

43

PATHOLOGIE-BIOLOGIE

EXPANSION
Editeur

« LES ARN MESSAGERS » GOUVERNANT LA SYNTHÈSE « IN VITRO » DES CHAINES PEPTIDIQUES EN PRÉSENCE DE « POLYPEPTIDES SYNTHÉTASES »

M. BELJANSKI et C. FISCHER (*) (**)

INTRODUCTION

EN 1954 nous avons abordé le problème de la biosynthèse des protéines en utilisant des protoplastes (sphéropastes) de *Micrococcus lysodeikticus*, système subcellulaire capable d'incorporer les acides aminés dans les protéines acido-précipitables. La RNase exogène inactivait ce système. Par contre, l'incorporation était activée en présence de DNase et de ribonucléoside-5'-monophosphates exogènes [probablement après que ceux-ci aient été phosphorylés (2)]. Avec le Dr Ochoa (1956-1958) nous avons utilisé des fragments membraneux d'*Alcaligenes faecalis* en vue de diriger l'incorporation des acides aminés dans les protéines en ajoutant aux fragments soit des ARN de diverses origines soit des polynucléotides synthétiques. Les ARN totaux de sources variées : *Alcaligenes faecalis*, *Azotobacter vinelandii*, *Staphylococcus*, *Levures*, stimulaient fortement l'incorporation des acides aminés. L'ARN de TMV activait l'incorporation de la valine ¹⁴C par exemple et non celle de la leucine ¹⁴C. Le Poly U stimulait l'incorporation de la valine ¹⁴C, mais était inactif avec Phé, Gly, Leu, Thr, Tyr, Pro. Le Poly C et souvent le Poly U montraient une action inhibitrice pour l'incorporation des acides aminés. Cette inhibition fut plus ou moins levée après « déprotéinisation » de ces polymères par le chloroforme. L'action stimulante du Poly A ou du Poly AC, Poly AU fut aussi étudiée, mais la complexité du matériel utilisé et la forte variabilité des résultats obtenus ne nous ont pas permis d'interpréter de façon satisfaisante ces diverses observations (3). Cependant, c'est au cours de ce travail que nous avons décelé dans des extraits solubles d'*Alcali-*

genes faecalis la présence d'une fraction enzymatique qui, ajoutée aux fragments bactériens stimulait fortement l'incorporation des acides aminés (4). Nous avons alors pensé que l'activité stimulante était due aux enzymes découverts par Hoagland (14), enzymes qui activent les acides aminés uniquement en présence d'ATP (échange ATP = P³²P³²). Des purifications ultérieures ont montré que notre fraction enzymatique contenait des enzymes tout à fait particuliers et qu'ils sont impliqués dans la synthèse des liaisons peptidiques (4). En effet ce système enzymatique est capable d'utiliser les quatre ribonucléoside-5'-triphosphates (ATP, GTP, CTP et UTP) pour la formation « in vitro » des α-peptides de faible poids moléculaire (5). Cette synthèse a lieu en l'absence de tout organite cellulaire. Un acide ribonucléique fortement lié aux enzymes ou une fraction particulière d'ARN exogène est indispensable au fonctionnement de ces enzymes. Cet ARN possède la capacité de fixer tous les L-acides aminés en formant un complexe « AA-ARN » qui sert d'intermédiaire dans la synthèse des liaisons peptidiques. Nous avons montré que l'ARN actif a le rapport des bases proche de celui de l'ADN d'*Alcaligenes faecalis* et possède donc cette caractéristique de l'ARN messenger. Les résultats concernant ces dernières recherches feront l'objet du présent article.

EXPÉRIENCES ET RÉSULTATS

Principe d'isolement et propriétés des polypeptides synthétases.

Les bactéries (*Alcaligenes faecalis*) prélevées avant la phase exponentielle de croissance sont lavées, puis détruites par sonication à basse température. Les débris sont éliminés par centrifugation et les enzymes que nous appelons « Polypeptide synthétases » sont isolés et purifiés par la méthode décrite (6). Ces enzymes possèdent les caractéristiques principales suivantes :

(*) Service de Biochimie Cellulaire, Institut Pasteur, 25, rue du Dr-Roux, Paris-15^e.

(**) Ce travail a bénéficié de l'aide du Jane Coffin Childs Memorial Fund for Medical Research, du National Institute of Health, du Commissariat à l'Energie Atomique et de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique.

