Identification des sites d'attachement spécifiques d'arginine et de valine dans des RNA d'origines différentes. VIII

M. Beljanski, C. Fischer-Ferraro et P. Bourgarel

Service de Biochimie cellulaire de l'Institut Pasteur, Paris

(Reçu le 11 septembre/23 novembre 1967)

The binding sites, to which [14C]arginine and [14C]valine are linked to a messenger-like RNA of Alcaligenes faecalis in the presence of ATP and a purified "polypeptide synthetase" preparation from the same organism, have been identified. From a large scale incubation mixture, [14C]Arg-RNA was isolated and degraded with ribonuclease. By electrophoretic and chromatographic methods two compounds were obtained, CpUp-[14C]Arg, and CpUp-[14C]Arg-Cp. Evidence is presented indicating that the carboxylic group of the amino acid was bound in ester linkage to the hydroxyl in 2'-position of the uridylic ribose. The same compound were obtained when an RNA fraction from Escherichia coli was used. Similar experiment with [14C]valine yielded CpCp-[14C]Val and CpCp-[14C]Val-Cp with either RNA fraction. With TYMV-RNA as acceptor, CpCp-[14C]Val was identified. The possible significance of these results is discussed.

A plusieurs reprises nous avons décrit un système soluble purifié capable de synthétiser in vitro des oligopeptides [1-3]. Ce système est constitué de préparation enzymatique purifiée (polypeptide synthétases) et de certaines fractions de RNA particulier provenant d'Alcaligenes faecalis ou d'Escherichia coli [4]. Dans la préparation des polypeptide synthétases il existe très certainement un enzyme pour chaque acide aminé catalysant en présence soit de chacun des quatre ribonucleoside-5'-triphosphates, soit de deux seulement, la fixation d'un acide aminé donné dans des RNA utilisés [5]. Les RNA actifs dans le présent système sont des RNA à marquage rapide provenant des bactéries, des levures, des cellules du foie de rat [4] et le TYMV RNA provenant de la mosaïque jaune du navet [9]. La fixation sans compétition de quantités importantes d'acides aminés à des RNA actifs d'origine bactérienne suggérait déjà que les acides aminés fixés devraient être liés à des sites localisés le long de la chaîne des RNA.

Nous présentons ici les données relatives à l'isolement et à l'identification de di- et de trinucléotides porteurs de [14C]arginine et de [14C]valine. Ces composés ont été isolés à partir de complexe [14C]AA-mRNA formé in vitro entre acide aminé L marqué au 14C et le RNA actif dans le présent système.

Abréviations non usuelles. Fraction d'acide ribonucléique à marquage rapide ayant certaines caractéristiques du RNA messager, mRNA (matriciel); acide aminé marqué au ¹⁴C, [¹⁴C]AA; tobacco yellow mosaic virus (virus de la mosaique jaune du navet), TYMV; tâches radioactives migrant ou ne migrant pas vers la cathode, N₁ ou N₂; mélange des isomères 2' et 3' du CMP et de l'UMP, Cyd-2'(3')-P et Urd-2'(3')-P.

Enzyme. Ribonucléase (EC 2.7.7.16).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souches bactériennes. Les bactéries d'Alcaligenes faecalis ont été cultivées en milieu trypticase [6], celles d'Escherichia coli B en milieu synthétique 63 [7] et récoltées avant la fin de la phase exponentielle de croissance.

Préparations enzymatiques. La méthode permettant d'isoler et de purifier les préparations enzymatiques (polypeptide synthétases) a été décrite [5]. La fraction gel S-1 a été utilisée (étape 5).

Acides ribonucléiques. Les RNA ont été isolés à l'aide de phénol et les fractions enriches en RNA à marquage rapide (mRNA) ont été obtenues par fractionnement des RNA totaux à l'aide de sulfate d'ammonium d'après la méthode décrite [4]. Une fraction de RNA actif précipitant entre 60-65% et l'autre entre 80-90% de la saturation en sulfate d'ammonium, ont été caractérisées comme RNA à marquage rapide [4]. Le RNA isolé à partir de virus de la mosaïque jaune de navet a été aimablement mis à notre disposition par M. le Professeur L. Hirth et par le Dr. J. M. Bové.

