

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE. — *Synthèse in vitro d'un ARN utilisé comme amorceur pour la réplication de l'ADN*. Note (*) de MM. Michel Plawecki et Mirko Beljanski, présentée par M. Pierre Lépine.

La polynucléotide phosphorylase (PNPase) d'*E. coli* est capable de synthétiser à haute température un ARN possédant la propriété de servir *in vitro* comme amorceur pour la réplication de l'ADN en présence de l'ADN polymérase I ADN dépendante.

Le mécanisme de la réplication de l'ADN, constituant essentiel des gènes chez les êtres vivants, a suscité de nombreuses recherches depuis la découverte chez les bactéries de l'ADN polymérase I ADN dépendante (¹). Sans entrer dans la controverse concernant l'activité réparatrice ou répliquative des différentes ADN polymérases I, II et III [(²), (³), (⁴)], nous avons porté notre attention sur l'initiation *in vitro* de la synthèse d'ADN en présence d'ADN polymérase I d'*E. coli*.

Récemment nous avons montré (⁵) que l'ADN d'*E. coli* est porteur d'un ARN particulier et que cet ARN peut, *in vitro*, être répliqué par la polynucléotide phosphorylase de ces mêmes bactéries (⁶). Il a été confirmé (⁷) qu'un ARN de faible masse moléculaire se trouve lié à l'ADN nouvellement synthétisé *in vivo* chez les bactéries. De plus la réplication *in vitro* de l'ADN du phage $\Phi \times 174$ exige la présence d'un ARN, ARN synthétisé en présence de rifampicine (⁸) ce qui exclut la participation de l'ARN polymérase ADN dépendante dans cette réaction.

Nous montrons ici que, *in vitro*, la PNPase des bactéries sauvages d'*E. coli* synthétise à 70° un ARN (ARN-70°) que l'ADN polymérase ADN dépendante d'origine bactérienne utilise comme amorceur pour la synthèse des nouvelles chaînes d'ADN.

MATÉRIEL ET MÉTHODES. — La PNPase a été purifiée environ 300 fois (⁶) à partir des bactéries *E. coli* K-12 Hfr, souche sauvage. D'après le rapport 280/260 la fraction enzymatique ne contient pas plus de 0,75 % de matériel constitué de nucléotides ; elle ne contient ni RNA polymérase ni nucléase en quantité détectable.

Pour la synthèse de l'ARN-70° le milieu réactionnel contient : Tris-HCl pH 8,5, 10 μ M ; MnCl₂ 0,4 μ M ; nucléoside-5'-diphosphate (ADP, GDP, CDP, UDP) 0,25 μ M de chaque. PNPase 100 μ g. Il est indispensable d'ajouter l'enzyme en dernier. Volume final 0,2 ml. Incubation à 70° pendant 2 h 30 à 3 h 30. L'ARN synthétisé est séparé de l'enzyme à l'aide de chloroforme puis dialysé à 4° contre de l'eau distillée pendant 72 h. Les ADN bactériens et ADN des phages λ et T₄ ont été isolés et purifiés par le phénol (en présence de lauryl-sulfate) et le chloroforme. Les ADN des mammifères proviennent de chez « Worthington Biochemical Corp. » USA. Le contenu en ARN de tous les ADN a été rigoureusement contrôlé (teneur inférieure à 10 %). Certains ADN ont été traités par le KOH (0,3 N pendant 16 h à 37° puis dialysés) afin d'éliminer totalement l'ARN contaminant l'ADN.

L'isolement de l'ADN polymérase provenant des bactéries ML 30 et M 500 shor, et le milieu réactionnel ont été précédemment décrits (⁹).

RÉSULTATS. — A 37°, en présence des 4 XDP, chacun utilisé en quantité équimolaire, la PNPase des bactéries d'*E. coli* synthétise un ARN (rapport G + A/C + U = 1) inactif comme amorceur dans la répliation *in vitro* de l'ADN. Le polyribonucléotide « associé » en très faible quantité à la PNPase des bactéries sauvages (6) est également sans effet.

