

# SUR LA TENEUR EN AMYLASE DE FRAGMENTS NUCLÉÉS ET ÉNUCLÉÉS D'*AMOEBEA PROTEUS*

par

ENRICO URBANI\*

*Laboratoire de Morphologie animale de l'Université de Bruxelles (Belgique)*

Afin d'éclaircir la nature du contrôle exercé par le noyau sur le cytoplasme de la cellule, BRACHET et ses collaborateurs ont suivi la teneur en certains constituants chimiques et en enzymes de fragments nucléés et énucléés d'*Amoeba proteus* du premier jusqu'au treizième ou quinzisième jour après la section de l'amibe. A l'aide de techniques cytochimiques et microchimiques, ils ont pu suivre ainsi, dans les deux fragments, la teneur en acide ribonucléique, glycogène, tyrosine, phosphatase acide, adénosin-triphosphatase, estérase et la consommation d'oxygène<sup>1,2,3</sup>.

Dans ce même domaine, il était intéressant de savoir comment se comporteraient les enzymes protéolytiques et nous avons étudié, de façon quantitative, la teneur en dipeptidase et en protéinase: nous avons vu que les fragments énucléés conservent, 14 à 15 jours après l'énucléation, leur activité enzymatique qui est cependant moins forte que celle des fragments nucléés<sup>4</sup>. Cette étude a montré clairement aussi une différence de comportement, au cours des jours qui suivent la section de l'amibe, entre la dipeptidase et la protéinase qui ont probablement, selon HOLTER ET LØVTRUP<sup>5</sup>, une localisation différente dans le cytoplasme de l'amibe.

Nous sommes passé ensuite à l'étude de l'amylase, en suivant la technique de HOLTER ET DOYLE<sup>6</sup>. Les amibes ont été coupées à l'aide d'un cheveu de verre et maintenues à jeun jusqu'au 14<sup>me</sup> jour de l'expérience. Les dosages ont été effectués sur 20 fragments de tailles aussi identiques que possible. Les résultats obtenus sont consignés dans la table ci-dessous.

On voit que dans les premières heures après la section, on retrouve une activité enzymatique égale dans les deux types de fragments. Après un jour et demi à trois jours, l'activité enzymatique des fragments énucléés est *plus forte* que celle des fragments nucléés: parfois cette augmentation n'est pas bien notable, mais dans d'autres cas elle est, au contraire, très forte. Au cours des jours suivants, l'activité enzymatique des fragments énucléés redevient à peu près égale à celle des fragments nucléés pour lui devenir inférieure 14 jours après la section.

TABLEAU I

Temps après la section des amibes	5 heures	6 heures	1,5 jours	2 jours	3 jours	6 jours	7 jours	9 jours	11 jours	14 jours
Nucléés. Activité enzymatique en $\mu\text{l Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ N}/50$	4.20 4.40	1.80 2.80	4.80 5.40	2.80 4.70 5.90 5.35*	3.60 5.20 4.80	5.90	5.40	3.60 5.40	4.20	4.60 4.80
Enucléés. Activité enzymatique en $\mu\text{l Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ N}/50$	4.40 4.00	1.60 1.60	7.60 11.20	5.40 11.40 16.70 6.10*	7.00 7.40 7.00	4.70	5.20	3.40 5.00	3.60	3.40 3.80

\* Moyenne de quatre dosages sur une même souche d'amibes

Ces résultats nous ont amené à étudier plus soigneusement les propriétés de l'amylase des amibes; voici les principaux résultats obtenus.

L'activité enzymatique d'un homogénéisat d'amibes (broyage dans un microhomogénéisateur) est plus forte que celle d'un même nombre d'amibes non homogénéisées; il n'en va pas de même pour la dipeptidase et la protéinase.

L'activité enzymatique d'un cytolysat d'amibes, obtenu par gel et dégel répétés avec de la neige carbonique, est semblable à celle d'une même quantité d'amibes intactes. Le froid n'inactive cependant pas l'amylase.

L'activité enzymatique d'amibes énucléées depuis deux jours et homogénéisées par broyage s'est révélée légèrement supérieure à celle des fragments nucléés.

L'activité enzymatique des amibes énucléées et cytolysées par le froid s'est montrée tantôt

\* Rockefeller fellow.

plus forte, tantôt égale à celle des amibes nucléées, confirmant donc le résultat obtenu dans le cas des amibes intactes.