Acides aminés. La DL-[14C]arginine et la DL-[14C]-valine (activité spécifique 5 mC/mmole) proviennent du Commissariat à l'Energie Atomique; les ribonucléoside-5'-triphosphates de Pabst Co. et Duchapt-Caron (Montrouge, Seine); la ribonucléase pancréatique de Worthington Biochemical Co.; le metapériodate de sodium de Serlabo (Paris); la phosphatase prostatique a été prédarée par le Dr. A. M. Michelson.

Solvants pour chromatographie. (a) éthanol-acétate d'ammonium M pH 5.0 (70:30, v/v); (b) n-butanol—

Vol.

d'in 30 n 600 RN. coli, 100-

d'inc préc 1—3 dialy (pH par c

plex(

comp pH 4 ribon Arg-I favor

dégrade la élimir man : 50 ml phorès tempé mis er

La ta migre périenconten actif c une so HClO₄ radioac phorèse matogr solvant La :

sur l'io (papier de RN. fois sél papier et anal; détermi Constan appareil Müller è ment de Trai.

sont dép effectuée acide acétique—eau (70:10:20, v/v/v). Les papiers Whatmann n° 1-3 ont été utilisés.

Synthèse du complexe [¹⁴C]AA-mRNA. Le milieu d'incubation contient, dans un volume final de 10 à 30 ml: MgCl₂, 200 μmoles; tampon Tris-HCl (pH 7,6), 600 μmoles; DL-[¹⁴C]acide-aminé, 6 μmoles (30 μC); RNA matriciel d'Alcaligenes faecalis ou d'Escherichia coli, 80—120 mg; de la mosaïque jaune du navet, 100—160 mg; enzyme gel S-1, 5 mg [5]. Après 30 min d'incubation à 32°, le complexe [¹⁴C]AA-RNA est précipité et lavé par HClO₄ 0,3 N, redissous dans 1—3 ml de tampon succinate 0,2 M (pH 6,0) puis dialysé une nuit contre du tampon acétate 0,01 M (pH 4,1). Les protéines précipitées sont éliminées par centrifugation; le surnageant contenant le complexe [¹⁴C]AA-RNA est concentré à froid à 1—1,5 ml.

Dégradation du complexe [14C]AA-RNA. Le complexe est incubé à 24° (tampon acétate 0,1 M de pH 4,1) avec de la ribonucléase pancréatique (RNA/ribonucléase = 100/1,5) pendant 24 h pour le [14C]-Arg-RNA et 2—3 h pour le [14C]Val-RNA. Ces temps favorables ont été déterminés expérimentalement.

Séparation par électrophorèse des produits de dégradation du complexe [14C]AA-RNA. Après action de la ribonucléase, le matériel insoluble à pH 3,5 est éliminé et le surnageant déposé sur papier Whatman n° 1 préalablement imbibé de tampon acétate 50 mM pH 3,5 (1-2 mg/cm) et soumis à une électrophorèse de 1-3 h (55 volts/cm; 1,5-2 mA/cm) à la température de 0°. Après séchage, l'ionogramme est mis en contact avec un film Kodirex pendant 24 h.

Isolement et purification des taches radioactives. La tache N₁ radioactive (voir l'ionogramme) qui migre nettement vers la cathode peut, selon l'expérience, être plus ou moins diffuse; le papier contenant cette tache est excisé et le matériel radioactif concentré à l'aide de solvant (a) puis élué avec une solution d'acide acétique 0,01 N additionnée de HClO₄ (concentration finale 10⁻⁵ N). Le matériel radioactif est lyophilisé à froid, purifié par électrophorèse dans les conditions décrites puis par chromatographie sur papier Whatman n° 1 à l'aide du solvant (b), et enfin analysé.

