

CHROM. 6090

RELATION ENTRE LA STRUCTURE ET LE COEFFICIENT DE PARTAGE  
DES tRNA DE LEVURE DANS LES SYSTÈMES SOLVANTS SALINS\*

JEAN-PIERRE GAREL\*\* ET PAUL MANDEL\*\*\*

*Centre de Neurochimie du CNRS et Institut de Chimie Biologique, Université Louis-Pasteur,  
67-Strasbourg (France)*

(Reçu le 17 avril 1972)

## SUMMARY

*Relation between the structure and the partition coefficient of yeast tRNA's in saline solvent systems*

The relationship between the structure of thirteen yeast tRNA's of known sequence and their partition coefficients  $K$  was studied. tRNA's were fractionated by counter-current distribution in "saline solvent systems" composed of an inorganic component of high molarity (phosphate or sulphate) and various organic components (acid, amide, or ether-alcohol). The behaviour of the tRNA's does not depend on the nature of the saline solvent system used. It conforms to the following basic equation:

$$\log K = c(A/A + G)(Pu/Py) + d \text{ or } c(A/Py) + d$$

tRNA<sup>Asp</sup> and tRNA<sup>Val</sup> are notable exceptions to this law. Their partition coefficients can be explained by the low amounts or the complete loss of alkylated bases in the anticodon region. The marked decrease in  $K$  when tRNA's lose their 3'-terminal adenosine and some considerations from a statistical analysis of the base distribution and the number of homologous sequences (and their intramolecular position) suggest that there are at least two conformational factors common to yeast tRNA's solubilized in a medium of high ionic strength: an exposed anticodon region on the one hand and the 3'-terminal adenosine, which is apparently involved in a structure more expanded than that of the tRNA without 3'-terminal adenosine, on the other hand.

## INTRODUCTION

Les techniques analytiques ou préparatives utilisées dans le fractionnement des acides ribonucléiques de transfert (tRNA) mettant en oeuvre le principe de la séparation liquide-liquide en continu (chromatographie de partage) et en dis-

\* Dédié au Professeur DR. R. TSCHESCHE, Chemisches Institut, Bonn, B.R.D., pour son 65ème anniversaire.

\*\* Ce mémoire fait partie de la thèse de doctorat ès sciences de J.-P. GAREL, attaché de recherche au C.N.R.S.

\*\*\* Correspondance à Dr. J.-P. GAREL, Centre de Neurochimie du C.N.R.S., 11, rue Humann, 67-Strasbourg, France.

continu (distribution à contre-courant), se fondent toutes sur l'existence de coefficients de partage  $K$  différents pour des tRNA différents. Il existe certainement une relation entre le coefficient de partage et la structure des tRNA, mais sa nature est complexe et encore inconnue.

Nous appelons "système solvant salin" un système solvant caractérisé par une composante inorganique (sulfate, phosphate) et plusieurs composantes organiques (acide, amide, ou éther-alcool). Dans un "système solvant organique", les tRNA sont solubilisés sous la forme de sels d'ammonium quaternaire: système de ZACHAU *et al.*<sup>1</sup>, MUENCH ET BERG<sup>2</sup>, et KELMERS *et al.*<sup>3</sup>.

Dans divers systèmes solvants salins, WARNER ET VAIMBERG<sup>4</sup> et KIRBY<sup>5,6</sup> observaient que les fractions de RNA distribué par contre-courant étaient hétérogènes. Un enrichissement en AMP (ou A) et une diminution en GMP (ou G) et en CMP (ou C) s'accompagnent d'une augmentation du coefficient de partage. Dans une étude comparée plus approfondie sur les tRNA de levure de boulangerie, HOLLEY *et coll.*<sup>7,8</sup> mesurent les coefficients de partage des tRNA<sup>Ala</sup>, tRNA<sup>Tyr</sup> et tRNA<sup>Val</sup> et déterminent leur composition nucléotidique sur des fractions enrichies. Les compositions très voisines des deux derniers tRNA ne permettent pas d'expliquer l'écart de 1-10 de leur coefficient de partage. Ces auteurs avancent l'idée de la contribution de la séquence pour expliquer cette différence de comportement.

CANTONI *et coll.*<sup>9</sup> se fondent sur les  $R_F$  des tRNA de levure et de colibacille, fractionnés par chromatographie de partage sur colonne avec un système solvant organique, et font appel à la nature de la zone de l'anticodon plus ou moins riche en pyrimidines pour expliquer l'ordre d'éluion observé. Plus récemment, la relation éventuelle entre les propriétés codantes des tRNA et leur polarité responsable de leur mobilité chromatographique a fait l'objet d'une étude approfondie de WEHRLI ET STAEHELIN<sup>10</sup>. Ces auteurs constatent un parallélisme entre l'ordre d'éluion des tRNA de colibacille, de levure, et de foie de rat, fractionnés par chromatographie de partage sur colonne dans un système solvant organique, en présence de tampon phosphate 1.25 M pH 6.88 et la nature des codons commençant par la première base U, A, C, ou G.

GAREL ET MANDEL<sup>11</sup>, dans une étude sur les isothermes de partage des tRNA de levure, signalaient que l'apparition des tRNA dans la phase supérieure d'un système solvant salin évolue parallèlement à l'augmentation du rapport des bases A/G qu'ils chiffraient pour les tRNA<sup>Ala</sup>, tRNA<sup>Val</sup>, tRNA<sup>Ser</sup> et tRNA<sup>Phe</sup>. C'est cette relation que nous proposons d'étudier en détail, afin de mieux comprendre les lois du comportement des tRNA dans un système solvant à force ionique élevée.

Dans un système solvant  $S$ , à la température d'équilibre  $T$ , le coefficient de partage  $K$  d'un polynucléotide est relié à l'énergie libre  $\Delta F$  nécessaire pour transférer une mole du soluté de la phase stationnaire dans la phase mobile par la relation:

$$\log K = \Delta F_{(S,T)} \quad (1)$$

Le coefficient de partage  $K$  est alors fonction des cinq paramètres structuraux suivants: composition nucléotidique, séquence, masse ou longueur de chaîne, taux d'hélicité, et conformation. Pour des oligoribonucléotides simples, nous avons montré<sup>12</sup> que  $\log K$  était une fonction de la composition nucléotidique et de la longueur de chaîne. Les modifications séquentielles n'avaient pas d'effet mesurable sur  $K$ .

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

*Distribution à contre-courant*

Elle est effectuée avec un appareil EV-800 (Wright Scientific, Kenley, Grande-Bretagne) de 160 éléments de 3 ml de capacité pour chaque phase. Le distributeur est placé dans une salle dont la température est réglable à 0.5° près.

Le système solvant salin utilisé, décrit ailleurs<sup>11</sup>, est constitué par 1 200 ml de tampon phosphate de potassium 1.50 *M* pH 7.0, 400 ml de méthoxy-2 éthanol, et 380 ml de butoxy-2 éthanol. D'après nos conventions, c'est le système dit PMB (300:100:95) ou à 19.2 % de butoxy-2 éthanol. Il est choisi de telle façon que le coefficient de partage moyen des tRNA de levure soit voisin de l'unité, à la température de 10°.

Après l'équilibration des phases supérieure et inférieure à 10°, on pipette 3 ml de la phase inférieure stationnaire dans chaque élément du distributeur. La phase supérieure est stockée dans un réservoir qui alimente par un siphon l'élément de rang 0. Puis on dissout une quantité de tRNA (500–2 500 unités d'absorbance à 260 nm (UA<sub>260</sub>), S-RNS B, Boehringer, Mannheim, B.R.D.) dans 3 ml d'eau distillée qu'on porte à 1.50 *M* en tampon phosphate par addition de 228 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 486 mg de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Prolabo). On reconstitue avec cette solution saline le système solvant initial par addition de 1 ml de méthoxy-2 éthanol et 0.95 ml de butoxy-2 éthanol. On le répartit dans les deux premiers éléments du distributeur, en ajustant le volume de chacune des phases à 3 ml avec une solution fraîche. Les périodes d'agitation et de décantation sont fixées à 3 et à 4 min, respectivement. Lorsque le nombre de transferts effectués dépasse le nombre d'éléments du distributeur, les fractions de tête sont recueillies dans un collecteur à marche synchrone. Les absorbances de chacune des phases sont lues directement contre une solution de phase fraîche, à 260 et à 280 nm, dans des cuves de 1.00 cm de trajet optique.

Les trois autres systèmes solvants utilisés pour la distribution à contre-courant des tRNA de levure seront appelés: PIF ou tampon phosphate-isopropanol-formamide<sup>8, 13, 14</sup>; PEBD ou tampon phosphate-éthoxy-2 éthanol-butoxy-2 éthanol-N,N-dibutyl aminoéthanol<sup>15</sup>; SAFE ou sulfate d'ammonium-acétate-formaldéhyde-éthoxy-2 éthanol<sup>16</sup>.

