

VIROLOGIE. — *ARN-amorceurs riches en nucléotides G et A indispensables à la réplication in vitro de l'ADN des phages Φ X 174 et lambda (λ).* Note (*) de M. Mirko Beljanski, présentée par M. Pierre Lépine.

Les ARN-fragments riches en nucléotides G et A déclenchent en présence d'ADN polymérase ADN dépendante I, la réplication de l'ADN circulaire simple chaîne du phage Φ X 174 en double chaîne ou forme répliquative ainsi que celle de l'ADN du phage λ .

On ne connaît pas tous les constituants chez *E. coli*, indispensables à la réplication *in vitro* de l'ADN des phages Φ X 174, M 13 et λ [(¹), (²), (³)], et celle-ci n'a pu être réalisée *in vitro* avec des constituants purifiés et bien caractérisés. La réplication de l'ADN simple chaîne du phage Φ X 174 nécessite la présence d'un ARN (non isolé) que l'extrait bactérien synthétise en présence de rifampicine (⁴) alors que pour l'ADN du phage M 13 la synthèse de l'ARN est inhibée par l'antibiotique. Pour celle de l'ADN du phage λ , l'ARN-amorceur n'a pas été mis en évidence [(³), (⁵)].

Nous avons précédemment montré que la réplication des ADN d'origines différentes peut être déclenchée *in vitro* avec une relative spécificité par les ARN-fragments constitués de 25 à 50 nucléotides (1 à 2 S) à condition que l'ADN utilisé comme matrice et l'ADN polymérase I d'*E. coli* (partiellement purifiée) soient tous deux exempts d'ARN de type amorceur (⁶). Ici nous démontrons que la *simple chaîne circulaire* de l'ADN du phage Φ X 174 exige la présence d'un ARN-fragment riche en nucléotides G et A pour sa réplication. Il en est de même pour la réplication de l'ADN du phage λ , ADN qui aurait une structure circulaire (⁷).

Parmi les ARN-fragments provenant des ARN ribosomiques (23 S + 16 S) isolés d'*E. coli* M 500 Sho-R (⁸), P₁, P₂ et P₃, riches en nucléotides G et A (⁹) se sont avérés être de puissants amorceurs pour la réplication de l'ADN des deux phages utilisés. En effet on constate que la simple chaîne de l'ADN Φ X 174 (ADN mis à notre disposition par le Dr R. Sinsheimer) incubé en milieu réactionnel complet ne peut être répliquée (tableau I). Les ARN-fragments P₁, P₂ ou P₃, chacun séparément ajouté, déclenchent la réplication de l'ADN du phage Φ X 174 simple chaîne ainsi que celle de l'ADN du phage λ (ADN mis à notre disposition par le Dr B. Nisman).

Une quantité donnée d'ADN Φ X 174 simple chaîne et différentes concentrations d'ARN-amorceur P₁ permettent de constater que le plateau indiquant l'effet maximal de l'amorceur est atteint avec 0,1-0,2 μ g d'ARN-fragment P₁ ou P₂ ou P₃ pour 0,15 μ g d'ADN. L'effet obtenu par un des ARN-amorceurs actifs n'est pas augmenté par le mélange des trois suggérant que chacun d'eux se fixerait sur un et même site de l'ADN (tableau I). Par contre l'ARN-fragment P₄, peu riche en G et A (¹⁰), a un faible effet alors que les ARN-fragments obtenus par l'action de la RNase T₁, soit N₁ sur les ARN ribosomiques, sont inactifs. Les poly AG et poly A synthétiques sont pratiquement inactifs. L'ARN-70 (⁶) actif lors de la réplication de l'ADN des

TABLEAU I

Effet des ARN-fragments (*E. coli*) dans la répllication *in vitro* de l'ADN du phage Φ X 174 et de celle de l'ADN natif du phage lambda (λ)

	³ H d-GTP incorporé en 10 mn à 36° (CPM)				
	ADN du phage Φ X 174	ADN du phage λ		ADN du phage Φ X 174	ADN du phage λ
Milieu complet	564	376	Milieu complet	564	376
Milieu complet + P ₁ (0,5 µg)	13 674	9 476	Milieu complet + P ₁ + RNase T ₁ (20 µg)	3 270	—
Milieu complet + P ₂ (0,5 µg)	12 672	5 730	Milieu complet + P ₁ mais sans d-ATP, d-CTP, d-TTP	1 076	736
Milieu complet + P ₃ (0,5 µg)	11 276	1 310	Milieu complet + P ₂ prétraité par le périodate	670	—
Milieu complet + P ₄ (0,5 µg)	3 566	576	Milieu complet + P ₂ + N-éthylmaléimide	12 970	—
Milieu complet + P ₁ + P ₂ (0,5 µg chaque)	13 004	—	Milieu complet + Poly AG (1 µg)	610	376
Milieu complet + P ₁ + P ₂ + P ₃ (0,5 µg chaque)	11 676	—	Milieu complet + Poly AG (2,5 µg)	645	380
Milieu complet + P ₁ (<i>E. coli</i> K 12)	9 060	6 132	Milieu complet + Poly AG (5 µg)	1 430	582
Milieu complet + P ₁ + actinomycine (3 µg)	3 110	578	Milieu complet + Poly A (2 µg)	2 430	572
Milieu complet + P ₁ + rifampicine (20 µg)	12 146	—	Milieu complet + ARN-70° (6) (2 µg)	577	576
Milieu complet + P ₁ + ATP (0,1 µM)	13 120	9 386	Milieu complet + ARN-fragment T ₁ (2 µg)	542	413
Milieu complet + P ₁ + DNase (3 µg)	486	392			