La tache N₂ radioactive qui reste près de l'origine sur l'ionogramme est d'abord séparée latéralement (papier excisé) à l'aide de solvant (a) des morceaux de RNA pouvant se trouver près de l'origine. Une fois sélectionnée elle est rechromatrographiée sur papier (solvant b) puis purifiée comme la tache N₁ et analysée. Le spectre d'absorption ultraviolet est déterminé à l'aide du spectrophotomètre de Jean et Constant. La radioactivité est déterminée dans un appareil Tracerlab combiné avec le compteur Geiger-Müller à anticoïncidence (bruit de fond de 2; rendement de 15%).

Traitement avec $NaIO_4$. Environ $20-30~\mu g$ de N_1 sont déposés sur papier Whatman n° 1 puis la réaction effectuée d'après la méthode de Gordon et coll. [8].

Traitement par la phosphatase prostatique. 20 à 30 μ g de N_1 ou de N_2 sont incubés à 24° dans du tampon succinate 0,05 M (pH 6,0) avec 20 μ g de phosphatase. Temps 20 min. L'acide aminé est détaché de N_1 ou de N_2 par KOH 0,05 N pendant 15 min à 24°.

Identification des nucléotides. L'hydrolyse de N_1 et de N_2 (A_{250} de 1,5 à 2,0, à 260 m μ) purifiés est effectuée par KOH 0,45 N pendant 24 h à 37°. La colonne de Dowex X-1 (200—400 mesh), est utilisée pour la séparation des nucléotides et des nucléosides [4].

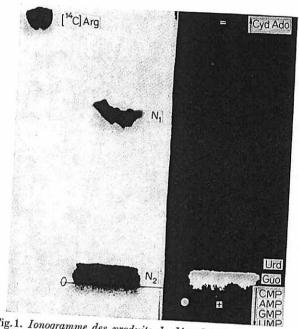


Fig. 1. Ionogramme des produits de dégradation du complexe [14C] Arg-RNA d'A. faecalis. Durée de la séparation: 2 heures. Le RNA de E. coli donne des résultats identiques

RÉSULTATS

Constituants de N_1 -[14C]Arg et de N_2 -[14C]Arg

Sur l'ionogramme (Fig. 1) représentant une partie du complexe [14C]Arg-RNA dégradé (RNA provenant d'Alcaligenes faecalis et d'Escherichia coli) on observe essentiellement deux taches radioactives, l'une N_1 -[14C]Arg qui migre vers la cathode plus lentement que la [14C]arginine libre, et l'autre N₂-[14C]Arg se déplaçant peu dans le même sens. L'analyse de N₁-[14C]Arg purifié montre (Tableau 1) la stoechiométrie suivante: 1 Arg, 1 Cyd-2'(3')-P et de 1 Urd-2'(3')-P. Il s'agit donc d'un dinucléotide (CpUp) porteur d'arginine. Dans les meilleures conditions, le N₁-[14C]Arg représente environ 30 % de l'[14C]arginine initialement attachée au RNA (Tableau 1). Le spectre de N_1 -[14C] Arg avant et après hydrolyse ne diffère pas de celui d'un mélange équimolaire de Cyd-2'(3')-Pet d'Urd-2'(3')-P (Fig. 2). La tache N₂[14C]Årg (Fig. 1)

Matériel	Radioactivité _ (×10 ⁻³)	Composition			_ Rendement
		Arginine	Cyd-2'(3')-P	Urd-2'(3')-P	en 14C
	coups/min		nmoles		%
Alcaligenes faecalis RNA-[14 C]Arg N ₁ -[14 C]Arg N ₂ -[14 C]Arg	560 168 280	860 260 430	250 910	$\begin{array}{c} 270 \\ 440 \end{array}$	100 30 50
$\begin{array}{c} Escherichia\ coli\\ ENA-[^{14}C]Arg\\ N_1-[^{14}C]Arg\\ N_2-[^{14}C]Arg \end{array}$	456 130 190	700 200 280	180 570	210 270	100 28 42

