

CHIMIE BIOLOGIQUE. — *Isolement de di- et trinuécléotides, sites spécifiques d'attachement d'arginine et de valine dans des ARN d'origine différente.*
 Note (*) de MM. MIRKO BELJANSKI et PIERRE BOURGAREL, transmise par M. Jacques Tréfouël.

Nous avons isolé et identifié à partir de complexe « acide aminé-¹⁴C-ARN actifs », synthétisé *in vitro*, des di- et tri-nuécléotides auxquels sont attachées l'arginine et la valine. La nature du nucléotide et la liaison l'unissant à l'acide aminé sont précisées.

Nous avons montré qu'une fraction d'ARN à marquage rapide d'*Alcaligenes faecalis* (1) et l'ARN purifié à partir de virus de la mosaïque jaune du navet, TYMV (2) fixent en présence de polypeptide-synthétases purifiées et d'un des quatre ribonucléoside-5'-triphosphates, les acides aminés (¹⁴C) par liaison covalente. L'absence de compétition entre les acides aminés et le taux d'acides aminés fixés (1) suggérait déjà que ceux-ci devraient être liés à des sites spécifiques à l'intérieur de la chaîne des ARN actifs. Les résultats concernant l'identification des sites d'attachement de l'arginine et de la valine sont présentés ici.

Synthèse et dégradation du complexe « acide aminé ¹⁴C-ARN » (AA-ARN).
 — Le milieu d'incubation contient en μmoles : MgCl₂, 200; tampon Tris (pH 7,6), 450; ATP, 100; dl-acide aminé ¹⁴C, 6,0 (30 μCi); ARN d'*Alcaligenes f.* (ou d'*E. coli*) [fractions précipitant entre 60-65 et 80-90 % de SO₄(NH₄)₂] (1), 80-120 mg; ARN du TYMV, 160 mg; enzyme gel S-1, 5 mg (3); volume final, 10 ml. Incubation, 30 mn à 32°. Le complexe « AA-ARN » précipité et lavé par HClO₄, 0,3 N est redissous dans 1-2 ml de tampon succinate 0,2 M (pH 5,0), puis dialysé une nuit contre du tampon acétate 0,01 M (pH 4,5). Les protéines sont éliminées; le surnageant (AA-¹⁴C-ARN) concentré à froid est incubé à 24° avec de la RNase (ARN/RNase : 100/1), 24 h pour Arg-¹⁴C-ARN et 2 h pour val-¹⁴C-ARN.

TABLEAU I.
 Complexe ARN-m-Arg-¹⁴C.

Matériel.	CPM (× 10 ⁻³).	μ mole Arg- ¹⁴ C.	μmole (nucléotides).		Rendement % de ¹⁴ C.
			CMP.	UMP.	
<i>Alcaligenes f. :</i>					
ARN-Arg- ¹⁴ C.....	560	0,86	—	—	100
X ₁ -Arg- ¹⁴ C.....	168	0,26	0,25	0,27	30
X ₂ -Arg- ¹⁴ C.....	280	0,43	0,91	0,44	50
<i>E. coli :</i>					
ARN-Arg- ¹⁴ C.....	456	0,70	—	—	100
X ₁ -Arg- ¹⁴ C.....	130	0,20	0,18	0,21	28
X ₂ -Arg- ¹⁴ C.....	190	0,28	0,57	0,27	42

Séparation des produits de dégradation de l'« AA-ARN ». — Après élimination du matériel insoluble à pH 3,5, le surnageant est soumis à l'électrophorèse (0°) sur papier Whatman n° 1 : 1-2 mg/cm; tampon acétate M/20, pH 3,5 : 55 V/cm, 2 mA/cm, 1-3 h. Les taches radioactives sont concentrées sur papier à l'aide de solvant *a* : alcool 70 : acétate de NH₄M 30 ml, pH 5,0 puis éluées avec une solution de CH₃COOH 0,01 N. L'éluat lyophilisé est purifié par chromatographie sur papier (butanol : CH₃COOH : H₂O, 70 : 10 : 20), puis par électrophorèse à pH 3,5. Une partie du matériel ¹⁴C

