

41

COLLOQUES INTERNATIONAUX  
DU  
CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

---

N° 124

MÉCANISMES DE RÉGULATION  
DES ACTIVITÉS CELLULAIRES  
CHEZ LES MICROORGANISMES

Marseille  
23-27 Juillet 1963

EXTRAIT

ÉDITIONS DU CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE  
15, quai Anatole-France - PARIS-VII

1965

# A. R. N. MESSENGER: INTERMÉDIAIRE DIRECT DANS LA SYNTHÈSE DES LIAISONS PEPTIDIQUES

M. BELJANSKI

Service de Biochimie cellulaire, Institut Pasteur, Paris

## RÉSUMÉ

La formation de peptides en présence de ribonucléoside-5'-triphosphates et de polypeptide synthétases d'*Alcaligenes faecalis*, exige la participation d'une fraction d'ARN. L'ARN actif provenant de ces mêmes bactéries a été identifié par divers moyens comme étant l'ARN messenger. Cet ARN a été partiellement purifié à l'aide de sulfate d'ammoniaque. Il est capable de fixer sans compétition les L-acides aminés pour former un complexe « AA-ARN », qui, isolé et réincubé dans du tampon Tris, sans addition d'enzymes, donne naissance à des peptides. Les ARN à marquage rapide contenant les ARN messagers et provenant de diverses origines servent d'accepteurs des acides aminés en présence d'enzymes d'*Alcaligenes faecalis*.

## SUMMARY

### MESSENGER-RNA AS A DIRECT INTERMEDIATE FOR THE SYNTHESIS OF PEPTIDE BONDS

The formation of peptides in the presence of ribonucleoside-5'-triphosphates and of polypeptide synthetases from *Alcaligenes faecalis* requires the participation of a RNA fraction. Active RNA obtained from these bacteria has been identified by several procedures as being messenger RNA and has been partially purified by ammonium-sulfate fractionation. This RNA fraction has the ability to fix un-competitively L-amino-acids, forming a « RNA-AA » complex which, when isolated and incubated again in Tris buffer without the addition of enzyme, gives rise to peptides formation. Rapidly-labelled RNA, containing messenger RNA and obtained from various origins, acts as an amino-acids acceptor in the presence of *Alcaligenes faecalis* enzymes.

Les homo- et hétéro-peptides peuvent être synthétisés par les polypeptide synthétases, enzymes partiellement purifiés à partir d'*Alcaligenes faecalis*. Cette synthèse a lieu en présence de chacun des ribonucléoside-5'-triphosphates et de L-acides aminés. La réaction globale pourrait s'écrire : X-R-P-P

+ AA  $\longrightarrow$  peptides + P + X-R-P-P (1). Nous avons mis en évidence que les préparations enzymatiques ne sont actives que lorsqu'elles contiennent un certain taux d'acides ribonucléiques (1 à 3 %) (1). Les enzymes ayant perdu leur activité à la suite de l'élimination des acides nucléiques normalement liés à ces préparations peuvent être réactivés pour les réactions décrites par addition de certaines fractions d'ARN isolées à partir de ces mêmes bactéries. Les ARN possèdent les propriétés de fixer tous les L-acides aminés en présence de nos préparations enzymatiques (2). Un complexe « AA-ARN » peut être isolé sous forme de précipité stable en milieu acide. Les ARN d'*Alcaligenes faecalis* ayant incorporé le

5-fluorouracile ou l'azaguanine pendant des temps très courts sont également actifs, mais présentent des modifications spécifiques pour la fixation des acides aminés (tableau I) (2). Ces observations suggéraient que la fraction d'ARN impliquée dans ces réactions devait être un ARN à renouvellement rapide.

TABLEAU 1

Complexe acide aminé  $^{14}\text{C}$ -ARN (*Alcaligenes faecalis*).

Les conditions de formation et d'isolement du complexe « AA-ARN » ont été décrites (2).

