

BBA 65544

## INTERACTION ENTRE LA TRYPTOPHANE-tRNA SYNTHÉTASE ET LE TRYPTOPHANE OU CERTAINS ANALOGUES DU TRYPTOPHANE

GENEVIÈVE LEMAIRE, MIREILLE DORIZZI ET B. LABOUESSE

*Institut de Biochimie, Faculté des Sciences, 91-Orsay (France)*

(Reçu le 31 août, 1966)

## SUMMARY

*Interaction between tryptophanyl-sRNA synthetase and tryptophan or certain analogues of tryptophan*

Beef pancreatic tryptophan-sRNA synthetase (L-tryptophan:sRNA ligase (AMP), EC 6.1.1.2) is protected against heat denaturation by L-tryptophan and against *p*-chloromercuribenzoate or proteolytic inactivation by L-tryptophan + ATP. 25 tryptophan analogues were tested. None is as effective as L-tryptophan except L-tryptophan hydroxamate. The other amino acids and ATP alone are totally ineffective. A weak protection is afforded by tryptamine and this protection is enhanced by ATP, though ATP has no action of its own and does not bind covalently to tryptamine.

## INTRODUCTION

Il est établi dans plusieurs cas que de nombreux paramètres structuraux d'un enzyme varient lors de la fixation de son ou ses substrats<sup>1,2</sup>, et que ces variations sont intimement liées à la formation des complexes transitoires que l'on observe cinétiquement<sup>3,4</sup>. La fixation de composés voisins du substrat est toutefois susceptible d'entraîner dans la protéine un changement de conformation différent de celui qu'impose le substrat normal<sup>5</sup> et on peut s'attendre à ce que les propriétés catalytiques de l'enzyme puissent être modifiées par la présence de faux substrats. C'est ainsi que NORRIS ET BERG<sup>6</sup> ont montré que l'isoleucine RNA synthétase était susceptible de former l'adénylate de la valine mais n'était pas capable de transférer la valine sur le tRNA de l'isoleucine. Une telle impossibilité peut être due à une complémentarité rigoureuse entre RNA et acides aminés<sup>7</sup> mais également à un "ajustage mal induit" de l'enzyme par la valine, vis-à-vis du tRNA.

Pour obtenir des informations approfondies sur l'effet de la fixation du substrat sur un enzyme, les aminoacyl-RNA-synthétases sont particulièrement favorables. Il est en effet possible d'isoler le complexe enzyme-AMP-acide aminé<sup>6,8-10</sup> et par

---

Abréviation: tRNA, transfer RNA; PCMB, *p*-chloromercuribenzoate.

conséquent comparer les propriétés chimiques et physico-chimiques de ce complexe et de l'enzyme libre, ce qui est difficile avec la plupart des systèmes enzymatiques. Si des perturbations sont apportées à la structure tertiaire de l'enzyme par la présence du substrat, on peut s'attendre à ce qu'elles se manifestent dans la stabilité de la protéine<sup>11</sup> et une étude préliminaire de l'effet du substrat ou analogues de substrat sur cette stabilité doit permettre de savoir si l'on peut s'attendre à des différences négligeables ou notables.

Dans ce travail le comportement de la tryptophane RNA synthétase en présence de tryptophane ou d'analogues du tryptophane a été étudié à différentes températures et en présence de PCMB ou de trypsine, et les résultats obtenus montrent dans tous les cas un très grand renforcement de la stabilité de la protéine en présence de son substrat.

#### MÉTHODE EXPÉRIMENTALE

##### *Matériel*

*Acides aminés et analogues*: Les acides aminés et les analogues du tryptophane proviennent: L-tryptophane, D-tryptophane et tryptamine: Koch Light Laboratories; DL-7-azatryptophane, 4-methyl-DL-tryptophane, 5-methyl-DL-tryptophane, 6-methyl-DL-tryptophane: Sigma Chemical Company; 3-indole acétate, 3-indole butyrate, 3-indole propionate, indoline: Eastman Organic Chemicals; 5-fluoro-DL-tryptophane: Nutritional Biochemicals Corp.; indole: Riedel De Haen AG; L-tyrosine, L-phénylalanine, L-valine, L-alanine, riboflavine, L-kynurénine sulfate: Calbiochem; L-tryptophane amide: Yeda. Le L-tryptophane éthylester, le N-acétyl-L-tryptophane et l'hydroxamate de L-tryptophane ont été préparés au laboratoire. Il a été vérifié par chromatographie que ces préparations étaient exemptes de tryptophane. Tous les autres produits chimiques sont de qualité analytique.

