

## V. ROLE DES POLYPEPTIDE-SYNTHÉTASES DANS LA FORMATION DE PEPTIDES SPÉCIFIQUES EN PRÉSENCE DE RIBONUCLEOSIDE TRIPHOSPHATES

MIRKO BELJANSKI, MONIQUE BELJANSKI ET THÉRÈSE LOVIGNY

*Service de Biochimie Cellulaire, Institut Pasteur, Paris (France)*

(Reçu le 3 mai, 1961)

---

### SUMMARY

*The role of polypeptide synthetases in the formation of specific peptides  
in the presence of ribonucleoside triphosphates*

Polypeptide synthetases purified from crude extracts of *Alcaligenes faecalis*, show the ability to synthesize *in vitro* different peptides from one or several free amino acids when incubated with either ATP, GTP, UTP or CTP. Each of the four ribonucleoside triphosphates is cleaved into ribonucleoside diphosphate and inorganic phosphate in the presence of a rather specific set of L-amino acids. The stoichiometry of the reaction is established. The composition of certain newly formed peptides is determined by chemical and enzymic means.

---

### INTRODUCTION

Dans nos travaux antérieurs<sup>1,2</sup> nous avons démontré l'existence de quatre enzymes spécifiques dans la fraction "EAA" purifiée à partir d'*Alcaligenes faecalis*. Ces enzymes activent l'incorporation des acides aminés dans les fragments subcellulaires provenant de ces mêmes bactéries<sup>3</sup>. Ils transfèrent le phosphore terminal des ribonucléoside triphosphates aux ribonucléoside diphosphates homologues. De plus, ils catalysent la libération du phosphore terminal à partir de chacun des quatre ribonucléoside triphosphates en présence de L-acides aminés. La libération de l'orthophosphate est accompagnée de synthèse de liaisons peptidiques<sup>2</sup>.

Dans le présent travail nous montrons que les 18 L-acides aminés individuellement testés pour la libération de l'orthophosphate se répartissent essentiellement en quatre groupes distincts, chaque groupe étant spécifique d'un des quatre ribonucléoside triphosphates. Les enzymes de la fraction "EAA" sont capables de synthétiser à partir d'un ou de plusieurs acides aminés des peptides différents selon la source d'énergie (ATP ou GTP ou UTP ou CTP). La stoechiométrie de cette réaction est établie. C'est le groupement carboxylique de l'acide aminé qui est activé. Le poids moléculaire de certains peptides a été déterminé.

---

Abréviation: TCA, acide trichloroacétique.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

*Préparation de la fraction enzymatique "EAA"*

Le mode d'isolement et de purification de la fraction enzymatique "EAA" ("amino acid incorporation enzymes") à partir d'*Alcaligenes faecalis* No. 1850 a été déjà publié<sup>3,4</sup>. La fraction purifiée est essentiellement dépourvue des activités enzymatiques suivantes: ATPase, pyrophosphatase, polynucléotide phosphorylase, myokinase, diphosphonucléoside kinase ainsi que les enzymes qui catalysent l'échange ATP-PP<sub>3</sub> en présence de L-acides aminés. Ni en présence ni en absence d'acides aminés, l'échange entre le <sup>32</sup>P et le phosphore terminal de chacun des quatre ribonucléoside triphosphates n'est catalysé par la fraction "EAA".

*Libération du phosphore terminal des ribonucléoside triphosphates en présence d'acides aminés*

Les conditions d'incubation pour l'étude de la "réaction de libération" de l'orthophosphate sont décrites dans la légende du Tableau I. La réaction est arrêtée par addition de TCA à 10%. Les protéines sont éliminées par centrifugation et l'orthophosphate du surnageant est déterminé par deux méthodes différentes<sup>5,6</sup>. Le surnageant peut aussi être chromatographié sur papier<sup>7</sup>; les nucléotides sont élués et dosés spectrophotométriquement.

*Formation de peptides*

Les acides aminés sont incubés en l'absence et en présence soit d'ATP, GTP, UTP ou de CTP dans les conditions indiquées par la légende de la Fig. 4. La réaction

TABLEAU I

μMOLES DE PHOSPHORE LIBÉRÉ PAR HEURE ET PAR MG DE PROTÉINES "EAA"

Milieu d'incubation: 100 μmoles de tampon Tris pH 8.1, 5 μmoles de MgCl<sub>2</sub>, 5 μmoles de KF, 3 μmoles de L-acide aminé, 1 μmole de ribonucléoside triphosphate, 200 μg d'enzyme "EAA".  
Volume final 1 ml. Incubation 1 h à 34°.