	µMoles par mg d'ARN			
	Ala	Leu	Lys	His
ARN-rm.....	5,30	4,57	4,75	1,88
ARN-rm - 5 FU....	3,70	2,45	2,35	3,60
ARN-rm - Aza G...	2,20	1,90	1,75	1,00
ARN <sub>s</sub> .....	0,90	0,90	0,70	0,25
ADN.....	0,20	0,15	0,14	0,07
AGUC.....	0,15	0,10	0,10	0,09
Poly U.....	0,12	0,10	0,08	0,06
Poly A.....	0,10	0,08	0,12	0,08
ARN-rm + RNase...	0,15	0,20	0,10	0,05
ARN-rm + DNase...	5,40	4,65	4,79	1,95

Nous avons récemment déterminé la nature de l'ARN actif dans le système décrit et avons établi qu'une fraction d'ARN isolée à partir des levures et des tissus animaux possédait les mêmes propriétés que l'ARN actif isolé d'*Alcaligenes faecalis* (3). On sait que les ARN peuvent être facilement séparés sur un gradient de saccharose (4) (5). Dans ces conditions les ARN à renouvellement rapide marqués pendant des temps courts (30 sec. à 2 min.) soit par l'uracile  $^{14}\text{C}$  soit par le  $^{32}\text{P}$  présentent des courbes caractéristiques de ce type d'ARN d'une part et de l'espèce dont ils proviennent d'autre part (fig. 1, 2, 3). Après séparation des ARN sur gradient de saccharose nous avons déterminé la capacité de chacune des fractions à fixer les L-acides aminés  $^{14}\text{C}$  en présence de ribonucléoside-5'-triphosphates et d'un excès d'enzymes (3). Les résultats illustrés par les figures 1, 2, 3 montrent que la courbe du complexe

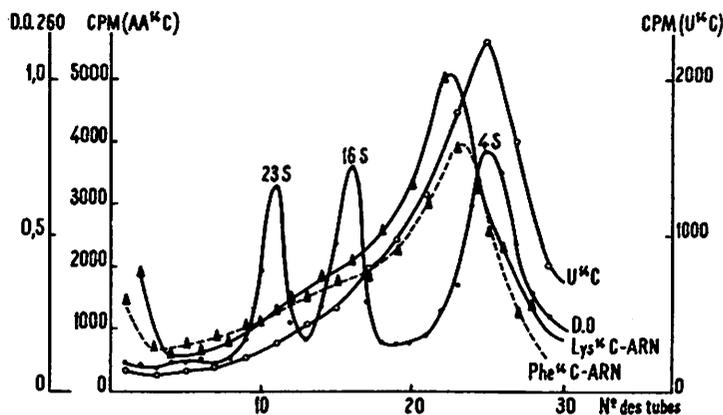


FIG. 1

Les ARN d'*Alcaligenes faecalis* sédimentés sur gradient de saccharose. L'ARN-mr a été marqué pendant 36 sec. à l'uracile  $^{14}\text{C}$ . Les résultats de l'incorporation des acides aminés  $^{14}\text{C}$  dans l'ARN de chaque fraction du gradient sont exprimés en nombre d'impulsions par minute. Les valeurs de la radioactivité correspondant à l'uracile  $^{14}\text{C}$  dans l'ARN-mr ont été déduites.

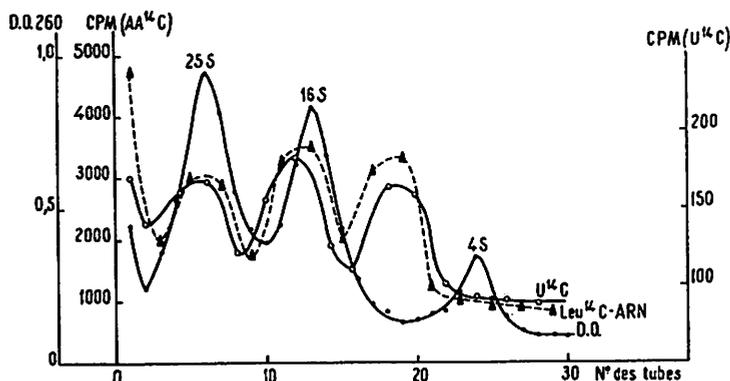


FIG. 2

Les ARN des levures, sédimentés sur gradient de saccharose. La radioactivité correspondant à l'ARN-mr n'a pas été retranchée. L'ARN-mr a été marqué pendant 30 sec.