*Extraction des tRNA*

Le contenu des éléments du distributeur est rassemblé par fraction de 5 ou de 10 éléments et numéroté dans le sens du déplacement de la phase supérieure mobile. On ajoute 5–10 ml de méthoxy-2 éthanol et on équilibre la nouvelle solution à –20°, de façon à faire passer la totalité des tRNA dans la phase organique qu'on extrait ensuite deux fois avec un volume d'éther diéthylique exempt de peroxydes. La phase aqueuse est dialysée pendant 24 h à 4° contre 100 volumes d'eau déminéralisée. Les fractions de tRNA sont ensuite lyophilisées et conservées au froid. Le rendement moyen est de 80 ± 5 %.

*Préparation des L-aminoacide-tRNA ligases [EC 6.1.1]*

Les conditions de préparation des enzymes d'acylation sont similaires à celles décrites ailleurs<sup>11</sup> pour le foie de rat. Les activités spécifiques des [<sup>14</sup>C]aminoacides provenant du C.E.A., Saclay, France, n'ont pas été diluées.

*Composition nucléotidique*

Nous avons adopté la méthode de dosage spectrophotométrique de EAST<sup>17</sup>. L'hydrolysate potassique de tRNA (4-5 UA<sub>260</sub>) est chromatographié sur une courte colonne (0.5 × 2 cm) de Dowex 50W-X4 (200-400 mesh, Paris-Labo, France) qui fournit les paires de nucléotides UMP + GMP et AMP + CMP. Chaque composante est alors dosée par voie spectrophotométrique à deux longueurs d'onde et à pH 1.0. La quantité en pmoles de chacun des nucléotides est calculée selon les relations suivantes que nous avons mises au point pour les tRNA, en tenant compte de la présence de 15 % de  $\psi$ MP élué avec l'UMP:

$$\text{UMP} = 0.275 A_{275} - 0.350 A_{285} \quad (2)$$

$$\text{GMP} = 0.190 A_{285} - 0.044 A_{275} \quad (3)$$

$$\text{AMP} = 0.078 B_{257} - 0.035 B_{280} \quad (4)$$

$$\text{CMP} = 0.087 B_{280} - 0.018 B_{257} \quad (5)$$

où  $A$  et  $B$  représentent les absorbances aux longueurs d'onde indiquées en indice (nm) du volume total de chaque éluat, lu à pH 1.0, avec un spectrophotomètre Zeiss PMQ II.

*Calcul du coefficient de partage*

Le coefficient de partage  $K$  d'une fraction distribuée à contre-courant qui apparaît au niveau de l'élément de rang  $r$  après  $n$  transferts pour un distributeur possédant  $t$  éléments, est donné par les relations:

$$K = \frac{r}{n-r} \quad \text{quand } r \leq t \quad (6)$$

$$K = \frac{t}{n-r} \quad \text{quand } r \geq t \quad (7)$$

En général, les profils d'absorbance ou de radioactivité des tRNA distribués à contre-courant décrits dans la littérature sont assez explicites pour éviter toute ambiguïté.

*Étude statistique de la distribution des bases*

Cette étude a été réalisée par J. L. CHASSE du Laboratoire de Biométrie de l'Université Claude Bernard de Lyon, sur un ordinateur Wang 700.

L'examen de la distribution des bases (A, G, C et U) dans un tRNA est fondé sur l'hypothèse ( $H_0$ ) d'un arrangement aléatoire des quatre bases. Pour tester cette hypothèse, le premier critère retenu est d'étudier la distribution globale des différentes bases. Un second critère plus élaboré consiste à étudier, à l'intérieur de la chaîne d'un tRNA, la distribution des séquences identiques de longueur  $i$  pour chacune des quatre bases. Selon l'hypothèse ( $H_0$ ), la probabilité de voisinage d'une base avec une autre est indépendante de la nature des bases considérées. Il est alors possible d'étudier, de façon théorique, la distribution des séquences identiques de différentes longueurs selon MOOD<sup>18</sup>. L'étude a été faite en négligeant le groupement terminal commun, CCA.

Pour une base quelconque, G par exemple, nous noterons (voir Tableau II):

$r_i$  = nombre de séquences de longueur  $i$  dans un tRNA

$n_1 = n_G$  = nombre de G dans ce tRNA

$n_2 = n_X$  = nombre de bases autres que G dans le tRNA

$n = n_1 + n_2$  = nombre total de bases dans le tRNA(-CCA)

$$x^{(a)} = x(x-1)(x-2)\dots(x-a+1) \quad (8)$$

Si  $H_0$  est vraie, l'espérance mathématique du nombre de séquences de longueur  $i$ , pour la base G, est donnée par la relation:

$$E(r_i) = \frac{(n_2 + 1)^{(2)} n_1^{(i)}}{n^{(i+1)}} \quad (9)$$

et le nombre total de séquences:

$$r_i = \frac{(n_2 + 1)n_1}{n} \quad (10)$$

Outre la distribution des bases, il est possible d'étudier leur répartition dans la molécule de tRNA. Celle-ci a été divisée en quatre régions: dihydrouridine, anticodon, bras supplémentaire, et T $\psi$ C. Nous avons alors testé (test binomial) l'hypothèse que les fréquences des bases puriques A et G soient les mêmes dans chacune de ces quatre régions prises isolément que celles observées pour l'ensemble de la molécule (voir Tableau III).

## RÉSULTATS

### Données structurales

Les tRNA étudiées proviennent tous des levures de boulangerie et de brasserie (*Saccharomyces cerevisiae*) et de l'espèce *Torula utilis*. Les séquences de ces tRNA, que nous n'avons pas reproduites ici, sont assez différentes. En termes de A, G, et Py, on dénombre cependant 24 positions homologues, y compris le triplet 3'-terminal: 4A, 4G et 16 Py.

Le Tableau I rassemble quelques données structurales pour treize tRNA dont la séquence est connue actuellement. Nous n'avons pas tenu compte de la séquence du tRNA<sub>3</sub><sup>Leu</sup> "renaturable"<sup>19,20</sup>, car il est *a priori* difficile de l'identifier à l'une des espèces isoacceptrices des tRNA<sup>Leu</sup> distribuées par contre-courant selon DIRHEIMER ET EBEL<sup>13</sup>. Ces tRNA se différencient nettement par leur composition en bases. Le rapport purines/pyrimidines (Pu/Py) fluctue de 0.88 pour le tRNA<sup>Val</sup> à 1.11 pour le tRNA<sup>Phe</sup> tandis que le taux relatif de A et de G, exprimé par le rapport A/A + G, passe de 22 % pour le tRNA<sup>Ala</sup> à 46 % pour le tRNA<sup>Trp</sup>. On constate que les longueurs de chaîne sont très voisines ( $77 \pm 2$  nucléotides), sauf pour les tRNA<sup>Ser</sup> qui sont 10 % plus longs que les autres. Il en est de même pour le taux d'hélicité; si l'on considère la structure secondaire en feuille de trèfle, celui-ci varie autour de  $54 \pm 3$  %. Toutefois, la nature interne des appariements de bases fait apparaître une prépondérance des paires G-C qui n'est pas directement proportionnelle au taux de G et C dans la molécule entière. Le taux de G-C par rapport à

TABLEAU I

QUELQUES DONNÉES STRUCTURALES POUR TREIZE tRNA

tRNA	Espèce	Réf.	A	G	C	U+D $\psi$	I	T	N	Total	Bases rares		Pu Py	A A+G (%)	A Py (%)	Hélicité (%)	G-C (%)
											Rég. anticodon	Totales					
Ala	Boul.	21	8	28	23	14	2	1		78 <sup>a</sup>	1	3	0.95	22	21	51	85
Arg <sub>3</sub>	Bras.	23	16	21	21	12	3	1	U	75 <sup>b</sup>	2	6	0.97	43.2	42.1	56	62
			16	20	20	14	3	1	U	75 <sup>b</sup>	2	6	0.97	44.5	41.0	56	57
Asp	Bras.	24	13	24	19	15	3	1		75	1	2	0.97	35	34	53	65
Ile	<i>T. utilis</i>	25	15	22	21	14	2	1	1	77	1	4	1.02	40.5	40	52	70
Lys <sub>1</sub>	Boul.	26	15	21	18	15	5	1	1	76	2	6	0.90	41.7	37.5	55	57
Phe	Boul.	27	18	22	18	14	2	1	1	76	4	9	1.11	45	50	55	57
Ser <sub>2a</sub>	Bras.	28	18	25	20	17	3	1	1	85 <sup>c</sup>	1	6	1.07	42	45	57	62
Ser <sub>2b</sub>	Bras.	28	16	27	19	18	3	1	1	85 <sup>c</sup>	1	6	1.07	37	39.5	57	62
Trp	Bras.	29	17	20	18	14	5	1		75	2	7	0.95	46	43.5	53	65
Tyr	Boul.	30	17	23	21	13	3	1		78	1	6	1.05	42.5	44.5	51	75
Tyr	<i>T. utilis</i>	31	18	22	21	12	4	1	1	78	1	6	1.05	45	47.2	51	75
Val <sub>2</sub>	Bras.	32	15	20	21	15	4	1	1	77 <sup>d</sup>	0	3	0.88	43	37.8	52	60
Val <sub>1</sub>	<i>T. utilis</i>	34	15	19	21	14	4	1	1	75	0	3	0.88	44	37.8	53	60

<sup>a</sup> Séquence revue par MERRILL<sup>22</sup>.<sup>b</sup> Microhétérogénéité dans la séquence du tRNA<sub>3</sub>Arg.<sup>c</sup> Ser<sub>2a</sub> = Ser<sub>1</sub> et Ser<sub>2b</sub> = Ser<sub>11</sub> de ZACHAU *et al.*<sup>28</sup>.<sup>d</sup> Analogue à la séquence corrigée du tRNA<sub>1</sub>Val de levure de boulangerie décrite par BAYEV *et al.*<sup>33</sup>.

l'ensemble des bases appariées varie de 57 % pour les tRNA<sup>Phe</sup>, tRNA<sub>3</sub><sup>Arg</sup> et tRNA<sub>1</sub><sup>Lys</sup> à 85 % pour le tRNA<sup>Ala</sup>.