L-acides aminés	ATP	GTP	UTP	CTP
Sans	< 0.01	< 0.01	< 0.01	< 0.01
Glycine	2.45	0.70	< 0.01	< 0.01
Alanine	1.51	1.12	0.92	< 0.01
Aspartate	2.24	< 0.01	0.20	0.42
Cystine	1.51	< 0.01	< 0.01	0.93
Tyrosine	< 0.01	< 0.01	0.42	0.70
Tryptophane	1.50	< 0.01	1.40	< 0.01
Sérine	1.12	0.42	< 0.01	< 0.01
Glutamate	0.92	2.00	0.42	< 0.01
Lysine	0.70	< 0.01	< 0.01	0.94
Proline	0.42	0.70	0.70	< 0.01
Cystéine	1.81	1.81	< 0.01	1.32
Leucine	< 0.01	< 0.01	2.38	1.40
Valine	< 0.01	< 0.01	< 0.01	1.40
Phénylalanine	< 0.01	< 0.01	< 0.01	1.40
Histidine	< 0.01	< 0.01	< 0.01	0.84
Isoleucine	< 0.01	< 0.01	1.10	< 0.01
Thréonine	< 0.01	1.52	< 0.01	< 0.01
Arginine	< 0.01	1.50	0.56	< 0.01
Méthionine	< 0.01	0.56	1.12	< 0.01

est arrêtée soit par chauffage à 100° pendant 30 sec, soit par l'alcool éthylique ou par l'acide perchlorique. Les protéines sont éliminées par centrifugation. Le surnageant contenant les acides aminés et les peptides est concentré sous vide puis chromatographié.

### *Détection de peptides*

*Analyse chromatographique:* Selon les conditions de l'expérience nous avons utilisé le papier Whatman No. 1 ou 2. La chromatographie descendante, uni- ou bi-dimensionnelle fut pratiquée à l'aide des solvants suivants: butanol-acide acétique-eau (25:6:25 ou 4:1:6); phénol-eau (9:1); pyridine-eau (8:2); propanol-eau (8:2); les acides aminés libres ou engagés en liaisons peptidiques sont révélés par radioautographie ou parfois par pulvérisation sur les chromatogrammes d'une solution de ninhydrine à 0.2 % dans du butanol saturé d'eau. Certains "peptides" ont été élués puis analysés.

*Hydrolyse acide:* Les "peptides" élués ont été hydrolysés à l'aide d'acide chlorhydrique 6 N pendant 14 h à 110°. Après élimination de l'acide par évaporation, la chromatographie de l'hydrolysate permet de retrouver le ou les acides aminés libres mis dans le milieu d'incubation. Par contre, les "peptides" ne sont plus détectables.

*Hydrolyse enzymatique:* La trypsine fut utilisée pour l'analyse de certains "peptides". Le milieu d'incubation contenait: 50 µg de bicarbonate de soude pH 7.6; 100 µg de solution de trypsine; 0.1 ml de solution de polypeptide. Volume final 1 ml. La réaction est arrêtée, après 16 h d'incubation à 34°, par chauffage pendant 3 min à 100° en présence d'éthanol. Après centrifugation, le surnageant est concentré et chromatographié sur papier Whatman No. 2 en deux dimensions.

### *Technique au fluorodinitrobenzène*

Nous avons utilisé la technique au 1-fluoro-2,4-dinitrobenzène décrite par SANGER<sup>8</sup> et BISERTE<sup>9</sup> afin de préciser quel acide aminé occupe la position N terminale dans les peptides mixtes. Cette technique permet également de déterminer la nature des peptides formés à partir d'un seul acide aminé. Au peptide dissous dans 0.2 ml d'une solution de bicarbonate de soude à 1 %, on ajoute 20 µl de FDNB dans 0.2 ml d'alcool éthylique à 95°. Agitation mécanique pendant 2 h à 37° à l'obscurité. L'alcool est éliminé et l'excès de FDNB est enlevé par épuisements à l'éther éthylique distillé et privé de peroxydes. La solution aqueuse est évaporée à sec et le résidu hydrolysé à l'aide d'acide chlorhydrique 5.7 N pendant 8 h à 105°. L'acide est évaporé et l'hydrolysate chromatographié sur papier. Les DNP-dérivés séparés des acides aminés libres sont élués<sup>10</sup> et dosés soit dans le Beckman à 360 mµ soit par la mesure de la radioactivité. La concentration des acides aminés libres est déterminée par la méthode colorimétrique à la ninhydrine<sup>10</sup> ou par la détermination de la radioactivité.

Les L- et D-acides aminés proviennent de chez Hoffmann La Roche et de chez "California Foundation for Biochemical Research". Les L-acides aminés uniformément marqués en <sup>14</sup>C proviennent du Service des Isotopes de l'Institut Pasteur. La trypsine est un produit commercial de Worthington, Inc. (U.S.A.). Les ribonucléoside-5'-triphosphates et les ribonucléoside-5'-diphosphates sont produits par Sigma Chemical Company, St. Louis (U.S.A.). Le chloramphénicol provient des laboratoires français de chimiothérapie, Roussel. Films Kodirex de la maison Kodak.

## RÉSULTATS

*Libération de l'orthophosphate*

Le transfert du phosphore entre des nucléotides homologues<sup>1</sup> suggérait qu'en présence de la fraction "EAA" les acides aminés pouvaient catalyser la libération du phosphore terminal à partir des ribonucléoside triphosphates. Le Tableau I montre que le système enzymatique ne catalyse la libération d'orthophosphate à partir d'ATP, GTP, UTP et de CTP qu'en présence d'acides aminés. Cette libération, linéaire pendant 3 h dans les conditions expérimentales utilisées (Fig. 1), est dépendante non

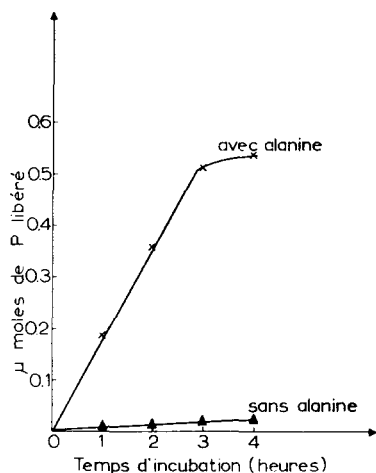


Fig. 1. Conditions identiques à celles décrites dans la légende du Tableau I. Temps d'incubation de 1, 2, 3 et 4 h.

