

VIROLOGIE. — *ARN-fragments, amorceurs nécessaires à la réplication in vitro des ADN*. Note (\*) de M. Mirko Beljanski, M<sup>me</sup> Monique Beljanski, MM. Michel Plawecki et Pierre Bourgarel, présentée par M. Pierre Lépine.

La dégradation ménagée d'ARN ribosomiques, de préférence riches en nucléotides G et A, par diverses ribonucléases, permet d'obtenir des familles d'ARN-fragments dont chacun diffère par sa composition en nucléotides, masse moléculaire et surtout par sa capacité à servir, *in vitro*, d'amorceur permettant à l'ADN polymérase ADN dépendante de répliquer des ADN d'origines très différentes.

Il existe chez certaines bactéries des ARN particulièrement riches en nucléotides G et A. Des ARN de faible masse moléculaire et « génétiquement » actifs se trouvent liés à l'ADN (<sup>1</sup>) ; ils sont doués de propriétés biologiques bien spécifiques (ARN transformants) [(<sup>1</sup>), (<sup>2</sup>)] : ainsi un tel ARN isolé d'*E. coli* « transforme » *A. tumefaciens* B<sub>6</sub>, souche oncogène chez les plantes, en « mutant » ayant définitivement perdu la capacité d'exprimer son pouvoir tumorigène (<sup>3</sup>). Nous avons également montré qu'un ARN synthétisé à l'aide de la polynucléotide phosphorylase est capable d'amorcer la réplication *in vitro* de certains ADN [(<sup>4</sup>), (<sup>5</sup>)]. Ceci nous a conduits à imaginer la possibilité de produire en quantité abondante une gamme d'ARN-fragments, ayant chacun, de par sa taille et sa composition à l'image des ARN riches en nucléotides G et A, une affinité sélective pour un type d'ADN donné (<sup>5</sup>).

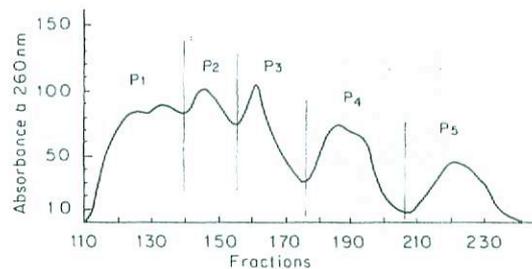


Fig. 1. — Profil d'élution des ARN-fragments après dégradation des ARN ribosomiques par la RNase pancréatique [16 à 20 mg de ARN-r/4 ml de H<sub>2</sub>O distillée + 300 µg de RNase P cristallisée (ou 15 000 unités de RNase T<sub>1</sub>). Incuber 30 mn à 36 °C. La RNase est éliminée à l'aide de chloroforme et les produits séparés sur colonne de « Séphadex G 25 » fine en tampon Tris M/100, pH 7,4].

I. SOURCE ET ISOLEMENT DES ARN-FRAGMENTS. — Les ARN ribosomiques (ARN-r) purifiés et provenant de diverses bactéries ou organes d'animaux, peuvent servir de source pour obtenir des ARN-fragments actifs (<sup>5</sup>). Cependant *E. coli* M 500 Sho-R (<sup>2</sup>) dont les ARN ribosomiques sont très riches en nucléotides G et A, est actuellement la meilleure source.

Après dégradation ménagée des ARN-r à l'aide des ribonucléases (RNases) [fig. 1 et (<sup>5</sup>)], les différentes fractions obtenues par l'action de la RNase pancréatique ont été désignées par le sigle P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub> et P<sub>5</sub> selon l'ordre de sortie de la colonne. Plusieurs ARN-fragments ont été caractérisés par : le rapport des bases (tableau I), le spectre d'absorption en ultraviolet, l'absence d'hyperchromicité et leur masse moléculaire (25-50 nucléotides) (<sup>5</sup>).