On doit aussi prendre en considération le nombre et surtout la nature et la répartition des bases alkylées et des nucléosides O'-méthylés. Ces composés exercent un effet lipophile ou hydrophobe non négligeable sur le coefficient de partage qui aura tendance à augmenter si la région contenant telle ou telle base alkylée est exposée. On remarque ainsi que quatre résidus lipophiles sur neuf se situent dans la région de l'anticodon du tRNA<sup>Phe</sup>; pour le tRNA<sup>Asp</sup>, on en retrouve un sur deux et aucun sur les trois pour le tRNA<sup>Val</sup>.

Le Tableau II représente les répartitions des séquences de bases identiques observées (ligne supérieure) et théoriques (ligne inférieure), en négligeant le trinucéotide 3'-terminal. L'hypothèse d'une distribution aléatoire des bases est acceptable (test  $X^2$ ) pour la grande majorité des tRNA de levure, sauf pour le tRNA<sup>Ala</sup> qui présente un excès de G et une déficience marquée de A. Pour la distribution des chaînons de séquences identiques, l'hypothèse ( $H_0$ ) est valable sauf pour les tRNA suivants caractérisés par des regroupements de A: tRNA<sup>Ser</sup>, tRNA<sup>Trp</sup> de levure de brasserie et tRNA<sup>Tyr</sup> de l'espèce *Torula*. Dans les tRNA<sup>Ser</sup>, on trouve encore des regroupements significatifs de U. On peut déjà conclure en affirmant que l'adénine est toujours directement concernée quand il y a un écart entre les distributions observées et théoriques.

Le Tableau III fait état de la répartition des bases pures dans les bras et boucles attenantes pour treize tRNA de levure. Les écarts significatifs dans la distribution de ces bases par région par rapport à leur distribution moyenne dans l'ensemble de la molécule apparaissent toujours dans la région de l'anticodon, caractérisée soit par un excès de G (tRNA<sup>Asp</sup>), soit au contraire par un excès de A (tRNA<sub>3</sub><sup>Arg</sup>, tRNA<sup>Ser</sup>, tRNA<sup>Trp</sup>, et tRNA<sup>Tyr</sup>).

#### *Distribution à contre-courant*

La Fig. 1 représente les profils d'absorbance de tRNA de levure de boulangerie, distribués par contre-courant dans divers systèmes solvants salins du type PMB renfermant une teneur variable en butoxy-2 éthanol. Le coefficient de partage moyen évolue conformément à la relation empirique proposée par GAREL ET MANDEL<sup>11</sup>. La Fig. 2 illustre un fractionnement optimal de tRNA de levure de boulangerie dans le système PMB à 19.2 % de butoxy-2 éthanol, à 10° sur 142 transferts, en présence de MgCl<sub>2</sub> 1 mM. La fraction dotée de l'activité acceptrice maximale, indiquée sur la Fig. 2, est utilisée pour le calcul du coefficient de partage selon la formule 6. Ce mode de calcul a été appliqué aux tRNA distribués dans d'autres systèmes solvants salins. Les données sont rapportées dans le Tableau IV.

#### *Loi de comportement des tRNA*

Le Tableau V rassemble quelques données sur les compositions en bases de cinq fractions de tRNA distribué par contre-courant dans les conditions de la Fig. 2 (système solvant PMB + Mg<sup>2+</sup>). Conformément à nos observations antérieures sur les oligoribonucléotides<sup>12</sup>, les tRNA hydrophiles (à faible coefficient de partage) sont caractérisés par une faible teneur en A et un taux important de G; c'est l'inverse pour les tRNA lipophiles (à coefficient de partage élevé). L'augmentation du coefficient de partage s'accompagne d'une augmentation de la proportion relative

TABLEAU II

DISTRIBUTION OBSERVÉE ET THÉORIQUE DES SÉQUENCES DE BASES IDENTIQUES POUR DES tRNA  
La ligne supérieure représente la distribution observée, la ligne inférieure la distribution théorique

tRNA	Espèce	A					G				
		$n_A$	$r_1$	$r_2$	$r_3$	$r_{>3}$	$n_G$	$r_1$	$r_2$	$r_3$	$r_{>3}$
Ala <sup>a</sup>	Boul.	7	7	0	0	0	30	12	6	2	0
			5.92	0.49	0.03	0.001		11.19	4.44	1.73	1.0
Arg <sub>3</sub>	Brass.	15	7	4	0	0	21	14	2	1	0
			9.37	1.87	0.35	0.07		10.89	3.11	0.86	0.2
Asp	Brass.	12	6	3	0	0	24	13	2	1	1
			8.59	1.35	0.20	0.03		11.04	3.63	1.16	0.5
Ile <sup>b</sup>	<i>T. utilis</i>	14	10	2	0	0	23	10	5	1	0
			9.48	1.71	0.29	0.05		11.29	3.45	1.02	0.4
Lys <sub>1</sub>	Boul.	14	9	1	1	0	21	11	3	0	1
			9.37	1.74	0.3	0.06		10.89	3.11	0.86	0.2
Phe <sup>b</sup>	Boul.	17	13	2	0	0	22	13	3	1	0
			10.24	2.34	0.51	0.13		10.97	3.29	0.95	0.3
Ser <sub>2a</sub>	Brass.	17	4	2	3	0	26	11	6	1	0
			10.98	2.20	0.42	0.09		12.49	3.90	1.19	0.4
Ser <sub>2b</sub>	Brass.	15	5	2	2	0	28	13	6	1	0
			10.29	1.80	0.30	0.05		12.52	4.23	1.34	0.6
Trp	Brass.	16	5	4	1	0	20	8	6	0	0
			10.06	2.13	0.42	0.10		10.89	2.91	0.75	0.2
Tyr	Boul.	16	7	3	1	0	23	11	3	2	0
			10.20	2.10	0.41	0.09		11.42	3.44	1.00	0.3
Tyr	<i>T. utilis</i>	17	6	4	1	0	22	11	4	1	0
			10.48	2.30	0.48	0.11		11.34	3.26	0.91	0.3
Val <sub>2</sub>	Brass.	14	9	1	1	0	21	10	4	1	0
			9.18	1.71	0.29	0.05		11.13	3.09	0.83	0.2
Val <sub>1</sub>	<i>T. utilis</i>	14	9	1	1	0	20	9	4	1	0
			9.37	1.74	0.30	0.06		10.78	2.93	0.76	0.2

<sup>a</sup> Distribution non aléatoire des bases dans le tRNA<sup>Ala</sup>.

<sup>b</sup> Il n'a pas été tenu compte de la base purique anormale (Y pour le tRNA<sup>Phe</sup> et N<sup>+</sup> pour le tRNA<sup>Ile</sup>) adjacente en 3' à l'anticodon pour la distribution des bases puriques.

des nucléotides adényliques (A/A + G) et du rapport des nucléotides puriques et pyrimidiques (Pu/Py). Le rapport G + C/A + U diminue nettement. Cette corrélation est exprimée graphiquement par les diagrammes semi-logarithmiques des Figs. 3-5 qui représentent la relation linéaire entre le logarithme du coefficient de partage ( $\log K$ ) et la composition en bases du tRNA global.

Pour les quatre types de systèmes solvants salins (S) étudiés (PMB<sup>11</sup>, PIF<sup>8, 13, 14</sup>, PEBD<sup>15</sup>, et SAFE<sup>10</sup>) à la température (T), on peut écrire la relation fondamentale suivante:

$$\log K_{(S,T)} = c(A/A + G) (Pu/Py) + d \quad (11)$$

En négligeant la présence de l'inosine, cette relation se simplifie:

$$\log K_{(S,T)} = c(A/Py) + d \quad (12)$$

$c$  et  $d$  sont des constantes propres à chaque système solvant.