##### *Dosage de l'activité enzymatique*

L'activité enzymatique de la tryptophane RNA synthétase est dosée par la méthode des hydroxamates<sup>12</sup>. Le processus expérimental est semblable à celui décrit par DAVIE *et al.*<sup>13</sup>. L'unité d'activité est donnée par la quantité d'enzyme nécessaire pour former une  $\mu$ moles d'hydroxamate de tryptophane par ml et par h à 37°. L'activité spécifique est exprimée en  $\mu$ moles d'hydroxamate formé par mg de protéine et par h, la concentration en protéine étant déterminée par turbidimétrie selon la méthode de DAVIE *et al.*<sup>13</sup>. La pyrophosphatase nécessaire aux dosages nous a été généreusement offerte par le Dr. KUNITZ; elle a été également préparée à partir de levure Springer par une méthode adaptée de celles décrites par KUNITZ<sup>14</sup> et par HEPPEL ET HILMOE<sup>15</sup>.

##### *Préparation de la tryptophane RNA synthétase*

La tryptophane RNA synthétase est obtenue à partir de pancréas de boeuf. Les premiers stades de la préparation sont conformes à ceux décrits par DAVIE<sup>16</sup>; ils permettent d'avoir des fractions enzymatiques (Am 60) dont les propriétés sont identiques à celles que rapporte Davie pour ces mêmes fractions. La purification est poursuivie à l'aide d'un traitement thermique à 50° en présence de tryptophane  $10^{-2}$  M, et de chromatographie sur Sephadex G-100. On obtient ainsi des fractions enzyma-

TABLEAU I

## THERMOSSTABILITÉ DE LA TRYPTOPHANE RNA SYNTHÉTASE À DIFFÉRENTS pH ET À DIFFÉRENTES TEMPÉRATURES

Chaque solution contient l'enzyme à la concentration de 0.4 mg/ml dans un tampon Tris-phosphate  $10^{-2}$  M aux pH et aux températures indiqués. La force ionique est amenée à 0.1 par addition de KCl. Après différents temps d'incubation, une partie aliquote est prélevée et diluée dix fois dans le substrat (tryptophane  $10^{-2}$  M, ATP  $10^{-2}$  M;  $MgCl_2$   $10^{-2}$  M, hydroxylamine 1 M, pyrophosphatase 0.1 unité Kunitz/ml, pH 7.8, 37°). Chaque mesure d'activité repose sur au moins 5 déterminations de la quantité d'hydroxamate de tryptophane formé dans le mélange réactionnel en fonction du temps, ce qui permet de vérifier l'absence de dénaturation de l'enzyme pendant le dosage. Les inactivations à chaque pH et à chaque température suivent une cinétique de premier ordre. Les constantes de vitesse sont exprimées en  $min^{-1}$ .

| pH  | $k \times 10^3$ ( $min^{-1}$ ) |     |     |     |
|-----|--------------------------------|-----|-----|-----|
|     | 50°                            | 60° | 65° | 70° |
| 7   | 1.6                            | 3.3 | —   | 40  |
| 7.8 | 5                              | 10  | 30  | 150 |
| 9   | 8                              | —   | —   | —   |

tiques ("G-100") dont l'activité spécifique est de 250 fois supérieure à celle de l'homogénat de départ. Les fractions G-100 ne contiennent pas de nucléotides dans les proportions décelables par un dosage de pentose; le rapport des absorptions à 280 et 260 m $\mu$ , qui est de 0.8 pour les fractions Am 60 devient de 1.8 pour les fractions G-100. La protéine obtenue sédimente à 67 770 tours/min sous forme d'un pic symétrique ( $s_{20,w} = 4.9$  S) et ne donne qu'une bande par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à pH 7. Les fractions G-100 ne permettent la formation d'hydroxamate qu'à partir de tryptophane et de phénylalanine, le rapport de ces activités étant de 100/0.7.