TABLEAU I

Analyse de l'ARN synthétisé par la polynucléotide phosphorylase

| | moles pour 100 moles de nucléotides analysés | | | |
|-------------------|--|--------|---------|----------|
| | 37 °C | 70 °C | | |
| | | Exp. I | Exp. II | Exp. III |
| G | 26,4 | 34,3 | 29 | 32,1 |
| A | 25,2 | 26,6 | 31 | 32,9 |
| C | 25,5 | 24,4 | 21 | 21,0 |
| U | 22,9 | 14,7 | 19 | 14,0 |
| G + A/C + U | 1,07 | 1,56 | 1,50 | 1,85 |

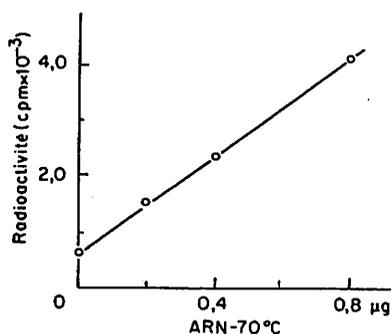


Fig. 1

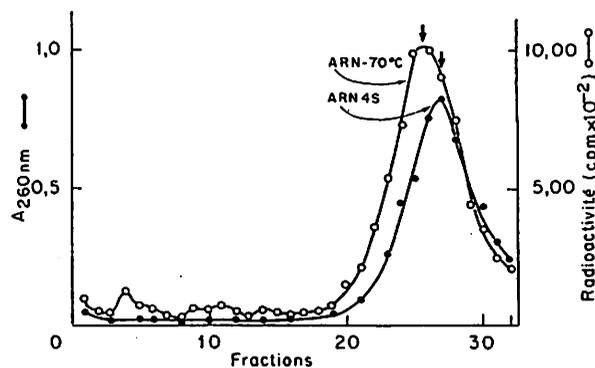


Fig. 2

Fig. 1. — Effet de l'ARN-70° sur la répliation de l'ADN d'*A. tumefaciens* B6.

Fig. 2. — Profil de sédimentation de l'ARN-70° sur un gradient de saccharose 5-20 %.

Par contre, à 70°, la PNPase synthétise un ARN (ARN-70°) contenant des nucléotides à bases puriques en excès (tableau I). Purifié, cet ARN ajouté au milieu réactionnel de l'ADN polymérase, stimule fortement la polymérisation des 4 *d*-XTP H³. La stimulation est proportionnelle à la quantité d'ARN présent dans le milieu d'incubation (fig. 1). L'effet de l'ARN-70° ne s'observe que lorsque les 4 désoxy nucléotides sont présents dans le milieu d'incubation. L'omission d'un seul des 4 *d*-XTP se traduit par une nette diminution de la quantité des désoxypolymères formés (tableau II).

La stimulation par l'ARN-70° ne s'observe pas en présence de RNase A ou T₁, ou si l'ARN amorceur a été préalablement traité par la périodate de Na (destruction du nucléoside terminal). Il en est de même si l'ADN matriciel est dégradé par la DNase.

Si nous utilisons de petites quantités d'ADN matriciel, préalablement traité par le KOH, nous pouvons rendre la réaction complètement dépendante de l'ARN-70° (tableaux II et III).

Dans les conditions utilisées, l'ARN-70° est essentiellement actif dans la répliation des ADN bactériens ou de celui des mammifères. Par contre il est très peu actif dans la répliation des ADN des phages λ et T₄ (tableau III).

TABLEAU II

Activité de l'ADN polymérase ADN dépendante des bactéries *E. coli*

| | <i>d</i> -TTP H ³ incorporé en 20 mn (cpm) |
|---|--|
| Milieu complet (avec ARN-70°) (ADN d' <i>A. tumefaciens</i> 0,5 µg) | 2 870 |
| Milieu complet (ADN polymérase ADN dépendante chauffée) | 410 |
| Milieu sans ADN | 380 |
| Milieu sans ARN-70° | 372 |
| Milieu sans ADN et sans ARN-70° | 210 |
| Milieu complet (ARN-70° traité par le périodate de Na) | 342 |
| Milieu sans <i>d</i> -ATP | 860 |
| Milieu sans <i>d</i> -ATP, sans <i>d</i> -CTP | 372 |
| Milieu sans <i>d</i> -ATP, sans <i>d</i> -CTP sans <i>d</i> -GTP | 280 |

TABLEAU III

Action de l'ARN-70° sur la répliation de différents ADN

| | pmoles de <i>d</i> -TTP H ³ incorporé en 20 mn | | |
|--|---|--------------|-------------|
| | sans ARN-70° | avec ARN-70° | stimulation |
| ADN phage T ₄ 0,5 µg | 37,6 | 43,0 | 0 |
| ADN phage λ 0,5 µg | 24,1 | 74,0 | 3 |
| ADN du sperme de saumon 0,5 µg | 14,0 | 146,0 | 10 |
| ADN du thymus de veau 0,5 µg | 39,6 | 449,6 | 11 |
| ADN <i>A. tumefaciens</i> B ₆ traité par le KOH 0,5 µg | 10,3 | 312,0 | 30 |

ANALYSE DE L'ARN-70°. — Le tableau I montre que l'ARN-70° contient un excès de bases puriques (G + A/C + U = 1,5-1,8) comme les ARN transformants précédemment décrits [(⁵), (¹⁰)]. La taille de l'ARN-70°, d'après sa position sur le gradient de saccharose par rapport au t-RNA, est d'environ 5 S (*fig. 2*).

