

45

L'ARN ISOLÉ DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE JAUNE
DU NAVET ACCEPTEUR DES L-ACIDES AMINÉS
EN PRÉSENCE D'ENZYMES BACTÉRIENS (*).

par M. BELJANSKI.

Service de Biochimie Cellulaire, Institut Pasteur, Paris.

(Mémoire reçu le 28 avril 1965).

Nous avons précédemment montré qu'il existe chez *Alcaligenes faecalis* une fraction d'ARN à marquage rapide fixant les L-acides aminés en présence d'un des quatre ribonucléoside-5'-triphosphates et d'enzymes purifiés d'origine bactérienne [1]. Les L-acides aminés sont attachés à l'ARN (**) actif par une liaison covalente et le complexe acide aminé ¹⁴C-ARN est précipitable en milieu acide, à basse température. Rappelons que les acides aminés fixés sur l'ARN, peuvent, dans un second temps, former des liaisons peptidiques [2]. Parmi divers ARN d'*Escherichia coli*, des levures, seule la fraction d'ARN à marquage rapide fixe les acides aminés en présence d'enzymes isolés à partir d'*Alcaligenes faecalis*. Dans nos conditions expérimentales l'ARN ribosomal et l'ARN de transfert ne possèdent pas cette propriété.

Nous présentons ici, les résultats concernant la formation du complexe entre les acides L-acides aminés ¹⁴C et l'ARN purifié, isolé du virus de la mosaïque jaune du Navet.

Diverses préparations d'ARN viral isolées par la méthode au phénol, à partir de virus purifiés ont été aimablement mises à notre disposition par le Dr. HIRTH et ses collaborateurs [3]. Pour la formation du complexe « acide aminé-ARN viral » nous avons utilisé une fraction enzymatique purifiée à partir d'*Alcaligenes faecalis* selon la technique décrite [4, 5]. Le principe est le suivant : après incubation à 32° de l'ARN (20 à 40 µg) en présence d'acide aminé ¹⁴C, d'un ribonucléoside-5'-triphosphates et d'enzymes (60 µg) dans du tampon Tris pH 7,6 contenant du Mg⁺ (4.10⁻³M), le complexe est précipité par HClO₄ 0.3N

(*) Ce travail a bénéficié de l'aide du « National Institute of Health », du « Jane Coffin Childs Memorial Fund », du Commissariat à l'Energie Atomique et de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique.

(**) Abréviations : ARN et ADN : acide ribo- et désoxy-ribonucléiques ; RNase : ribonucléase ; DNase : Désoxyribonucléase ; ATP, UTP, GTP, CTP : adénosine-, uridine-, guanosine-, cytidine-5'-triphosphate. Biogel P 60 : polyacrylamine ; TYMV : virus de la mosaïque jaune du Navet.

(fin) et lavé, soit par HClO_4 0.3N, soit dialysé en milieu acide, soit séparé de l'acide aminé ^{14}C libre sur colonne de Biogel P 60. Le précipité est dissous dans une solution d'ammoniaque N, desséché ; puis la radioactivité déterminée à l'aide du compteur Tracerlab.

TABLEAU I.
Complexe « acide aminé ^{14}C -ARN » viral.

L-acides aminés ^{14}C	aa ^{14}C fixé par 100 μg d'ARN C P M
Leu.....	30
Ala.....	40
Phé.....	35
Iso.....	20
Arg.....	25
Pro.....	30
Ser.....	30
Val.....	6000

Milieu d'incubation en μMoles par ml : MgCl_2 4,0 ; Tris pH 7,6 50 ; ATP 0,6 ; valine ^{14}C 4 $\text{m}\mu\text{M}$: 185000 CPM ; ARN 20 μg ; enzyme 60 μg ; incubation 20 minutes à 32°.

TABLEAU II.
Complexe valine ^{14}C -ARN
formé en présence de divers ribonucléoside-5'-triphosphates.