Cette formulation n'est valable que pour un nombre total de nucléotides constant, ce qui est pratiquement le cas pour la famille des tRNA. Comme nous le



LEVURE

(voir MÉTHODES).

$K$					$U, \psi, T$					$Total$
	$r_1$	$r_2$	$r_3$	$r_{>3}$	$nU$	$r_1$	$r_2$	$r_3$	$r_{>3}$	$n$
12	3	1	0	0	17	11	3	0	0	75 <sup>a</sup>
11.24	3.08	0.81	0.27	0	17	10.48	2.30	0.48	0.11	72
14	0	0	1 (5)	0	17	11	3	0	0	72
10.64	2.73	0.67	0.26	0	19	10.24	2.34	0.51	0.13	72
9	2	0	1 (4)	0	19	10	3	1	0	72
10.24	2.34	0.51	0.13	0	17	10.64	2.73	0.67	0.21	74 <sup>b</sup>
7	3	2	0	0	17	9	4	0	0	74 <sup>b</sup>
10.83	2.40	0.65	0.19	0	21	10.60	2.31	0.69	0.12	72
7	4	0	1 (5)	0	21	7	5	0	1 (4)	72
9.99	2.14	0.43	0.10	0	17	10.89	3.11	0.86	0.28	72 <sup>b</sup>
10	3	0	0	0	17	8	3	1	0	72 <sup>b</sup>
9.99	2.14	0.43	0.10	0	21	10.24	2.34	0.51	0.13	82
11	2	1	0	0	21	7	5	0	1 (4)	82
11.27	2.40	0.48	0.11	0	22	11.96	2.99	0.72	0.21	82
10	2	1	0	0	22	5	5	1	1 (4)	82
10.98	2.20	0.42	0.08	0	20	12.12	3.18	0.81	0.25	73
9	4	0	0	0	20	9	4	1	0	73
10.32	2.33	0.50	0.12	0	17	10.89	2.91	0.75	0.24	75
12	1	1	1 (5)	0	17	8	3	1	0	75
10.93	2.69	0.64	0.18	0	17	10.48	2.30	0.48	0.11	75
12	1	1	1 (5)	0	17	10	2	1	0	75
10.93	2.69	0.64	0.18	0	20	10.48	2.30	0.48	0.11	74
13	1	0	1 (4)	0	20	11	3	1	0	74
10.83	2.71	0.65	0.19	0	19	10.99	2.90	0.73	0.23	72
12	1	0	1 (5)	0	19	10	3	1	0	72
10.75	2.73	0.67	0.20	0	19	10.64	2.73	0.67	0.20	72

montrons ailleurs<sup>12</sup>, les contributions individuelles des nucléotides pyrimidiques C et U sont identiques. Il n'est donc pas nécessaire de les différencier dans les relations précédentes. Les comportements des hUMP et  $\psi$ MP dans le système solvant PMB ne sont pas très différents de celui de l'UMP. On peut donc traiter ces composés avec l'ensemble des CMP et UMP. Le coefficient de partage de l'IMP se rapproche davantage de celui du GMP que de celui toujours élevé de l'AMP<sup>30</sup>. On pourra, si nécessaire pour le calcul, assimiler I à G.

Les pentes  $c$  des droites des Fig. 3-5 sont voisines, quelle que soit la nature, et la composition des systèmes solvants salins. Ceci indique que ces quatre systèmes solvants appartiennent à une même famille qui influence de manière similaire la structure polynucléotidique des tRNA. Ces droites passent par le point représentatif du tRNA<sup>Ala</sup>. Elles ne rendent pas compte apparemment des points représentatifs des tRNA<sup>Asp</sup> et tRNA<sup>Val</sup> dont les coefficients de partage sont anormalement faibles. Ce dernier constitue une exception dans tous les systèmes solvants. Son coefficient de partage est 2-4 fois plus petit que la valeur attendue, fondée sur sa composition en bases globales.

TABLEAU III

RÉPARTITION DES BASES PURIQUES DANS DIVERSES RÉGIONS DE LA MOLÉCULE DES tRNA DE LEVURE

Les valeurs en caractères mi-grasses correspondent aux écarts significatifs par rapport à la distribution dans l'ensemble de la molécule. Voir légende Tableau II.

tRNA	Espèce	DihydroU		Anticodon		Supplément		T, $\psi$ ,C		Nombre total moins CCA		
		A	G	A	G	A	G	A	G	A	G	n
Ala	Boul.	2 1.68	8 7.20	1 1.59	7 6.80	1 0.47	2 2.00	2 1.59	5 6.80	7	30	75
Arg <sub>3</sub>	Brass.	4 3.12	5 4.37	5 3.54	2 4.96	2 1.04	1 1.46	3 3.54	4 4.96	15	21	72
Asp	Brass.	5 2.67	4 5.33	0 2.83	7 5.67	2 0.67	1 1.33	2 2.83	5 5.67	12	24	72
Ile	<i>T. utilis</i>	3 3.45	6 5.28	4 3.45	5 5.28	2 1.01	1 1.55	3 3.45	4 5.28	15	23	74
Lys <sub>1</sub>	Boul.	3 3.11	6 4.67	4 3.30	3 4.96	1 0.92	0 1.46	2 3.30	6 4.96	14	21	72+
Phe	Boul.	3 3.78	7 4.89	5 4.01	4 5.19	1 1.18	2 1.53	3 4.01	4 5.19	17	22	72
Ser <sub>2a</sub>	Brass.	3 3.32	7 5.07	7 3.52	3 5.39	0 2.90	5 4.44	4 3.52	4 5.39	17	26	82
Ser <sub>2b</sub>	Brass.	3 2.93	7 5.03	7 3.11	3 5.34	0 2.56	5 4.40	2 3.11	6 5.34	15	28	82
Trp	Brass.	4 3.51	5 4.38	6 3.73	2 4.66	0 1.32	3 1.64	3 3.29	4 4.11	16	20	72
Tyr	Boul.	4 3.84	6 5.52	6 3.63	3 5.21	2 1.07	1 1.53	1 3.63	6 5.21	16	23	75
Tyr	<i>T. utilis</i>	4 4.08	6 5.28	6 3.85	3 4.99	2 1.13	0 1.47	2 3.85	6 4.99	17	22	75
Val <sub>2</sub>	Brass.	2 3.21	6 4.82	4 3.21	3 4.82	1 0.76	0 1.13	2 3.21	5 4.82	14	21	74
Val <sub>1</sub>	<i>T. utilis</i>	2 3.30	6 4.72	4 3.30	4 4.72	1 0.58	0 0.83	2 3.30	5 4.72	14	20	72

## DISCUSSION

Parmi les cinq facteurs ou paramètres structuraux définis précédemment le Tableau I montre que la masse et le taux d'hélicité sont très voisins pour les tRNA de levure. Quelles que soient leurs contributions, en valeur absolue sur le coefficient de partage, on admettra qu'elles sont identiques ou non significativement différentes pour tous les tRNA. De plus, un certain nombre de considérations physico-chimiques nous autorisent à admettre que la conformation générale des tRNA de levure dans un système solvant salin est compacte. Les tRNA étudiés *in vitro* en milieu de force ionique élevée (1 M Na<sup>+</sup> ou K<sup>+</sup> par exemple) acquièrent une rigidité conformationnelle comparable à celle qui peut exister *in vivo*, en présence d'ions Mg<sup>2+</sup> à faible concentration 5 mM<sup>37,38</sup>. Par dilution isotopique de <sup>32</sup>PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>, nous avons estimé<sup>39</sup> la molarité réelle du phosphate dans chaque phase du système solvant salin PMB. Dans les conditions de la distribution à contre-courant de la Fig. 2 ou 3, la molarité est voisine de 2.5 M dans la phase inférieure et de 0.21 M dans la phase supérieure. En outre, HANLON ET MAJOR<sup>39</sup> ont montré que l'acide polyadénylique en solution dans du polyéthylène glycol légèrement acidifié conserve