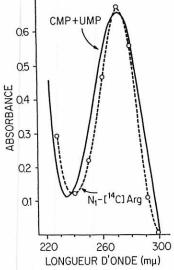


Fig.2. Spectre d'absorption ultraviolet de N_1 - $[^{14}C]$ Arg en milieu acide (O). Par comparaison, le spectre d'absorption d'un mélange de Cyd-2'(3')-P et de'Urd-2'(3')-P est donné en trait plein (——)

est constituée (Tableau 1) de: 1[¹⁴C]Arg, 2 Cyt-2′(3′)-P, 1 Urd-2′(3′)-P. Il s'agit donc d'un trinucléotide CpUpCp auquel l'arginine est attachée. Le N₂-[¹⁴C]Arg représente environ 50 ⁰/₀ d'arginine totale liée au RNA (Tableau 1). Les résultats concernant le complexe [¹⁴C]Arg-RNA d'E. coli montrent (Tableau 1) que là aussi la [¹⁴C]arginine est liée dans le N₁ au CpUp d'une part et au CpUpCp d'autre part, comme dans le cas de [¹⁴C]Arg-RNA d'A. faecalis. Il est à remarquer que l'incubation du complexe [¹⁴C]Arg-RNA en présence de ribonucléase pendant 24 et souvent 36 heures ne suffisait pas à dégrader le CpUp et le CpUpCp lorsqu'ils sont porteurs d'arginine.

Constituants de N₁-[14C]Val et de N₂-[14C]Val

L'ionogramme des produits de dégradation du complexe [14 C]Val-RNA indépendamment de l'origine des RNA utilisés montre essentiellement 2 taches radioactives, N_1 -[14 C]Val et N_2 -[14 C]Val (Fig. 3). Après

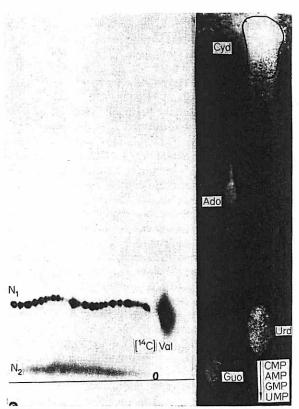


Fig. 3. Ionogramme des produits de dégradation du complexe [14C]Val-RNA du TYMV. Durée de la séparation: 1 heure. Le RNA de A. faecalis et d'E. coli donnent des résultats identiques

purification, la N₁-[¹⁴C]Val migre moins rapidement vers la cathode que lors de la première électrophorèse. Les raisons de ce changement nous échappent actuellement. L'analyse de N₁-[¹⁴C]Val montre que ce produit hydrolysé par KOH donne 1 Val et 2 Cyd-2′(3′)-P. Il s'agit donc d'un dinucléotide CpCp-[¹⁴C]Val (Tableau 2). Le spectre d'absorption ultraviolet de N₁-[¹⁴C]Val déterminé avant et après hydrolyse par KOH ne diffère pas de celui du Cyd-2′(3′)-P purifié (Fig. 4). Dans l'hydrolysat alcalin du N₂-[¹⁴C]Val on trouve 1 Val et 3 Cyd-2′(3′)-P (Tableau 2): il s'agit d'un trinucléotide CpCp-[¹⁴C]Val-Cp. Le

Fig.4. en mili

Vol

R N N

TYM

renden N₁-[¹⁴C 70 % sa qu'apr RNA d 2 Cyd-2 fixée pa par le F

Nou devrait par un détermin léotides, en prése lysé à l'a

13 Europe

Tableau 2. Complexe mRNA-[14C] Val

Matériel	Radio-	Com	position	Rendement	
ALGUOTICE	activité (×10 ⁻²)	Valine	Cyd-2'(3')-P		
A. faecalis	coups/min	nı	moles	°/ _°	
$\dot{R}NA$ -[^{14}C]Val N_1 -[^{14}C]Val N_2 -[^{14}C]Val	300 72 150	760 180 380	370 1100	100 26 50	
E. coli RNA-[¹⁴ C]Val N ₁ -[¹⁴ C]Val N ₂ -[¹⁴ C]Val	205 60 86	520 150 220	320 680	100 30 42	
TYMV RNA-[¹⁴ C]Val N ₁ -[¹⁴ C]Val	80 34	190 80	140	100 42	