	Val ^{14}C -ARN (20 μg) C P M			
	ATP	UTP	CTP	GTP
Milieu complet.....	2 980	2 300	1 000	1 050
sans ARN.....	60	70	40	40
sans énergie.....	45	50	50	45
sans enzyme.....	40	50	40	40
+ ADP (2 μM).....	830	—	—	—
+ AMP (5 μM).....	3 016	—	—	—
+ UDP (2 μM).....	—	630	—	—
+ UMP (5 μM).....	—	2 380	—	—
+ GDP (2 μM).....	—	—	—	210

Conditions d'incubation (voir Tableau I).
0,6 μM de chaque ribonucléoside-5'-triphosphate.

Les résultats résumés dans le Tableau I montrent que parmi les acides aminés utilisés, seule, apparemment, la valine s'attache à l'ARN viral. Dans les conditions décrites la fixation de la valine sur l'ARN atteint un plateau au bout de 20 minutes à 30°. La figure 2 montre la quantité de valine ^{14}C fixée en fonction de diverses quantités d'ARN présentes dans le milieu d'incubation. Le complexe « AA-ARN » ne

se forme pas en présence de ribonucléase tandis que la DNase n'a aucun effet sur l'attachement de l'acide aminé à l'ARN. La fixation des acides aminés a lieu en présence de chacun des quatre ribonucléosides-5'-triphosphates (ATP, UTP, GTP, CTP). Le taux de fixation semble varier selon le ribonucléoside triphosphates utilisé (Tableau II). L'ob-

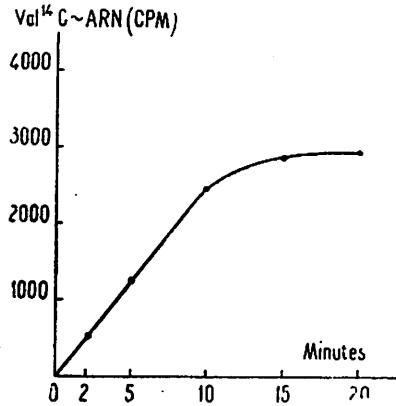


FIG. 1. — Formation du complexe val ¹⁴C-ARN viral en fonction du temps. Conditions voir Tableau I.

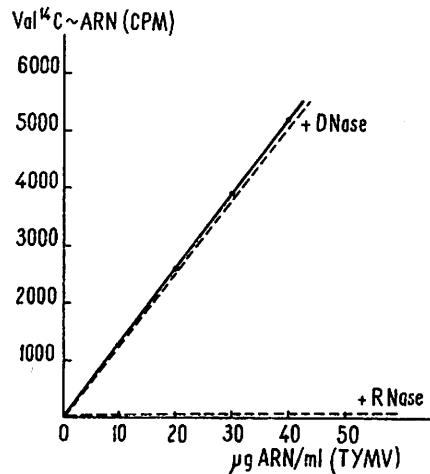


FIG. 2. — Formation du complexe entre val ¹⁴C et l'ARN (diverses concentrations) en présence de RNase (1 µg) et de DNase (20 µg).

servation que l'ARN viral n'accepte que la valine ¹⁴C dans les conditions habituelles est très surprenante à première vue. On peut cependant penser que des régions particulières d'ARN seraient les sites de fixation de la valine ¹⁴C. Nous avons cherché les conditions pouvant

permettre de rendre accessibles aux autres acides aminés les régions d'ARN initialement inactives. L'ARN viral a été soumis à l'ultra-centrifugation sur gradient de saccharose (5-20 p. 100) pendant 16 h dans

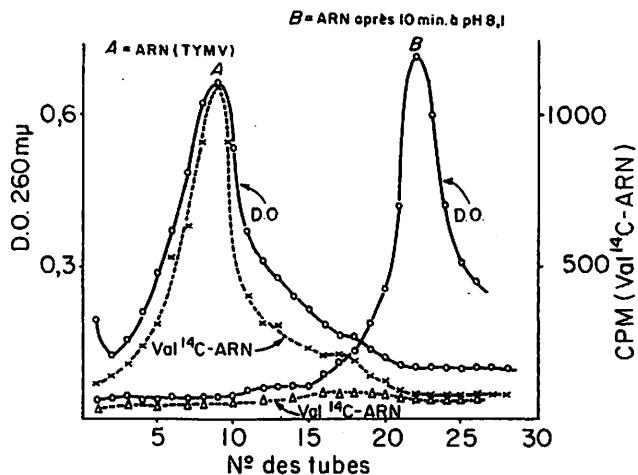


FIG. 3. — Complexe val ^{14}C -ARN formé à l'aide de chaque fraction du gradient après ultracentrifugation de l'ARN viral sur gradient de saccharose (5-20 p. 100, Tris « pH » 7,0). Conditions, voir Tableau I).