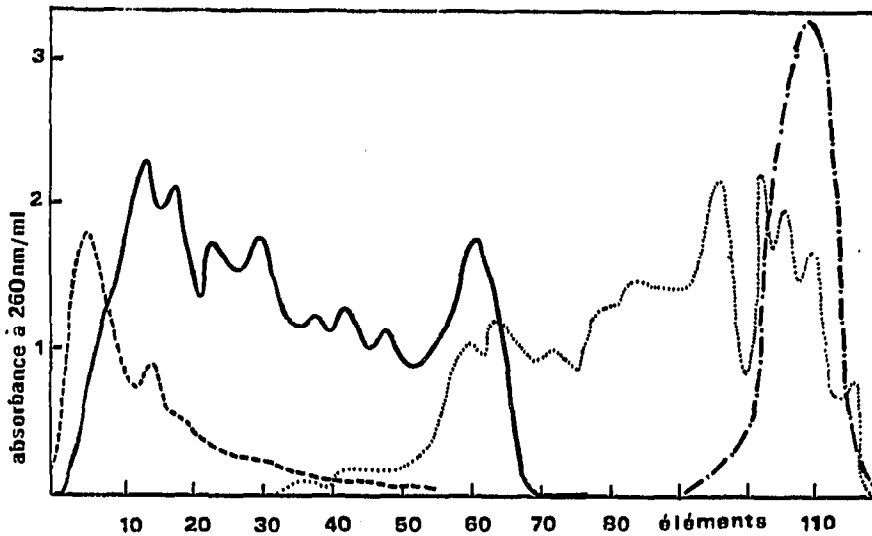


Fig. 1. Distribution à contre-courant de tRNA de levure de boulangerie dans le système solvant salin PMB sur 120 transferts. - - - - , 10°, 23.8% de BuO, pH 7.0; —, 10° 15.3% de BuO, pH 8.0; . . . . ., 10°, 17.5% de BuO, pH 7.0; —. —. —, 10°, 12.5% de BuO, pH 7.0. La valeur indiquée de l'absorbance, quel que soit l'emplacement de l'élément du distributeur, est proportionnelle à la quantité totale de tRNA contenu dans cet élément (phases inférieure et supérieure réunies). 75–150 UA<sub>260</sub> de tRNA sont dissous dans 3.0 ml d'eau distillée qu'on porte à 1.50 M, pH 7.0 (ou pH 8.0) en tampon phosphate par addition de 228 mg (ou 54 mg) de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 486 mg (ou 720 mg) de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Prolabo). On ajoute ensuite 1 ml de méthoxy-2 éthanol et un volume adéquat de butoxy-2 éthanol pour réaliser les systèmes PMB indiqués (12.5–23.8%). Ce système solvant est équilibré à 10°, puis réparti dans les deux premiers éléments du distributeur (EV-800 Wright Scientific, Grande-Bretagne). Le volume de chacune des phases est ajusté à 3 ml avec une solution fraîche. Après les 120 transferts (périodes d'agitation et de décantation fixées à 3 et 4 min, respectivement), on ajoute 1.0 ml de méthoxy-2 éthanol par élément; on agite 5 min et après une décantation simple, on prélève une fraction aliquote de la seule phase supérieure pour mesurer son absorbance.

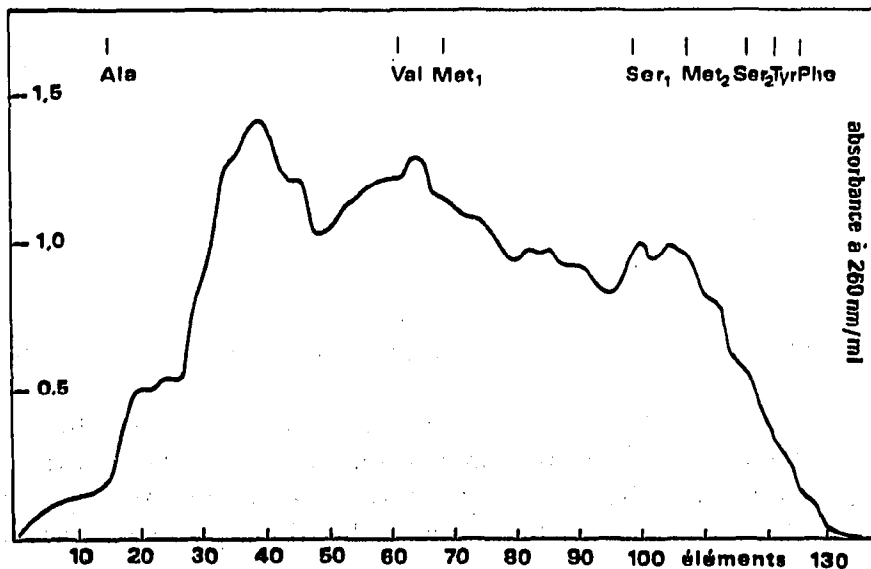


Fig. 2. Distribution à contre-courant de tRNA de levure de boulangerie (600 UA<sub>260</sub>) dans le système PMB (19.2% de BuO, 10°, 142 transferts) en présence de Mg<sup>2+</sup> 1 mM (voir MÉTHODES). L'emplacement de la concentration maximale de six tRNA est indiqué en haut de la figure.

TABLEAU IV

COEFFICIENTS DE PARTAGE DE tRNA FRACTIONNÉS PAR DISTRIBUTION À CONTRE-COURANT DANS DIVERS SYSTÈMES SOLVANTS SALINS

Les valeurs des coefficients de partage ont été calculées au moyen des formules 6 et 7. Les systèmes solvants salins utilisés sont constitués par du tampon phosphate-isopropanol-formamide (PIF)<sup>8,13,14</sup>; tampon phosphate-éthoxy-2 éthanol-butoxy-2 éthanol-N,N-dibutyl aminoéthanol (PEBD)<sup>15</sup>; sulfate d'ammonium-acétate-formaldéhyde-éthoxy-2 éthanol (SAFE)<sup>10</sup>; tampon phosphate-méthoxy-2 éthanol-butoxy-2 éthanol (PMB)<sup>11</sup>.

RNA	PIF <sup>13</sup>	PIF <sup>8</sup>	PIF <sup>14</sup>	PEBD <sup>15</sup>	SAFE <sup>10</sup>	PMB + Mg <sup>2+</sup> 11
Ala	0.23	0.21	0.13	0.064	0.08	0.118
Arg <sub>1</sub>	0.48					
Arg <sub>2</sub>	0.76					
Arg <sub>3</sub>	1.31					
Asp	0.31					
Glu <sub>1</sub>	0.49					
Glu <sub>2</sub>	0.64					
Glu <sub>3</sub>	1.06					
Gly <sub>1</sub>	0.43					
Gly <sub>2</sub>	0.86					
Gly <sub>3</sub>	1.47					
His <sub>1</sub>	0.72	1.50		0.77		
Ile <sub>1</sub>	0.62					
Ile <sub>2</sub>	1.08					
Leu <sub>1</sub>	0.53					
Leu <sub>2</sub>	0.80					
Leu <sub>3</sub>	1.25					
Leu <sub>4</sub>	2.50					
Lys <sub>1</sub>	1.08		2.05			
Lys <sub>2</sub>	1.78					
Met <sub>1</sub>	0.57					
Met <sub>2</sub>	1.19					0.89
Met <sub>3</sub>	1.78					2.74
Phe	4.16					7.80
Pro	0.37					
Ser <sub>1</sub>	1.30					2.21
Ser <sub>2</sub>	2.08				1.55	4.45
Thr <sub>1</sub>	0.57		0.57	0.29		
Thr <sub>2</sub>	0.69				0.88	
Trp	1.78		2.06	1.48		
Tyr	3.12	8.80	4.78	2.45	3.00	6.10
Val <sub>1</sub> <sup>a</sup>	0.34					
Val <sub>2</sub> <sup>a</sup>	0.55	0.57		0.15	0.13	0.72
Val <sub>3</sub> <sup>a</sup>	0.72					

<sup>a</sup> Valeurs confirmées par BONNET *et al.*<sup>35</sup>.

sa structure secondaire. Il y a donc tout lieu de penser que, dans les systèmes solvants salins à pH neutre ou acide, les tRNA ont une conformation compacte et non dénaturée.

Les écarts observés pour les tRNA<sup>ASP</sup> et tRNA<sup>VAL</sup> et, dans une plus faible mesure, pour tRNA<sup>TYR</sup>, seront attribués aux deux autres paramètres structuraux: composition nucléotidique et surtout répartition topographique des bases, y compris les bases alkylées, dans les régions externes de la macromolécule en contact avec le solvant.

La relation générale 12 implique que tous les nucléotides contribuent à la valeur de *K* et que, par conséquent, ils sont tous accessibles au milieu solvant. Or

TABLEAU V

COMPOSITION NUCLÉOTIDIQUE DES FRACTIONS DE tRNA DE LEVURE DISTRIBUÉES PAR CONTRE-COURANT DANS LE SYSTÈME SOLVANT PMB +  $Mg^{2+}$ 

Conditions sont indiquées dans la Fig. 2.

Fraction No (élément)	C (%)	A (%)	G (%)	U+ $\psi$ (%)	A/A+G (%)	Pu/Py	A/Py (%)	G+C/A+U
25	28.0	14.9	34.6	22.5	30.0	0.98	29.4	1.67
65	26.7	17.0	34.5	21.8	33.0	1.06	35.0	1.58
95	26.5	19.0	33.7	20.7	36.0	1.11	40.0	1.51
105	25.8	20.8	32.6	20.8	39.0	1.14	44.6	1.40
125	27.5	22.5	30.7	19.3	42.3	1.18	48.0	1.39
tRNA brut	27.6	19.1	31.9	21.5	37.4	1.04	38.8	1.53

les tRNA possèdent une structure tridimensionnelle compacte. Certains segments caténaux sont repliés à l'intérieur de la macromolécule et ne sont plus accessibles. En toute rigueur, leurs nucléotides ne doivent pas être pris en considération dans le calcul du coefficient de partage, à moins que la distribution des bases de l'ensemble de la molécule ne soit pas statistiquement différente de la distribution des bases exposées. Il peut être nécessaire de distinguer entre un *coefficient de partage théorique* correspondant à un tRNA imaginaire (plan par exemple) dont toutes les bases seraient accessibles, et un *coefficient de partage réel* correspondant aux bases, appariées ou libres, des zones accessibles au solvant.