TABLEAU I

Rapport des bases G + A/C + U des ARN-fragments de la série P et T obtenus à partir d'ARN ribosomiques

moles pour 100 moles de nucléotides					
ARN-r d' <i>E. coli</i> M 500 Sho-R		ARN-r d' <i>E. coli</i> Hfr sauvage		ARN-r d' <i>E. coli</i> M 500 Sho-R	
P <sub>1</sub> .....	9,0	P <sub>1</sub> .....	3,5	T <sub>1</sub> .....	1,28
P <sub>2</sub> .....	4,8	P <sub>2</sub> .....	1,50	T <sub>2</sub> .....	1,26
P <sub>3</sub> .....	2,3	P <sub>3</sub> .....	1,49	T <sub>3</sub> .....	1,16
P <sub>4</sub> .....	1,06	P <sub>4</sub> .....	0,98		

Pour les conditions, voir (8).

TABLEAU II

Effets de divers ARN-fragments dans la réplication *in vitro* des ADN d'origines différentes

Source d'ADN	Nanomoles de <sup>3</sup> H TTP incorporé en 10 mn à 36°									
	Sans ARN-fragment	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	P <sub>4</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	U <sub>1</sub>	U <sub>2</sub>
Virus du fibrome de Shope .....	0,04 (*)	0,38	0,50	0,46	0,06	0,04	0,15	0,10	0,04	0,04
Phage φ X 174, simple chaîne ..	0,02	1,00	1,15	1,06	0,14	0,07	0,06	—	0,03	0,03
Phage lambda (λ) .....	0,002	0,21	0,24	0,11	0,06	0,04	0,05	—	0,002	0,002
Cerveau de singe .....	0,03 (*)	0,03	0,04	0,03	0,03	1,01	0,26	0,11	0,11	0,12
Rate de singe .....	0,04 (*)	0,32	0,37	0,36	0,32	0,92	0,93	0,27	0,04	0,03
Peau de lapin .....	0,20	1,43	0,88	0,84	0,38	0,37	0,94	1,38	0,20	0,21
Testicules de lapin .....	0,21	0,94	1,30	0,73	1,01	—	—	—	—	—
Polype de l'utérus humain .....	0,12	0,93	0,50	0,50	0,52	0,35	0,44	0,37	0,11	0,12
Kyste d'un sein humain .....	0,12	0,64	0,93	1,38	0,27	0,56	1,04	0,87	—	—
Tabac (culture <i>in vitro</i> ) .....	0,03 (*)	0,27	0,52	0,58	0,66	—	0,55	0,34	0,34	—
<i>E. coli</i> Hfr M 500 Sho-R .....	0,02 (*)	0,13	0,14	0,17	0,11	0,56	0,83	0,11	0,10	0,09
<i>A. tumefaciens</i> B <sub>6</sub> oncogène .....	0,03 (*)	0,49	0,54	0,38	0,35	0,06	0,06	0,04	0,22	0,08
Virus du fibrome de Shope (+ P <sub>1</sub> prétraité par le périodate) .....		0,06								

(\*) ADN prétraités par le KOH 0,3 N 16 h à 24° afin d'éliminer l'ARN contaminant puis dialysés contre l'eau distillée.

Pour les conditions de synthèse d'ADN, voir (6) et (4). ADN, 0,5 µg ; ARN-fragments, 0,5 à 2,0 µg.

II. RÉSULTATS. — Les ARN-fragments de la série P et de la série T (RNase T<sub>1</sub>) (fig. 1) se sont révélés être d'excellents amorces pour la réplication *in vitro* des ADN d'origines différentes (tableau II). Par contre les ARN ribosomiques intacts, même riches en G et A, ainsi que les ARN de transfert sont inactifs.