la Spinco préparative (SW₂₅). Le diagramme 3 montre que la courbe des densités optiques prises à 260 m μ n'est pas symétrique ; elle indique une faible polydispersion de l'ARN vers les régions de faibles masses moléculaires (A). La courbe représentant le complexe (Fig. 3) « val ^{14}C -ARN » (A) suit la courbe des densités optiques uniquement dans la région du pic (38 S). En dehors du pic il existe un sensible

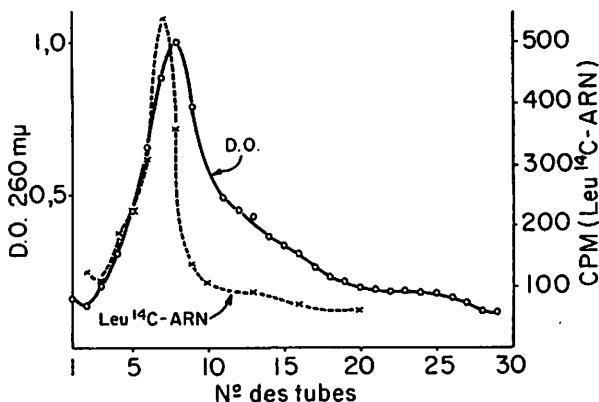


FIG. 4. — Complexe Leu ^{14}C -ARN formé après ultracentrifugation de l'ARN viral sur gradient de saccharose. Conditions, voir Fig. 3.

décalage entre les densités optiques et le complexe « val ^{14}C -ARN ». Il est surprenant de constater que les acides aminés qui ne se fixaient pas sur l'ARN total s'attachent maintenant sur certaines fractions de l'ARN après centrifugation de celui-ci sur gradient de saccharose. Les courbes représentant les complexes « Leu ^{14}C -ARN » et « Ala ^{14}C -ARN » ne suivent que très partiellement les densités optiques du côté des molécules lourdes. L'absence de parallélisme entre les densités optiques et le complexe formé avec ces acides aminés est considérable dans la région à droite du pic.

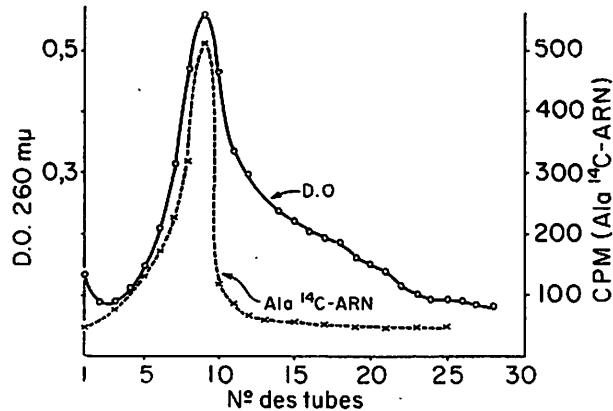


FIG. 5. — Complexe Ala ^{14}C -ARN formé après centrifugation de l'ARN viral sur gradient de saccharose. Conditions, voir Fig. 3.

