

Cinétique de l'incorporation de la [¹⁴C]arginine dans différents peptides de l'hémoglobine de lapin

L'étude de l'incorporation du glycocolle¹ et de la phénylalanine² dans l'hémoglobine de lapin après incubation de réticulocytes a montré une inégalité de marquage de l'acide aminé dans la globine, après une incubation comprise entre 1 h et 4 h. Ces résultats impliquent une synthèse non instantanée de la molécule protéique avec l'existence possible de peptides intermédiaires libres ou liés à la matrice ribonucléique. Pour étudier avec plus de précision la cinétique de l'incorporation, nous avons hydrolysé la globine préalablement marquée *in vitro* par la [¹⁴C]arginine après différents temps d'incubation et séparé les peptides formés par la méthode d'INGRAM³; l'arginine a été isolée des différents peptides et son activité spécifique mesurée.

Les globules rouges de lapin traités à la phénylhydrazine sont incubés selon la technique de BORSOOK *et al.*⁴ modifiée² en présence de 20 μ C d'arginine par ml de culot globulaire.

L'hémoglobine est préparée selon ROCHE, DERRIEN ET MOUTTE⁵ et la globine selon ANSON ET MIRSKY⁶. Les fractionnements des chaînes peptidiques α et β sont effectués selon WILSON ET SMITH⁷; l'hydrolyse trypsique et les "finger prints" sont réalisés selon INGRAM⁸. Les autoradiographies effectuées sur film Kodirex durent de 1 à 3 mois.

Les peptides repérés par autoradiographie sont découpés, élués par l'eau, évaporés, repris par HCl 6 N distillé 3 fois, hydrolysés en ampoule sous vide. Après lavage, on isole par chromatographie en milieu butanol-acide acétique l'acide aminé qu'on évapore sur lame de verre, on mesure sa radioactivité dans un compteur à gaz, et on le dose selon ROSENBERG, ENNOR ET MORRISON⁸. Chaque expérience est faite sur les peptides de quatre "finger prints", de façon que la quantité d'arginine varie entre 2 et 18 μ g.

Les résultats, qui sont résumés dans la Fig. I et le Tableau I, montrent une inégalité de marquage variant avec le temps d'incubation; après une incubation de 10 min,

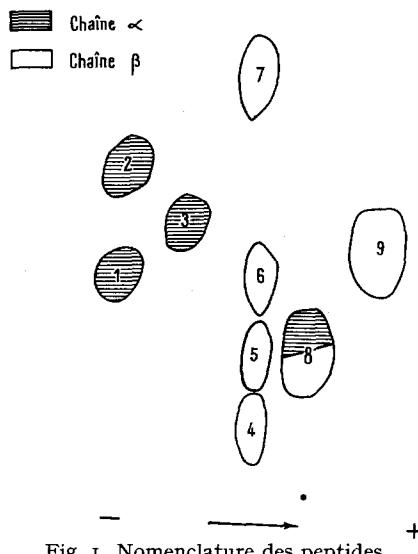


Fig. I. Nomenclature des peptides.

TABLEAU I

VARIATIONS DE L'ACTIVITÉ SPÉCIFIQUE DE L'ARGININE DES DIFFÉRENTS PEPTIDES DE LA GLOBINE
AVEC LA DURÉE D'INCUBATION DES RÉTICULOCTYTES

Nature de la chaîne Dénomination des peptides	α	α	α		β	β	β	α et β	β	
	γ	γ	β	4	5	6	7	8	9	
Durée d'incubation (min)	10	8	12	11	19	12	30	43	14	34
		13	14	12	23	32	35	55	19	72
	50	120	126	116	180	110	143	136	104	213
		112	106	94	107	110	143	91	107	256
	200	240	225	182	246	203	230	250	218	347
		276		210		254	245	223	288	408

cette inégalité est très accentuée, les activités spécifiques variant dans le rapport 1 à 5, puis elle s'atténue avec le temps, elle reste cependant indiscutable pour au moins 1 peptide après 200 min d'incubation.

Les peptides appartenant à la chaîne α semblent initialement moins marqués que ceux provenant de la chaîne β .

Ces résultats permettent d'exclure une synthèse de la globine selon la conception en "fermeture éclair" avec fermeture simultanée de toutes les liaisons peptidiques et établissent le fait que les différents sites de la globine sont synthétisés à des vitesses différentes.

Il est cependant difficile de déduire de ces résultats l'ordre de formation de ces peptides. En effet le peptide le plus marqué peut aussi bien être celui qui se forme le premier lors de la synthèse de l'hémoglobine, que celui qui se forme le dernier, complétant la synthèse de l'hémoglobine; la complexité du problème a bien été montrée par DALGLIESH⁹, les peptides pouvant quitter vraisemblablement en partie la matrice nucléique avant que la molécule protéique soit complètement formée et une seconde molécule pouvant commencer à se synthétiser avant que la précédente soit complète. Si l'on admet que la synthèse de l'hémoglobine dure quelques minutes *in vitro*^{10,11} une persistance de l'inégalité de marquage reste difficile à interpréter en l'état actuel de nos connaissances.

G. SCHAPIRA
J. C. DREYFUS
J. KRUH
D. LABIE

Laboratoire de Recherches de Biochimie Médicale,
149 Rue de Sèvres, Paris (France)

- ¹ J. KRUH, J. C. DREYFUS, G. SCHAPIRA ET P. PADIEU, *J. Biol. Chem.*, 228 (1957) 213.
- ² J. KRUH, J. C. DREYFUS ET G. SCHAPIRA, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 1075.
- ³ V. M. INGRAM, *Biochim. Biophys. Acta*, 28 (1958) 539.
- ⁴ H. BORSOOK, C. L. DEASY, A. J. HAAGEN-SMIT, G. KEIGHLEY AND P. H. LOWY, *J. Biol. Chem.*, 196 (1952) 669.
- ⁵ J. ROCHE, Y. DERRIEN ET M. MOUTTE, *Trav. membres, Bull. soc. chim. biol.*, 23 (1941) 1114.
- ⁶ M. L. ANSON AND A. E. MIRSKY, *J. Gen. Physiol.*, 13 (1930) 469.
- ⁷ S. WILSON AND D. B. SMITH, *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37 (1959) 405.
- ⁸ H. ROSENBERG, A. M. ENNOR AND J. F. MORRISON, *Biochem. J.*, 63 (1956) 153.
- ⁹ C. E. DALGLIESH, *Science*, 125 (1957) 271.
- ¹⁰ L. B. LOFTFIELD AND E. A. EIGNER, *J. Biol. Chem.*, 231 (1958) 925.
- ¹¹ J. KRUH, G. SCHAPIRA ET J. C. DREYFUS, *Biochim. Biophys. Acta*, 39 (1960) 157.

Reçu le 20 septembre, 1960