1. *Effet des ARN-fragments dans la réplication in vitro des ADN.* — On constate qu'en milieu complet (6) l'ADN polymérase I bactérienne purifiée de façon à être essentiellement dépourvue d'ARN de type amorces (4) est incapable de répliquer les ADN purifiés intacts et exempts d'ARN contaminants (ADN prétraités par le KOH) (tableau II). L'addition d'ARN-fragments de la série P ou T quoi qu'ils ne soient pas transcrits en ADN, se traduit par une rapide et très forte augmentation de la synthèse de l'ADN (forme acido-précipitable) suivie à l'aide de l'incorporation

de  $^3\text{H}$ -desoxyribonucléoside-5'-triphosphates (d-XTP). La DNase inhibe cette réaction.

Différents ARN-fragments (tableau II) expriment *in vitro* une affinité relative voir même sélective pour des ADN d'origines différentes ou provenant d'un même animal mais appartenant à des organes différents.

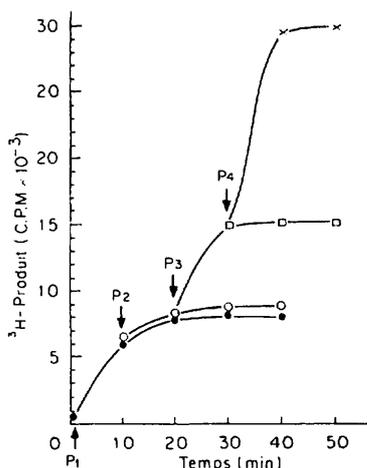


Fig. 2

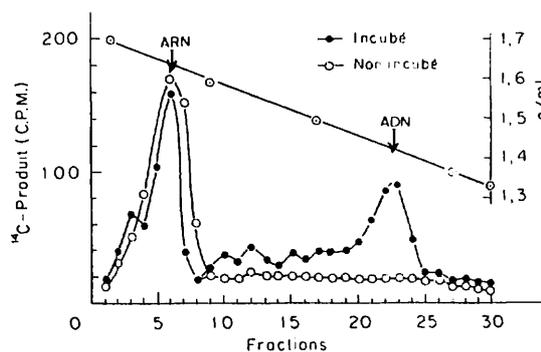


Fig. 3

Fig. 2. — Effet des différents ARN-fragments de la série P dans la synthèse de l'ADN du foie de caille (4).

Fig. 3. — Séparation sur gradient de  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$  de l'ARN-fragment  $\text{P}_1$  ( $^{14}\text{C}$ ) et de l'ADN (foie de caille) synthétisé en sa présence.

2. *Mode d'action possible des ARN-fragments.* — L'absence de compétition entre certains ARN-fragments ( $\text{P}_1$  et  $\text{P}_2$  excepté), chacun utilisé à une concentration saturante pour une quantité donnée d'ADN lors de sa répliation (fig. 2) permet de penser à l'existence de plusieurs et différents sites d'initiation chez l'ADN. Ceci suggère que la composition en nucléotides des ARN-fragments semble plus importante que la masse moléculaire relative.

L'inactivation du groupement 3' OH de l'ARN-fragment ( $\text{P}_1$ ) par le périodate de sodium (agissant sur 2 OH adjacents) fait disparaître l'effet amorceur (tableau II). Ceci est en accord avec le modèle théorique proposé par Ioannou (7) et qui implique obligatoirement la formation d'une liaison covalente entre l'ARN-fragment et l'ADN en voie de synthèse. Rappelons que les cellules de mammifères contiennent des ARN de très faible masse moléculaire sans que leur rôle ait été précisé [(8), (9)].