## RÉSULTATS

*Protection contre l'inactivation par la chaleur*

Le Tableau I montre les vitesses d'inactivation de l'enzyme à différentes températures et différents pH. Dans tous les cas ces inactivations suivent une cinétique de premier ordre. En présence de tryptophane  $10^{-2}$  M, à 50°, la protection de l'enzyme est complète à pH 9 aussi bien qu'à pH 7. La Fig. 1 montre qu'au-delà de 50°, l'inactivation de l'enzyme par la chaleur est fortement ralentie par la présence de tryptophane. A 65°, pH 7.8, la constante de vitesse d'inactivation est diminuée de plus de 10 fois par addition de tryptophane. Par contre, l'ATP ne réduit la vitesse d'inactivation que faiblement à la concentration où l'action du tryptophane est maximum; l'addition simultanée d'ATP et de tryptophane n'augmente pas la stabilité de l'enzyme. On peut donc penser que l'adénylate de tryptophane ne protège pas l'enzyme plus que le tryptophane lui-même (Fig. 2); cependant il est probable qu'à la température utilisée cet adénylate est instable et s'hydrolyse. CHAPEVILLE *et al.*<sup>10</sup> ont montré en effet que la demi-vie de l'adénylate de tyrosine est très brève même lorsqu'il est fixé à l'enzyme (5 min à 37°). A l'opposé de ce que BALDWIN ET BERG<sup>17</sup> ont observé avec l'isoleucine RNA synthétase de *E. coli* il y a une forte protection de l'enzyme par l'acide aminé et une faible protection par l'ATP dans le cas de la tryptophane RNA synthétase. La protection par le tryptophane est maximum pour une concentration de  $10^{-2}$  M (Tableau II) et la vitesse d'inactivation à 65° est réduite de moitié par le tryptophane

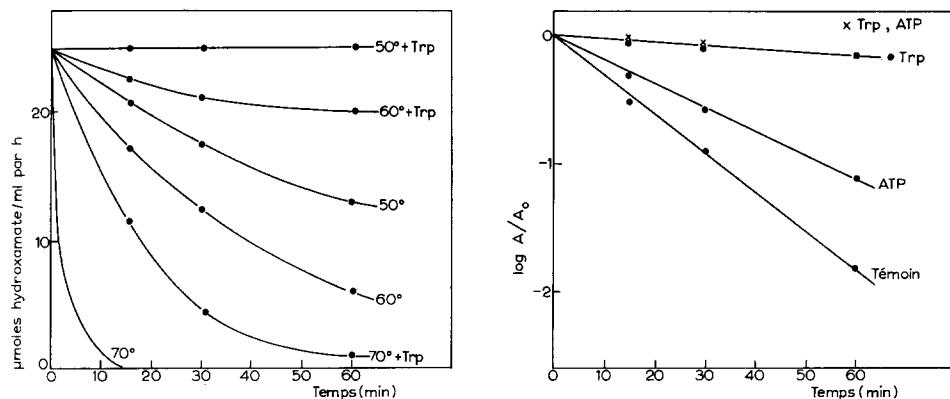


Fig. 1. Thermostabilité de la tryptophane RNA synthétase en présence ou en absence de tryptophane à pH 7.8. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles données dans le Tableau I. La concentration du tryptophane est de  $10^{-2}$  M pendant l'inactivation.

Fig. 2. Protection de la tryptophane RNA synthétase par le tryptophane et l'ATP à pH 7.8, 65°. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles données dans le Tableau I. L'ATP ajouté est sous forme d'une solution équimoléculaire ATP-MgCl<sub>2</sub>. A<sub>0</sub>, activité au temps 0; A, activité au temps t.

