

78

BIOLOGIE MOLÉCULAIRE. — *Découpage des ARN ribosomiques d'Escherichia coli par la ribonucléase U₂ et transcription in vitro des « ARN-fragments » en ADN complémentaire.* Note (*) de M. Mirko Beljanski, Pierre Bourgarel et Monique S. Beljanski, présentée par M. Pierre-Paul Grassé.

Dans des conditions bien définies les ARN ribosomiques purifiés d'*Escherichia coli* peuvent être dégradés par la ribonucléase U₂ en « ARN-fragments » de 60-70 nucléotides. *In vitro*, ces fragments sont efficacement transcrits en ADN complémentaire par l'ADN polymérase ARN dépendante partiellement purifiée à partir d'extraits d'*Escherichia coli*. *In vivo*, ces « ARN-fragments-U₂ » inhibent le développement des tumeurs végétales (*).

Under well defined conditions ribosomal RNAs purified from Escherichia coli can be degraded by ribonuclease U₂ giving rise to RNA fragments of 60-70 nucleotides. In vitro, these fragments are efficiently transcribed into a complementary DNA by DNA polymerase RNA dependent, partially purified from extracts of E. coli. In vivo, "RNA-fragments-U₂" inhibit the development of plant tumors.

Nous avons précédemment montré que les ARN ribosomiques (ARN-r) purifiés d'*Escherichia coli* M 500 Sho-R peuvent être dégradés par l'action ménagée de la ribonucléase pancréatique ou T₁ en « ARN-fragments » constitués de 20-50 nucléotides (*). Ces « ARN-fragments » agissent *in vitro* comme amorces permettant la réplication des ADN par l'ADN polymérase I ADN dépendante. Par contre ni les ARN ribosomiques intacts ni ces mêmes « ARN fragments » dont ils dérivent ne sont, *in vitro*, transcrits en ADN par l'ADN polymérase ARN dépendante d'origine bactérienne (*).

Nous montrons ici que l'action ménagée de la ribonucléase U₂ (l'enzyme découpant l'ARN essentiellement au niveau des bases puriques A et G) (2) sur les ARN ribosomiques purifiés d'*E. coli* M 500 Sho-R se traduit par l'apparition d'« ARN-fragments » qui sont *in vitro*, efficacement transcrits en ADN complémentaire par l'ADN polymérase ARN dépendante provenant de ces mêmes bactéries.

Les ARN-r (23 S + 16 S : 3 000 + 1 500 nucléotides) isolés à partir de ribosomes purifiés provenant d'extraits d'*E. coli* M 500 Sho-R (*) sont riches en nucléotides puriques (G + A/C + U = 2,0), comparaison faite avec les ARN-r des bactéries sauvages (G + A/C + U = 1,0).

La dégradation ménagée des ARN-r par la ribonucléase U₂ est réalisée dans les conditions suivantes : 16 mg d'ARN dissous dans 4 ml d'eau distillée sont incubés avec 20 unités de RNase U₂ (Sankyo Co, Japon) pendant 45 mn à 36°C. La réaction est arrêtée par addition d'un même volume de chloroforme contenant 5 % d'alcool isoamylique suivie d'une agitation vigoureuse pendant quelques minutes. Après centrifugation à 5 000 tr/mn pendant 5 mn, la phase aqueuse est retraitée par le chloroforme (la même opération est répétée encore deux fois). La phase aqueuse contenant les « ARN-fragments » est filtrée sur une colonne de « Sephadex G-25 » fine, équilibrée avec du tampon Tris-HCl M/100, pH 7,5. C'est par ce même tampon que les « ARN-fragments » sont élués de la colonne sous forme d'un pic large caractérisé par l'absorbance à 260 nm. L'éluat est arbitrairement séparé en quelques fractions. Après dialyse contre de l'eau distillée, les « ARN-fragments-U₂ » de chaque fraction sont analysés et utilisés comme matrice permettant la polymérisation de désoxyribonucléoside-5'-triphosphates en ADN.

Déterminée par électrophorèse sur gel d'acrylamide, la masse moléculaire des « ARN-fragments-U » est légèrement inférieure à celle de l'ARN 4 S isolé d'*E. coli* M 500 Sho-R ce qui correspondrait à 60-70 nucléotides. Aucune différence significative n'est détectée

quant à la position de chacune des fractions d'« ARN-fragments- U_2 » séparément soumises à l'électrophorèse. Le rapport des bases puriques/pyrimidiques des « ARN-fragments- U_2 » est proche de celui des ARN ribosomiques que nous avons soumis à l'action de la RNase U_2 (tableau I). Les « ARN-fragments- U_2 » (2 mg) ne réagissent pas à la réaction de diphényl-

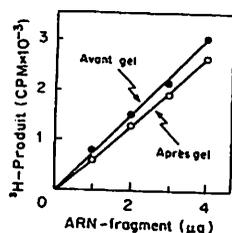


Fig. 1

Fig. 1. - Synthèse d'ADN en présence de différentes concentrations d'« ARN-fragments- U_2 » servant de matrice.

