

TABLE I  
ACTION OF PHOSPHOPROTEIN PHOSPHATASE ON DIFFERENT SUBSTRATES

Substrate	% Phosphorus split	
	with activator	without activator
"Unfractionated" Casein *	81	18
$\alpha$ -Casein *	78	8
$\beta$ -Casein *	80	18
Phosvitin **	60	10
Glycerophosphate **	0	1

\* Final concentration of 5 mg protein/ml.

\*\* Final concentration of 50  $\mu$ g of organic P/ml.

for the enzyme. Dephosphorylation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -casein has also been found to be brought about readily by a phosphoprotein phosphatase preparation from chick embryo<sup>4</sup>. Phosphomonoesterases on the contrary dephosphorylate only  $\alpha$ -casein. It is hence justifiable to conclude on these grounds that phosphoprotein phosphatase is an enzyme quite distinct from the phosphomonoesterases. The nature of the phosphorus linkage attacked by this enzyme is not yet clear and remains to be investigated.

We wish to thank Dr. T. L. McMEEKIN of the Eastern Regional Laboratory (U.S.A.) for a generous gift of  $\alpha$ - and  $\beta$ -casein samples used in this investigation.

#### REFERENCES

- 1 T. A. SUNDARARAJAN AND P. S. SARMA, *Biochem. J.*, 56 (1954) 125.
- 2 G. E. PERLMANN, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 3191.
- 3 G. E. PERLMANN, *Phosphorus Metabolism*, The Johns Hopkins Press, Baltimore; 1952, Vol. 2, p. 167.
- 4 C. A. KIND, personal communication.

Received February 17th, 1954

#### ACCUMULATION D'ACIDE THYMIDYLIQUE CHEZ *E. COLI* B APRÈS IRRADIATION U.V.

par

D. KANAZIR\*

*Laboratoire de Morphologie animale, Université libre de Bruxelles (Belgique)*

De nombreux travaux ont montré que l'irradiation, tant X que U.V., de divers organismes entraîne un ralentissement de la synthèse de l'acide désoxyribonucléique (ADN). KELNER a établi notamment que chez *E. coli* en phase de croissance, la synthèse de l'ADN est bloquée complètement<sup>4</sup>. Ce blocage n'est que temporaire et il s'accompagne d'un enrichissement des bactéries en nucléotides acidesolubles<sup>3</sup>. Dans le présent travail, une accumulation d'acide thymidylque dans les bactéries irradiées est mise en évidence.

Les bactéries sont cultivées dans un milieu synthétique décrit précédemment. Elles sont récoltées au cours de leur croissance logarithmique (densité optique 0.4, mesurée au spectrophotomètre Coleman Univ. M. 14 à 700  $\mu$ m) et additionnées d'un volume égal de milieu frais. L'irradiation est effectuée dans des boîtes de Pétri ouvertes, disposées sur un agitateur électromagnétique (épaisseur de couche 5 mm). La lampe Mineralight utilisée pour l'irradiation est placée à 30 cm et le flux total est de  $9.5 \cdot 10^2$  ergs/mm<sup>2</sup>. Environ 1000 ml de suspension bactérienne, irradiée par lots de 100 ml, sont incubés immédiatement après l'irradiation, à 37° et à l'obscurité, pendant des périodes de 30 ou 50 minutes et soumis à une agitation vigoureuse. Pendant ce temps, aucune synthèse de l'ADN n'a lieu dans les lots irradiés. Après l'incubation, les bactéries sont récoltées par centrifugation à 4° C, lavées deux fois à l'aide de NaCl 0.9 % et délipidées à l'alcool-éther (3:1). Les culots bactériens sont ensuite

