antibiotique, chez un mutant-sh d'*E. coli* résistant à la showdomycine, dont la croissance ne diffère pas de celle des bactéries normales. Les bactéries mutantes-sh contiennent une ARN polymérase à activité fortement réduite et une polynucléotide phosphorylase possédant de nouvelles propriétés. Ce dernier enzyme pourrait être *in vivo* responsable de la biosynthèse des ARN modifiés.

★  
★★

Nous remercions vivement le Dr K. Takeda, de *Shionagi Research Laboratory, Osaka, Japon*, qui a aimablement mis à notre disposition la showdomycine avant la commercialisation de l'antibiotique.

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] WATSON (J.). *Molecular biology of the gene*. Benjamin (W. A.) Inc., edit., New York, Amsterdam, 1965.
- [2] OISHI (M.), OISHI (A.) and SUEOKA (N.). Location of genetic loci of soluble RNA on *Bacillus subtilis* chromosome. *Proc. nat. Acad. Sci. U. S.*, 1966, **55**, 109.
- [3] SPIEGELMAN (S.) and HAYASHI (M.). The present status of the transfer of genetic information and its control. *Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol.*, 1963, **28**, 161.
- [4] YANKOFSKY (S. A.) and SPIEGELMAN (S.). Distinct cistrons for the two ribosomal RNA components. *Proc. nat. Acad. Sci. U. S.*, 1963, **49**, 539.
- [5] DUBNAU (D.), SMITH (I.) and MARMUR (J.). Gene conservation in *Bacillus* Species. — II. The location of genes concerned with the synthesis of ribosomal components and soluble RNA. *Proc. nat. Acad. Sci. U. S.*, 1965, **54**, 724.
- [6] JACOB (F.) and MONOD (J.). Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J. mol. Biol.*, 1961, **3**, 318.
- [7] BOLTON (E. T.) and MCCARTHY (B. J.). A general method for the isolation of RNA complementary to DNA. *Proc. nat. Acad. Sci. U. S.*, 1962, **48**, 1390.
- [8] LEVINTHAL (C.), KEYNAN (A.) and HIGA (A.). Messenger RNA turnover and protein synthesis in *B. subtilis* inhibited by actinomycin D. *Proc. nat. Acad. U. S.*, 1962 **48**, 1631.
- [9] NEIDHARDT (C.). The regulation of RNA synthesis in bacteria. *Nucleic Acid Res. mol. Biol.*, 1964, **3**, 145.
- [10] HURWITZ (J.) and AUGUST (J. T.). The role of DNA in RNA synthesis. In DAVIDSON (J. N.) et COHN (W. E.), *Progress in Nucleic Acid Research*, Academic Press edit., New York, 1963, **4**, 59.
- [11] HURWITZ (J.), EVANS (A.), BABINET (Ch.) and SKALKA (A.). On the copying of DNA in the RNA polymerase reaction. *Cold Spring Harbor Symp. quant. Biol.*, 1963, **28**, 59.