« AA-ARN » suit dans tous les cas celle de l'ARN à marquage rapide (ARN-mr = messenger + éosomal). Les acides aminés suivants : Phe; Lys; Leu; Ileu; Ala; Val; individuellement utilisés donnent des complexes « AA-ARN » dont les courbes sont semblables. Ces résultats indiquent fortement que seul l'ARN à marquage rapide est capable de fixer les L-acides aminés. Dans la région (fig. 1) où l'ARN-mr est le mieux séparé des autres ARN nous trouvons par exemple 1 Lys ou 0,6 Phe pour 120-150 nucléotides. Précisons que l'ARN de transfert et l'ADN isolés de ces mêmes bactéries sont pratiquement inactifs (tableau I). Le complexe « AA-ARN » ne se forme pas en présence de ribonucléase; par contre la désoxyribonucléase est sans effet.

Nous avons cherché à déterminer quelle était la fraction de l'ARN-mr (*Alcaligenes faecalis*) qui est spécifiquement responsable de la fixation des L-acides aminés. Après marquage au <sup>32</sup>P (36 sec.) des ARN-mr nous avons purifié les ARN totaux. A l'aide de sulfate d'ammoniaque les ARN ont été fractionnés en 8 ou 10 parties dans du tampon phosphate 0,1 M pH 7,4. Nous avons déterminé sur

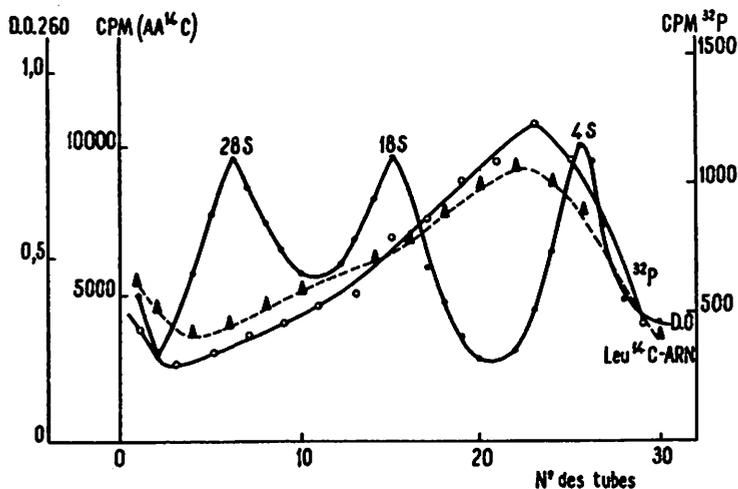


FIG. 3

Les ARN du foie de rat, sédimentés sur un gradient de saccharose. Les valeurs correspondant à la radioactivité de l'ARN-mr (marqué au <sup>32</sup>P pendant 90 sec.) n'ont pas été déduites.

chaque fraction dialysée la capacité à former le complexe « AA-ARN », la teneur en  $^{32}\text{P}$  ainsi que le rapport de radioactivité des nucléotides séparés, après hydrolyse alcaline, sur Dowex 1  $\times$  2. Le tableau II montre les compositions en bases de certaines fractions d'acides ribonucléiques. Les fractions les plus

TABLEAU 2  
*Composition en bases de divers acides nucléiques chez Alcaligènes Faecalis.*