- Ils dégradent en présence de L-acides aminés les quatre ribonucléoside-5'-triphosphates (ATP, GTP, CTP, UTP) ;
- ils synthétisent de petits peptides en présence d'un des quatre ribonucléoside-5'-triphosphates ;
- l'activité dépend d'une fraction d'ARN bien définie et capable de former un complexe avec les acides aminés.

Les préparations d'enzymes sont systématiquement traitées par la bentonite afin d'éliminer éventuellement la ribonucléase présente. Le principe général de notre méthode d'isolement de ces enzymes peut être appliqué à d'autres sources qu'*Alcaligenes faecalis*, mais chaque matériel nécessite quelques moyens de purification différents (tableau I).

TABLEAU I. — Dégradation des ribonucléoside-5'-triphosphates en présence de L-acides aminés et d'ARN-rm.

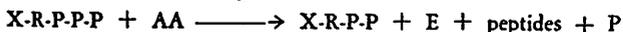
	µMole de Phosphore libéré		
	ATP	GTP	UTP
Milieu complet	0,46	0,21	0,19
Sans MgCl ₂	0,01	0,01	0,01
Sans Alanine	0,01	0,01	0,01
Sans ARN-rm	0,10	0,04	0,01
ARN-rm après RNase	0,11	0,04	0,05

µMoles/ml : ribonucléose-5'-triphosphates ; 2,0 ; l-alanine, 6,0 ; tampon Tris (pH 8,0), 100 ; K.F. ; 2,0 ; MgCl₂, 5,0 ; acides nucléiques, 30 µg ; enzymes 300 µg. Incubation 1 heure à 32°.

Synthèse des peptides par les « Polypeptides synthétases ».

Le principe de la synthèse des peptides constitués d'un seul ou de plusieurs acides aminés est le suivant : un (ou plusieurs) acide aminé ¹⁴C (Ala., Phé., His., par exemple) un (ou plusieurs) ribonucléoside-5'-triphosphate, tampon Tris contenant du Mg⁺⁺, et des enzymes purifiés. Après incubation à 32° pendant des temps variables les protéines sont précipitées en milieu acide, puis éliminées par centrifugation. Le surnageant est analysé par chromatographie sur papier suivie d'autoradiographie. Diverses techniques utilisées (6) révèlent l'existence dans le surnageant de di-, tri- et tétra-peptides constitués d'un même ou de plusieurs acides aminés (¹⁴C). Dans certains cas des peptides plus longs que le térapeptide peuvent être synthétisés mais ils restent toujours acido-solubles. La stoechiométrie de la réaction a été établie et montre que la formation d'une liaison peptidique exige la dégradation d'une molécule de ribonucléoside-5'-triphosphate. La réaction globale serait la suivante :

E



Nous avons appelé ces enzymes « polypeptides synthétases » (tableau II).

Caractérisation de l' « ARN messenger » comme intermédiaire direct dans la synthèse des liaisons peptidiques.

Les expériences décrites pour la synthèse des peptides ont été réalisées avec des enzymes purifiés contenant 1 à 3 % d'acides nucléiques, ARN en particulier. Ce matériel nucléotidique est fortement lié aux protéines et reste insensible à la ribonucléase. Cependant l'élimination de ces acides nucléiques par des purifications plus poussées (7), rendait les préparations enzymatiques pratiquement inactives. La réactivation de ces mêmes enzymes par divers types d'acides nucléiques fut tentée.

TABLEAU II. — Formation de peptides à ¹⁴C alanine.

	µMole de ¹⁴ C alanine dans		
	dipeptide	tripeptide	térapeptide
Milieu complet (ATP)	0,16	trace	0,78
Sans ARN-rm (ATP)	0,12	—	trace
Milieu complet (GTP)	trace	0,33	—
Sans ARN-rm (GTP)	trace	—	—

µMoles/ml : ATP, 2,5 ; GTP, 3 ; MgCl₂, 5,0 ; tampon Tris (pH 8,0) 100 ; L-¹⁴C alanine 6 ; (2 × 10⁶ coups/min) ; acides nucléiques 30 µg ; enzymes 300 µg. Incubation 2 heures à 32°.

Parmi ces acides nucléiques (ADN, ARN ribosomal, ARN de transfert), une fraction d'ARN liée à l'ARN ribosomal s'est montrée capable de réactiver les enzymes inactifs pour la dégradation des ribonucléoside-5'-triphosphates en présence d'acides aminés ainsi que pour la synthèse des petits peptides (7). Ces observations montraient que la fraction d'ARN pourrait servir d'intermédiaire dans la formation de liaisons peptidiques. En effet cet ARN possède la capacité de former un complexe avec les L-acides aminés lorsque l'on incube en présence d'une source d'énergie (GTP, ATP, CTP ou UTP) et de « polypeptides synthétases » (tableau III). Le complexe « AA-

TABLEAU III. — Formation du complexe « acide aminé — ARN-r ».