Conditions d'incubation, voir (10).

TABLEAU II

Rapport des bases de l'ADN du phage Φ X 174 (simple chaîne) et de l'ADN synthétisé (forme répllicative) en présence d'ARN-fragment P₁

Bases	Moles pour 100 moles de nucléotides		
	ADN simple chaîne (4)	³ H-ADN synthétisé (forme répllicative)	
		Exp. I	Exp. II
A	1,00	1,00	1,00
G	1,06	1,08	1,04
C	0,82	0,76	0,84
T	1,06	0,90	0,97
G + C/A + T	0,92	0,97	0,95

Le rapport des bases ³H-ADN a été déterminé par la quantité de chaque ³H d-XMP incorporé dans le matériel acido-précipitable [conditions d'incubation (10)].

bactéries est sans effet dans celle des ADN des phages, excluant de ce fait une éventuelle contamination de ces derniers par les ADN bactériens. Le périodate de sodium (agissant sur 2 OH adjacents) supprime l'effet amorceur de l'ARN, révélant l'importance du groupement 3' OH dans la réplication des ADN. En présence des RNases A ou T₁ la synthèse d'ADN est considérablement diminuée. Des résultats semblables ont été obtenus pour la réplication de l'ADN du phage λ.

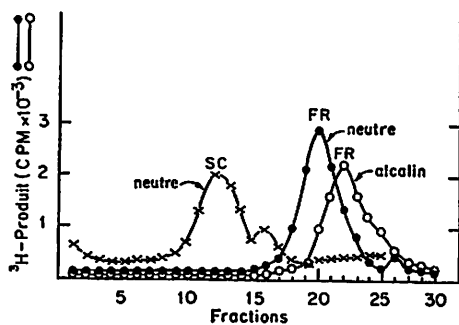


Fig. 1

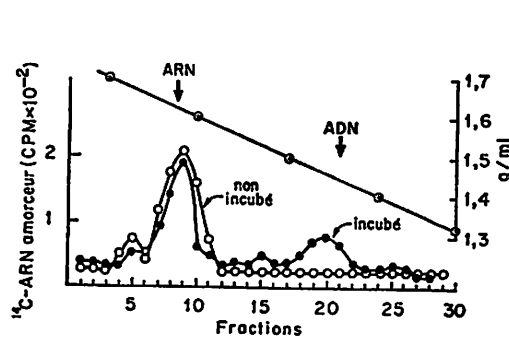


Fig. 2

Fig. 1. — Profil sur gradient de saccharose (neutre et alcalin) de l'ADN Φ X 174 simple chaîne (SC) et de l'ADN forme répliquative (FR) synthétisée en présence d'amorceur. Centrifugation à 65 000 tr/mn 2 h 30 à 4 °C.

Fig. 2. — Séparation sur gradient de Cs₂SO₄ de l'ARN-fragment P₁ (¹⁴C) et de l'ADN synthétisé en sa présence. Détection de la radioactivité.

Sur gradient de saccharose on peut aisément distinguer l'ADN simple chaîne du phage Φ X 174 de sa forme répliquative [(¹), (²)]. Afin de bien démontrer que l'ARN-fragment actif permet *in vitro* la synthèse de la double chaîne, l'ADN Φ X 174 simple chaîne a été incubé 20 mn dans des conditions optimales en présence d'amorceur P₁ puis l'enzyme fut éliminée par le chloroforme en présence d'EDTA 10⁻³ et de lauryl sulfate (0,02 %). Après séparation des phases par centrifugation, la phase aqueuse contenant le produit ³H synthétisé a été centrifugée sur gradient de saccharose (5-20 %) pendant 2 h 30 à 65 000 tr/mn à 4 °C. Les fractions ont été collectées et le ³H-ADN précipité par l'acide trichloroacétique à 5 % (conc. finale). Le précipité est filtré, lavé, séché et la radioactivité déterminée. La figure 1 montre que le ³H-ADN synthétisé en présence d'amorceur (qui rappelons-le est constitué de 25-50 nucléotides) occupe sur gradient de saccharose une position très différente de celle de l'ADN simple chaîne. Il ne s'agit pas d'une simple réparation de l'ADN mais de la synthèse de la forme « répliquative », chaîne probablement non fermée (fig. 3). L'ADN synthétisé possède le même rapport de bases que l'ADN du phage Φ X 174 (tableau II). L'ARN-amorceur ne sert qu'à initier la réplication. Nos résultats sont en accord avec ceux obtenus à l'aide d'extraits bactériens non purifiés [(¹), (²)].