La courbe du pH établie pour la formation du complexe val ^{14}C -ARN viral total, montre que la fixation de la valine est extrêmement faible à pH 7,0 (contrairement à ce qu'on observe avec l'ARN d'*Alcaligenes* [5]), tandis qu'à pH plus élevé (diminution sensible de l'hypochromicité) la fixation atteint son optimum à pH 7,6. L'ARN du TYMV ne contenant pas de nucléase nous avons pensé qu'une modification de la structure de l'ARN viral à pH alcalin rendait certaines régions de l'ARN accessibles aux enzymes pour la fixation de l'acide aminé. Rappelons que la vitesse d'incorporation de la valine (Fig. 1) n'est pas modifiée en présence d'un grand excès d'enzymes, ce qui indique que la modification progressive de la structure de l'ARN ne dépend pas d'enzymes mais du pH. En effet l'ARN viral incubé en l'absence d'enzymes dans du tampon Tris 0,2M pH 8,0 (ou véronal pH 8,0) pendant 10 minutes puis rapidement passé sur colonne de Biogel P 60 ne possède plus le pouvoir de fixer les acides aminés essayés. Examiné sur gradient de saccharose, le profil d'un tel ARN a changé et le pic se situe au voisinage de 4 S (courbe B, Fig. 3). Des résultats semblables sont obtenus lorsque l'ARN est chauffé à 100° pendant 10 minutes dans

du Tris « pH » 7,0. Par contre, pour une incubation de 2 à 4 minutes dans du tampon Tris pH 8,0, l'ARN est très polydisperse et seules les molécules lourdes dans les régions du gradient possèdent encore une certaine capacité de fixer les acides aminés. La quantité d'acides aminés ^{14}C (val, leu, ala) fixés sur l'ARN viral (*) varie selon les prépara-

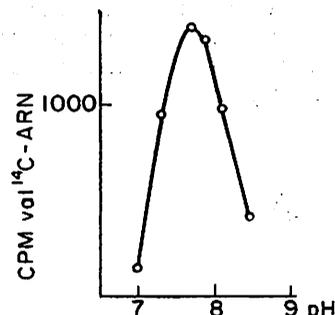


Fig. 6. — Formation du complexe val ^{14}C -ARN en fonction du pH (Tampon Tris).

tions d'ARN, selon son intégrité et les conditions dans lesquelles on suit la formation du complexe (Tableau III et Fig. 4 et 5). L'ensemble de ces résultats montre que l'ARN isolé du virus de la mosaïque jaune du Navet est capable de fixer les acides aminés lorsqu'il possède une masse moléculaire élevée et se trouve sous une forme où certaines régions d'ARN sont accessibles aux enzymes. Par contre, dégradé (taille $\neq 4$ S) il ne présente aucune activité acceptrice. Le complexe AA-ARN est stable en milieu acide à froid et à la température du laboratoire. Par contre, l'acide aminé du complexe est détaché de l'ARN par chauffage en milieu acide et en milieu fortement alcalin (Tableau IV). L'hydroxylamine enlève l'acide aminé du complexe en milieu de pH neutre. La vitesse de réaction entre l'hydroxylamine et l'acide aminé lié à l'ARN est lente (effet du pH). Ces observations confirment que l'acide aminé dans le complexe AA-ARN est lié à l'ARN par une liaison covalente.

Il est fort intéressant de comparer nos résultats montrant que la fixation des acides aminés sur l'ARN viral est étroitement liée à l'intégrité de l'ARN, aux résultats de M. HIRTH et ses coll. [7]. Ces auteurs ont montré que l'ARN viral ayant la masse moléculaire de 2×10^6 ainsi que celui partiellement dégradé possèdent un pouvoir infectieux, tandis que l'ARN dégradé en présence de versène et ayant une constante de sédimentation d'environ 4 S n'est plus infectieux. Nous avons constaté que l'ARN viral dégradé par simple incubation dans du tampon Tris 0,2M pH 8,0 en ARN de masse moléculaire proche de 4 S, a complètement perdu son pouvoir accepteur pour les acides aminés. Il s'agit

La masse moléculaire de l'ARN du TYMV est d'environ 2×10^6 (6.000 nucléotides) ; celle de la protéine capsulaire est de 20.000 (189 résidus d'acides aminés) [6].

TABLEAU III.
Quantité d'acides aminés ^{14}C fixés sur l'ARN du TYMV.