Conditions	µMoles d'acide aminé incorporé			
	¹⁴ C Alanine		¹⁴ C Leucine	
	ATP	GTP	UTP	CTP
Milieu complet	1,15	0,63	0,87	0,86
Sans énergie	0,05	0,04	0,06	0,04
Sans enzymes	0,03	0,03	0,03	0,04
Sans ARN-rm	0,04	0,02	0,03	0,04
Sans Mg ⁺⁺	0,03	0,03	0,04	0,03
ADN	0,08	0,06	0,06	0,07
S-ARN	0,22	0,18	0,20	0,26
ARN de l'enzyme	1,03	0,51	—	0,82
Poly AGUC	0,07	0,05	0,04	0,06
Poly U	0,06	0,05	0,05	0,04

µMoles/ml : ribonucléoside-5'-triphosphates 0,5 à 2,0 ; ARN (ou polynucléotides synthétiques) 200 µg ; MgCl₂, 5,0 ; Acide aminé ¹⁴C 3 à 50 µMoles (2 × 10⁶ coups/min) ; tampon Tris (pH 8,0) 50 ; K.F. 2,0 ; enzymes 50 µg. Incubation 20 minutes à 32°.

ARN » peut être isolé en milieu acide. Le fait que la formation du complexe « AA-ARN » avait lieu non seulement en présence d'ATP mais également en présence de GTP, CTP et UTP suggérait fortement que l'ARN impliqué dans le présent système enzymatique devait être différent de l'ARN de transfert (8). Le complexe « AA-ARN » étant facilement isolable en milieu acide fut utilisé comme moyen de rechercher la fraction d'ARN active. Il est connu que les analogues des bases tels que le 5-fluorouracile (5 FU) et l'azaguanine (Aza-G) qui s'incorporent dans les acides ribonucléiques à renouvellement rapide (marquage des bactéries pendant 30 secondes) inhibent la synthèse des protéines (10, 12). L'ARN « riboso-

mal » d'*Alcaligenes faecalis* ayant incorporé soit le 5 FU soit l'Aza-G pendant 30 secondes par exemple, présente des modifications spécifiques et profondes pour la fixation des acides aminés (tableau IV). Ces observations suggéraient fortement

TABLEAU IV. — Capacité acceptrice de l'ARN-m contenant le 5 FU. Temps d'incorporation du 5 FU dans l'ARN-m.

	µMoles				% de fixation (5 min.)
	0 min.	0,5 min.	2,5 min.	5 min.	
Leu.	100	72	53	37	63
Lys.	100	85	51	48	52
Ala.	100	85	68	45	55
His.	100	200	178	196	200

Conditions semblables à celles décrites dans la légende du tableau III.

que la fraction d'ARN active dans le présent système devrait être un ARN à renouvellement rapide (8).

A l'heure actuelle on distingue deux types d'ARN à renouvellement rapide : « l'ARN messenger » (ARN-m) dont le rapport des bases est identique à celui de l'ADN de même origine, et « l'ARN éosomal » précurseur de l'ARN ribosomal. Les divers types d'ARN peuvent être en particulier séparés à l'aide d'un gradient linéaire de saccharose (9). Les ARN totaux d'*Alcaligenes faecalis* contenant des ARN à renouvellement rapide marqués à l'uracile ¹⁴C ont été isolés puis séparés par centrifugation sur gradient de saccharose. Les échantillons collectés ont été essayés pour leur capacité à former le complexe avec les acides aminés dans des conditions semblables à celles utilisées pour la synthèse des peptides. Les résultats présentés par les figures 1 et 2 montrent les densités optiques (pics 23 S et 16 S = ARN ribosomique ; 4 S = ARN de transfert). La courbe de l'ARN à renouvellement rapide (uracile ¹⁴C) a un profil différent des autres ARN. La courbe représentant le complexe « AA-ARN » suit uniquement celle de l'ARN à renouvellement rapide. Afin de déterminer si la fraction active était constituée de l'ARN-m ou de l'ARN éosomal, nous avons séparé aussi bien que possible ces deux ARN marqués l'un et l'autre au ³²P pendant 30 secondes. Cette séparation fut obtenue en fractionnant l'ensemble des ARN par le sulfate d'ammonium. Nous avons analysé une dizaine de ces fractions pour leur capacité à former le complexe avec les acides aminés et avons déterminé le rapport des nucléotides marqués constituant ces fractions d'ARN. Les résultats (tableau V), montrent que pour les fractions d'ARN précipitant entre 65 % et 90 % de sulfate d'ammonium, la fixation des acides aminés est proportionnelle à l'activité spécifique de l'ARN. Dans ces fractions le rapport des bases des nucléotides marqués (³²P) est pratiquement