extraits, à deux reprises et à froid, par de l'acide perchlorique à 1% (durée de l'extraction: 20 minutes); le pH est alors immédiatement ramené à 7. Dans l'une des expériences, l'extraction a été effectuée par de l'acide trichloracétique à 5% qui a été ensuite éliminé par une dizaine d'extractions à l'éther (pH final d'environ 5). Les extraits sont alors évaporés sous vide, redissous dans un petit volume (50  $\mu$ l) d'eau et chromatographiés en deux temps. Du butanol  $n\text{-NH}_4\text{OH}$  (I)<sup>5</sup> est d'abord utilisé pour séparer les nucléosides et les bases azotées, les nucléotides restant immobiles. Ces derniers sont alors élusés à l'eau (ou par  $\text{HCl } N/10$ ) et chromatographiés à leur tour dans du butanol-(tertiaire)- $\text{HCl}$  (II)<sup>6</sup>. Les taches sont révélées par leur absorption U.V., élues et analysées au Beckman par rapport à un éluat du papier à chromatographie (blanc). Les chromatogrammes sont effectués sur papier Whatman n° I et III. Les pentoses et le phosphate des nucléotides sont dosés, selon les méthodes que nous avons employées précédemment<sup>1</sup>, dans les éluats des chromatogrammes.

Le présent travail n'est consacré qu'à l'acide thymidylique et les résultats expérimentaux sont consignés dans le Tableau I. Dans tous les cas examinés, on constate que le composé élut contient des proportions approximativement équimoléculaires de phosphate et de désoxyribose. Le spectre d'absorption des éluats correspond à celui d'une quantité identique d'acide thymidylique. Enfin la thymine a été identifiée dans l'hydrolysat<sup>7</sup> de la substance isolée par chromatographie dans le solvant I.

TABLEAU I

	Expérience n° III				Expérience n° IV				Expérience n° VII			
	Après incubation 50'				Après incubation 50'				Après incubation 30'			
	avant irr.	témoins	irradiées	avant irr.	témoins	irradiées	avant irr.	témoins	irradiées	avant irr.	témoins	irradiées
Poids sec des bact. en mg	120	220	196	140	250	210	112	165	150			
Ac. thymidylique spectre $\mu\text{M}/\text{mg}$ de poids sec	—	1	1.67	—	1.30	2.75	0.92	0.62	2.18			
Désoxyribose $\mu\text{M}/\text{mg}$ de poids sec	—	1.2	1.66	—	1.40	2.62	0.98	1.14	3.05			
Phosphate $\mu\text{M}/\text{mg}$ de poids sec	—	0.84	1.25	—	1.24	2.34	—	—	—			

On constate que les bactéries irradiées contiennent nettement plus d'acide thymidylique que les témoins: plus du double après 30 minutes d'irradiation, un peu moins après 50 minutes, moment où la synthèse d'ADN va s'amorcer. Il semble clair que cette accumulation d'acide thymidylique doit être en relation étroite avec le blocage de la synthèse de l'ADN. Ce constituant est probablement un précurseur direct de l'ADN, ce qui pourrait être démontré en recherchant s'il est incorporé dans la macromolécule.

L'expérience présente concorde avec l'idée que ce ne sont pas les stades initiaux de la synthèse de l'ADN qui sont bloqués par l'irradiation. Des enrichissements analogues, mais moins considérables cependant, ont été observés pour une série de constituants puriques. On doit d'ailleurs s'attendre à ce que ceux des précurseurs de l'ADN qui donnent probablement aussi naissance à l'acide ribonucléique soient moins affectés que l'acide thymidylique: en effet, la synthèse de l'acide ribonucléique se poursuit presque normalement après irradiation<sup>8</sup>. Nous avons déjà mis en évidence précédemment une diminution de l'utilisation de l'adenosinetriphosphate après irradiation de *E. coli*: l'identification et l'analyse quantitative de divers autres constituants est un cours et elles feront l'objet d'un prochain travail.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 G. CERIOTTI, *J. Biol. Chem.*, 198 (1952) 297.
- 2 M. ERRERA, *Brit. J. Radiol.*, 27 (1954) 76.
- 3 D. KANAZIR ET M. ERRERA, *Biochim. Biophys. Acta*, (sous presse).
- 4 A. KELNER, *J. Bactériol.*, 65 (1953) 252.
- 5 A. MARSHAK ET H. VOGEL, *J. Biol. Chem.*, 189 (1951) 597.
- 6 R. MARKHAM ET J. D. SMITH, *Biochem. J.*, 49 (1951) 407.
- 7 G. R. WYATT, *Biochem. J.*, 48 (1951) 584.

Reçu le 22 février 1954