Il est difficile de donner dès à présent une explication satisfaisante de l'augmentation d'activité que l'on trouve dans les fragments énucléés dans les premiers jours après l'énucléation. On pourrait penser que l'absence du noyau provoque une libération d'enzyme comme le broyage mécanique; toutefois, cette libération n'a pas lieu dans les amibes cytolysées par le froid.

On peut conclure, d'après les recherches que nous avons effectuées sur la dipeptidase, la protéinase et l'amylase que le noyau exerce sur ces enzymes un contrôle éloigné (BRACHET<sup>3</sup>) et que, en l'absence du noyau, les enzymes restent longtemps actifs et capables d'agir sur leurs substrats.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> J. BRACHET, *Nature*, 168 (1951) 205.
- <sup>2</sup> N. LINET ET J. BRACHET, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 607.
- <sup>3</sup> J. BRACHET, *Actualités Biochimiques*, 16 (1952) Ed. Masson & Desoer.
- <sup>4</sup> E. URBANI, *Arch. Intern. Physiol.*, 60 (1952).
- <sup>5</sup> H. HOLTER ET S. LÖVTRUP, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg*, 27 (1949) 27.
- <sup>6</sup> H. HOLTER ET W. L. DOYLE, *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg*, 22 (1938) 219.

Reçu le 24 mai 1952

## EXTRÉMITÉS N-TERMINALES DE LA PROTÉINE DE L' $\alpha$ -CHYMOTRYPSINE

par

P. DESNUELLE, M. ROVERY ET C. FABRE

*Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences, Marseille (France)*

Dans un précédent travail<sup>1</sup>, nous avons appliqué la technique de SANGER au chymotrypsinogène et à l' $\alpha$ -chymotrypsine cristallisée. Le chymotrypsinogène semble dépourvu de fonctions  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> libres. Dans les cristaux d' $\alpha$ -chymotrypsine au contraire, on rencontre une série de résidus N-terminaux. Les uns (alanine, isoleucine) s'y trouvent en proportions à peu près stoechiométriques (environ 1 résidu pour 21,500 g). Tous les autres s'y trouvent en proportions notablement plus faibles. Les cristaux d' $\alpha$ -chymotrypsine sont donc probablement constitués, non par une protéine pure comme on aurait pu le penser, mais par un mélange d'une protéine et de peptides (ou aminoacides). Ces derniers sont si fortement ancrés à la protéine que ni les cristallisations ni même la précipitation trichloracétique ne réussissent à les éliminer.

Nous avons trouvé que la séparation de la protéine et des peptides (aminoacides) peut être réalisée de deux façons différentes. En épuisant longuement à l'eau, à l'alcool et à l'éther, la DNP- $\alpha$ -chymotrypsine, on extrait une partie des DNP-peptides (ou aminoacides). Simultanément, la substance insoluble (qui contient la DNP-protéine) perd quelques-uns de ses résidus N- $\alpha$ -terminaux non-stoechiométriques mais conserve son alanine et son isoleucine. D'autre part, deux cristallisations<sup>2</sup> de la diisopropylphospho- $\alpha$ -chymotrypsine (enzyme inhibé par 1 mol de diisopropylfluorophosphate) permettent également, comme l'a déjà noté JANSEN<sup>3</sup> de réaliser une excellente purification. En combinant les deux traitements, on obtient une substance contenant uniquement 0.8-0.9 résidus d'alanine et de isoleucine pour 21,500 g\*.

Ces résultats suggèrent que la protéine des cristaux d' $\alpha$ -chymotrypsine possède deux chaînes peptidiques ouvertes. Elle est donc vraisemblablement engendrée par l'ouverture de deux liaisons peptidiques au sein du chymotrypsinogène\*\*.

Des expériences sont actuellement en cours pour savoir si cette protéine, une fois débarrassée de ses peptides (ou aminoacides), possède encore une activité enzymatique.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> P. DESNUELLE, M. ROVERY ET C. FABRE, *Compt. rend.*, 233 (1951) 1496.
- <sup>2</sup> E. F. JANSEN, M. D. F. NUTTING, R. JANG ET A. K. BALLS, *J. Biol. Chem.*, 179 (1949) 189.
- <sup>3</sup> E. F. JANSEN, M. D. F. NUTTING, R. JANG ET A. K. BALLS, *J. Biol. Chem.*, 185 (1950) 209.
- <sup>4</sup> *Crystalline Enzymes*, Columbia University Press, New York 1948, page 111.

Reçu le 29 avril 1952

\* Ainsi que 0.2 résidu N-terminal de phénylalanine.

\*\* Ce résultat est en accord avec la formol-titration (4 liaisons rompues pour 36,000 g).