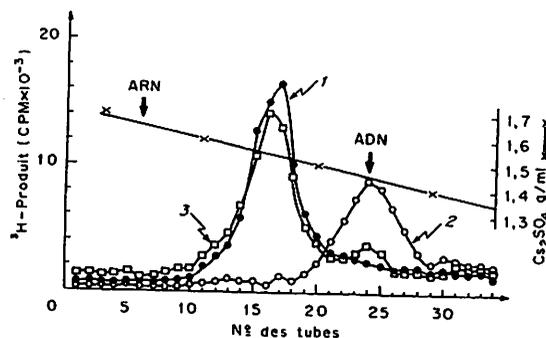


Fig. 2

Fig. 2. - Ultracentrifugation du 3H -ADN sur gradient de densité de Cs_2SO_4 ($^{\circ}$). 1, 3H -produit séparé de l'enzyme mais non séparé de l'« ARN-fragment » utilisé comme matrice; 2, 3H -produit séparé de l'enzyme puis prétraité par 0,3 N KOH à 80° pendant 20 mn; 3, hybride synthétique « 3H -ADN-ARN-fragment- U_2 ».

amine; ils sont donc exempts d'ADN. Les conditions pour la transcription des « ARN-fragments- U » et le contrôle de l'ADN synthétisé sont réalisés selon les techniques décrites pour la transcription *in vitro* des ARN transformants (1).

TABLEAU I

Rapport des bases des ARN-r, « ARN-fragments- U_2 » (I, II) et de l'ADN synthétisé en présence d'« ARN-fragments- U_2 » (I)

Moles pour 100 moles de nucléotides analysés ($^{\circ}$)

	<i>E. coli</i> M 500 Sho-R		« ARN-fragment - U_2 » (I)	« ARN-fragment - U_2 » (II)	3H -ADN synthétisé	
	23 S ARN	16 S ARN				
A.....	31,0	32,0	27,4	27,5	T	27,3
G.....	34,3	35,0	37,1	36,0	C	36,6
C.....	17,7	16,7	20,5	17,1	G	21,6
U.....	16,1	16,3	15,2	20,0	A	14,3
G+A/C+U.....	1,96	2,01	1,82	1,73	C+T/G+A	1,80

Le rapport des bases des ARN-r et des « ARN-fragments- U_2 » est déterminé selon la méthode de Bjorg and Svensen ($^{\circ}$). L'ARN (100 μg) est hydrolysé par HCl 1 N à 100° pendant 1 h. HCl est évaporé et le résidu dissous dans l'eau est chromatographié sur plaque d'Ecteola ($^{\circ}$). Les taches absorbant les ultraviolets sont détectées, éluées et leur concentration déterminée à 260 et 280 nm. Le rapport des bases du 3H -ADN synthétisé est déterminé par la quantité de chaque 3H d-XMP incorporé dans le matériel acido-précipitable. Un dXTP (5 nMoles) marqué en 3H (50 000 CPM) a été utilisé ainsi que 3 autres dXTP non radioactifs. L'ADN polymérase ARN dépendante (80 μg) d'*E. coli* a été utilisée ($^{\circ}$).

Les résultats, résumés dans le tableau II, montrent que la transcription exige la présence simultanée des quatre désoxyribonucléoside-5'-triphosphates (d-XTP). L'omission de l'un d'entre eux se traduit par l'absence de ^3H -ADN acido-précipitable. Le ^3H -ADN n'est pas détectable lorsque l'« ARN-fragment- U_2 » est prétraité par la RNase pancréatique A ou lorsque la réaction a lieu en présence de DNase. L'inactivation du 3'OH de l'« ARN-fragment » par le périodate rend celui-ci inactif. Le polymère rA-dT, actif dans la transcription de certains ARN [(³), (⁴)] est ici sans effet.

TABLEAU II

Transcription d'« ARN-fragment- U_2 » en ADN acido-précipitable

	^3H -TTP incorporé (pmoles)	Inhibition (%)
Milieu complet.....	101,0	-
Milieu complet - d-CTP, d-ATP, d-GTP (3 nMoles chacun).....	8,7	90
Milieu complet - MgCl_2 (2 μM).....	4,3	95
Milieu complet - « ARN-fragment- U_2 » (4 μg).....	5,1	94
Milieu complet + RNase A (20 μg).....	11,0	88
Milieu complet + DNase (5 μg).....	4,2	95
Milieu complet + Poly (rA)-poly (dT) _{10 12} (2 μg).....	102,0	0
Milieu complet (enzyme chauffé 10 mn à 100°).....	2,8	97
Milieu complet - « ARN-fragment- U_2 » mais + ARN de transfert (4 μg).....	5,4	93
Milieu complet + ARN-r non dégradé (4 μg).....	12,3	87

Les constituants du milieu complet sont indiqués dans le tableau. L'ADN polymérase ARN dépendante d'*E. coli* (80 μg) a été utilisée. Incubation 20 mn à 37°C. D'autres détails techniques ont été décrits ailleurs (²).