3. *Etablissement d'une liaison covalente entre l'ARN-fragment et l'ADN en voie de synthèse.* — L'ARN-fragment  $\text{P}_1$   $^{14}\text{C}$  (isolé à partir d'ARN ribosomiques marqués par  $^{14}\text{C}$ -adénine et  $^{14}\text{C}$ -guanine au cours de la croissance des bactéries M 500 Sho-R) fut ajouté au milieu réactionnel complet. Après 10 mn d'incubation à 36 °C, l'enzyme fut éliminée par le chloroforme (en présence de lauryl sulfate 0,002 % et EDTA  $10^{-3}$  M). La phase aqueuse a été centrifugée sur gradient de  $\text{Cs}_2\text{SO}_4$  pendant 64 h à 30 000 tr/mn à 20 °C et la radioactivité du matériel acido-précipitable déterminée. On constate (fig. 3) que l'ARN-fragment  $^{14}\text{C}$  sédimente dans la région de l'ARN.

mais qu'une quantité de radioactivité non négligeable se trouve dans la région de l'ADN, et ceci uniquement lorsqu'il y eut incubation. Ce résultat montre que la liaison covalente qui se forme entre l'ARN-fragment agissant comme amorceur et l'ADN en voie de synthèse semble être d'une grande importance (fig. 4).

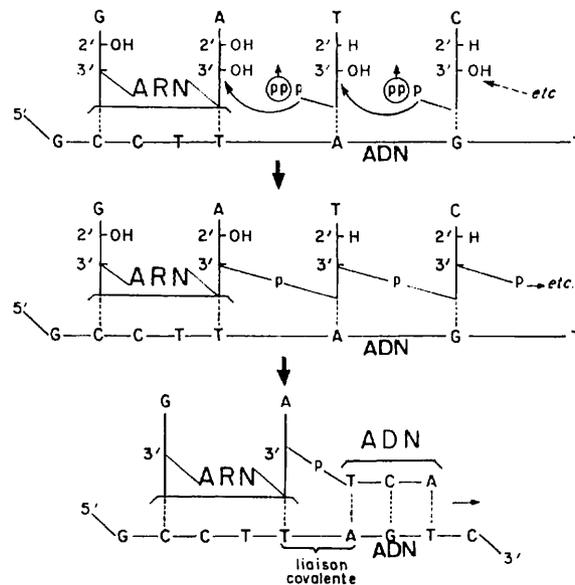


Fig. 4. — Schéma représentant la répllication d'une simple chaîne intacte d'ADN en présence d'ARN-fragment

CONCLUSION. — Les ARN-fragments obtenus par dégradation ménagée des ARN ribosomiques (*E. coli*) en présence de ribonucléases, agissent avec une certaine spécificité comme amorceurs dans la répllication *in vitro* des ADN d'origines différentes. Ces résultats rendent possible de prévoir dans une large mesure l'action éventuelle des ARN-fragments particuliers dans le processus de la répllication *in vivo* des ADN. L'introduction dans une cellule dérégulée d'ARN-fragments exogènes pourrait permettre à cette cellule de retrouver sa physiologie normale.

(\*) Séance du 16 décembre 1974.

- (1) M. BELJANSKI et coll., *Comptes rendus*, 272, Série D, 1971, p. 2107 et 2736.
- (2) M. BELJANSKI et coll., *Proc. Nat. Acad. Sc. USA*, 68, 1971, p. 491.
- (3) M. BELJANSKI et coll., *Proc. Nat. Acad. Sc. USA*, 69, 1972, p. 191.
- (4) M. PLAWECKI et M. BELJANSKI, *Comptes rendus*, 278, Série D, 1974, p. 1413.
- (5) M. BELJANSKI et M. BELJANSKI, Dépôt de Brevet français n° 7438768.
- (6) M. BELJANSKI, *Comptes rendus*, 276, Série D, 1973, p. 1625.
- (7) P. IOANNOU, *Nature New Biology*, 244, 1973, p. 257.
- (8) C. W. DINGMAN et A. C. PEACKOCK, *Biochemistry*, 7, 1968, p. 659.
- (9) P. HELLUNG-LARSEN et S. FREDERIKSEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 262, 1972, p. 290.

Service de Biochimie Cellulaire,  
Institut Pasteur,  
28, rue du Docteur-Roux, 75015 Paris.