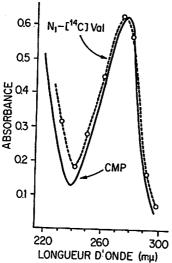


Fig. 4. Spectre d'absorption ultraviolet de N₁-[14C] Val purifié en milieu acide (O). Par comparaison, le spectre d'absorption du Cyd-2'(3')-P est donné en trait plain (——)

rendement (Tableau 2) représentant la somme de N₁-[¹⁴C]Val et de N₂-[¹⁴C] Val peut varier de 30 à 70 % selon l'expérience. Il est intéressant de souligner qu'après hydrolyse par KOH du complexe [¹⁴C]Val-RNA du TYMV (N₁-[¹⁴C]Val) on obtient 1 valine et 2 Cyd-2'(3')-P. Nous constatons donc que la valine fixée par le RNA soit d'A. faecalis, soit d'E. coli, soit par le RNA de TYMV, est attaché au Cyd-2'(3')-P.

Ordre des nucléotides dans le di- et le trinucléotide-[14C]Arg

Nous avons vu que le dinucléotide-[14C]Arg devrait être constitué de Cyd-3'-P et d'Urd-3'-P liés par une liaison phosphodiester (Fig. 6). Afin de déterminer la position respective de ces deux nucléotides, le dinucléotide-[14C]Arg est incubé d'abord en présence de phosphatase prostatique, puis hydrolysé à l'aide de KOH, et enfin les produits de dégrada-

tion sont séparés sur colonne de Dowex [4]. Le Tableau 3 montre la présence de 1 Cyd-2'(3')-P et de 1 uridine, ce dernier provenant de l'Urd-3'-P: c'est donc bien l'Urd-3'-P qui porte le phosphate libre en position 3'.

Le trinucleotide CpUp-[14C]Arg-Cp est d'abord traité par la phosphatase et l'hydrolyse alcaline produit 1 Cyt-2'(3')-P, 1 Urd-2'(3')-P et 1 cytidine. Après traitement du CpUp-[14C]Arg-Cp par la phosphatase puis par le métaperiodate et hydrolyse ménagée, les résultats analytiques montrent la présence d'un dérivé dialdéhyde de cytidine et d'un dinucléotide CpUp. L'ordre de ce dernier est établi comme dans le cas du dinucléotide-[14C]Arg.

Nature de la liaison dans l'acide aminé-dinucléotide et dans l'acide aminé-trinucléotide

Le complexe [14C]acide aminé-RNA ainsi que le di- et le trinucléotide-acide aminé sont stables en milieu acide à froid. L'hydroxylamine 0,2 M (pH 7,0)

Fig. 5. Action du métapériodate sur CpU. (a) réaction positive; sur N₁-[¹⁴C]Arg après traitement par KOH; (b) réaction négative, et après traitements successifs par la phosphatase (1) puis par KOH (2): (d) réaction positive)

détache lentement mais définitivement l'acide aminé du complexe [9] ce qui suggérait fortement qu'une liasison ester et non amide était formée entre le carboxyle de l'acide aminé et une partie du nucléotide. Le spectre d'absorption ultraviolet du nucléotide-acide aminé ne diffère pas de celui (Fig. 2 et 4) des mêmes nucléotides sans acide aminé ce qui montre que l'acide aminé n'est pas lié à l'une des bases. Il restait finalement la possibilité que l'acide aminé soit attaché par son carboxyle à l'hydroyxle en position 2' du ribose nucléotidique. Dans le cas du dinucléotide-[14C]acide aminé la Fig.5 montre que: (a) le métaperiodate agit sur un nucléotide lorsque deux hydrodroxyles adjacents sont libres; (b) le HIO4 n'agit pas sur le composé N₁-[14C]Arg (ici hypothétiquement représenté); (c) après traitement du N₁-[¹⁴C]Arg par KOH ([14C]Arg libérée) le HIO, n'agit toujours pas sur ce composé ce qui montre que l'hydroxyle de