La quantité d'ADN synthétisé est fonction de la quantité d'« ARN-fragment- U_2 » présent dans le milieu réactionnel (*fig. 1*). Après purification par électrophorèse sur gel d'acrylamide, l'« ARN-fragment » conserve ses propriétés d'être transcrit en ADN.

Le ^3H -ADN synthétisé est-il la copie complémentaire de l'« ARN-fragment- U_2 » ? La réponse est affirmative. En effet :

(1) les rapport de bases de l'« ARN-fragment- U_2 » et ceux du ^3H -ADN synthétisé sont complémentaires (tableau I);

(2) la synthèse du ^3H -ADN est strictement dépendante de la présence d'« ARN-fragment- U_2 » (tableau II). L'existence de l'hybride « ^3H -ADN-ARN-fragment » au cours de la transcription est démontrée de la manière suivante : après 20 mn d'incubation du milieu réactionnel complet, l'enzyme est éliminé par traitement à l'aide de chloroforme suivi d'une centrifugation à 10 000 tr/mn pendant 5 mn (traitement répété trois fois). La phase aqueuse est soumise à l'ultracentrifugation sur gradient de densité de Cs_2SO_4 et les fractions recueillies. La figure 2 montre que le ^3H -produit acido-précipitable sédimente entre la densité de l'« ARN-fragment- U_2 » (1 650) et celle de l'ADN d'*E. coli* (1 420). C'est seulement après dégradation de l'« ARN-fragment » par le KOH 0,3 N (20 mn à 80°C) que toute la radioactivité acido-précipitable sédimente à la densité de l'ADN. Ce résultat montre bien que le ^3H -ADN synthétisé est hybridé à l'« ARN-fragment- U_2 ». L'hybride synthétique, obtenu *in vitro* selon la technique déjà décrite (²) entre l'« ARN-fragment » et le ^3H -ADN, sédimente exactement à la même densité (Cs_2SO_4) que l'hybride « ^3H -ADN-ARN-fragment » enzymatiquement synthétisé (*fig. 2*).

Ces résultats confirment aussi que le ^3H -ADN est complémentaire de l'« ARN-fragment- U_2 », utilisé comme matrice. L'observation que les « ARN-fragments » obtenus à l'aide de la ribonucléase U_2 sont transcrits *in vitro* en ADN alors que ceux obtenus à partir du même ARN ribosomique mais par action de la RNase pancréatique ne le sont pas ⁽¹⁾ suggère que le nucléotide 3' terminal d'un « ARN-fragment » (et groupe de nucléotides adjacents) devrait posséder une adénine ou une guanine pour la transcription en ADN. En effet la RNase U_2 découpe l'ARN essentiellement au niveau de la liaison entre nucléotides puriques (3'—3') ⁽²⁾.

Nous venons de montrer que l'intervention d'une nucléase spécifique en l'occurrence U_2 , permet à l'ADN polymérase ARN dépendante de transcrire en ADN complémentaire les informations contenues dans l'ARN-fragmenté. Ce phénomène, observé *in vitro* soulève la question du rôle physiologique de tels « ARN-fragments » dans un système *in vivo*.

L'extrême importance de ces phénomènes est illustrée par le fait que les « ARN-fragments » obtenus par l'action de la RNase pancréatique sur les ARN ribosomiques induisent les tumeurs chez la plante ⁽³⁾ alors que les « ARN-fragments » obtenus par l'action de la RNase U_2 arrêtent le développement de la tumeur Crown Gall chez le Petit Pois décapité et préalablement inoculé par *A. Tumefaciens* ⁽⁴⁾.

(*) Séance du 8 mai 1978.

⁽¹⁾ M. BELJANSKI et coll., *Comptes rendus*, 280, série D, 1975, p. 363.

⁽²⁾ T. UCHIDA et coll., *J. Biochem.*, 67, 1970, p. 91.

⁽³⁾ M. REITZ et coll., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 49, 1972, p. 1216.

⁽⁴⁾ P. S. SARIN et coll., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 59, 1974, p. 202.

⁽⁵⁾ M. BELJANSKI et M. BELJANSKI, *Biochemical Genetics*, 12, 1974, p. 163.

⁽⁶⁾ M. BELJANSKI et M. I. AARON DA CUNHA, *Mol. Biol. Reports*, 2, 1976, p. 497.

⁽⁷⁾ R. BJÖRG et J. SVENSEN, *Biochim. Biophys. acta*, 138, 1967, p. 430.

⁽⁸⁾ L. LE GOFF et M. BELJANSKI, *Comptes rendus*, 286, série D, 1978, (à paraître).

Faculté de Pharmacie, rue Jean-Batiste-Clément, 92290 Châtenay-Malabry.