Préparations d'ARN	m μ moles d'AA ^{14}C fixés par mg d'ARN		
	Valine	Leucine	Alanine
I } — Total.....	1,0	0,08	0,03
I } — Sur gradient.....	1,6	1,0	1,0
II } — Total.....	4,0	0,05	0,04
II } — Sur gradient.....	4,5	2,20	2,30
III } — Total.....	2,5	0,06	0,04
III } — Sur gradient.....	2,7	1,80	1,70

Conditions d'incubation (voir Tableau I).

TABLEAU IV.
Conditions de stabilité et de dégradation du complexe « val ^{14}C -ARN ».

Conditions	100 μg d'ARN (Val ^{14}C -ARN) C P M
Temps 0; pH 3,0.....	6 300
Tampon succinate 0,2 M pH 6,2.....	6 200
Tris 0,5 M «pH» 7,0.....	6 000
Tampon Tris 0,5 M pH 8,0.....	2 840
Tris 0,5 M «pH» 7,0 + NH_2OH 0,5 M.....	2 000
Chauffé 5' à 100° dans TCA 5 p. 100.....	88
NH_4OH N.....	130

Complexe « valine ^{14}C -ARN » formé en présence d'ATP.
Après lavage par HClO_4 0,3 N le complexe a été incubé pendant 30 minutes à 32° dans les conditions ci-dessus.

dans les deux cas d'activités biologiques différentes, l'une manifestée *in vivo*, l'autre *in vitro* mais c'est le même ARN qu'on utilise pour ces activités biologiques. L'ARN du TYMV manifeste donc, en l'absence de ribosomes ou de fragments bactériens son activité acceptrice pour les acides aminés lorsqu'il est à l'état polymérisé.

Nous remercions très vivement M. le Professeur L. HIRTH et ses collaborateurs de nous avoir fourni aussi généreusement l'ARN du TYMV, sans lequel nous n'aurions pu mener à bien ce travail.

RÉSUMÉ.

L'ARN purifié à partir du virus de la mosaïque jaune du navet forme un complexe avec les L-acides aminés (^{14}C) lorsqu'il est incubé en pré-

sence d'un ribonucléoside-5'-triphosphate et d'enzymes bactériens purifiés. La fixation des acides aminés sur l'ARN viral est liée à l'intégrité de l'ARN. Certaines des propriétés de l'ARN et du complexe « ARN-acide aminé » ont été décrites.

SUMMARY.

RNA purified from turnip yellow mosaic virus forms a complex with L-amino acids (^{14}C) when incubated in the presence of ribonucleoside-5-triphosphate and purified bacterial enzymes. The amino acid fixation on viral RNA is dependent on RNA integrity. Some properties of RNA and of « AA-RNA » complex are described.

ZUSAMMENFASSUNG.

Die aus Viren der gelben Mosaik der weissen Rübe gereinigte RNS bildet einen Komplex mit den L-Aminosäuren (^{14}C) wenn sie in Gegenwart eines Ribonukleosid-5'-Triphosphats und von gereinigten Bakterien-Enzymen inkubiert wird. Die Fixation der Aminosäuren auf der Viren-RNS hängt mit der Vollständigkeit der RNS zusammen. Gewisse Eigenschaften der RNS und des « RNS-Aminosäure »-Komplexes werden beschrieben.

BIBLIOGRAPHIE.

1. BELJANSKI, M., FISCHER, C. et BELJANSKI, M. — *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1963, 257, 547.
2. BELJANSKI, M. — Colloque International du CNRS 1963 (Mécanismes de régulation des activités cellulaires chez les microorganismes).
3. HIRTH, L., HORN, P. et RICHARD, C. — *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1961, 253, 1500.
4. BELJANSKI, M. et OCHOA, S. — *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1958, 44, 494.
5. BELJANSKI, M. et BELJANSKI, M. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 72, 585.
6. SYMONS, R. H., REES, M. W., SHORT, M. N. et MARKHAM, R. — *J. Mol. Biol.*, 1963, 6, 1.
7. HIRTH, L., HORN, P. et STRAZIELLE, C. — *C. R. Acad. Sci. Paris*, 1962, 255, 212.