

CHIMIE BIOLOGIQUE. — *Synthèse de peptides par un système enzymatique en présence de nucléoside-triphosphates*. Note de M. MIKO BEJANSKI, présentée par M. Jacques Tréfouël.

Une fraction enzymatique « EAA » obtenue et purifiée à partir d'*Alcaligenes faecalis* ⁽¹⁾, ⁽²⁾ possède la capacité d'activer l'incorporation des acides aminés dans des fragments subcellulaires de ces mêmes bactéries ⁽¹⁾. Toutefois, elle semble incapable d'activer l'échange entre le PP ⁽¹⁾ et l'ATP ⁽¹⁾ en présence d'acides aminés ⁽²⁾, mais catalyse le transfert de l'orthophosphate entre les nucléoside-triphosphates et les nucléoside-diphosphates homologues (« réaction d'échange » : ATP-ADP; GTP-GDP; UTP-UDP; CTP-CDP ⁽¹⁾). Quatre enzymes distinctes agissant chacune sur un seul couple de nucléotides, sont responsables de cette activité ⁽²⁾. Précisons que la fraction « EAA » est dépourvue des activités correspondant à la pyrophosphatase et à la phosphorylase des polynucléotides. Elle contient environ 2 % d'acides nucléiques.

Nous avons cherché si la fraction « EAA » serait capable de libérer de l'orthophosphate à partir de nucléoside-triphosphates en présence d'acides aminés (« réaction de libération »). Il était également essentiel de déterminer si ce processus s'accompagnait de la formation de liaisons peptidiques.

1. *Libération d'orthophosphate*. — Le milieu d'incubation contient: 100 μ M de tampon tris-(hydroxyméthyl) aminométhane pH 7,3; 3 μ M de MgCl₂; 1 μ M de nucléoside-triphosphate; 3 μ M de L-acide aminé; 150 à 200 μ g de protéines de la fraction « EAA »; volume final, 1 ml. Incubation à 34°. La réaction est arrêtée par addition de 0,1 ml de HClO₄ 0,5 M. Les protéines sont éliminées par centrifugation et l'orthophosphate du surnageant est dosé ⁽³⁾. La figure 1 montre que le système ne catalyse la « réaction de libération » à partir d'ATP qu'en présence d'acide aminé (glycine). Une concentration en acide aminé supérieure à celle indiquée inhibe la réaction. Nous avons cherché à déterminer si la fraction « EAA » pouvait catalyser cette réaction à partir d'autres nucléoside-triphosphates. Le tableau I montre l'apparition de l'orthophosphate en présence d'acides aminés à partir de principaux types de nucléoside-triphosphates. On remarque que l'effet des acides aminés activant la « réaction de libération » est dans une large mesure spécifique et différent pour chaque nucléotide. Cette observation confirme que les enzymes de la fraction « EAA » sont spécifiques non seulement d'un nucléotide particulier mais aussi de certains acides aminés, activateurs de la « réaction de libération ». Cette réaction est-elle catalysée par les mêmes enzymes qui, en absence d'acides aminés, sont responsables de la « réaction d'échange »? L'une de nos préparations « d'EAA » ne présentait pas l'activité correspondante à l'échange UTP-UDP, mais transférait l'orthophosphate entre les trois autres paires de nucléo-

tides. Cette même fraction catalysait la « réaction de libération » à partir d'ATP, GTP et de CTP mais non à partir d'UTP.

TABLEAU I.

Micromoles de phosphore libéré par heure et par millilitre de milieu d'incubation.

L-acides aminés.....	ATP.	GTP.	UTP.	CTP.
Sans.....	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Glycine.....	0,35	0,10	<0,01	<0,01
Acide glutamique.....	0,13	0,30	0,08	<0,01
Leucine.....	<0,01	<0,01	0,34	0,20
Phénylalanine.....	<0,01	<0,01	<0,01	0,20

TABLEAU II.

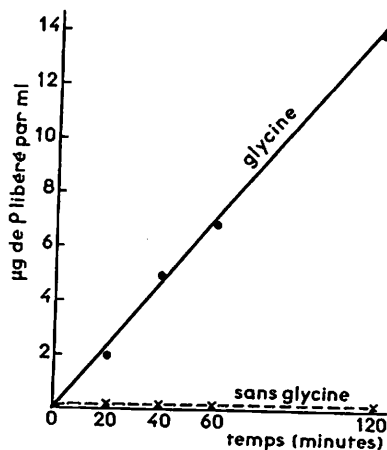
Micromoles de phosphore libéré par heure et par millilitre de milieu d'incubation.