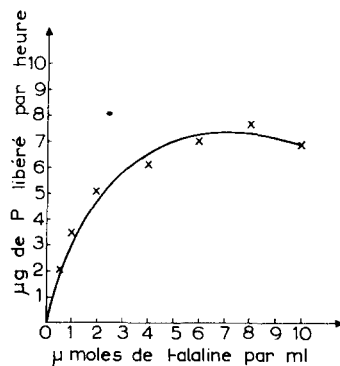


Fig. 2. Conditions décrites dans la légende du Tableau I. 2 μmoles d'ATP et différentes concentrations de L-alanine.

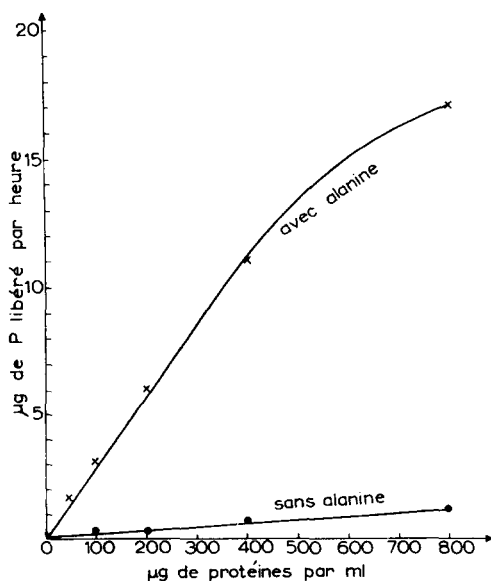


Fig. 3. Conditions décrites dans la légende du Tableau I. 2 μmoles d'ATP, 6 μmoles de L-alanine, différentes concentrations d'enzymes (μg).

seulement de la nature des acides aminés, mais aussi de leur concentration. Une concentration supérieure à celle indiquée dans la légende de la Fig. 2 inhibe la réaction. La Fig. 3 montre que la libération de l'orthophosphate est proportionnelle à la concentration de l'enzyme au dessous de 0.4 mg de protéines/ml. Le chauffage de ce dernier à 70° pendant 5 min détruit irréversiblement l'activité enzymatique de la fraction "EAA".

On remarque dans le Tableau I que l'effet des acides aminés activant la "réaction de libération" est dans une large mesure spécifique et différent pour chaque ribonucléoside triphosphate. Cette observation confirme que les enzymes de la fraction "EAA" sont spécifiques non seulement d'un nucléotide particulier<sup>1</sup> mais aussi de certains acides aminés activateurs de la "réaction de libération". Nous avons également étudié l'effet de différents analogues structuraux des acides aminés. Il est intéressant de remarquer que les analogues s'incorporant dans les protéines (*p*-fluorophénylalanine,  $\beta$ -2-thiénylalanine, norleucine<sup>11,12</sup>) sont actifs pour la libération de l'orthophosphate en présence du système enzymatique "EAA". Par contre le 5-méthyltryptophane qui ne semble pas être incorporé dans les protéines<sup>13</sup> est inactif dans cette réaction.

*Nature de certains peptides formés respectivement en présence d'ATP, UTP, GTP et CTP et d'un ou de plusieurs L-acides aminés*

L'effet des L-acides aminés sur la libération de l'orthophosphate à partir non seulement d'ATP, mais également des autres ribonucléoside triphosphates donnait à penser que la formation des peptides observés initialement en présence d'ATP devait également s'observer en présence de GTP, UTP et de CTP.

*Polypeptides d'un même acide aminé*

Incubée en présence de la fraction "EAA" la L-alanine catalyse la libération de l'orthophosphate principalement à partir d'ATP, nettement moins à partir de GTP et d'UTP, pas à partir de CTP (Tableau I). L'analyse chromatographique du sur-nageant provenant du milieu d'incubation de la fraction "EAA" en présence de [<sup>14</sup>C]alanine et d'ATP ou de GTP a révélé outre le [<sup>14</sup>C]alanine ( $R_F$  0.23), l'existence de nouvelles taches radioactives de  $R_F$  très différents (0.18, 0.10, 0.00 avec ATP; 0.10 et 0.08 avec GTP) (Fig. 4). L'analyse à l'aide du fluorodinitrobenzene des nouvelles taches formées en présence d'ATP a montré que chaque nouvelle tache représente un seul type de peptides constitués de [<sup>14</sup>C]alanine. Le DNP-[<sup>14</sup>C]alanine n'étant pas hydrolysable par l'acide chlorhydrique on peut déterminer, après hydrolyse acide de nos peptides dinitrophénylés, le rapport entre la concentration du DNP-[<sup>14</sup>C]alanine et celle du [<sup>14</sup>C]alanine libérée par hydrolyse. Ce rapport établit le nombre de molécules d'alanine polymérisées en liaisons peptidiques (Tableau II).