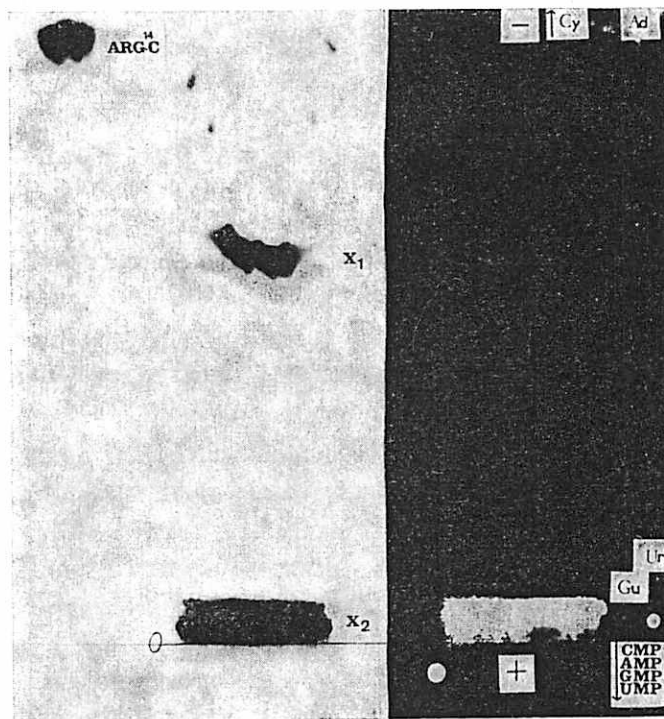


Fig. 1. — Ionogramme d'une partie du complexe « ARN-Arg-¹⁴C » préalablement dégradé par la RNase.

absorbant les ultraviolets, est dégradé par KOH 0,3 N (18 h), puis chromatographiée sur colonne de Dowex (1). Le spectre (ultraviolet) des nucléotides est déterminé, ainsi que la radioactivité.

RÉSULTATS. — *Complexe « Arg-¹⁴C-ARN » d'Alcaligenes f. et d'E. coli.* — L'ionogramme d'une partie du complexe « Arg-¹⁴C-ARN » dégradé montre qu'une tache X₁ (fig. 1) migre vers la cathode plus lentement que l'arginine ¹⁴C. La tache X₂ migre peu. Après purification de X₁ et hydrolyse nous trouvons la stœchiométrie : 1 arg, 1 CMP et 1 UMP (tableau I). il s'agit donc d'un dinucléotide porteur d'arginine. Le spectre de X₁ ne diffère pas de celui d'un mélange équimolaire de CMP et d'UMP (fig. 2 a). La tache X₂ est sélectionnée par le solvant *a* puis purifiée. L'analyse montre (tableau I) qu'elle est constituée d'arginine ¹⁴C et d'un triplet

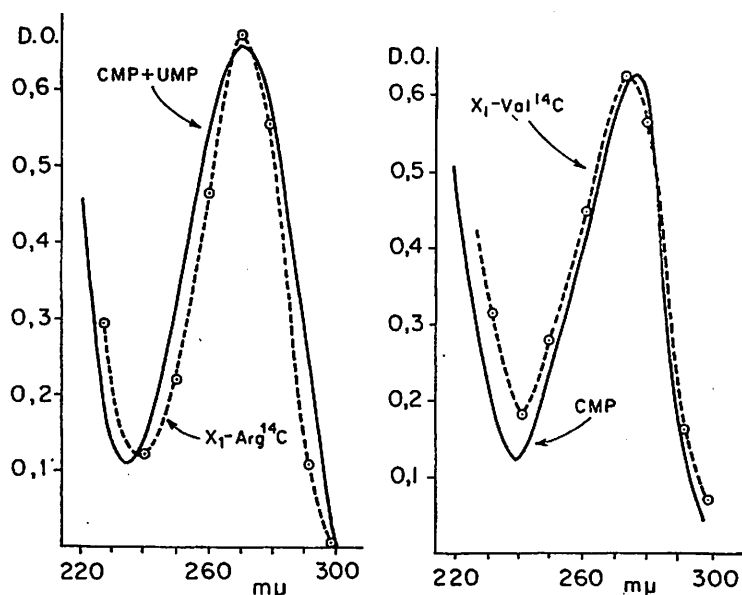


Fig. 2. — Spectre ultraviolet :
 (a) X_1 -Arg- ^{14}C et CMP + UMP ;
 (b) X_1 -val- ^{14}C et CMP.

Cp-Up-Cp (ordre déterminé par traitements successifs à la phosphatase, métaperiodate et hydrolyse ménagée). Les résultats concernant le complexe « Arg- ^{14}C -ARN » d'*E. coli* (tableau I) montrent que l'arginine ^{14}C est lié au Cp-Up d'une part et au Cp-Up-Cp d'autre part.