à la concentration de  $2 \cdot 10^{-4}$  M. Il faut une concentration en ATP 50 fois supérieure pour obtenir le même résultat. Aux concentrations en tryptophane où la protection est incomplète ( $10^{-3}$  M) l'addition d'ATP ( $10^{-3}$  M) n'apporte aucune protection supplémentaire.

L'addition de cystéine ou de glutathion réduit et d'EDTA ne change pas les vitesses de thermodénaturation, et une incubation avec de la cystéine à 25° après inactivation ne permet pas de regagner l'activité perdue. L'inactivation est accompagnée d'une précipitation irréversible de la protéine.

#### Protection contre l'inactivation par le PCMB

De nombreux enzymes d'activation sont stabilisés par la cystéine et inhibés par

TABLEAU II

THERMOSTABILITÉ DE LA TRYPTOPHANE RNA SYNTHÉTASE EN PRÉSENCE DE TRYPTOPHANE ET D'ATP À pH 7.8, 65°

Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles données dans le Tableau I. Les inactivations suivent une cinétique de premier ordre, et les constantes de vitesse sont exprimées en min<sup>-1</sup>.

| Tryptophane (M)   | ATP-MgCl <sub>2</sub> (M) | $k \times 10^3$ (min <sup>-1</sup> ) |
|-------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| 0                 | 0                         | 30                                   |
| $10^{-3}$         | 0                         | 9.5                                  |
| $2 \cdot 10^{-3}$ | 0                         | 7.5                                  |
| $10^{-2}$         | 0                         | 2.6                                  |
| $3 \cdot 10^{-2}$ | 0                         | 2.6                                  |
| 0                 | $2 \cdot 10^{-2}$         | 18                                   |
| 0                 | $4 \cdot 10^{-2}$         | 11                                   |
| $10^{-2}$         | $10^{-2}$                 | 2.6                                  |
| $10^{-3}$         | $10^{-3}$                 | 10                                   |

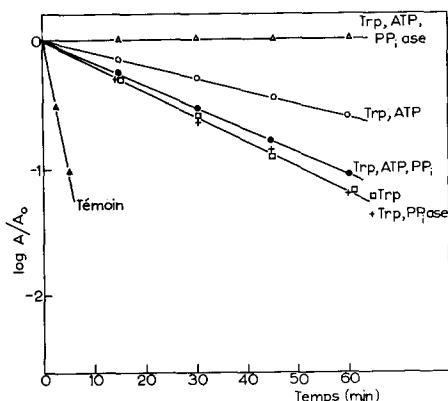


Fig. 3. Protection de la tryptophane RNA synthétase contre l'inactivation par le PCMB à pH 7.8, 25°, par le tryptophane, l'ATP et l'adénylate de tryptophane. Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles données dans le Tableau I. Le PCMB est à la concentration de  $10^{-3}$  M pendant l'inactivation. Il a été vérifié séparément que dans les conditions utilisées (dilution de 10 fois de la prise aliquote dans le substrat de dosage) le PCMB ne provoquait aucune diminution d'activité. La pyrophosphatase (PP<sub>i</sub>ase) est à la concentration de 0.1 unité Kunitz/ml pendant l'inactivation là où sa présence est mentionnée. Tryptophane,  $10^{-3}$  M; ATP,  $10^{-3}$  M; PP<sub>i</sub>,  $10^{-2}$  M.

les composés agissant sur les thiols<sup>18-20</sup>, bien que ce ne soit pas une règle absolue<sup>21</sup>. Dans le cas de la tryptophane RNA synthétase DAVIE *et al.*<sup>13</sup> avait montré une inhibition complète de l'activité enzymatique par le PCMB, partiellement levée par la cystéine et DE LUCA ET McELROY<sup>22</sup> ont montré que 4 groupes -SH par molécule d'enzyme étaient titrables par l'acide 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoïque en présence de tryptophane et 8 en absence de cet acide aminé.

La Fig. 3 montre qu'en présence de PCMB  $10^{-3}$  M l'activité de la tryptophane RNA synthétase est complètement perdue en quelques minutes à 25°, pH 7.8. Cependant contrairement aux observations de DAVIE *et al.*<sup>13</sup> cette inactivation est complètement réversible après addition de cystéine  $2 \cdot 10^{-3}$  M.