Nous avons pu obtenir en quantité mesurable et dans le cas de l'alanine seule incubée en présence d'ATP uniquement, les peptides suivants: dipeptide, tétrapeptide, octopeptide.

Certains peptides formés à partir du [<sup>14</sup>C]alanine en présence de GTP ne semblent pas formés en présence d'ATP (Fig. 4). Le GTP ainsi que l'UTP n'étant pas contaminés par de l'ATP, il est clair que ces nucléotides sont utilisés comme source d'énergie pour la formation des liaisons peptidiques.

*Stoechiométrie:* La relation entre la dégradation de l'ATP en ADP avec libération d'orthophosphate et le nombre de liaisons peptidiques formées est stoechiométrique

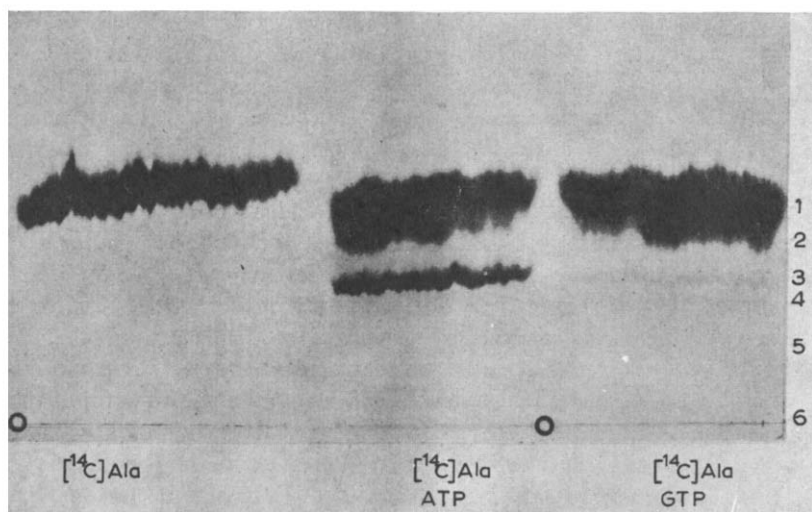


Fig. 4 Milieu d'incubation: 200  $\mu$ moles de tampon Tris pH 8.1, 10  $\mu$ moles de  $MgCl_2$ , 2  $\mu$ moles d'ATP (ou de GTP), 6  $\mu$ moles de L- $[^{14}C]$ alanine (250 000 coups/min); 500  $\mu$ g de protéines "EAA". Volume final 1 ml. Incubation 2 h à 34°. Whatman No. 1. Solvent propanol-eau. 1,  $[^{14}C]$ alanine; 2, dipeptide; 3, tetrapeptide; 6, octopeptide. Radioautogramme 3 jours.

TABLEAU II

ANALYSE DES PEPTIDES FORMÉS EN PRÉSENCE D'ATP À PARTIR DE  $[^{14}C]$ ALANINE

Conditions décrites dans la légende de la Fig. 4.

DNP-peptides							
Temps d'incubation (h)	Peptides	Sans hydrolyse (coups/min)	Après hydrolyse				Nombre de résidus de [ <sup>14</sup> C]alanine dans les peptides
			DNP-[ <sup>14</sup> C]alanine		[ <sup>14</sup> C]alanine libre		
			(coups/min)	(μmoles)	(coups/min)	(μmoles)	
1	No. 2	39 125	16 400	0.46	16 790	0.48	2
	No. 2	8304	4070	0.12	3780	0.11	2
2	No. 3	55 684	13 670	0.39	40 036	1.20	4
	No. 6	2090	210	0.006	1680	0.05	8

TABLEAU III

LIEN STOECHIO MÉTRIQUE ENTRE LA DÉGRADATION DE L'ATP  
ET LA SYNTHÈSE DE PEPTIDES

Conditions décrites dans la légende de la Fig. 4. Incubation 1 et 2 h.

Temps d'incubation (h)	Phosphore libéré ( $\mu$ moles)	ADP apparu ( $\mu$ moles)	AMP apparu ( $\mu$ moles)	Liaisons peptidiques formées ( $\mu$ moles)
1	0.56	0.53	0.01	0.48
2	1.10	1.05	0.03	1.32

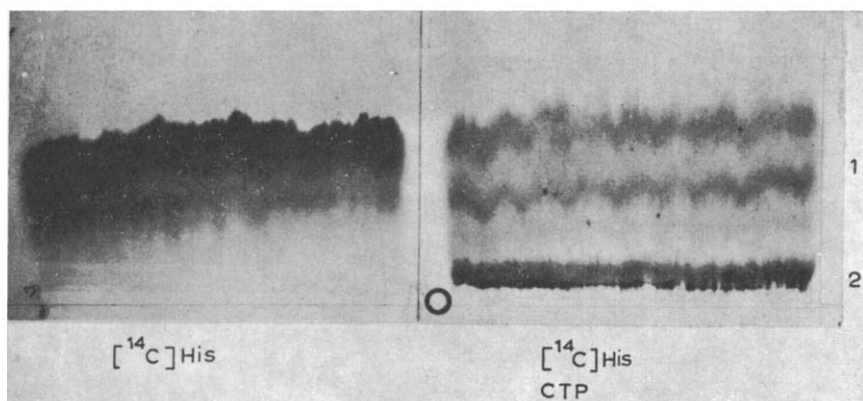


Fig. 5. Conditions décrites dans la légende de la Fig. 4. CTP remplace l'ATP. L-histidine remplace l'alanine. Incubation 1.5 h: 1,  $[^{14}\text{C}]$ histidine; 2, histidyl-histidine.

