

## MODIFICATIONS DU RENOUVELLEMENT DE L'AMP FINAL DU tRNA DANS LE FOIE DE RAT SOUS L'INFLUENCE DE DIVERS INHIBITEURS DE SYNTHÈSE

Y. MOULÉ et R. M. LANDIN

*Institut de Recherches Scientifiques sur le Cancer,  
94-Villejuif, France*

Received 22 April 1970

The turnover of terminal AMP of rat liver tRNA relative to that of internal AMP was studied in presence of various inhibitors. Actinomycin D and aflatoxin B<sub>1</sub>, which strongly depress transcription in liver, lead to an increase of the specific radioactivity of external AMP/specific radioactivity of internal AMP ratio. On the contrary, drugs which inhibit the *in vivo* incorporation of aminoacids determine a significant decrease of this ratio.

### 1. Introduction

L'instabilité de la séquence finale pCpCpA des tRNA\*, dont l'intégrité est indispensable à la fonction de fixation et de transfert des aminoacides [1], a été observée dans les cellules animales comme chez les procaryotes [bibliographie dans références 2 et 3]. La signification fonctionnelle de cette mobilité reste difficile à définir; en effet, si chacun s'accorde à reconnaître que l'AMP final du tRNA se renouvelle plus rapidement que les AMP intérieurs, on estime que le phénomène ne correspond pas à un échange systématique de l'AMP final du tRNA à chaque transfert d'acide aminé [4-7]. Cependant, un certain nombre de résultats montrent que l'état physiologique des cellules influe non seulement sur le degré d'intégrité du triplet pCpCpA mais sur son renouvellement à condition que les précurseurs indispensables soient fournis aux cellules [3-10].

Nous avons étudié les variations de renouvellement de l'AMP final du tRNA du foie par rapport à celui des AMP intérieurs lorsque l'animal est soumis à l'action

d'inhibiteurs de synthèse qui altèrent le fonctionnement cellulaire et nous rapportons ici ceux qui concernent l'inhibition de la transcription et de la traduction *in vivo*.

### 2. Méthodes

Les rats mâles Wistar (Souche Conimentry) nourris à un régime semi-synthétique équilibré, reçoivent une injection intrapéritonéale de 5  $\mu$ Ci/100 g de poids d'adénine-<sup>14</sup>C, 2 h avant leur sacrifice par décapitation.

Le foie est homogénéisé dans le saccharose 0,25 M et le tRNA est extrait par le phénol à partir de la phase soluble du cytoplasme [11]. L'AMP final et les AMP intérieurs du tRNA sont isolés après hydrolyse alcaline et électrophorèse des nucléotides libérés, selon une méthode précédemment décrite [11].

La radioactivité des nucléotides est déterminée au spectromètre à scintillation liquide de Packard.

### 3. Résultats et discussion

Dans le foie de rat en état stationnaire, seul l'AMP du pCpCpA se renouvelle indépendamment des nucléotides de la chaîne intérieure du tRNA: le rapport entre la radioactivité spécifique de l'AMP final et

#### \* Abréviations:

tRNA, RNA transfert

pCpCpA, 5'-CMP-5'-CMP-5'-AMP

nucléotide final, nucléotide du triplet pCpCpA

nucléotide intérieur, nucléotide de la chaîne du tRNA à

l'exclusion du CpCpA

AS, radioactivité spécifique.

celle de ses homologues intérieurs suit, en fonction du temps d'incorporation du précurseur, une évolution très particulière qui traduit une situation métabolique complexe au niveau du pool des précurseurs acidosolubles [11]. Dans les expériences dont les résultats sont rapportés ici, nous avons adopté un temps d'incorporation tel qu'il évite au maximum les phénomènes de réutilisation des précurseurs qui s'installent secondairement avec le temps: tous les rats ont été sacrifiés 2 h après l'injection de l'adénine- $^{14}\text{C}$ .

Chez les animaux témoins, le rapport AS de l'AMP final/AS des AMP intérieurs est de l'ordre de 12 (tableau 1). L'actinomycine dont la liaison avec le DNA se traduit par le blocage de la RNA-polymérase, inhibe la transcription de la chaîne intérieure du tRNA, à un degré qui dépend de la dose injectée mais qui, dans tous les cas, reste toujours inférieur à celui observé pour les autres RNA cellulaires [12]; quelle que soit la dose utilisée, le renouvellement de l'AMP final du tRNA est relativement moins affecté par l'antibiotique de telle manière que l'on observe une augmentation du rapport entre les AS de l'AMP final/AMP intérieurs (tableau 1). Pour des doses faibles de l'antibiotique, le

phénomène est réversible avec le temps. L'aflatoxine  $\text{B}_1$ , hépatocancérogène très puissant, est aussi un inhibiteur de la transcription dans le foie [13]. Elle conduit à des variations allant dans le même sens que celles déclenchées par l'actinomycine (tableau 1).