	Moles pour 100 moles de nucléotides				G + C A + U (T)
	A	G	C	U (T)	
ADN.....	16,5	33,9	32,8	16,0	2,30
ARN $^{32}\text{P}$ (65-90 %).	15,5	35,8	30,5	15,0	2,18
ARN (90 %).	15,8	33,0	32,0	17,8 (20, 25, 31)	
ARN $^{32}\text{P}$ (40 %).	24,3	28,0	25,5	25,0	1,09
ARN ribosomal.	23,2	27,3	24,0	26,0	1,04
ARN <sub>1</sub> .	20,0	31,0	30,6	20,6	1,58

actives (25 à 30 % de l'ARN-mr) pour la fixation des acides aminés (tableau III) sont celles qui présentent un rapport de la radioactivité des nucléotides semblable à celui de l'ADN. De plus, la fraction d'ARN la plus active présente pour A, G, C, le rapport (U. V.) très proche de celui trouvé pour l'ADN. Par

TABLEAU 3  
*Activité acceptrice des ARN (Alcaligènes Faecalis) fractionnés par  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ .*

Fractions	ARN mg	ARN mg/ml	$^{32}\text{P}$ (CPM) mg d'ARN	m $\mu$ Moles d'acide aminé incorporé dans 1 mg d'ARN		
				Ala	Leu	Phe
40	24,0	7,60	4060	1,5	1,2	1,0
55	0,98	1,00	6240	2,0	1,8	1,2
60	1,00	0,80	6460	4,0	3,18	2,7
65	1,30	0,44	5490	27,0	24,60	12,5
70	4,60	1,70	2860	17,6	13,00	7,6
80	4,30	2,82	2690	16,0	14,50	8,0
90	2,0	0,82	6130	29,0	26,00	14,2
95	0,36	0,22	4810	17,0	18,5	9,0

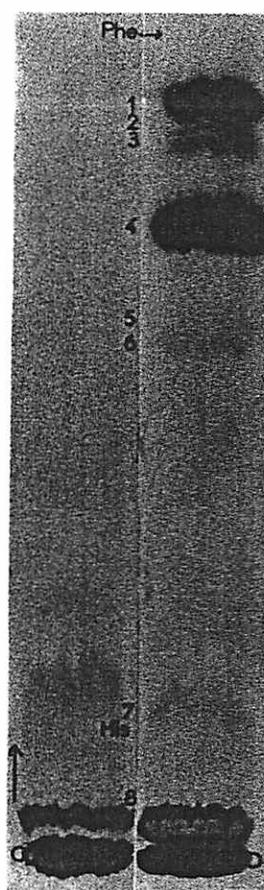
Conditions : voir tableau 1. Quantité d'ARN variant de 10 à 20  $\mu\text{g}/0,5$  ml.

contre, l'uracile de cette fraction se trouve en quantité variable selon les préparations (tableau II). Les fractions d'ARN qui précipitent entre 65 et 90 % de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  donnent généralement deux pics de radioactivité spécifique ( $^{32}\text{P}$  ou uracile  $^{14}\text{C}$ ). Dans cette région la formation du complexe « AA-ARN » est proportionnelle à l'activité spécifique de l'ARN. Par contre les fractions les moins actives de l'ARN-mr (70 %) précipitant entre 0 et 60 % de  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$  sont celles qui ont un rapport des nucléotides marqués proche de celui de l'ARN ribosomal. Nous constatons donc que les fractions acceptrices des acides aminés dans le présent système sont constituées essentiellement par l'ARN messenger. Dans le cas des levures et du foie de rat les ARN actifs en présence d'enzymes provenant d'*Alcaligenes faecalis* sont aussi, selon toute probabilité, les ARN messagers.

Les ARN isolés à partir du virus de la mosaïque jaune du navet (TYMV) et du virus de la mosaïque du tabac (TMV) ont été essayés pour la fixation des acides aminés  $^{14}\text{C}$  en présence d'enzymes d'*Alcaligenes*

*faecalis*. L'ARN de TYMV fixe certains acides aminés, la L-valine tout particulièrement. Par contre nous n'avons encore pu déterminer les conditions permettant une fixation appréciable des acides aminés par l'ARN provenant de TMV (6). De même divers polynucléotides de synthèse (homo- ou hétéro-polymères) se sont montrés pratiquement inactifs comme accepteurs des acides aminés dans le système enzymatique étudié (tableau I).