Vol.

syn.

ami

con:

con

ider

RN

san

segn

RN

diff

liés.

[10,

[13]

s'at

tou.

tR1

187

troi

lair

dég

étaı

tou:

gine

sent

les :

et]

spé

don

syn

des

naiı

nou

mas

tech

trav

Hea

tion

du (

Tableau 3. Nucléotides de N₁-[¹⁴C]Arg et de N₂-[¹⁴C]Arg

après action de KOH

Les analyses sont effectuées sur N₁-[14C]Arg et N₂-[14C]Arg purifiés. L'action de la phosphatase prostatique est suivie d'hydrolyse par KOH. La séparation des nucléotides et des nucléosides est effectuée sur colonne de Dowex-1 et est controlée par chromatographie sur papier

***************************************		-		
	Nuclé	otides	Nucléosides	
Composés	Cyd-2' (3')-P	Urd-2' (3')-P	Cyd	Urd
	nmoles		nmoles	
N ₁ -[¹⁴ C]Arg	120	130	_	-
N ₁ -[¹⁴ C]Arg après action de la phosphatase	120	_	_	120
N ₂ -[¹⁴ C]Arg	430	220	_	_
N ₂ -[¹⁴ C]Arg après action de la phosphatase	220	210	230	

Fig. 6. Structures de N1-Arg et de N2-Arg

l'uridine en position 3' devrait porter le phosphate; (d) finalement le métapériodate n'agit sur le CpUp-[14C]Arg (ou sur le CpCp-[14C]Val) qu'après traitement de ce composé par la phosphatase prostatique d'abord, qui enlève le phosphate en position 3' puis par KOH qui détache l'acide aminé.

L'analyse du trinucléotide-[14C]Arg (Tableau 3) a montré que l'ordre des nucléotides est le suivant: CpUpCp. Le métaperiodate n'agit pas sur ce composé, ce qui prouve que le nucléotide Cp ne possède pas d'hydroxyle libre en position 2' ou 3'. Contrairement au CpUp-[14C]Arg le traitement du CpUpCp-[14C]Arg par la phosphatase prostatique seulement permet au periodate d'agir. On constate donc que le Cp terminal ne porte pas la [14C]arginine.

Par analogie avec le CpUp-[¹⁴C]Arg dans lequel l'arginine est attachée à l'hydroxyle en position 2' de l'Urd-3'-P nous concluons que dans le CpUp-[¹⁴C]-Arg-Cp cet acide aminé est lié à l'Urd-3'-P. La structure serait celle représentée dans la Fig. 6.

Dans le cas du trinucléotide-[14C]Val nous avons montré que la valine ne se trouve pas attachée au dernier Cp du trinucléotide. Les données présentées dans ce chapitre et l'observation que l'hydroxylamine détache lentement l'acide aminé du complexe [9] permettent de conclure que l'acide aminé attaché au RNA matriciel et par conséquent au di- ou trinucléotide isolé est lié par son carboxyle à l'hydroxyle en position 2' du ribose nucléotidique.