- [12] WOESE (C.). Composition of various RNA fractions from microorganisms of different DNA composition. *Nature*, 1961, **189**, 920.
- [13] BELJANSKI (M.), FISCHER-FERRARO (C.) et BOURGAREL (P.). Identification des sites d'attachement spécifiques d'arginine et de valine dans des ARN d'origines différentes. — VIII. *Europ. J. Biochem.*, 1968, **4**, 184.
- [14] BELJANSKI (M.) et BELJANSKI (M.). Synthèse dans *Escherichia coli* des ARN dont la structure primaire diffère totalement de celle de l'ADN. *C.R. Acad. Sci.*, 1968, **267**, 1058.
- [15] PARDEE (A. B.), JACOB (F.) and MONOD (J.). The genetic control and cytoplasmic expression of « inductibility » in the synthesis of  $\beta$ -galactosidase by *E. coli*. *J. mol. Biol.*, 1959, **1**, 165.
- [16] BELJANSKI (M.) and OCHOA (S.). Protein biosynthesis by a cell-free bacterial system. *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.*, 1958, **44**, 494.
- [17] KOMATSU (Y.) and TANAKA (K.). Mechanism of action of showdomycin. I. Effect of showdomycin on the synthesis of nucleic acids and proteins in *E. coli* K 12. *Agric. biol. Chem.*, 1968, **32**, 1021.
- [18] NIRENBERG (M. W.). Cell-free protein synthesis directed by messenger RNA. *Methods in Enzymology*. In COLOWICK (S. P.) and KAPLAN (N. O.). Academic Press edit., New York, 1963, VI, 17.
- [19] BELJANSKI (M.), BELJANSKI (M.), BOURGAREL (P.) et CHASSAGNE (J.). Synthèse chez les bactéries d'ARN n'étant pas la copie de l'ADN. *C.R. Acad. Sci.*, 1969, **269**, 240.
- [20] BELJANSKI (M.). A propos du microdosage du ribose dans les acides nucléiques et leurs dérivés. *Ann. Inst. Pasteur*, 1949, **76**, 451.
- [21] SAITO (H.) and MIURA (K.). Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, **72**, 619.
- [22] WYATT (G. R.). Separation of nucleic acid components by chromatography on filter paper. *Nucleic Acids*. CHARGAFF (E.) and DAVIDSON (J. N.). Academic press edit., New York, 1955, **1**, 243.
- [23] DISCHE (Z.) — I. Color reactions of nucleic acids and their constituents based on reactions on their sugars. *Nucleic Acids*. CHARGAFF (E.) and DAVIDSON (J. N.), Academic Press edit., New York, 1955, **1**, 285.
- [24] BELJANSKI (M.), FISCHER-FERRARO (C.) et BELJANSKI (M.). Le RNA messenger, accepteur spécifique des L-acides aminés en présence d'enzymes bactériennes. *C.R. Acad. Sci.*, 1963, **257**, 547.
- [25] LOENING (U. E.). Molecular weights of ribosomal RNA in relation to evolution. *Biochem. J.*, 1967, **102**, 251.
- [26] GILLESPIE (D.) and SPIEGELMAN (S.). A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. *J. mol. Biol.*, 1965, **12**, 829.
- [27] CHAMBERLIN (M.) and BERG (P.). Deoxyribonucleic acid directed synthesis of ribonucleic acid by an enzyme from *Escherichia coli*. *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.* 1962, **48**, 81.
- [28] BELOZERSKY (A. N.) and SPIRIN (A. S.). A correlation between the composition of desoxyribonucleic acid and ribonucleic acids. *Nature*, 1958, **182**, 111.
- [29] HECHT (N. B.), BLEYMAN (M.) and WOESE (C. R.). The information of 5 ribosomal ribonucleic acid in *Bacillus subtilis* by posttranscriptional modification. *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.*, 1968, **59**, 1278.
- [30] MORELL (P.), SMITH (J.), DUBNOV (D.) and MARMUR (J.). Isolation and characterisation of low molecular weight ribonucleic acid species from *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 1967, **6**, 258.
- [31] BROWNLEE (G. G.) and SANGER (F.). Nucleotide sequence from low molecular weight ribosomal RNA of *Escherichia coli*. *J. mol. Biol.*, 1967, **23**, 337.
- [32] KEPES (A.). Régulation chez les microorganismes. C. N. R. S. édit., Rap. n° 124, Paris, 1965, 73.
- [33] NISHIMURA (H.), MAYANA (M.), KOMATSU (Y.), KATO (H.), SHIMAOKA (N.) and TANAKA (Y.). Showdomycin a new antibiotic from a *Streptomyces* Sp. *The Journal of antibiotics*, Sér. A., 1964, XVII, n° 4, 149.
- [34] SCHLEICH (T.) and GOLDSTEIN (J.). Gel filtration properties of CCD-prepared *E. coli* RNA. *Proc. nat. Acad. Sci. U.S.*, 1964, **52**, 745.