

## Incorporation *in vitro* de [<sup>14</sup>C]fluorophénylalanine dans l'hémoglobine des réticulocytes de lapin

L'étude de l'incorporation d'analogues d'acides aminés dans les protéines a pris un grand développement avec le progrès de nos connaissances sur la biosynthèse des protéines. Cependant, peu de travaux ont porté sur l'incorporation de fluorophénylalanine dans des protéines animales bien définies. VAUGHAN ET STEINBERG<sup>1</sup> ont montré l'incorporation *in vitro* de l'analogique dans l'ovalbumine d'oviducte *in vitro*. BOYER ET WESTHEAD<sup>2</sup> ont observé l'incorporation de la fluotophénylalanine dans l'aldolase et la phosphoglycéraldéhyde deshydrogénase de muscle de rat *in vitro*.

Nous avons cherché si la [<sup>14</sup>C]fluorophénylalanine était incorporée dans l'hémoglobine de réticulocytes de lapin *in vitro*. Les incubations ont été réalisées, selon la technique décrite précédemment<sup>3,4</sup>, pendant 3 h à 37°, en présence d'acides aminés à la concentration finale de 0,2 mM, à l'exception de phénylalanine et de tyrosine, et en présence du composé marqué.

Le problème qui se pose est de savoir si la fluorophénylalanine a été incorporée dans des liaisons peptidiques et si cette incorporation a bien lieu dans l'hémoglobine. La démonstration ne peut être qu'indirecte, du fait de la très petite quantité d'hémoglobine formée par rapport à celle préexistante dans les réticulocytes.

1. On constate une incorporation de [<sup>14</sup>C]fluorophénylalanine dans la globine préparée selon ROCHE *et al.*<sup>5</sup>, ANSON ET MIRSKY<sup>6</sup>, environ trois fois plus petite que celle de [<sup>14</sup>C]phénylalanine de même activité spécifique. Les mesures de radioactivité sont faites sur 100 mg de globine finement pulvérisée et étalée uniformément sur des plaques de cuivre de 2,85 cm<sup>2</sup> de surface: [<sup>14</sup>C]fluorophénylalanine, 317 coups/min; [<sup>14</sup>C]phénylalanine, 1014 coups/min.

2. L'incorporation est inhibée par l'addition au milieu d'incubation de dinitrophénol à la concentration de 10<sup>-3</sup> M: témoin, 317 coups/min; + dinitrophénol, 13 coups/min, soit 96 % d'inhibition.

3. Pour montrer que l'incorporation a bien lieu dans l'hémoglobine et non dans une autre molécule, protéine, peptide, ou ARN-aminoacides, on purifie deux fois par relargage, en utilisant des solutions de phosphates de moins en moins concentrées, de sorte qu'on ne recueille qu'une fraction de l'hémoglobine. Si l'incorporation a lieu dans une protéine autre que l'hémoglobine, cette protéine sera éliminée au moins partiellement, ou au contraire concentrée, et les traitements successifs modifieront la radioactivité dans le même sens. De plus, à chaque étape, la protéine est dissoute dans 1 N NaOH, précipitée par l'acide trichloracétique à 20 % et chauffée 15 min à 90°: ceci dans le but d'éliminer les composés nucléotidiques. Préparation initiale, 317 coups/min; 1ère purification, 294 coups/min; 2ème purification, 303 coups/min.

4. L'hémoglobine a été également soumise à électrophorèse sur gel d'amidon 3 h à pH 8,6, sous une tension de 4 V/cm<sup>7,8</sup>. On élue 5 bandes de 1 cm de largeur, on ajoute 100 mg d'hémoglobine comme entraîneur, à chaque fraction. La troisième bande correspond à l'hémoglobine initiale; la cinquième bande à la ligne de départ. On observe les radioactivités suivantes: 1ère bande, 0; 2e, 2; 3e, 10; 4e, 0; 5e, 0. La radioactivité est donc localisée dans l'hémoglobine.