L-acides aminés.....	ATP		UTP	
	sans.	+ chloram- phénicol.	sans.	+ chloram- phénicol.
Sans.....	<0,01	<0,01	<0,01	<0,01
Glycine.....	0,20	<0,01	-	-
Leucine..	-	-	0,21	<0,01

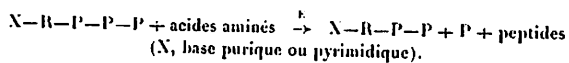
Il nous a paru important de déterminer si la « réaction d'échange » et la « réaction de libération » pouvaient être influencées par le chloramphénicol, inhibiteur de la biosynthèse des protéines. Cet antibiotique (100 µg/ml) est sans action sur la « réaction d'échange ». En revanche, il inhibe complètement la « réaction de libération » (tableau II). Cette observation constitue, autant que nous le sachions, le premier exemple où le chloramphénicol agit sur une réaction enzymatique bien déterminée.

2. *Formation de peptides.* — La libération d'orthophosphate dépendant de la présence d'acides aminés, suggérait la possibilité d'une synthèse de liaisons peptidiques par la fraction « EAA ». Nous avons donc ajouté au milieu d'incubation de l'UTP ainsi qu'un mélange de 18 L-acides aminés dont les suivants étaient radioactifs ¹⁴C : valine, leucine, phénylalanine, acide glutamique et glycine. Après 1 h 30 mn d'incubation la réaction était arrêtée, soit par HClO₄, soit par chauffage à 100° pendant 1 mn en présence d'éthanol. L'analyse par chromatographie sur papier suivie d'autoradiographie du surnageant a révélé l'existence de substances radioactives dont la position sur le chromatogramme différait nettement de celle des acides aminés ¹⁴C utilisés dans l'expérience. Ces substances apparaissent lorsque le milieu d'incubation contient à la fois des acides aminés et le nucléoside-triphosphate. Elles contiennent environ 20 % de la radioactivité totale. Remarquons que la fraction enzymatique qui s'est montrée incapable de catalyser « l'échange » UTP-UDP et la « réaction de libération » correspondante, était également incapable de former ces nouvelles substances. Certaines des nouvelles taches ont été éluées et hydrolysées par HClGN pendant 24 h à 110°. La chromatographie sur papier de

l'hydrolysats d'une seule tache a révéle la présence de six acides aminés dont deux radioactifs ^{14}C : leucine et acide glutamique. Des expériences préliminaires ont montré que les mêmes taches pouvaient également être dégradées par la trypsine. Ces observations suggèrent fortement qu'il s'agit bien de liaisons peptidiques. Les mêmes expériences effectuées séparément avec chaque type de nucléotide ont permis d'obtenir de nouvelles substances.



Les réactions étudiées pourraient être schématisées de la façon suivante :



Ces résultats posent la question de savoir si la libération de l'orthophosphate à partir des nucléoside-triphosphates est stœchiométriquement liée à la synthèse des peptides. Ce problème est à l'étude.

(¹) M. BELJANSKI et S. OCHOA, *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 44, 1958, p. 494.

(²) M. BELJANSKI, *Comptes rendus*, 248, 1959, p. 1446.

(³) M. BELJANSKI, *Bioch. Bioph. Acta* (sous presse).

(⁴) M. B. HOAGLAND, E. B. KELLER et P. C. ZAMECNIK, *J. B. C.*, 218, 1956, p. 345.

(⁵) M. MACHEBŒUF et J. DELSAL, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 25, 1943, p. 116.

(⁶) PP, pyrophosphate; ATP, adénosine triphosphate; ADP, adénosine diphosphate; GTP, guanosine triphosphate; GDP, guanosine diphosphate; CTP, cytidine triphosphate; CDP, cytidine diphosphate; UTP, uridine triphosphate; UDP, uridine diphosphate.

Extrait des *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*,
t. 250, p. 624-626, séance du 18 janvier 1960.

GAUTHIER-VILLARS,
55, Quai des Grands-Augustins, Paris (6^e),
Éditeur-Imprimeur-Libraire.
156874

Imprimé en France.