ANALYSE DU PRODUIT H³ SYNTHÉTISÉ PAR L'ADN POLYMERASE EN PRÉSENCE ET EN L'ABSENCE D'ARN-70°. — Le produit H³ synthétisé par l'ADN polymérase en présence d'ADN d'*A. tumefaciens* B₆ et d'ARN-70° est précipitable par l'ATC, résistant à la RNase et au KOH, à la pronase, mais il est dégradé par la DNase.

Afin de déterminer si l'ADN synthétisé était complémentaire de l'ADN utilisé comme matrice ou de l'ARN utilisé comme amorceur, le produit H³ synthétisé dans des conditions optimales a été séparé de l'enzyme puis hydrolysé. L'analyse globale des bases ne montre pas de différence significative entre l'ADN-H³ et l'ADN utilisé

comme matrice (tableau IV). L'ARN amorceur (ARN-70°) ne semble pas influencer la composition en nucléotides de l'ADN synthétisé par l'ADN polymérase I. Le produit de la réaction est bien la copie de la matrice utilisée. L'ARN-70° sert uniquement d'amorceur pour initier la synthèse de nouvelles chaînes de polydésoxyribonucléotides.

Des expériences réalisées sur gradient de Cs_2SO_4 indiquent que l'ADN- H^3 est lié à l'ARN amorceur. Cet « hybride ADN-ARN-70° » est détruit par le KOH, ce qui suggère que l'ARN-70° est lié de façon covalente à l'ADN.

TABLEAU IV

Composition de l'ADN H^3 synthétisé en présence d'ARN-70° et d'ADN B_6

| | moles pour 100 moles de nucléotides analysés | |
|-------------------|---|------------------|
| | d-XTP H^3 | ADN B_6 |
| d-ATP | 18,0 | 21,0 |
| d-GTP | 29,2 | 30,2 |
| d-CTP | 35,6 | 28,0 |
| d-TTP | 17,2 | 20,8 |
| C + T/G + A | 1,12 | 0,96 |

CONCLUSION. — Les faits présentés apportent la preuve qu'un ARN synthétisé à 70° par la PNPase initie *in vitro* en présence d'ADN polymérase ADN dépendante la répllication de l'ADN utilisé comme matrice. L'ARN amorceur possède une spécificité pour certains ADN. Ces observations sont en accord avec les constatations que l'ADN des cellules des mammifères ⁽¹⁾, des bactéries ⁽⁵⁾ et des phages à ADN ⁽¹²⁾ porte un ARN qui pourrait agir *in vivo* comme amorceur.

(*) Séance du 14 janvier 1974.

(1) A. KORNBERG, I. R. LEHMAN et E. S. SIMMS, *Fed. Proc.*, 15, 1956, p. 291.

(2) R. KNIPPERS, *Nature*, 228, 1970, p. 1050.

(3) R. E. MOSES et C. C. RICHARDSON, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 41, 1970, p. 1557.

(4) T. KORNBERG et M. C. GEFTER, *Proc. Nat. Acad. Sc. USA*, 68, 1971, p. 761.

(5) M. BELJANSKI, M^{me} M. BELJANSKI et P. BOURGAREL, *Comptes rendus*, 272, Série D, 1971, p. 2736.

(6) M. PLAWECKI et M. BELJANSKI, *Comptes rendus*, 273, Série D, 1971, p. 827.

(7) S. HIROSÉ, R. OKAZAKI et F. TAMANOI, *J. Mol. Biol.*, 77, 1973, p. 501.

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

(9) M. BELJANSKI, *Comptes rendus*, 276, Série D, 1973, p. 1625.

(10) M. BELJANSKI, M. BELJANSKI, P. MANIGAULT et P. BOURGAREL, *Proc. Nat. Acad. Sc. USA*, 69, 1972, p. 191.

(11) R. M. FOX et coll., *Nature New Biology*, 245, 1973, p. 234.

(12) J. F. SPEYER et coll., *J. of Virology*, 10, 1972, p. 902.

Institut Pasteur,
28, rue du Docteur-Roux, 75015 Paris.