$$\text{identique } \left(\frac{G+C}{A+U} = 2,18 \right) \text{ à celui de l'ADN } \left(\frac{G+C}{A+T} = 2,3 \right)$$

d'*Alcaligenes faecalis*. Par contre, les fractions précipitant entre 0 et 60 % de sulfate d'ammonium sont pratiquement

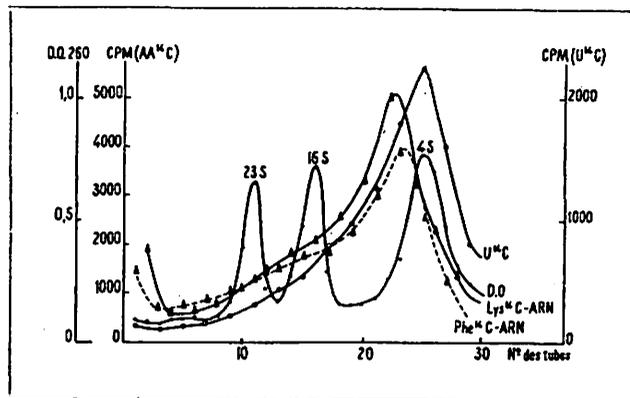


FIG. 1. — Profil des ARN d'*Alcaligenes faecalis* après gradient de saccharose. ●—● densité à 260 mµ ; O—O ¹⁴C uracile ; ▲—▲ [¹⁴C] Lys-ARN ; ▲—▲ [¹⁴C] Phe-ARN.

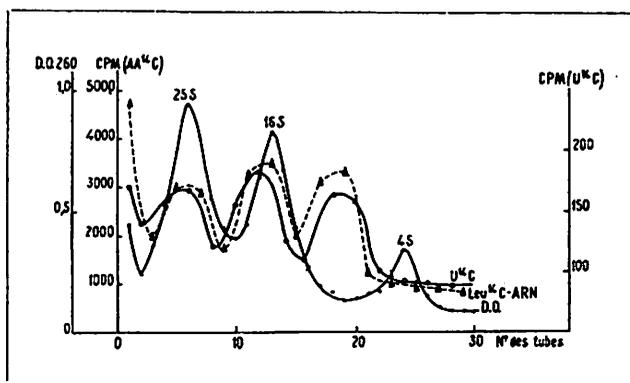


FIG. 2. — Profil des ARN de *Levures* sédimentés sur gradient de saccharose. ●—● densité à 260 mµ ; O—O ¹⁴C ; ▲—▲ [¹⁴C] Leu-ARN.

inactives et présentent un rapport des bases proche de celui de l'ARN ribosomal ($\frac{G+C}{A+U} = 1,03$). Ces résultats montrent clairement que c'est l'ARN défini comme « messenger » qui est actif dans le présent système.

L'ARN messenger joue un rôle de matrice.

L'ARN-m possède la capacité de fixer tous les L-acides aminés dans un rapport très proche de celui trouvé pour les acides aminés dans les protéines totales (24). Un acide aminé ¹⁴C donné se fixe indépendamment de la présence ou de l'absence d'autres L-acides aminés, c'est-à-dire sans compétition détectable. Pour inhiber faiblement (10 à 30 %) la fixation d'un acide aminé ¹⁴C donné, par un autre acide aminé ¹²C, il faut environ 3.000 à 5.000 fois plus de ce dernier. Ces observations montrent l'existence d'un enzyme pour chaque acide aminé et des sites spécifiques sur l'ARN-m pour la fixation des acides aminés. Lorsqu'on dispose d'une fraction d'ARN-m très active, l'acide aminé est fixé par 5 à 10 nucléotides. L'ARN-m lui-même peut donc servir de matrice qui aligne directement les acides aminés avant leur polymérisation en chaîne peptidique.

TABLEAU V. — Activité acceptrice des ARN (*Alcaligenes faecalis*) fractionnés par $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$.