L'inactivation est ralentie par le tryptophane  $10^{-3}$  M dont l'effet protecteur est incomplet à cette concentration, et elle n'est pas modifiée par la présence d'ATP seul. Par contre après formation d'adénylate de tryptophane (tryptophane  $10^{-3}$  M + ATP  $10^{-3}$  M + pyrophosphatase) il y a protection complète. Sans pyrophosphatase, et à fortiori après addition de pyrophosphate, il y a pyrophosphorolyse de l'adénylate de tryptophane et la protection est à peine plus grande qu'en présence de tryptophane seul. La protection des groupes -SH essentiels de l'enzyme est donc assurée par le complexe adénylate de tryptophane-enzyme, et non par le tryptophane seul.

#### *Protection contre l'inactivation par protéolyse*

Le Tableau III montre que la tryptophane RNA synthétase est rapidement inactivée par la trypsine. Cette inactivation est ralentie par le tryptophane et par l'ATP, séparément, alors que dans les cas précédents l'ATP seul n'avait pas d'effet. Il est donc vraisemblable que l'action inactivante de la température, du PCMB et de la trypsine ne s'exerce pas sur les mêmes parties de la protéine. Ainsi qu'on l'avait observé dans le cas de l'inactivation par le PCMB, la formation d'adénylate de tryptophane (à l'aide d'une addition de pyrophosphatase) assure une protection meilleure

TABLEAU III

## PROTECTION DE LA TRYPTOPHANE RNA SYNTHÉTASE CONTRE LA PROTÉOLYSE PAR LA TRYPSINE À pH 7.8, 25°

Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles données dans le Tableau I. La trypsine est à la concentration de 20 µg/ml dans le milieu d'incubation et est diluée 10 fois dans le mélange réactionnel. Il a été vérifié séparément qu'à 37°, pH 7.8, en présence de tryptophane 10<sup>-2</sup> M, ATP-MgCl<sub>2</sub> 10<sup>-2</sup> M, pyrophosphatase et hydroxylamine 1 M, la trypsine à la concentration de 2 µg/ml ne modifiait pas significativement l'activité de l'enzyme, et que dans tous les cas l'activité résiduelle des prises aliquotes était constante pendant les 30 min de mesure de l'activité (6 points expérimentaux).

| Tryptophane<br>(M) | ATP-MgCl <sub>2</sub><br>(M) | Pyrophos-<br>phatase<br>(unité<br>Kunitz/ml) | $k \times 10^3$<br>(min <sup>-1</sup> ) |
|--------------------|------------------------------|--|---|
| 0                  | 0                            | —  | 25                                      |
| 10 <sup>-2</sup>   | 0                            | —  | 12                                      |
| 0                  | 3 · 10 <sup>-2</sup>         | —  | 13                                      |
| 10 <sup>-2</sup>   | 10 <sup>-2</sup>             | —  | 8                                       |
| 10 <sup>-4</sup>   | 10 <sup>-4</sup>             | —  | 20                                      |
| 10 <sup>-4</sup>   | 10 <sup>-4</sup>             | 0.1  | 5                                       |

que le tryptophane et l'ATP 10<sup>-2</sup> M seuls. Des résultats identiques ont été obtenus lorsque la protéolyse a lieu sous l'action de la pronase.

*Protection contre l'inactivation thermique et l'inactivation par le PCMB, par des analogues du tryptophane*

Le Tableau IV donne les constantes de vitesse d'inactivation de premier ordre observées en présence d'une série d'analogues du tryptophane, sans ATP, dans des conditions où la protection par le tryptophane seul est complète. On voit que parmi les analogues utilisés un très petit nombre ont une action protectrice importante. Ces analogues présentent, lorsqu'ils sont efficaces: (a) le groupe aminé du tryptophane, libre; (b) le carboxyle du tryptophane, libre, remplacé par une autre charge négative (hydroxamate) ou, avec moins d'efficacité, supprimé (tryptamine).