Le Tableau III montre que la répartition des bases puriques dans les régions dihydrouridine, bras supplémentaire et T $\psi$ C est en général voisine de la fréquence

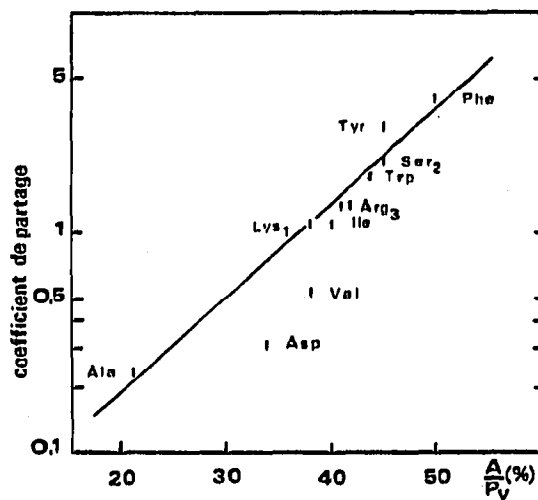
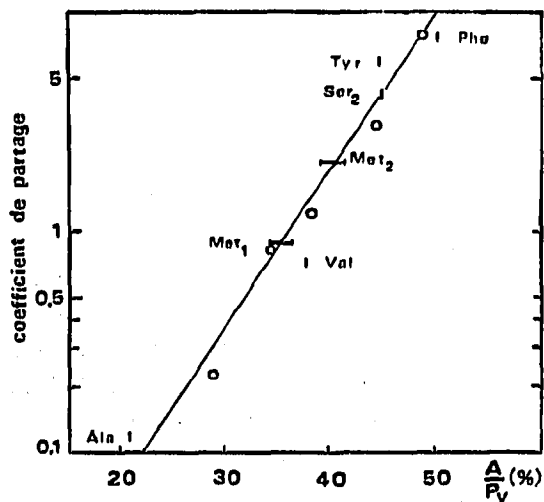


Fig. 3. Diagramme semi-logarithmique donnant la variation de  $K$  en fonction de la composition nucléotidique totale des tRNA fractionnés par distribution à contre-courant dans le système PMB contenant 1 mM  $Mg^{2+}$  et 19.3% de butoxy-2 éthanol (10°, et 142 transferts). (Voir Fig. 2.) —, tRNA de séquence connue; —, tRNA de structure inconnue; O, composition nucléotidique de la fraction correspondante (Tableau V). Cf. Tableau IV.

Fig. 4. Diagramme semi-logarithmique donnant la variation de  $K$  en fonction de la composition nucléotidique des tRNA de levure fractionnés par distribution à contre-courant dans le système solvant PIF selon DIRHEIMER ET EBEL<sup>13</sup> (Cf. Tableau IV).

observée pour l'ensemble de la molécule de tRNA. Ceci signifie que le coefficient de partage réel ou expérimentalement mesuré reflète une répartition des bases dans les zones accessibles au solvant identique à celle de la molécule toute entière. Toutefois, cette répartition est différente dans la région de l'anticodon pour les tRNA<sup>Arg</sup>, tRNA<sup>Asp</sup>, tRNA<sup>Ser</sup>, tRNA<sup>Trp</sup>, et tRNA<sup>Tyr</sup>. Elle peut alors modifier la valeur du coefficient de partage dans la mesure où cette région est exposée. Dans ces conditions, il devient possible d'interpréter l'écart entre coefficient de partage réel et théorique en termes de conformation.

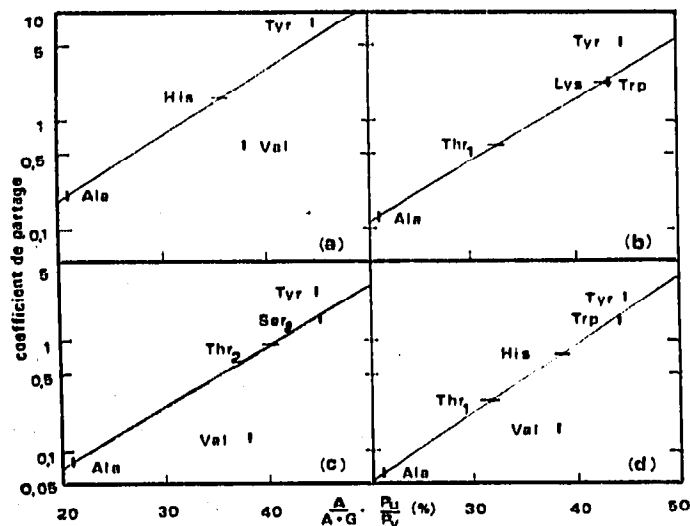


Fig. 5. Diagrammes semi-logarithmiques des tRNA de levure fractionnés par distribution à contre-courant dans divers systèmes solvants salins. (a) Système PIF<sup>9</sup>. (b) Système PIF<sup>14</sup>. (c) Système SAFE<sup>10</sup>. (d) Système PEBD<sup>16</sup>.

À la distribution parfois anormale des bases dans certaines zones exposées de la molécule de tRNA vient se superposer l'effet lipophile des bases modifiées. Les tRNA<sup>Asp</sup> et tRNA<sup>Val</sup> se caractérisent par un déficit important des composés hydrophobes, localisés plus particulièrement dans la région de l'anticodon. La Met<sub>1</sub> G, adjacente en 3' à l'anticodon du tRNA<sup>Asp</sup>, ne peut guère contribuer à augmenter le coefficient de partage comme le font les résidus A intacts ou N<sup>0</sup>-alkylés très lipophiles qu'on trouve dans les autres tRNA. En outre, la distribution des bases puriques dans la région de l'anticodon du tRNA<sup>Asp</sup> fait apparaître une complète absence de A. Il n'est donc pas étonnant de constater que le comportement de ce tRNA dans le système solvant salin PIF correspond à un coefficient de partage anormalement faible.

Le cas du tRNA<sup>Val</sup> peut être expliqué de manière semblable. L'hypothèse de HOLLEY *et al.*<sup>7</sup> qui faisaient appel à des séquences différentes pour différencier les coefficients de partage des tRNA<sup>Tyr</sup> et tRNA<sup>Val</sup>, aux compositions en bases assez voisines, ne semble pas devoir être retenue. Il est évident que les séquences sont différentes bien qu'elles possèdent 45 % environ d'homologies. Les systèmes solvants salins ne sont pas sensibles à des modifications séquentielles<sup>12</sup>. Par contre, il paraît plus important de relever le fait que, de tous les tRNA de levure connus actuellement, le tRNA<sup>Val</sup> possède une région de l'anticodon dépourvue de tout

caractère lipophile. Or, des travaux récents<sup>40</sup> ont montré que cette zone était accessible à des réactifs chimiques. La situation est très différente pour le tRNA<sup>Tyr</sup>. La région de son anticodon (bras hélicoïdal et boucle) est caractérisée par des regroupements adényliques AA dans le bras et AAA dans la boucle qui renferme en outre un chaînon isopentényle très lipophile. Cette différence dans la répartition des bases puriques explique l'accroissement du coefficient de partage du tRNA<sup>Tyr</sup> par rapport au tRNA<sup>Val</sup>.

L'absence ou la présence d'une base rare très lipophile adjacente en 3' à l'anticodon influe directement sur le coefficient de partage des tRNA et, par conséquent, leur mobilité chromatographique. THIEBE ET ZACHAU<sup>41</sup> ont séparé facilement, par distribution à contre-courant dans un système solvant organique, deux tRNA<sup>Phe</sup> qui diffèrent par l'absence (espèce I ou HCl), ou la présence (espèce II) de la base Y<sup>+</sup> (ref. 42), identifiée par l'équipe de WEINSTEIN *et coll.*<sup>43</sup>. Le passage de l'espèce II à l'espèce I se traduit par une diminution du coefficient de partage d'un facteur 3. Inversement, on peut remarquer qu'il suffit de multiplier les coefficients de partage réels des tRNA<sup>Asp</sup> et tRNA<sup>Val</sup> "sous-alkylés" par un facteur 2-4 pour que les points représentatifs se placent sur les courbes des Figs. 3-5.