Fractions	ARN mg	ARN mg/ml	^{32}P (CPM) mg d'ARN	$\gamma\gamma$ μ Moles d'acide aminé incorporé dans 1 mg d'ARN		
				Ala.	Leu.	Phé.
40	24,0	7,60	4.060	1,5	1,2	1,0
55	0,98	1,00	6.240	2,0	1,8	1,2
60	1,0	0,80	6.460	4,0	3,18	2,7
65	1,30	0,44	5.490	27,0	24,60	12,5
70	4,60	1,70	2.860	17,6	13,00	7,6
80	4,30	2,82	2.690	16,0	14,50	8,0
90	2,00	0,82	6.130	29,0	26,00	14,2
95	0,36	0,22	4.810	17,0	18,50	9,0

Conditions expérimentales (7).

TABLEAU VI. — Composition en bases de divers acides nucléiques chez « *Alcaligenes faecalis* ».

	Moles pour 100 moles de nucléotides				
	A	G	C	U(T)	$\frac{G + C}{A + U}$ (T)
ADN	16,5	33,9	32,8	16,0	2,30
ARN ^{32}P (65 - 90 %)	15,5	35,8	30,5	15,0	2,18
ARN ^{32}P (40 - 60 %)	24,3	28,0	25,5	25,0	1,09
ARN ribosomal	23,2	27,3	24,0	26,0	1,04
S-ARN	20,0	31,0	30,6	20,6	1,58

Conditions expérimentales (7).

Les « ARN messagers » hétérologues et les polynucléotides synthétiques.

Il était intéressant de vérifier si les ARN-m hétérologues pourraient former le complexe avec les acides aminés dans les conditions décrites en présence d'enzymes isolés d'*Alcaligenes faecalis*. Les expériences faites après la séparation de certains de ces ARN sur gradient de saccharose ont montré que les ARN-m d'*Escherichia coli*, levures, foie de rat, sont actifs pour la fixation des acides aminés essayés (fig. 2). L'ARN de TMV est inactif (présence d'une nucléase dans cet ARN ? et de nombreux acides aminés liés) ainsi que celui des réticulocytes. Les polynucléotides synthétisés par la polynucléotide phosphorylase (Poly U, Poly A, Poly C, Poly AGC, UGC, UAG, UCA et Poly AGUC) sont incapables d'accepter les acides aminés afin de former le complexe. Il faut souligner que ces polynucléotides ajoutés au milieu d'incubation contenant de l'ARN-m naturel d'*Alcaligenes faecalis*, n'influencent pas la formation du complexe « Acide aminé-ARN-m ».

DISCUSSION

Des enzymes purifiés à partir d'extraits d'*Alcaligenes faecalis* et certaines fractions d'ARN isolées de ces mêmes bactéries forment un système qui, en l'absence d'organites cellulaires, synthétise « *in vitro* » des liaisons α -peptidiques. Chacun des quatre ribonucléoside-5'-triphosphates participe dans cette synthèse. Une fraction d'ARN fortement liée aux protéines enzymatiques et insensible à la ribonucléase est absolument né-

cessaire au bon fonctionnement de ces enzymes (polypeptide synthétases). Les enzymes, privés de cette fraction, deviennent inactifs. On peut les réactiver par un ARN exogène provenant des ARN totaux que nous avons caractérisé comme de « l'ARN messager ». Cet ARN sert d'intermédiaire dans la synthèse des liaisons peptidiques. Il est capable de fixer sans synthèse détectable tous les L-acides aminés « activés » par les « polypeptides synthétases ». Assez purifié il accepte en moyenne un acide aminé par 5 à 10 nucléotides, dans un rapport proche de celui trouvé pour les acides aminés dans les protéines totales. En d'autres mots, l'ARN-m sert de matrice dans la polymérisation des acides aminés en protéines.

On peut modifier la capacité acceptrice de l'ARN-m en introduisant spécifiquement dans cet ARN le 5 FU ou l'aza-G. Ainsi modifié l'ARN a perdu une grande partie de son pouvoir accepteur pour la plupart des acides aminés. Par contre l'ARN-m contenant le 5 FU fixe plus abondamment l'histidine. Rappelons que ces mêmes analogues incorporés dans l'ARN de transfert ne modifient pas les propriétés de celui-ci, c'est-à-dire d'accepter sur l'adénosine terminale les acides aminés.

Des « ARN-messagers » de diverses origines se sont montrés capables de former en présence de polypeptides synthétase le complexe « acide-aminé-ARN ». Nous n'avons pas encore réussi à obtenir le complexe avec des ARN de TMV et de réticulocytes. Aucun des polynucléotides synthétiques mono- ou hétéro-polymères ne s'est montré capable de fixer les acides aminés.