TABLEAU IV

ANALYSE DU DIPEPTIDE FORMÉ EN PRÉSENCE DE CTP À PARTIR DE  $[^{14}\text{C}]$ HISTIDINE

Peptide obtenu dans les conditions présentées dans la légende de la Fig. 5.

DNP-peptide					
Avant hydrolyse (coups/min)	Après hydrolyse				Nombre de résidus de [ <sup>14</sup> C]histidine
	DNP-[ <sup>14</sup> C]histidine		[ <sup>14</sup> C]histidine libre		
	(coups/min)	(μmole)	(coups/min)	(μmole)	
45 000	22 200	0.66	20 760	0.62	2

(Tableau III). Lors de la synthèse d'un dipeptide nous avons établi que pour une micromole d'ATP dégradé une "micromole de liaison peptidique" est formée.

L'histidine est un des acides aminés qui en présence de la fraction "EAA" ne catalysent la libération de l'orthophosphate qu'à partir d'un seul ribonucléoside triphosphate, le CTP. La chromatographie sur papier du surnageant provenant du milieu d'incubation contenant le CTP, le  $[^{14}\text{C}]$ histidine et la fraction "EAA", révèle outre l'histidine libre, une tache radioactive non loin de l'origine (Fig. 5). L'analyse de cette nouvelle tache (No. 2) à l'aide du fluorodinitrobenzène a montré qu'un seul dérivé dinitrophénylé a été formé. L'hydrolyse acide de ce dernier et la détermination de la radioactivité du DNP- $[^{14}\text{C}]$ histidine et du  $[^{14}\text{C}]$ histidine libre révèle qu'il s'agit d'un peptide: histidyl-histidine (Tableau IV). Des peptides contenant plusieurs résidus d'histidine peuvent être également formés.

#### *Polypeptides de deux acides aminés*

Pour préciser quelle place, dans les peptides formés, occuperait chaque acide aminé selon le ribonucléoside triphosphate utilisé, nous avons incubé deux acides aminés, l'alanine et la phénylalanine en présence d'ATP ou de CTP. Nous savons (Tableau I) que l'alanine catalyse en présence de la fraction "EAA", la dégradation de l'ATP et la phénylalanine celle du CTP.

Nous observons lorsque le nucléotide utilisé est l'ATP, l'apparition de trois

"peptides" (Fig. 6) qui, hydrolysés à l'aide d'HCl redonnent les deux acides aminés. Le groupement N-terminal de ces peptides a été déterminé et correspond dans chaque cas au [ $^{14}\text{C}$ ]alanine. Le peptide No. 1 est constitué de deux résidus de [ $^{14}\text{C}$ ]alanine et d'un résidu de phénylalanine. Le peptide No. 3 est constitué de 4 résidus de [ $^{14}\text{C}$ ]alanine et d'un résidu de phénylalanine (Tableau V). La phénylalanine occuperait dans ces peptides la position carboxyl terminale.

Lorsqu'en présence de la fraction enzymatique "EAA", c'est maintenant le CTP qui est incubé avec l'alanine et la [ $^{14}\text{C}$ ]phénylalanine, la radioautographie du surnageant révèle outre la [ $^{14}\text{C}$ ]phénylalanine, la présence de nouvelles bandes radio-

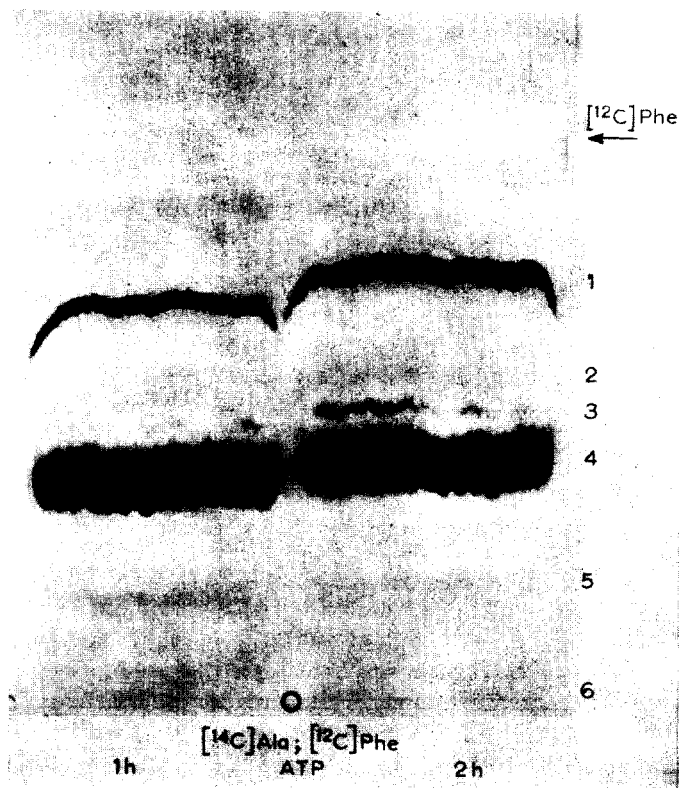


Fig. 6. Milieu d'incubation: 200  $\mu$ moles de tampon Tris pH 8.1, 10  $\mu$ moles de  $\text{MgCl}_2$ , 3  $\mu$ moles d'ATP, 6  $\mu$ moles de L- $^{14}\text{C}$ ]alanine (250000 coups/min), 3  $\mu$ moles de L-phénylalanine, 500  $\mu\text{g}$  d'enzyme "EAA". Incubation 1 et 2 h à 34°. Whatman No. 1. Solvent propanol-eau. 1, tripeptide mixte; 3, pentapeptide mixte; 4, [ $^{14}\text{C}$ ]alanine; 5, tétrapeptide à alanine; 6, octopeptide à alanine. Radioautogramme 3 jours.