Les tRNA<sup>Ser</sup> de ZACHAU *et al.*<sup>28</sup> possèdent une région de l'anticodon riche en A dont la N<sup>6</sup>-isopentényl-adénine, commune semble-t-il à tous les tRNA lipophiles répondant aux codons commençant par U (ref. 10). À la suite des travaux de l'équipe de STAEBELIN *et coll.*<sup>44</sup>, il paraît raisonnable de considérer que les notations tRNA<sub>1</sub><sup>Ser</sup> et tRNA<sub>2</sub><sup>Ser</sup> que nous avons utilisées se rapportent aux deux groupes de tRNA<sup>Ser</sup>: les tRNA<sub>1</sub><sup>Ser</sup> plus polaires, répondent aux codons AGPy et ne possèdent pas d'isopentényl-adénine dans la boucle de l'anticodon; les tRNA<sub>2</sub><sup>Ser</sup> plus lipophiles, répondent aux codons UCN. C'est à ce deuxième groupe qu'appartiennent les tRNA<sup>Ser</sup>I et II de ZACHAU, notés 2a et 2b dans le Tableau I. Les groupes 1 et 2 ont des compositions en bases très voisines. Seules des modifications séquentielles, localisées dans les zones exposées, peuvent être responsables de leur comportement différencié. Ainsi serait levée la difficulté signalée par RUSHIZKY *et al.*<sup>45</sup> pour expliquer la différence de mobilité de leur tRNA<sub>2</sub><sup>Ser</sup> et tRNA<sub>3</sub><sup>Ser</sup> de levure de boulangerie. On peut encore faire deux remarques. Les deux substitutions de A par G dans la boucle T $\psi$ C entre les espèces isoacceptrices 2a et 2b n'ont pas d'effet sur le coefficient de partage, du moins dans les systèmes solvants salins. Ceci pourrait être une indication pour un masquage de la boucle T $\psi$ C au solvant. Le lobe supplémentaire (positions 45-55), développé chez les tRNA<sup>Ser</sup> et riche en G et Py, s'accommode certainement mal de la nature organique de la phase supérieure dans laquelle se solubilisent préférentiellement les tRNA<sup>Ser</sup>. Ce lobe doit être replié au moins partiellement à l'intérieur de la molécule. C'est apparemment aussi sa conformation *in vivo*, dans des milieux de faible molarité, puisqu'il est peu sensible à l'action des ribonucléases.

L'ensemble de ces faits et de nos remarques permettent d'accréditer l'idée que la région de l'anticodon est certainement une zone exposée de la molécule de tRNA, même en milieu de force ionique élevée. Cette conclusion rejoint les résultats de divers auteurs dont REID *et al.*<sup>46</sup> qui montre, par l'utilisation de la ribonucléase T<sub>1</sub>, la grande accessibilité de la boucle de l'anticodon comparativement à celle du dihydroU, elle-même plus exposée que celle du T $\psi$ C chez le tRNA<sup>Phe</sup> de levure.

Un autre fait mérite d'être relevé au sujet de la conformation des tRNA. CANTONI *et coll.*<sup>47</sup> ont montré que la conversion enzymatique des tRNA terminés

TABLEAU VI

COEFFICIENT DE PARTAGE DE tRNA AMPUTÉS DE LEUR ADÉNOSINE 3'-TERMINALE

tRNA	Système solvant				
	Organique ref. 47	Salin SAFE <sup>57</sup>	Salin PIF <sup>57</sup>	Salin PEBD <sup>48</sup>	Salin PIF <sup>40</sup>
Ser-CC-OH	1.22	1.46	2.38		
Ser-CCA-OH	1.53	2.16	4.00		
Leu-CC-OH		0.63			
Leu-CCA-OH		1.22			
Phe-CC-OH				1.30 <sup>41</sup>	
Phe-CCA-OH				2.96 <sup>41</sup>	
Tyr-CC-OH					1.00 <sup>41</sup>
Tyr-CCA-OH					2.14 <sup>41</sup>

<sup>a</sup> Valeurs approximatives, car les indications bibliographiques sont insuffisantes.

à l'extrémité 3'-OH par la cytosine en tRNA normalement terminés par l'adénosine est accompagnée d'une augmentation importante du coefficient de partage. Le Tableau VI chiffre cette augmentation pour quatre tRNA. Quel que soit le système solvant utilisé (organique ou salin), les tRNA amputés de leur adénosine 3'-terminale migrent moins rapidement que les tRNA intacts. L'accroissement de  $K$  d'un tRNA-CC-OH au tRNA-CCA-OH est incompatible avec une variation de 1-1.5 % du rapport A/A + G.

Il faut convenir que la perte de l'adénosine 3'-terminale provoque, *in vitro* et dans des milieux de force ionique très variable, une modification relativement brutale de la conformation du tRNA-CC-OH dans le sens d'une plus grande compacité. En d'autres termes, nous pensons que l'adénosine terminale d'un tRNA participe à une structure tridimensionnelle plus dilatée. Les modèles dynamiques décrivant la structure spatiale des RNA<sup>50-52</sup> tiennent compte des modifications de la conformation ou des mouvements mécaniques des tRNA lors de l'acylation et/ou de la synthèse protéique. Toutefois, aucun de ces modèles ne fait intervenir la conformation qu'adoptent les tRNA amputés de leur adénosine terminale. Or, dans des circonstances physiologiques variées, les tRNA peuvent perdre leur adénosine 3'-terminale, chez les microorganismes<sup>53-55</sup>, le foie de rat<sup>56-59</sup>, la glande mammaire<sup>60</sup> et même leur triplet terminal<sup>61</sup>.

Les considérations précédentes sur la relation générale 12 relative au comportement des tRNA dans un système solvant salin, trouvent deux applications. En utilisant les courbes de référence des Figs. 3-5, on peut estimer la composition en A et G, le nombre de pyrimidines et dans certains cas prévoir l'existence d'un petit ou d'un grand nombre de bases rares, en connaissant la valeur du coefficient de partage. Les compositions qu'on peut ainsi estimer pour les tRNA<sup>Gly</sup> par exemple, sont en bon accord avec les résultats de BERGQUIST<sup>62</sup>.

Par ailleurs, le Tableau VII indique la répartition des bases dans les moitiés 5'-p et 3'-OH de sept tRNA soumis à l'hydrolyse ménagée par la ribonucléase T<sub>1</sub>. À condition d'éviter une réassociation des deux fragments dans les milieux de forte molarité utilisés pour une distribution à contre-courant ou une chromatographie de partage, il doit être possible de séparer les moitiés des tRNA spécifiques de Ala, Asp, Ser, Tyr et Val.



TABLEAU VII

DISTRIBUTION DES BASES DANS LES MOITIÉS 5'-p ET 3'-OH DE tRNA DE LEVURE APRÈS COUPURE PAR LA RIBONUCLÉASE T<sub>1</sub> AU NIVEAU DE L'ANTICODON

tRNA	Anticodon	5'-p			3'-OH			a
		A/A+G (%)	Pu/Py	A/Py (%)	A/A+G (%)	Pu/Py	A/Py (%)	
Ala	IGC	11.1	1.05	11.7	33.4	0.86	28.7	excellente
Asp	GUC	39.0	1.12	43.6	31.5	0.86	27.1	bonne
Phe	GAA	35.0	1.43	50.0	50.5	1.00	50.5	impossible
Ser <sub>1</sub>	IGA	41.0	1.92	78.6	43.0	0.72	31.2	excellente
Ser <sub>2</sub>	IGA	41.0	1.92	78.6	33.5	0.72	24.3	excellente
Tyr	GψA	42.0	1.12	47.0	43.0	1.00	43.0	difficile
Val <sub>2</sub>	IAC	21.4	0.75	16.0	57.0	1.00	57.0	excellente

a Critères de séparation par distribution à contre-courant ou chromatographie de partage dans un "système solvant salin".

## REMERCIEMENTS

Nous remercions tout spécialement MM. J. CL. JORDAN et W. REYMAN de l'Institut de Chimie biologique de l'U.E.R. médicale de l'Université L. Pasteur de Strasbourg, pour leur précieuse collaboration technique, M. J. L. CHASSE, du Laboratoire de Biométrie de l'Université Cl. Bernard de Lyon, pour l'ensemble de l'analyse numérique sur ordinateur, M. le Professeur M. STAHELIN, des laboratoires Ciba-Geigy de Bâle pour ses suggestions et M. le Professeur G. DIRHEIMER, du Laboratoire de Chimie biologique de la Faculté de Pharmacie de l'Université L. Pasteur de Strasbourg, qui a eu l'amabilité de nous communiquer les séquences de plusieurs tRNA avant leur publication.