Le seul dérivé modifié sur le noyau qui maintienne l'inactivation à une vitesse inférieure à 50% de celle observée avec le témoin en présence de PCMB 10<sup>-3</sup> M est le 5-fluorotryptophane. Le 7-azatryptophane, qui est substrat de la tryptophane RNA synthétase, n'assure pas de protection en absence d'ATP; cette incapacité peut être toutefois due à l'affinité assez faible du 7-azatryptophane pour l'enzyme<sup>32</sup>. Enfin on peut remarquer que les mélanges indole + alanine et indole + glycine sont incapables de remplacer le tryptophane.

*Additivité de l'effet protecteur de l'ATP et d'un analogue*

Dans le cas d'une inactivation par le PCMB 10<sup>-3</sup> M, on a vu qu'il n'y a aucune protection par l'ATP 10<sup>-3</sup> M (Fig. 3). On pourrait donc s'attendre à ce que l'addition d'ATP ne modifie pas l'effet protecteur apporté par un analogue du tryptophane. Le Tableau V montre que la protection par la tryptamine, analogue inapte à former un adénylate, puisqu'il ne possède pas de groupe carboxyle, est presque doublée en présence d'ATP. Il apparaît donc que la fixation de l'un des deux substrats favorise la fixation de l'autre et lui permet d'exercer un effet propre sans qu'une liaison covalente existe entre les deux.

TABLEAU IV

## PROTECTION DE LA TRYPTOPHANE RNA SYNTHÉTASE PAR DES ANALOGUES DU TRYPTOPHANE

Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles données dans le Tableau I. (1) d'après SHARON ET LIPPMANN<sup>32</sup>: S, analogue donnant lieu à la formation d'hydroxamate; I, substance inhibitrice; o, sans effet sur l'activité. (2) incubation à 25°, pH 7.8; concentration en analogue 10<sup>-3</sup> M; en PCMB 10<sup>-3</sup> M; (3) incubation à 50°, pH 7.8; concentration en analogue 10<sup>-2</sup> M

| Analogue                     | Substrat ou inhibiteur (1) | $k \times 10^3$ (min <sup>-1</sup> ) |           |
|------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|-----------|
|                              |                            | en présence de PCMB à 25° (2)        | à 50° (3) |
|                              |                            |                                      | à 25° (2) |
| o                            | —                          | 24                                   | 5         |
| L-Tryptophane                | S                          | 0                                    | 0         |
| D-Tryptophane                | I                          | 20                                   | 4         |
| 7-Aza-DL-tryptophane         | S                          | 24                                   | 5         |
| 5-Fluoro-DL-tryptophane      | S                          | 9.5                                  | 0         |
| 4-Méthyl-DL-tryptophane      | —                          | 14                                   | 0         |
| 5-Méthyl-DL-tryptophane      | I                          | 20                                   | 0         |
| 6-Méthyl-DL-tryptophane      | I                          | 24                                   | —         |
| L-Tryptophane-éthyl-ester    | —                          | 13                                   | 0         |
| Hydroxamate de L-tryptophane | I                          | 0                                    | 1         |
| L-Tryptophanamide            | —                          | 8                                    | 2.5       |
| Tryptamine                   | I                          | 5                                    | 0         |
| N-Acetyl-L-tryptophane       | o                          | 24                                   | 5         |
| Acide-3-indole propionique   | —                          | 24                                   | 5         |
| L-Tyrosine                   | —                          | 24                                   | 5         |
| L-Phénylalanine              | —                          | 24                                   | 5         |
| L-Alanine                    | —                          | 24                                   | 5         |
| L-Valine                     | —                          | 24                                   | 5         |
| Glycine                      | —                          | 24                                   | 5         |
| Indole                       | o                          | 24                                   | —         |
| Indole + L-alanine           | —                          | 24                                   | —         |
| Indole + glycine, indoline   | —                          | 24                                   | —         |
| Acide-3-indole acétique      | o                          | 24                                   | —         |
| Acide-3-indole butyrique     | —                          | 24                                   | —         |
| Tryptophol                   | —                          | 24                                   | —         |
| L-Kynurénine                 | —                          | 24                                   | —         |
| Riboflavine                  | —                          | 24                                   | —         |