Il est important de remarquer que tous les L-acides aminés peuvent être fixés sur l'ARN messager sans aucune compétition observable entre les acides aminés naturels. Pour obtenir une inhibition appréciable de la fixation d'Ileu  $^{14}\text{C}$  par exemple, il faut environ 3 000 fois plus de L-Val  $^{12}\text{C}$  (résultats inédits de WOESE, C. et BELJANSKI, M.). Les acides aminés se fixent sur l'ARN dans un rapport très proche (2) de celui observé pour les protéines totales (7). Dans les meilleures conditions chaque acide aminé est fixé pour environ 120-150 nucléotides (fig. 1). D'après l'ensemble de ces résultats les acides



ARNm-His $^{14}\text{C}$  ARNm $^{14}\text{C}$   
Phe $^{14}\text{C}$

FIG. 4

Le complexe « His  $^{14}\text{C}$ -ARN » et « His  $^{14}\text{C}$ , Phe  $^{14}\text{C}$ -ARN », isolé et lavé par  $\text{HClO}_4$  a été incubé simplement dans du tampon Tris 0,2 M pH 7,8, pendant 30 min. à 37°. Le milieu est ensuite acidifié et le mélange chromatographié. Radioautogramme, 3 jours. L'analyse des peptides a été réalisée à l'aide de fluorodinitrobenzène. 1 : Phe-Phe; 2 : Phe-Phe-His; 4 : Phe-Phe-Phé-Phé; 8 : His-His.

aminés doivent se fixer le long de la chaîne de l'ARN messager, qui servirait de matrice pour les acides aminés « activés » permettant par la suite la formation des chaînes peptidiques. La stabilité du complexe « AA-ARN » en milieu acide et son instabilité en milieu alcalin suggèrent l'existence d'une liaison ester entre le groupement carboxylique de l'acide aminé « activé » et un site de nucléotides. La formation du complexe « AA-ARN » précède l'apparition de peptides dans le milieu d'incubation. Les expériences préliminaires montrent que si l'on isole et lave à l'aide de  $\text{HClO}_4$  le complexe « AA-ARN » porteur de 1 ou de 2 acides aminés  $^{14}\text{C}$  on peut suivre l'apparition des peptides par simple incubation du complexe en tampon Tris pH 7,2 à 9,0. On observe alors la formation de peptides de faibles poids moléculaire constitués de 1 ou de 2 acides aminés (fig. 4). Ces peptides ne contiennent pas de matériel nucléotidique. Au-delà de pH 9,0, les peptides ne se forment plus et l'acide aminé est détaché de l'ARN sous forme libre.

#### BIBLIOGRAPHIE

1. BELJANSKI, M. (1962). *Biophys. Biochem. Res. Comm.*, 8, 15.
2. BELJANSKI, M. et BELJANSKI, M. (1963). *Biochim., Biophys. Acta*, 72, 585.
3. BELJANSKI, M., FISCHER, C. et BELJANSKI, M. (1963). *Compt. Rend. Ac. Sc.*, 257, 547.
4. BRITTEN, R. J. et ROBERTS, R. B. (1960). *Science*, 131, 32.
5. NOMURA, M., HALL, B. D. et SPIEGELMAN, S. (1960). *J. Mol. Biol.*, 2, 306.
6. Travaux non publiés en collaboration avec le Dr. L. Hirth.
7. SUEOKA, N. (1961). *Proc. Nat. Acad. Sc., U.S.*, 47, 1141.

#### ABRÉVIATIONS

ARN-rm, ARN ribosomal + ARN à marquage rapide; ARN-rm 5 FU, ARN ribosomal + ARN à marquage rapide contenant du 5 fluoro-uracile; ARN-rm Aza G, ARN ribosomal + ARN à marquage rapide contenant de l'azaguanine; Complexe « AA-ARN », complexe « acide aminé - ARN ».