Des différences essentielles entre les systèmes constitués par les ribosomes (polysomes) + surnageant... (14) et le système soluble des « polypeptides synthétases » (7) doivent être soulignées :

<i>Polypeptide synthétase</i> Enzymes solubles purifiés E X-R-P-P-P → X-R-P-P + P	<i>Système des ribosomes</i> (polysomes) + surnageant... E ATP ⇌ AMP + PP
1. Utilisent ATP, GTP, CTP, UTP comme source d'énergie pour la fixation directe des L-ac aminés sur l'ARN-m donc pour la synthèse des peptides et très probablement des polypeptides.	Seul l'ATP est utilisé comme source d'énergie pour l'activation des ac. aminés et leur transfert sur le S-ARN. Les ribosomes sont indispensables pour la formation des liaisons peptidiques. On constate que le GTP, nécessaire dans le système, est dégradé en GDP et P (16).
2. L'ARN-m contenant le 5-FU ou l'aza-G perd une grande partie de ses capacités acceptrices pour les ac. aminés.	Le S-ARN contenant le 5-FU ou l'aza-G conserve ses propriétés acceptrices inchangées (12).
3. L'ARN-m homologue peut fixer un ac. aminé par 5 à 10 nucléotides. Répartition des ac. aminés le long de la chaîne.	Le S-ARN fixe l'ac. aminé par 90 nucléotides. Les acides aminés sont fixés au bout de la chaîne (23).
4. La formation du complexe AA-ARN-m est fortement inhibée par : ADP, GDP, UDP, CDP, 5-FU-dé-UTP, désoxyribonucléoside-5'-triphosphates. Pas d'inhibition par AMP, GMP, CMP, UMP.	La formation du complexe « S-ARN-AA » est spécifiquement inhibée par l'AMP. Pas d'inhibition par ribonucléoside-5'-diphosphates (ADP) (1). Le 5 FU-dé-UTP est sans action.
5. Les polynucléotides synthétiques ne forment pas le complexe avec les ac. aminés.	Les poly-nucléotides synthétiques jouent le rôle du « messenger » (17).
6. L'ARN de TYMV fixe certains acides aminés.	

Nos expériences encore non publiées montrent que dans le complexe « ARN-messenger-AA » ce sont les nucléotides qui portent les acides aminés. Ces résultats peuvent avoir une signification importante dans la détermination du code génétique contenu dans l'ARN-m naturel. De plus la fixation directe de tous les acides aminés sur l'ARN possédant les caractéristiques d'une matrice (ARN-m), l'absence de compétition entre les acides aminés naturels, suggèrent fortement que le système dont nous disposons (« polypeptide synthétases » + ARN-m) devrait permettre la formation « *in vitro* » de longues chaînes polypeptidiques et spécifiques.

De nombreux résultats publiés dans la littérature bien que fragmentaires (13, 26, 15, 25, 18, 21, 27, 19) devraient être examinés avec soin, car ils suggèrent l'existence d'une voie de biosynthèse de protéines différente de celle généralement admise. Certains de ces auteurs confirment nos résultats (18, 26, 15, 25, 21, 28).

Nisman et Fukuhara (21) ont isolé et purifié des enzymes solubles à partir d'*Escherichia coli* possédant certaines caractéristiques des polypeptides synthétases. En effet ces préparations enzymatiques sont capables de dégrader en présence de L-acides aminés et d'acides nucléiques chacun des quatre ribonucléoside-5'-triphosphates selon la réaction que nous avons décrite (5). Des résultats semblables ont été obtenus par Schuur et ses coll. (21) à l'aide d'un système isolé à partir de levures.

Tissières et Hopkins (27) ont constaté que les ribosomes + surnageant d'*Escherichia coli* incorporent les acides aminés ¹⁴C plus activement en présence de ATP, GTP, CTP, UTP qu'en leur absence. D'après ces auteurs les ribonucléoside-5'-triphosphates serviraient uniquement pour la synthèse de « l'ARN messenger ». En présence de DNase l'effet de ces nucléotides est fortement diminué. Mais on pourrait également penser que ces mêmes nucléotides stimulent l'incorporation des acides aminés assurée par les polypeptide synthétases et que les désoxyribonucléoside-5'-monophosphates, formés sous l'action de la DNase, étant d'abord phosphorylés inhibent l'activité des enzymes semblables ou identiques aux « polypeptide synthétases » d'*Alcaligenes faecalis*.