Ainsi les inhibiteurs de la transcription dans le foie ont comme conséquence une augmentation apparente du renouvellement de l'AMP final du pCpCpA comparativement à celui de ses homologues intérieurs, et ceci peut s'expliquer par le fait que le renouvellement des trois nucléotides terminaux est assuré par une pyrophosphorylase dont l'activité n'est pas aussi rapidement atteinte par l'inhibiteur que celle de la RNA-polymérase.

Le blocage de la synthèse protéique a été réalisé soit par la puromycine, soit par la cycloheximide dans des conditions telles que 95% au moins de l'incorporation des acides aminés est inhibée *in vivo*. Les deux drogues diminuent sensiblement le renouvellement de l'AMP final; par contre, après 2 h d'action, la radioactivité des AMP intérieurs n'est que peu modifiée par la puromycine et pas du tout par la cycloheximide. Il en résulte un rapport AS de AMP

Tableau 1

Influence de certains inhibiteurs de synthèse sur le renouvellement *in vivo* de l'AMP final et des AMP intérieurs du tRNA du foie de rat.

Traitements appliqués aux rats	AMP final		AMP intérieur		$\frac{\text{AS AMP final}}{\text{AS AMP intérieurs}}$
	dpm $\mu\text{gP}$	% inhibiton par rapport au témoin	dpm $\mu\text{gP}$	% inhibition par rapport au témoin	
Témoin	3040	—	250	—	12,1
Actinomycine <sup>a</sup>					
800 $\mu\text{g/kg}$	1737	42,8	63	74,8	27,6
200 $\mu\text{g/kg}$	2040	32,8	116	53,6	17,6
Aflatoxine $\text{B}_1$ <sup>b</sup>					
1 mg/kg	1892	37,7	105	58	18
Puromycine <sup>c</sup>	1390	54,3	151	39,6	9,2
Cycloheximide <sup>d</sup>	1704	43,9	284	nul	6

Chaque animal a reçu 5  $\mu\text{Ci}$  d'adénine- $^{14}\text{C}$  par 100 g de poids pendant 2 h.

<sup>a</sup> L'actinomycine Merck est injectée en solution dans 0,2 ml de propylène glycol 2 h avant l'injection de l'adénine- $^{14}\text{C}$ .

<sup>b</sup> L'aflatoxine  $\text{B}_1$  est injectée en solution dans le propylène glycol 2 h avant le précurseur.

<sup>c</sup> La puromycine est administrée en 4 injections de 40 mg/kg chacune: la 1ère, 5 min avant le précurseur, les 3 autres respectivement 30, 60 et 90 min après le précurseur.

<sup>d</sup> La cycloheximide est injectée à la dose de 2 mg/kg, 5 min avant le précurseur.

final/AS des AMP intérieurs très sensiblement diminué (tableau 1). Nous avons observé un fait analogue chez des animaux soumis à un jeûne protéique total pendant 6 à 7 semaines: le rapport entre les AS des AMP final et intérieurs est de 6 environ pour des conditions d'incorporation de l'adénine- $^{14}\text{C}$  identiques à celles utilisées dans ce travail (résultats non publiés).

Ainsi une altération de la synthèse protéique dans le foie est susceptible de ralentir le renouvellement l'AMP terminal du tRNA sans que celui de la chaîne intérieure soit changé. L'intérêt de ces derniers résultats nous semble résider dans la mise en évidence d'une corrélation entre le renouvellement *in vivo* de l'AMP final du tRNA dans le foie et l'activité de la chaîne métabolique de la traduction dans laquelle le tRNA est directement impliqué, même si la nature exacte de cette relation reste à définir.

#### Remerciements

Nous remercions Mademoiselle Darracq pour sa collaboration technique. Ce travail a bénéficié d'une aide du Département de Biologie du Commissariat à l'Energie Atomique.

#### Références

- [1] L.I.Hecht, M.L.Stephenson et P.C.Zamecnik, *Biochim. Biophys. Acta* 29 (1958) 460.
- [2] C.E.Holt, P.B.Joel et E.Herbert, *J. Biol. Chem.* 241 (1966) 1819.
- [3] R.Giege et J.P.Ebel, *Biochim. Biophys. Acta* 161 (1968) 126.
- [4] D.Nathans et F.Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 47 (1961) 497.
- [5] C.Scholtissek, *Biochim. Biophys. Acta* 61 (1962) 499.
- [6] M.Cannon, *Biochim. Biophys. Acta* 87 (1964) 154.
- [7] R.Rosset et R.Monier, *Biochim. Biophys. Acta* 108 (1965) 376.
- [8] V.R.Glisin et M.V.Glisin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 52 (1964) 1548.
- [9] M.Cannon, *Biochem. J.* 94 (1965) 8 P.
- [10] M.D.Herrington et A.O.Hawtrey, *Biochem. J.* 116 (1970) 405.
- [11] R.M.Landin et Y.Moulé, *Biochim. Biophys. Acta* 129 (1966) 249.
- [12] Y.Moulé et R.M.Landin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 20 (1965) 491.
- [13] C.Lafarge, C.Frayssinet et A.M.de Recondo, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 47 (1965) 1724.