TABLEAU V

## PROTECTION DE LA TRYPTOPHANE RNA SYNTHÉTASE PAR LA TRYPTAMINE ET L'ATP CONTRE L'INACTIVATION PAR LE PCMB À pH 7.8, 25°

Les conditions expérimentales sont les mêmes que celles données dans le Tableau I. Le PCMB est à la concentration de 10<sup>-3</sup> M pendant l'inactivation.

| Tryptamine (M)   | ATP (M)          | $k \times 10^3$ (min <sup>-1</sup> ) |
|------------------|------------------|--------------------------------------|
| 10 <sup>-8</sup> | 0                | 75                                   |
| 0                | 10 <sup>-3</sup> | 200                                  |
| 10 <sup>-8</sup> | 10 <sup>-3</sup> | 45                                   |
| 0                | 0                | 200                                  |

## DISCUSSION

L'ensemble des résultats obtenus montre l'existence de fortes interactions entre la tryptophane RNA synthétase et le tryptophane, interactions qui sont très spécifiques. La protection maximum apportée par la formation d'adénylate de tryptophane laisse penser que la fixation d'une molécule d'adénylate par molécule d'enzyme<sup>23</sup> suffit à imposer cette protection. Les dénaturations thermiques, où l'adénylate ne semble pas avoir d'action différente du tryptophane seul sont effectuées dans des conditions où cet adénylate a peu de chance de demeurer stable (affinité du pyrophosphate pour l'enzyme très élevée, pyrophosphatase dénaturée au-dessus de 40°) mais il n'y a pas d'argument en faveur de la fixation de plus d'une molécule de tryptophane par molécule d'enzyme à haute température.

Ces résultats diffèrent apparemment de ceux que BALDWIN ET BERG<sup>17</sup> ont obtenus avec l'isoleucine RNA synthétase, où l'isoleucine seule n'a aucun effet protecteur. Il n'est donc pas possible de faire un parallélisme absolu entre les résultats obtenus dans le présent travail et ceux relatifs à d'autres systèmes d'activation des acides aminés; il est cependant probable que le comportement de l'enzyme d'activation de l'isoleucine et de celui du tryptophane sont comparables lorsque le complexe enzyme-AMP-acide aminé est formé, et que les variations de comportement vis-à-vis de températures élevées de l'isoleucine et de la tryptophane RNA synthétases traduisent des variations dans les affinités de ces enzymes pour le pyrophosphate et pour l'acide aminé spécifique. La nécessité de former l'adénylate d'isoleucine pour obtenir une protection effective de l'isoleucine RNA synthétase peut en effet provenir de la nécessité de l'ATP pour permettre l'accès de l'isoleucine au site actif, de même qu'on observe une meilleure protection de la tryptophane RNA synthétase par la tryptamine en présence d'ATP.

La résistance à la protéolyse en présence de tryptophane peut être rapprochée de celle qu'a observée MARKUS<sup>24</sup> avec la sérum albumine pour laquelle la fixation d'une molécule de tryptophane par molécule de protéine fait décroître la vitesse de protéolyse. MARKUS suggère que la fixation d'un petit ligand réduit le nombre de conformations qu'une protéine peut présenter et limite par là les chances d'une attaque protéolytique sur une ou plusieurs formes réversiblement dénaturées de la protéine<sup>25</sup>. Si l'on accepte cette hypothèse, la fixation de tryptophane sur la tryptophane RNA synthétase a une action limitée à la restriction des degrés de liberté de la conformation de l'enzyme. Une telle hypothèse permettrait d'expliquer la diminution des groupes sulfhydryles blocables par le PCMB (réf. 22), et la résistance de l'enzyme à une inactivation par le PCMB. Il faut alors admettre que la molécule protéique devient plus rigide lors de la fixation du ligand, ou qu'elle prend une conformation différente de la conformation statistique moyenne qu'elle possédait en absence de ligand ou en présence d'un ligand aspécifique tel que la plupart des analogues du tryptophane énumérés dans le Tableau IV. Il importe toutefois de souligner la grande spécificité d'interaction entre la tryptophane RNA synthétase et le tryptophane. Plusieurs exemples d'interactions sont connus entre des molécules apolaires aromatiques et la myoglobine<sup>26,27</sup>, ces molécules apolaires étant susceptibles de remplacer l'hème ou de favoriser le remplacement du fer de l'hème par du zinc. Dans le cas de la tryptophane RNA synthétase, de telles interactions aspécifiques entre molécules aromatiques et protéine semblent exclues.