actives (Fig. 7). Après élution et hydrolyse acide ces nouvelles bandes redonnent les deux acides aminés utilisés au départ. La faible quantité de peptides formés ne nous a pas permis d'en déterminer le poids moléculaire. Toutefois, le traitement de ces peptides par le fluorodinitrobenzène, a permis de constater que chaque bande nouvelle est constituée d'un seul type de peptide; dans chaque peptide de cette série c'est la phénylalanine qui occupe la place N-terminale.

Les résultats obtenus à l'aide de ces deux ribonucléoside triphosphates montrent clairement qu'en partant de deux acides aminés, le système enzymatique "EAA" est



TABLEAU V  
ANALYSE DES PEPTIDES NO. 1 ET 3 FORMÉS EN PRÉSENCE D'ATP  
À PARTIR DE  $[^{14}\text{C}]$ ALANINE ET DE PHÉNYLALANINE  
Les DNP-peptides contiennent tout le  $[^{14}\text{C}]$ alanine.

DNP-peptides								
Peptides	Avant hydrolyse (coups/min)	Après hydrolyse				Phénylalanine libre (μmoles)	Nombre de résidus dans les peptides [ <sup>14</sup> C]alanine et [ <sup>14</sup> C]phénylalanine	
		DNP-[ <sup>14</sup> C]alanine		[ <sup>14</sup> C]alanine libre				
		(coups/min)	(μmoles)	(coups/min)	(μmoles)			
No. 1	34 018	17 750	0.74	18 604	0.75	0.69	2	1
No. 3	6630	1620	0.067	4924	0.20	0.06	4	1



Fig. 7. Milieu d'incubation: 200  $\mu$ moles de tampon Tris pH 8.1, 10  $\mu$ moles de  $\text{MgCl}_2$ , 3  $\mu$ moles de CTP, 6  $\mu$ moles de L- $[^{14}\text{C}]$ phénylalanine (250000 coups/min), 3  $\mu$ moles de L-alanine. Volume final 1 ml. Incubation 1 h à 34° Whatman No. 1. Solvent propanol-eau. 1,  $[^{14}\text{C}]$ phénylalanine; 2, peptide à phényl; 3, 4, 5 et 6 peptides mixtes. Radioautogramme 3 jours.

capable de synthétiser des peptides différents selon que la source d'énergie est l'ATP ou le CTP. Ces résultats fournissent également la preuve que c'est le groupement carboxylique des acides aminés qui est "activé" par le système enzymatique.

#### *Polypeptides de plusieurs acides aminés*

Il fallait vérifier que, dans les peptides formés par la fraction "EAA" en présence des 4 ribonucléoside triphosphates et de 18 L-acides aminés, différentes combinaisons

d'acides aminés pouvaient se réaliser dans les peptides. Nous avons inclu 4 acides aminés marqués au  $^{14}\text{C}$ : arginine, leucine, alanine, phénylalanine, chacun étant spécifique d'un nucléotide. La concentration choisie assurait la libération de l'orthophosphate à partir du nucléotide correspondant. Il faut préciser que les protéines enzymatiques précipitées et lavées après incubation d'un tel mélange ne contiennent pas de radioactivité. L'autoradiogramme du surnageant révèle, outre les 4 acides aminés marqués, la présence de plusieurs nouvelles taches radioactives de  $R_F$  différents (Fig. 8). La "nouvelle tache" No. 1 a été éluée et analysée. L'hydrolyse par

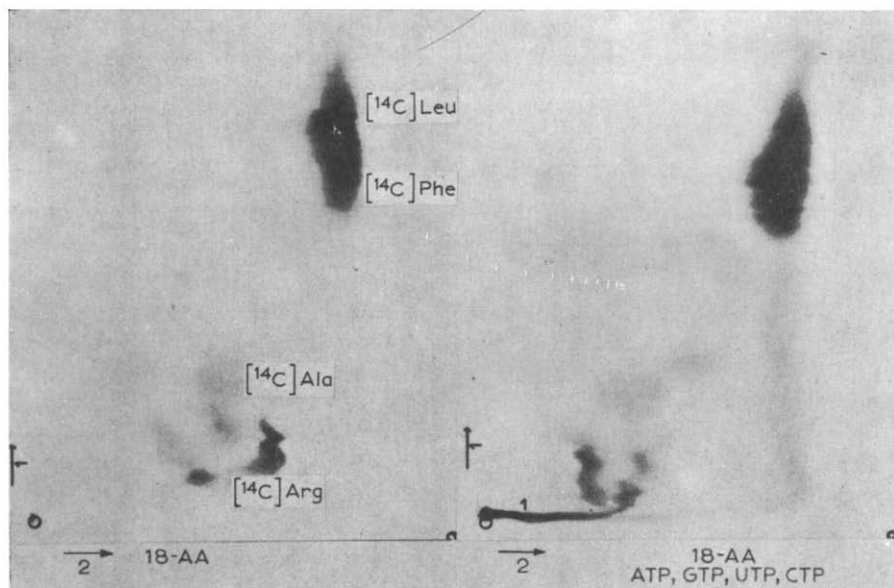
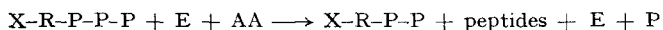