Ceci nous imposait donc de contrôler rigoureusement si l'ARN-amorceur se lie à l'ADN au cours de la synthèse de la forme répliquative. Afin de le démontrer, le ¹⁴C amorceur P₁ (isolé à partir de l'ARN ribosomique provenant d'*E. coli* cultivé

en présence de ^{14}C guanine et ^{14}C adénine) a été ajouté au milieu réactionnel complet contenant les 4 ^{12}C *d*-XTP et l'ADN simple chaîne du phage Φ X 174. Après 10 mn d'incubation l'enzyme fut éliminée par le chloroforme comme précédemment décrit⁽¹⁰⁾ et la phase aqueuse contenant l'ADN synthétisé et l'amorceur ^{14}C -P₁ a été centrifugée sur gradient de Cs₂SO₄ pendant 64 h à 30 000 tr/mn à 20 °C. Lorsque le milieu réactionnel complet n'a pas été incubé, la radioactivité ^{14}C de l'amorceur se trouve exclusivement dans la région de l'ARN (*fig. 2*) alors qu'après incubation on constate (*fig. 2*) qu'une quantité de radioactivité ^{14}C sédimente dans la région de l'ADN

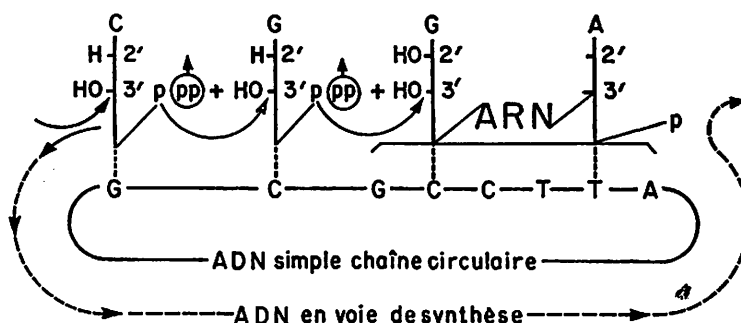


Fig. 3. — Schéma illustrant la synthèse de la forme répliquative (non fermée) de l'ADN du phage Φ X 174 à partir de la simple chaîne en présence d'amorceur P₁

(1 420) ce qui montre qu'une liaison covalente entre l'ARN-amorceur et l'ADN a dû se former au cours de la synthèse de l'ADN. On peut penser que les ARN-fragments P₁, P₂ et P₃, provenant des bactéries *E. coli* sont, pour les phages Φ X 174 et λ , des amorceurs « naturels ». En effet, ils permettent *in vitro* la synthèse de la double chaîne (forme répliquative de l'ADN du phage Φ X 174) et n'inhibent pas, dans les conditions de nos expériences, ni la reproduction des phages ni leur pouvoir lysant vis-à-vis des bactéries *E. coli*. Par contre, ces mêmes ARN-fragments qui, *in vitro*, interviennent dans la synthèse de l'ADN de certains virus à ADN, bloquent *in vivo* la multiplication de ces virus⁽¹⁰⁾.

(*) Séance du 10 février 1975.

(1) R. SCHEKMAN et coll., *Proc. Nat. Acad. Sc. USA*, 69, 1972, p. 2691.

(2) W. WICKNER et coll., *Proc. Nat. Acad. Sc. USA*, 69, 1972, p. 965.

(3) H. SHIZUYA et C. C. RICHARDSON, *Proc. Nat. Acad. Sc. USA*, 71, 1974, p. 1758.

(4) R. L. SINSHEIMER, *J. Mol. Biol.*, 1, 1959, p. 43.

(5) A. KLEIN et A. POWLING, *Nature New Biol.*, 239, 1972, p. 71.

(6) M. PLAWECKI et M. BELJANSKI, *Comptes rendus*, 278, Série D, 1974, p. 1413.

(7) T. OGAWA et coll., *Proc. Nat. Acad. Sc. USA*, 60, 1968, p. 861.

(8) M. BELJANSKI et coll., *Proc. Nat. Acad. Sc. USA*, 68, 1971, p. 491.

(9) M. BELJANSKI et coll., Brevet n° 7438768, 1974.

(10) M. BELJANSKI et coll., *Comptes rendus*, 280, Série D, 1975, p. 363 et 783.

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