Les polysomes d'*Escherichia coli* décrits par Raacke et ses coll. (20) possèdent pour les ribonucléoside-5'-triphosphates des activités phosphatasiques 100 fois supérieures à celles que possèdent ces mêmes enzymes solubles. Il serait, à notre avis, intéressant de déterminer si ces activités dépendent de l'ARN et de quel type d'ARN, des acides aminés ou de l'un et l'autre ensembles comme dans le cas des « polypeptides synthétases » que nous utilisons. Une fraction enzymatique soluble purifiée par Monro et ses coll. (16) à partir d'*E. coli* dégrade le GTP et GDP et P uniquement en présence de « ribosomes ». Quelle partie des « ribosomes » est en effet indispensable à la dégradation du GTP ?

En utilisant des microsomes ou des fragments de ceux-ci, isolés du foie de rat, Zalta (28, 30) a mis en évidence la présence dans ces préparations actives pour l'incorporation des acides aminés, d'enzymes analogues aux « polypeptides synthétases ». Zalta et nous-mêmes (29) avons observé que le surnageant 105.000 g du foie de rat après dialyse poussée se montre capable de synthétiser en présence de GTP comme seule source d'énergie exogène de très nombreux peptides acidosolubles à partir d'acides aminés libres. Silverman et ses coll. (22) ont récemment montré que l'incubation du surnageant 105.000 g des cellules du foie de rat avec du GTP rend les enzymes inactifs pour le transfert de la Phé ¹⁴C-S-ARN » dans les protéines lorsque ce surnageant préincubé est mis en présence de ribosomes. Des résultats semblables ont été observés par Fessenden et Moldave (11). Le GMP est sans effet tandis que le GDP n'a pas été essayé. Rappelons que ce dernier, à certaines concentrations, inhibe l'activité de notre système enzymatique.

Prosser et ses coll. (19) ont montré qu'un système « post microsomal » insensible à la ribonucléase est capable d'incor-

porer les acides aminés dans les protéines acido-précipitables. ATP, GTP, UTP, CTP stimulent l'incorporation ; dans ces préparations la présence de S-RNA n'a pu être mise en évidence.

La fibroïne, protéine du ver à soie, contient 42 % de glycine et 28 % d'alanine ; la tyrosine et le tryptophane sont présents en trace. Heller et ses coll. (13) ont montré que des extraits des glandes dans lesquelles se trouve la fibroïne « active » fortement la tyrosine et le tryptophane tandis que la glycine et l'alanine ne sont pas activés par les enzymes de Hoagland (25). De plus Suzuka et ses coll. (26) n'ont pu

mettre en évidence la participation du S-ARN dans la synthèse « *in vitro* » de cette protéine.

ABRÉVIATIONS

ARN, ADN : acides ribo-, déoxyribo-nucléiques ; ARN-m : ARN ribosomal contenant de l'ARN à marquage rapide ; S-ARN : ARN le transfert ; AA-ARN : complexe entre les acides aminés et les ARN ; 5 FU : 5-fluoro-uracile ; aza-G : azaguanine ; Poly AGUC, Poly U, Poly A, Poly C, Poly AGC, Poly UCG, Poly UAG : polynucléotides synthétisés par la polynucléotide phosphorylase ; ARN-TMV : ARN de la mosaïque jaune du navet ; DNase : déoxyribo-nucléase ; ATP, GTP, CTP, UTP : triphosphates d'adénine, guanine, uridine, cytidine ; ADP, GDP, UDP : diphosphates d'adénine, guanine, cytidine, uridine ; AMP, GMP, CMP, UMP : monophosphates d'adénine, guanine, cytidine, uridine. ARN-m : ARN messenger.