Fig. 8. Milieu d'incubation: 200  $\mu\text{moles}$  de tampon Tris pH 8.1, 10  $\mu\text{moles}$  de  $\text{MgCl}_2$ , 2  $\mu\text{moles}$  d'ATP, 2  $\mu\text{moles}$  de GTP, 2  $\mu\text{moles}$  d'UTP, 2  $\mu\text{moles}$  de CTP, 5  $\mu\text{moles}$  d'un mélange de 18 L-acides aminés, 3  $\mu\text{moles}$  (200 000 coups/min) de chacun des acides aminés suivants: L-arginine, L-alanine, L-leucine, L-phénylalanine; 600  $\mu\text{g}$  de fraction enzymatique "EAA". Volume final 1.5 ml. Incubation 2 h à  $34^\circ$ . Whatman No. 2. Solvants: butanol-acide acétique-eau; phénol-eau. Radioautogramme 2 jours.

la trypsine a donné trois peptides qui chacun, après hydrolyse à l'acide chlorhydrique, redonne 7 acides aminés dont les 4 acides aminés déjà cités. La trypsine agissant sur la chaîne peptidique au niveau de l'arginine et de la lysine, ces résultats montrent qu'il s'agit d'un polypeptide.

Nous proposons de remplacer l'appellation initiale, fraction enzymatique "EAA", par le nom plus approprié de chacun des enzymes qui la constituent: ATP-polypeptide synthétase; GTP-polypeptide synthétase; UTP-polypeptide synthétase; CTP-polypeptide synthétase. Il est vraisemblable que ces enzymes agissent selon le schéma suivant:



Rappelons que le glutathion ( $\gamma$ -peptide) a été synthétisé *in vitro* à l'aide d'un enzyme purifié par SNOKE ET BLOCH<sup>13</sup>, synthèse répondant à ce schéma.

CONCLUSIONS ET DISCUSSION

Les 4 enzymes spécifiques appelés polypeptide synthétases, que nous avons isolés à partir d'*Alcaligenes faecalis*, sont capables de dégrader en présence de L-acides aminés les ribonucléoside triphosphates (ATP, GTP, UTP, CTP) en ribonucléoside diphosphates avec apparition de l'orthophosphate. Les résultats ont montré que chaque enzyme est spécifique non seulement d'un nucléotide donné, mais également d'un groupe d'acides aminés. Toutefois, certains de ces derniers se montrent capables d'activer la "réaction de libération" en présence de deux ou de trois nucléoside triphosphates différents. On peut obtenir des peptides avec chacun des ribonucléoside triphosphates utilisés séparément et le ou les acides aminés spécifiques de ce nucléotide. Des peptides constitués d'un même acide aminé ou bien des peptides mixtes peuvent être formés. Tous ces  $\alpha$ -peptides sont acido-solubles. On constate qu'en présence de deux acides aminés dont l'un active la libération du phosphore terminal d'un ribonucléoside triphosphate et l'autre pas il se forme des peptides tels que le résidu N terminal est constitué par l'acide aminé activateur de la "réaction de libération". Nous en concluons que la réaction conduisant à la formation des peptides résulte de l'activation du groupement carboxylique des acides aminés.

Si les polypeptide synthétases dont nous venons de parler représentent le système enzymatique indispensable à la polymérisation des acides aminés on doit les retrouver dans d'autres espèces bactériennes ou animales. NISMAN ET FUKUHARA<sup>14</sup> ont partiellement purifié à partir d'*Escherichia coli* des enzymes catalysant en présence d'acides aminés la dégradation des ribonucléoside triphosphates selon la réaction que nous avons déjà décrite<sup>2</sup>. Ils ont remarqué que la spécificité des acides aminés pour les enzymes provenant d'*Escherichia coli* était différente de celle observée avec les enzymes que nous avons isolés à partir d'*Alcaligenes faecalis*. Les préparations enzymatiques obtenues par précipitation à pH 5.0 du surnageant isolé à partir du foie de rats selon la technique de HOAGLAND *et al.*<sup>15</sup> contiennent également les 4 polypeptide synthétases<sup>17</sup>. Le spectre de spécificité vis à vis des acides aminés est différent de celui observé avec les enzymes isolés à partir d'*Alcaligenes faecalis* et d'*Escherichia coli*. ZALTA<sup>16</sup> a montré que les granules préparés à partir de microsomes du foie de rats, capables d'incorporer les acides aminés contiennent également ces mêmes enzymes. Ce système semble exempt d'enzymes catalysant l'échange ATP-PP<sup>32</sup>.