## RÉSUMÉ

On a étudié la relation entre le coefficient de partage  $K$  de treize tRNA spécifiques de séquence connue, fractionnés par distribution à contre-courant dans des "systèmes solvants salins" constitués par une composante inorganique à molarité élevée (phosphate ou sulfate) et plusieurs composantes organiques (acide, amide ou éther-alcool). Le comportement des tRNA individuels est pratiquement indépendant de la nature du système solvant salin utilisé. Il obéit à la relation fondamentale suivante:

$$\log K = c(A/A + G) (Pu/Py) + d \text{ ou } c(A/Py) + d$$

Les exceptions notables à cette loi sont les tRNA<sup>Asp</sup> et tRNA<sup>Val</sup>. Leur faible coefficient de partage s'explique en faisant appel au déficit et même à l'absence de bases alkylées dans la région de leur anticodon. La baisse importante de  $K$  lorsque les tRNA perdent leur adénosine 3'-terminale, et un certain nombre de considérations fondées sur une analyse statistique de la distribution des bases, des regroupements de séquence identique et de leur localisation au sein de la molécule de tRNA conduisent à postuler deux éléments conformationnels communs

aux tRNA delevure solubilisés dans un milieu de force ionique élevée: zone de l'anticodon exposée et participation de l'adénosine 3'-terminale à une structure plus dilatée.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 H. G. ZACHAU, M. TADA, W. B. LAWSON ET M. SCHWEIGER, *Biochim. Biophys. Acta*, 53 (1961) 221.
- 2 K. H. MUENCH ET P. BERG, *Biochemistry*, 5 (1966) 970.
- 3 A. D. KELMERS, G. D. NOVELLI ET M. STULBERG, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 3979.
- 4 R. C. WARNER ET P. VAIMBERG, *Fed. Proc.*, 17 (1959) 331.
- 5 K. S. KIRBY, *Biochim. Biophys. Acta*, 41 (1960) 338.
- 6 K. S. KIRBY, *Biochim. Biophys. Acta*, 61 (1962) 506.
- 7 R. W. HOLLEY, J. APGAR, S. H. MERRILL ET P. L. ZUBROFF, *J. Amer. Chem. Soc.*, 83 (1961) 4861.
- 8 J. APGAR, R. W. HOLLEY ET S. H. MERRILL, *J. Biol. Chem.*, 237 (1962) 796.
- 9 S. G. NATHENSON, F. C. DOHAN, H. H. RICHARDS ET G. L. CANTONI, *Biochemistry*, 4 (1965) 2412.
- 10 W. WEHRLI ET M. STAHELIN, *Biochemistry*, 10 (1971) 1878.
- 11 J.-P. GAREL ET P. MANDEL, *Eur. J. Biochem.*, 5 (1968) 474.
- 12 J.-P. GAREL, J.-C. JORDAN ET P. MANDEL, *J. Chromatogr.*, 67 (1972) 277.
- 13 G. DIRHEIMER ET J. P. EBEL, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 49 (1967) 1679.
- 14 J. APGAR ET R. W. HOLLEY, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 8 (1962) 391.
- 15 J. APGAR, R. W. HOLLEY ET S. H. MERRILL, *Biochim. Biophys. Acta*, 53 (1961) 220.
- 16 B. P. DOCTOR ET C. M. CONNELLY, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 6 (1961) 201.
- 17 J. L. EAST, *Anal. Biochem.*, 24 (1968) 409.
- 18 A. M. MOOD, *Ann. Math. Stat.*, 11 (1940) 367.
- 19 S. KOWALSKI, T. YAMANE ET J. R. FRESCO, *Science*, 172 (1971) 385.
- 20 S. H. CHANG ET N. MILLER, *Fed. Proc.*, 30 (1971) 1101.
- 21 R. W. HOLLEY, J. APGAR, G. A. EVERETT, J. T. MADISON, M. MARQUISEE, S. H. MERRILL, J. R. PENSWICK ET A. ZAMIR, *Science*, 147 (1965) 1462.
- 22 S. H. MERRILL, *Biopolymers*, 6 (1968) 1727.
- 23 B. KUNTZEL, J. WEISSENBACH ET G. DIRHEIMER, *FEBS Lett.*, sous presse.
- 24 G. KEITH, J. GANGLOFF, J. P. EBEL ET G. DIRHEIMER, *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 270 (1970) 613.
- 25 S. TAKEMURA, M. MURAKAMI ET M. MIYAZAKI, *J. Biochem.*, 65 (1969) 553.
- 26 J. T. MADISON, S. J. BOGULAWSKI ET G. H. TEETOR, *Science*, 176 (1972) 687.
- 27 U. L. RAJBHANDARY, S. H. CHANG, A. STUART, R. D. FAUKNER, R. M. HOSKINSON ET H. G. KHORANA, *Proc. Nat. Acad. Sci. US*, 57 (1967) 751.
- 28 H. G. ZACHAU, D. DUTTING ET H. FELDMANN, *Z. Physiol. Chem.*, 347 (1966) 212.
- 29 G. KEITH, A. ROY, J. P. EBEL ET G. DIRHEIMER, *FEBS Lett.*, 17 (1971) 306.
- 30 J. T. MADISON, G. A. EVERETT ET H. K. KUNG, *Science*, 153 (1966) 531.
- 31 S. HASHIMOTO, M. MIYAZAKI ET S. TAKEMURA, *J. Biochem.*, 65 (1969) 659.
- 32 J. BONNET, J. P. EBEL ET G. DIRHEIMER, *FEBS Lett.*, 15 (1971) 286.
- 33 A. A. BAYEV, T. V. KENSTERN, A. D. MIRZABEKOV, A. I. KRUTILINA ET V.D. AXELROD, *Mol. Biol.*, 1 (1967) 754.
- 34 S. TAKEMURA, T. MIZUTANI ET M. MIYAZAKI, *J. Biochem.*, 63 (1968) 277.
- 35 J. BONNET, G. DIRHEIMER ET J. P. EBEL, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 51 (1969) 415.
- 36 J.-P. GAREL, en préparation.
- 37 J. R. FRESCO, A. ADAMS, R. ASCIONE, D. NENLEY ET T. LINDAHL, *Symp. Quant. Biol.*, 31 (1966) 527.
- 38 J. A. LAKE ET W. W. BEEMAN, *J. Mol. Biol.*, 31 (1968) 115.
- 39 S. HANLON ET E. O. MAJOR, *Biochemistry*, 7 (1968) 4350.
- 40 V. V. VLASOV, N. I. GRINEVA ET D. G. KNORRE, *FEBS Lett.*, 20 (1972) 66.
- 41 R. THIEBE ET H. G. ZACHAU, *Biochim. Biophys. Acta*, 103 (1965) 568.
- 42 R. THIEBE ET H. G. ZACHAU, *Eur. J. Biochem.*, 5 (1968) 546.
- 43 K. NAKANISHI, F. FURUTACHI, M. FUNAMIZU, D. GRUNBERGER ET I. B. WEINSTEIN, *J. Amer. Chem. Soc.*, 92 (1970) 7617.
- 44 P. MÜLLER, W. WEHRLI ET M. STAHELIN, *Biochemistry*, 10 (1971) 1885.
- 45 G. W. RUSHIZKY, H. A. SOBER, C. M. CONNELLY ET B. P. DOCTOR, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 18 (1965) 489.
- 46 B. R. REID, B. EINARSON ET J. SCHMIDT, *Biochimie*, 54 (1972) 325.
- 47 P. LEHOWITZ, P. I. IPATA, H. M. MAKMAN, H. H. RICHARDS ET G. L. CANTONI, *Biochemistry*, 5 (1966) 3617.

- 48 U. I. RAJBHANRAY, A. STUART, R. M. HOSKINSON ET H. G. KHORANA, *J. Biol. Chem.*, 243 (1968) 565.
- 49 J. T. MADISON, G. A. EVERETT ET H. K. KUNG, *Symp. Quant. Biol.*, 31 (1966) 409.
- 50 G. MELCHER, *FEBS Lett.*, 3 (1969) 185.
- 51 D. J. ABRAHAM, *J. Theor. Biol.*, 30 (1971) 83.
- 52 A. DANCHIN, *FEBS Lett.*, 13 (1971) 152.
- 53 R. MONIER, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 44 (1962) 109.
- 54 R. ROSSET ET R. MONIER, *Biochim. Biophys. Acta*, 108 (1965) 376, 385.
- 55 M. CANNON, *Biochim. Biophys. Acta*, 87 (1964) 154.
- 56 C. SCHOLTISSEK, *Biochim. Biophys. Acta*, 61 (1962) 499.
- 57 V. DANIEL ET U. Z. LITTAUER, *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 2102.
- 58 R. M. LANDIN ET Y. MOULE, *Biochim. Biophys. Acta*, 129 (1966) 249.
- 59 Y. MOULE ET R. M. LANDIN, *FEBS Lett.*, 8 (1970) 189.
- 60 M. D. HERRINGTON ET A. O. HAWTREY, *Biochem. J.*, 116 (1970) 405.
- 61 R. GIEGE ET J. P. EBEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 161 (1968) 125.
- 62 P. L. BERGQUIST, *Symp. Quant. Biol.*, 31 (1966) 435.

*J. Chromatogr.*, 71 (1972) 203-221