BIBLIOGRAPHIE

1. ALLEN E. H., GLASSMAN E., CORDES E., SCHWEET R. S. — Incorporation of amino acids into ribonucleic acids. *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 1068.
2. BELJANSKI M. — L'action de la ribonucléase et de la déoxyribo-nucléase sur l'incorporation du glyco-collé radioactif dans les protéines de lysats de « *Micrococcus lysodeikticus* », et résultats inédits. *Biochim. Biophys. Acta*, 1954, 15, 425.
3. BELJANSKI M., OCHOA S. — Résultats non publiés.
4. BELJANSKI M., OCHOA S. — Protein biosynthesis by a cell-free bacterial system. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1958, 44, 494.
5. BELJANSKI M. — Synthèse de peptides par un système enzymatique en présence de nucléoside-triphosphates. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1960, 250, 624.
6. BELJANSKI M., BELJANSKI M., LOVINY T. — Rôle des polypeptides synthétisés dans la formation de peptides spécifiques en présence de ribonucléoside-triphosphates. *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 56, 559.
7. BELJANSKI M., BELJANSKI M. — « Acide aminé-acide ribonucléique » intermédiaire dans la synthèse des liaisons peptidiques. *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 72, 585.
8. BELJANSKI M., FISCHER C., BELJANSKI M. — Le RNA messenger accepteur spécifique des L-acides aminés en présence d'enzymes bactériens. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1963, 257, 547.
9. BRITTON J., ROBERTS R. B. — High resolution density gradient sedimentation analysis. *Science*, 1960, 131, 32.
10. CHANTRENNE H., DEVREUX S. — Dissociation of the synthesis of nucleic acids from the synthesis of protein by a purine analogue. *Exp. Cell. Res.*, 1950, 6, suppl. 155.
11. FESSENDEN J. M., MOLDAVE K. — Polyuridylic acid and aminoacyl transfer to mammalian ribosomes. *Nature*, 1963, 199, 1172.
12. GROS F., NOANO S. — Bacterial synthesis of « modified » enzymes in the presence of a pyrimidine analogue. Symposium on protein biosynthesis, Wassenaar, 1960, Academic Press, London, 195.
13. HELLER J., SZAFRANSKI P., SULKOWSKI E. — Activation of amino-acids in relation to the synthesis of Silk protein. *Nature*, 1959, 183, 397.
14. HOAGLAND M. B., KELLER E. B., ZAMECNIK P. C. — Enzymatic carboxyl activation of amino acids. *J. Biol. Chem.*, 1956, 218, 345.
15. MIURA Y., ITO H., MOMOSE L., SUNAGA K., IKEDA K. — Studies on the protein synthesis in Silk glands. *J. Biochem.*, 1962, 52, 333.
16. MONRO R., VON EHRENSTEIN G., LIPMANN F. — Discussion. Symposia on quantitative biology, 1961, Cold Spring Harbor L. I. New-York, XXVI, 156.
17. NIRENBERG M. W., MATTHAEI J. H. — The dependence of cell free protein synthesis in a « *E. coli* » upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1961, 47, 1588.
18. NISMAN B., FUKUHARA H. — Isolement d'un système enzymatique qui synthétise des protéines à partir d'un extrait d'« *Escherichia coli* » par fractionnement au sulfate d'ammonium et chromatographie sur colonne de cellulose. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1960, 251, 908.
19. PROSSER E. J. T., HIRD H. J., MUNRO H. N. — A particulate fraction of liver containing a ribonuclease resistant system for amino acid incorporation into protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1961, 4, 243.
20. RAACKE I. D., FIALA J., JUKES T. H. — Self sufficiency of natural « *E. coli* » polysomes for amino acid incorporation. *Fed. Proc.*, 1964, 23, 218.
21. SCHUURS A. H. W. N., de KLOET S. R., KONINGSBERGER V. V. — Nucleoside triphosphate dependent peptide activation by a crude soluble protein fraction of baker's yeast ; a new type of activating mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1960, 3, 301.
22. SILVERMAN D. A., LIAO S., ZELIS R. E., WILLIAMS-ASHMAN H. G. — Abnormalous effects of GTP on amino acid incorporation by mammalian ribosomal systems. *Fed. Proc.*, 1964, 23, 220.
23. STEPHENSON M. L., ZAMECNIK P. C. — Isolation of valyl-RNA of a high degree of purity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1962, 7, 91.
24. SUEOKA N. — Correlation between base composition of deoxyribonucleic acid and amino acid composition of protein. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1961, 47, 1141.
25. SUZUKA I., TANAKA S., SHIMURA K. — Studies on the biosynthesis of Silk fibroin. IV. - A particulate fraction controlling the specificity of fibroin synthesis in a cell free system. *J. Biochem.*, 1962, 52, 54.
26. SUZUKA I., TANAKA S., SHIMURA K. — Amino acid activating enzyme free from pyrophosphate exchange. *J. Biochem.*, 1961, 49, 81.
27. TISSIERES A., HOPKINS J. W. — Factors affecting amino acid incorporation into proteins by « *Escherichia coli* » ribosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 1961, 47, 2015.
28. ZALTA J. P. — Nouveau système d'incorporation des acides aminés isolé des microsomes du foie de rat. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1960, 250, 4058.
29. ZALTA J. P., BELJANSKI M. — Synthèse de peptides par des fractions subcellulaires préparées à partir du foie de rat. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1961, 253, 567.
30. ZALTA J. P., LACHURIE F., OSORNO S. — Existence de deux systèmes permettant l'incorporation des acides aminés dans les microsomes du foie de Rat. *C. R. Acad. Sci. (Paris)*, 1960, 251, 814.