CONCLUSIONS ET DISCUSSION

A partir de complexe [14C]AA-mRNA synthétisé in vitro à l'aide de polypeptide synthétases et d'ATP nous avons, après dégradation du complexe, isolé et identifié certains fragments de RNA porteurs d'acides aminés marqués au ¹⁴C. Dans le cas de [¹⁴C]Arg-RNA un dinucléotide, CpUp-[14C]Arg et un trinucléotide CpUp[14C]Arg-Cp ont été identifiés et analysés. Dans les composés isolés (RNA d'Alcaligenes faecalis et d'Escherichia coli) la [14C]arginine est attachée à l'hydroxyle en position 2' du ribose de l'Urd-3'-P. Parmi les produits de dégradation du complexe [14C]Val-RNA (d'Alcaligenes faecalis, d'Escherichia coli et RNA du TYMV) nous avons isolé un dinucléotide CpCp-[14C]Val et un trinucléotide CpCp-[14C]-Val-Cp chacun portant en quantité stoechiométrique la [14C]valine. Le rendement (la somme de dinucléotide-[14C]AA + trinucléotide-[14C]AA) varie selon l'expérience et peut atteindre dans le meilleur cas environ 70% de la quantité totale d'acide aminé initialement fixé dans le mRNA.

Par des moyens chimiques et enzymatiques, nous avons montré que la liaison qui unit la [¹⁴C]arginine et la [¹⁴C]valine aux oligonucléotides isolés est formée entre le carboxyle de l'acide aminé et l'hydroxyle en position 2' du ribose nucléotidique. Il serait intéressant de vérifier au moyen de modèles chimiques la structure de CpUp-[¹⁴C]Arg et celle de CpUp-[¹⁴C]-

Arg-Cp.

L'obtention du CpUp-[14C]Arg à partir du complexe [14C]Arg-RNA en présence de ribonucléase peut s'expliquer de la façon suivante: la [14C]arginine liée par son carboxyle à l'hydroxyle en position 2' de l'Urd-3'-P peut réagir par son groupement α aminé avec le phosphate rendant celui-ci cyclique et permettant à la ribonucléase de couper la liaison entre l'Urd-3'-P porteur de [14C]arginine et le nucléotide suivant (ce dernier n'est pas nécessairement le Cyd-3'-P). De plus l'arginine peut réagir par son groupement γ aminé soit avec la cytosine, soit avec le phosphate du Cyd-3'-P adjacent, stabilisant ainsi la liaison phosphodiester vis à vis de la ribonucléase.

Les données présentées ici et celles antérieurement décrites [2] montrent que les polypeptide-synthétases sélectionnent les acides aminés pour les fixer à des sites situés à l'intérieur de la chaîne des RNA matriciels. Les 20 acides aminés sont susceptibles de s'attacher sans compétition détectable aux mRNA; on trouve donc 1 acide aminé pour 6 à 15 nucléotides. A la différence du RNA de transfert fixant les acides aminés uniquement en présence d'ATP et les attachant toujours à l'adénosine terminale, les mRNA que nous avons utilisés peuvent selon la nature de l'acide aminé, fixer celui-ci soit en présence de chaque nucléoside triphosphate soit en présence de deux seulement [5]. Il est particulièrement intéressant de remarquer que le RNA du TYMV (masse moléculaire = 2×10^6) acepte en présence de polypeptide-

13*

synthétases et d'une source d'énergie certains acides aminés lorsque l'intégrité de ce RNA semble être conservée [9]. Parmi les produits de dégradation du complexe [14C]Val-RNA du TYMV nous avons identifié le CpCp-[14C]Val (comme dans le cas des RNA d'Alcaligenes faecalis et d'Escherichia coli), sans toutefois préciser si la [14C]valine est liée à un segment privilégié du RNA du TYMV.

Plusieurs auteurs [10,13] ont constaté que des RNA isolés à partir d'extraits cellulaires d'origines différentes, sont porteurs d'acides aminés fortement liés. Pour certains il s'agirait de liaison phosphoamide [10,11], pour d'autres la liaison n'a pas été précisée [13]. Le mécanisme par lequel les acides aminés s'attachent à ces RNA n'a pas été précisé; il ne cadre toutefois pas avec le mécanisme proposé pour le tRNA [13,16]. Des nucléotides-peptides [14,15,17, 18] et des nucléotides-acides aminés [19,20] ont été trouvés par plusieurs auteurs dans des extraits cellulaires. Nous pensons qu'il s'agit là de produits de dégradation du mRNA chargé en acides aminés, étant donné que les polypeptide-synthétases sont toujours présentes dans les extraits cellulaires d'origines différentes [1].