Complexe val- ^{14}C -ARN d'Alcaligenes f., d'E. coli et de TYMV. — Parmi les produits de dégradation du complexe formé avec les différents ARN, on observe sur l'ionogramme essentiellement deux taches radioactives : X_1 qui migre vers la cathode et X_2 se déplaçant peu. L'analyse de X_1 purifié montre la présence de 1 valine et de 2 CMP, le X_2 étant constitué de 1 val et de 3 CMP (tableau II). Dans X_1 la val- ^{14}C est attachée au

TABLEAU II.
 Complexe ARN-val- ^{14}C .

Matériel.	CPM ($\times 10^{-3}$).	μ mole val- ^{14}C .	μ mole (nucléotide) CMP.	Rendement % de ^{14}C .
<i>Alcaligenes f. :</i>				
ARN-val- ^{14}C	300	0,76	—	100
X_1 -val- ^{14}C	72	0,18	0,37	26
X_2 -val- ^{14}C	150	0,38	1,10	50
<i>E. coli :</i>				
ARN-val- ^{14}C	205	0,52	—	100
X_1 -val- ^{14}C	60	0,15	0,32	30
X_2 -val- ^{14}C	86	0,22	0,68	42
<i>TYMV :</i>				
ARN-val- ^{14}C	80	0,19	—	100
X_1 -val- ^{14}C	34	0,08	0,14	42

dinucléotide Cp-Cp indépendamment de l'origine des ARN utilisés et dans le X₂ elle est liée à un trinucéotide (tableau II). Le spectre de X₁-val-¹⁴C (fig. 2) ne diffère pas de celui du CMP. Il faut préciser que le complexe val-¹⁴C-ARN du TYMV ne se forme que si cet ARN possède son intégrité.

Quel est le type de liaison unissant l'acide aminé aux fragments d'ARN ? La stabilité à froid en milieu acide du di- et trinucéotide-acide aminé et le fait que le NH₂OH (pH 7,0) détache lentement mais définitivement l'acide aminé du complexe ⁽²⁾ montrent respectivement que la liaison n'est ni du type phosphoanhydride, ni phosphoamide ⁽⁴⁾. Le spectre ultra-violet d'un dinucléotide (fig. 2) n'étant pas modifié par la présence d'acide

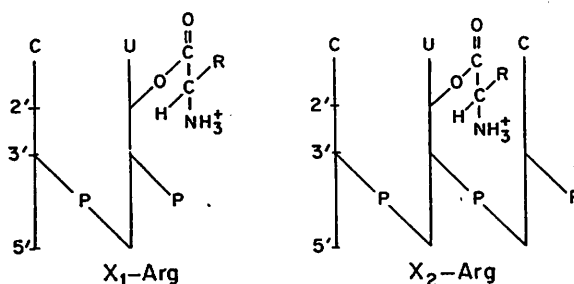


Fig. 3. — Structure du di-nucléotide-Arg (X₁-Arg-¹⁴C) et du trinucéotide-Arg (X₂-Arg-¹⁴C).

aminé, celui-ci n'est donc pas lié à l'une des bases. La RNase ne dégrade pas le dinucléotide chargé en acide aminé. Le métaperiodate n'agit, sur ce produit (X₁) qu'après traitements successifs de celui-ci par la phosphatase prostatique (pH 5,0) et par le KOH. L'ensemble de nos résultats permettent de conclure que dans le di- et le trinucéotide, l'acide aminé est lié par son —COOH au 2'—OH du ribose nucléotidique. La structure que nous proposons (cas d'arginine) et qu'il serait intéressant de vérifier à l'aide des modèles est la suivante (fig. 3) :

Nous concluons : 1° un acide aminé donné, attaché par les polypeptide-synthétases à des ARN d'origine différente (*Alcaligenes f.*, *E. coli*, TYMV) est lié à un même nucléotide spécifique dans les di- et les trinucéotides isolés; 2° les polypeptide-synthétases peuvent directement reconnaître à la fois chaque acide aminé et les sites (triplets) dans l'ARN que nous proposons dorénavant d'appeler ARN matriciel.

(*) Séance du 20 mars 1967.

(1) M. BELJANSKI, M^{me} C. FISCHER et M^{me} M. BELJANSKI, *Comptes rendus*, 257, 1963, p. 547.

(2) M. BELJANSKI, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47, 1965, p. 1645.

(3) M^{me} C. FISCHER-FERRARO et M^{me} M. BELJANSKI, *Comptes rendus*, 264, série D, 1967, p. 411.

(4) R. H. HALL, *Biochemistry*, 6, 1964, p. 769.

(Service de Biochimie cellulaire,
Institut Pasteur, 28, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e.)