5. Pour s'assurer que la [<sup>14</sup>C]fluorophénylalanine est bien incorporée comme telle, on hydrolyse 50 mg de globine, on ajoute 5 mg de fluorophénylalanine comme

Abbréviation: ARN, acide ribonucléïne.

entraîneur. On sépare l'ensemble des composés aromatiques sur charbon<sup>9</sup>, et on isole phénylalanine, tyrosine et fluorophénylalanine par chromatographie bidimensionnelle, selon la technique de BOISSONNAS<sup>10</sup>, reprise par MUNIER ET COHEN<sup>11</sup>. On réalise 16 chromatographies et on élue les taches dont on mesure la radioactivité: tyrosine, 0 coups/min; phénylalanine, 13 coups/min; fluorophénylalanine, 260 coups/min. La faible radioactivité de la phénylalanine peut être due à l'imperfection de certaines chromatographies.

6. Il y a compétition entre l'incorporation de fluorophénylalanine et celle de phénylalanine. Il est difficile de donner des valeurs précises, du fait de la préexistence d'une petite quantité de phénylalanine dans les réticulocytes.

Si l'on incube avec  $0.1 \cdot 10^{-2}$  mM de [<sup>14</sup>C]fluorophénylalanine, l'addition de  $0.1 \cdot 10^{-2}$  mM de phénylalanine provoque 50 % d'inhibition (Fig. I, Courbe I). Lorsque l'on incube avec  $0.1 \cdot 10^{-2}$  mM de [<sup>14</sup>C]phénylalanine, on a une inhibition de 50 % par addition de  $0.5 \cdot 10^{-2}$  mM de fluorophénylalanine (Fig. I, Courbe II).

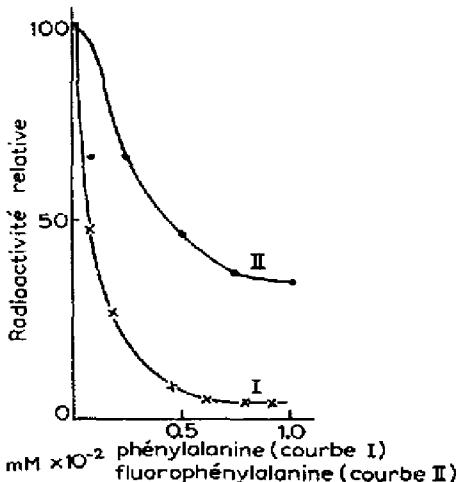


Fig. I. Courbe I = Incorporation de fluorophénylalanine en présence de quantités croissantes de phénylalanine. Courbe II = Incorporation de phénylalanine en présence de quantités croissantes de fluorophénylalanine.

7. Il n'y a pas compétition entre l'incorporation de fluorophénylalanine et celle de tyrosine (Tableau I).

L'incorporation de tyrosine n'est que très légèrement inhibée par la fluorophénylalanine. La tyrosine a une légère action activatrice, car elle participe à la synthèse de la protéine.

8. A concentration relativement élevée, la fluorophénylalanine inhibe la biosynthèse de l'hémoglobine. Au milieu d'incubation, on ajoute de la phénylalanine et de la tyrosine à la concentration finale de 0,2 mM, de la fluorophénylalanine à différentes concentrations et du [<sup>14</sup>C]glycocolle (Tableau II).

Cette inhibition est vraisemblablement due au fait que la fluorophénylalanine, se substituant en partie à la phénylalanine, et s'incorporant moins rapidement, la biosynthèse de l'hémoglobine est ralentie.