De l'ensemble des faits que nous venons de présenter et tenant compte de nos résultats concernant les RNA actifs des bactéries, levures, tissus animaux et RNA du TYMV [4,9] nous concluons qu'un site spécifique situé dans le mRNA auquel un acide aminé donné est attaché en présence d'enzymes (polypeptidesynthétases) est le même indépendamment de l'origine des RNA utilisés, du moins pour les bactéries.

Les résultats décrits et nos observations préliminaires [21] permettent de penser que ces RNA que nous pouvons désormais appeler matriciels ont des masses moléculaires différentes et pourraient, par des techniques appropriées, être isolés et caractérisés. Ce travail est en cours.

Ce travail a bénéficié de l'aide des National Institutes of Health, du Jane Goffin Childs Memorial Fund, de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique, et du Commissariat à l'Energie Atomique.

Note added in proof. In a preliminary note (C.R.Ac.Sc. Paris. 1968, 266, Série D-845-847) we have described different characteristics of purified template RNA (RNA matriciel). Its sedimentation coefficient is 5,5 S and molecular weight 50.000. The chain is terminated by uridine in 3' OH position and by uridine diphosphate in 5'-OH position.

BIBLIOGRAPHIE

- 1. Beljanski, M., et Beljanski, M., Biochim. Biophys. Acta, 72 (1963) 585.
- 2. Beljanski, M., et Fischer, C., Pathol. Biol. 13 (1965)
- 3. Zalta, J. P., et Beljanski, M., Compt. Rend. 253 (1961) 567.
- 4. Beljanski, M., Fischer, C., et Beljanski, M., Comp. Rend. 257 (1963) 547.
- 5. Fischer, C., et Beljanski, M., résultats inédits.
- 6. Beljanski, M., et Ochoa, S., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 44 (1958) 494.
- 7. Pardee, A. B., Jacob, F., et Monod, M., J. Mol. Biol. 1 (1959) 165.
- 8. Gordon, H. T., Thornburg, W., et Werum, L. V., Anal. Chem. 28 (1956) 849.

 9. Beljanski, M., Bull. Soc. Chim. Biol. 47 (1965) 1645.
- 10. Potter, J. L., et Dounce, A., J. Am. Chem. Soc. 78 (1956)
- 11. Bogdanov, A. A., Prokofev, M. A., Antonovich, E. G., Terganova, G. V., et Anisimova, V. V., Biokhimiya, 27 (1962) 266.
- 12. Hall, R. H., Biochemistry, 3 (1964) 769.
- Ingram, V. M., et Sullivan, E., Biochim. Biophys. Acta, 61 (1962) 583.
- 14. Harris, G., et Wiseman, A., Biochim. Biophys. Acta, 55 (1962) 374.
- 15. Schuurs, A. H., et Köningsberger, V. V., Biochim. Bio-
- phys. Acta, 44 (1960) 167.
 Id. Zachau, H. G., Acs, G., et Lipman, F., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 44 (1958) 885.
- Michelson, A. M., The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides, Academic Press, New York 1963, p. 191.
- 18. Ondarza, R. N., Biochim. Biophys. Acta, 59 (1962)
- 19. Hansen, R. G., et Hagenan, E., Arch. Biochem. Biophys. 62 (1956) 511.
- 20. Reith, W. S., Nature, 178 (1956) 1393.
- 21. Beljanski, M., résultats inédits.

M. Beljanski, C. Fischer-Ferraro et P. Bourgarel Service de Biochimie cellulaire, Institut Pasteur 25 Rue du Docteur Roux, F-75 Paris-15, France