La question se pose maintenant de savoir quel est le rôle de ces systèmes enzymatiques dans la biosynthèse des protéines proprement dites et comment nos résultats se situent par rapport à ceux obtenus par HOAGLAND<sup>18</sup>. Rappelons que cet auteur a montré que des enzymes spécifiques présents dans le cytoplasme des tissus animaux "activent" les acides aminés uniquement en présence d'ATP (ATP-PP<sup>32</sup>).

Pour situer les polypeptide synthétases dans le cadre de la biosynthèse des protéines nous soulignons les points suivants: (a) Les préparations enzymatiques "EAA" contenant les polypeptide synthétases accélèrent l'incorporation des acides aminés dans des chaînes polypeptidiques<sup>4</sup>. (b) Dans ces mêmes préparations nous n'avons pu révéler l'existence des enzymes catalysant en présence d'acides aminés, l'échange entre le pyrophosphate et l'ATP. Ce résultat ne contredit pas la participation de ces derniers enzymes (ATP-PP<sup>32</sup>) dans l'incorporation des acides aminés dans les protéines. (c) Chaque polypeptide synthétase utilise en présence d'acides aminés spécifiques un ribonucléoside triphosphate pour la synthèse des peptides.

(d) Dans la préparation (enzymes à pH 5.0) décrite par HOAGLAND, fraction indispensable à la synthèse des protéines, nous avons mis en évidence<sup>17</sup> la présence des 4 polypeptide synthétases; ainsi peut s'expliquer la nécessité du GTP dans le système de cet auteur. Nous avons montré en particulier, qu'en présence de GTP comme seul nucléoside triphosphate, cette préparation enzymatique synthétise de nombreux peptides<sup>17</sup>. (e) Le chloramphénicol, inhibiteur de la biosynthèse des protéines, inhibe l'activité des polypeptide synthétases d'origine bactérienne<sup>2</sup> ou animale<sup>17</sup> en présence de certains acides aminés.

L'ensemble de ces observations montre que les polypeptide synthétases sont capables de réaliser la synthèse des liaisons peptidiques. Il s'agit de préciser le mécanisme par lequel ces enzymes participent dans la biosynthèse des protéines proprement dites.

#### REMERCIEMENT

Remerciements très vifs à Monsieur le Professeur J. MONOD pour tout l'intérêt qu'il a bien voulu porter à ce travail.

#### RÉSUMÉ

Les polypeptide synthétases purifiées à partir d'extraits d'*Alcaligenes faecalis* possèdent la capacité de synthétiser *in vitro* différents peptides à partir d'un ou de plusieurs acides aminés en présence soit d'ATP, GTP, UTP ou de CTP. Un groupe spécifique de L-acides aminés permet la dégradation de chacun des quatre ribonucléoside triphosphates en ribonucléoside diphosphate et en phosphore minéral. La stoechiométrie de la réaction est établie. La composition de certains peptides formés est déterminée par les méthodes chimiques et enzymatiques.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> M. BELJANSKI, *Compt. rend.*, 248 (1959) 1446.
- <sup>2</sup> M. BELJANSKI, *Compt. rend.*, 250 (1960) 624.
- <sup>3</sup> M. BELJANSKI ET S. OCHOA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 44 (1958) 494.
- <sup>4</sup> M. BELJANSKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 41 (1960) 104.
- <sup>5</sup> A. P. BRIGGS, *J. Biol. Chem.*, 53 (1922) 13.
- <sup>6</sup> J. L. DELSAL ET H. MANHOURI, *Bull. soc. chim. biol.*, 40 (1958) 1623.
- <sup>7</sup> H. A. KREBS ET R. HEMS, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1956) 172.
- <sup>8</sup> F. SANGER, *Biochem. J.*, 39 (1945) 507.
- <sup>9</sup> G. BISERTE, J. W. HOLLEMAN, J. HOLLEMAN-DEHOVE ET P. SAUTIERE, *J. Chromatography*, 2 (1959) 263.
- <sup>10</sup> R. J. BLOCK, E. K. DURRUM ET G. ZWEIG, *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, Academic Press, Inc. Publ., New York, 1955, p. 102.
- <sup>11</sup> R. S. BAKER, J. E. JOHNSON ET S. W. FOX, *Federation Proc.*, 13 (1954) 178.
- <sup>12</sup> G. N. COHEN ET R. MUNIER, *Biochim. Biophys. Acta*, 31 (1959) 347.
- <sup>13</sup> J. E. SNOKE ET K. BLOCH, *J. Biol. Chem.*, 213 (1955) 825.
- <sup>14</sup> B. NISMAN ET H. FUKUHARA, *Compt. rend.*, 251 (1960) 908.
- <sup>15</sup> M. B. HOAGLAND, E. B. KELLER ET P. C. ZAMECNIK, *J. Biol. Chem.*, 218 (1956) 345.
- <sup>16</sup> J. P. ZALTA, Réunion sur "The Structure of Cytoplasmic Particles and their Role in Protein Synthesis", 28/29 mars, 1960.
- <sup>17</sup> J. P. ZALTA ET M. BELJANSKI, *Compt. rend.*, 253 (1961) 567.
- <sup>18</sup> M. B. HOAGLAND, dans E. CHARGAFF ET J. N. DAVIDSON, Vol. 3, *The Nucleic Acids*, Academic Press, Inc. New York, 1960, p. 349.