TABLEAU I

Incubation	coups/min
[ <sup>14</sup> C]tyrosine	996
+ $0.25 \cdot 10^{-2}$ mM fluorophénylalanine	966
+ $1 \cdot 10^{-2}$ mM fluorophénylalanine	916
[ <sup>14</sup> C]fluorophénylalanine	458
+ $0.25 \cdot 10^{-2}$ mM tyrosine	484
+ $1 \cdot 10^{-2}$ mM tyrosine	532

TABLEAU II

Incubation	coups/min
Témoin	308
+ $0.2 \cdot 10^{-2}$ mM fluorophénylalanine	308
+ $0.5 \cdot 10^{-2}$ mM fluorophénylalanine	278
+ $1 \cdot 10^{-2}$ mM fluorophénylalanine	262
+ $2 \cdot 10^{-2}$ mM fluorophénylalanine	242

Ces expériences montrent que la fluorophénylalanine peut s'incorporer dans l'hémoglobine en se substituant partiellement à la phénylalanine.

Nous remercions les Professeurs G. SCHAPIRA et J. C. DREYFUS pour les discussions au cours de ce travail et Madame L. TIKHONITZKY pour la participation technique.

Nous remercions l'Institut National d'Hygiène, la Caisse Nationale de Sécurité Sociale et le Centre National de la Recherche Scientifique de l'aide apportée à ce travail.

*Laboratoire de Recherches de Biochimie Médicale, Hôpital des Enfants-Malades, Paris (France)*

JACQUES KRUH  
JEAN ROSA

- <sup>1</sup> M. VAUGHAN ET D. STEINBERG, *Symp. VIII Congrès International de Biochimie, Vienne*, 1958.
- <sup>2</sup> P. D. BOYER ET E. W. WESTHEAD, *Im. Chem. Soc., abstracts of meetings*, September 1958.
- <sup>3</sup> J. KRUH ET H. BORSOK, *J. Biol. Chem.*, 226 (1956) 605.
- <sup>4</sup> J. KRUH, J. C. DREYFUS, G. SCHAPIRA ET P. PADIEU, *J. Biol. Chem.*, 228 (1957) 113.
- <sup>5</sup> J. ROCHE, Y. DERRIEN ET M. MOUTTE, *Bull. Soc. Biol.*, 23 (1941) 1114.
- <sup>6</sup> M. L. ANSON ET A. E. MIRSKY, *J. Gen. Physiol.*, 13 (1930) 409.
- <sup>7</sup> O. SMITHIES, *Biochem. J.*, 61 (1955) 620.
- <sup>8</sup> M. D. POULIK, *Nature*, 180 (1957) 1477.
- <sup>9</sup> C. FROMAGEOT, M. JUTISZ ET E. LEDERER, *Biochim. Biophys. Acta*, 2 (1948) 487.
- <sup>10</sup> R. A. BOISSONNAS, *Helv. Chim. Acta*, 33 (1950), 1066.
- <sup>11</sup> R. MUNTER ET G. N. COHEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 21 (1956) 592.

Reçu le 20 décembre 1958

## Preliminary Notes

### Formation of L-gulonolactone from D-glucuronolactone with TPN L-gulonic dehydrogenase

It has been established by several workers that the immediate precursor of L-ascorbic acid in animal tissue is L-gulonolactone<sup>1-4</sup>. However, the mechanism of formation of the lactone has not yet been elucidated completely. Recently, YAMADA<sup>5</sup> demonstrated the enzymic formation of L-gulonolactone from L-gulonate by the reverse reaction of lactonase I, but HERZ<sup>6</sup> suggested the direct conversion of D-glucuronolactone to L-gulonolactone without any consideration for the action of lactonase. The present paper describes the enzymic formation of L-gulonolactone from D-glucuronolactone by the action of TPN gulonic dehydrogenase which was considered to operate with D-glucuronate<sup>7</sup>.

The supernatant fraction<sup>8</sup> from rat liver was subjected to  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  fractionation (0.40-0.50 satn.), dialysis, and fractionation on DEAE-cellulose column. The second

Abbreviations: TPN, TPNH, oxidized and reduced triphosphopyridine nucleotide; DPNH, reduced diphasphopyridine nucleotide; DEAE, diethylaminoethyl; Tris, tris(hydroxymethyl)-aminomethane.