Les interactions entre RNA ou nucléotides et tryptophane RNA synthétase n'ont pas été abordées dans ce travail; on peut supposer sur la base des résultats obtenus avec d'autres systèmes d'activation<sup>28,29</sup> qu'elles sont aussi étroites que celles qui ont été observées ici. En particulier HELE<sup>30</sup> et RAVEL *et al.*<sup>31</sup> ont mis en évidence une action coopérative entre le tRNA et l'acide aminé spécifiques d'un enzyme d'activation encore plus marquée que celle qui a été conservée entre tryptamine et ATP pour la tryptophane RNA synthétase. On peut donc s'attendre à ce que la fixation d'un tRNA spécifique sur l'enzyme impose à la protéine une structure qui diffère de celle que l'enzyme possède après avoir fixé l'acide aminé ou l'ATP seulement.

Les résultats présentés dans ce travail suggèrent fortement que la tryptophane RNA synthétase possède une structure différente suivant qu'elle est engagée dans un complexe enzyme-substrat spécifique ou qu'elle est libre ou mise en présence de composés analogues au substrat. Il faut toutefois attendre des données de caractère plus structural pour préciser la nature de ces différences.

#### REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier le Dr. M. KUNITZ pour la pyrophosphatase qu'il nous a généreusement adressée et Monsieur ZONTAG pour les discussions qui nous ont permis d'obtenir la pyrophosphatase à partir de levure Springer. Nous remercions d'autre part Monsieur BRICAS pour son aide et ses conseils dans la préparation de certains analogues du tryptophane.

#### RÉSUMÉ

La tryptophane RNA synthétase de pancréas de boeuf (L-tryptophane:tRNA ligase (AMP), EC 6.1.1.2) est protégée contre l'inactivation thermique par le L-tryptophane et contre l'inactivation par le PCMB ou par protéolyse, par l'addition simultanée de L-tryptophane et d'ATP. Aucun analogue du tryptophane, sauf l'hydroxamate de L-tryptophane n'a d'action protectrice aussi élevée que le L-tryptophane parmi 25 analogues de tryptophane essayés. Aucun autre acide aminé n'a d'action protectrice. La faible protection de l'enzyme par la tryptamine vis-à-vis de l'inactivation par le PCMB est renforcée par l'ATP bien que ce dernier n'ait aucune action protectrice propre.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 K. YAGI, *Advan. Enzymol.*, 27 (1965) 1.
- 2 B. LABOUESSE, B. H. HAVSTEN ET G. P. HESS, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 48 (1962) 2137.
- 3 A. Y. MOON, J. M. STURTEVANT ET G. P. HESS, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 4204.
- 4 G. G. HAMMES ET P. FASELLA, *J. Am. Chem. Soc.*, 85 (1963) 3929.
- 5 H. PARKER ET R. LUMRY, *J. Am. Chem. Soc.*, 85 (1963) 483.
- 6 A. NORRIS ET P. BERG, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 52 (1964) 330.
- 7 G. E. WELTON ET S. R. PELC, *Nature*, 209 (1966) 870.
- 8 H. J. KINGDON, L. T. WEBSTER ET E. W. DAVIE, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 44 (1958) 757.
- 9 J. E. ALLENDE, C. C. ALLENDE, M. GATICA ET M. MATAMALA, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 16 (1964) 342.
- 10 F. CHAPEVILLE, A. L. HAENNI ET G. HERVÉ, *8èmes Journées Biochimiques Latines, Lisbonne, 1965*.

- 11 S. GRISOLIA, *Physiol. Rev.*, 44 (1964) 657.
- 12 M. B. HOAGLAND, E. B. KELLER ET P. C. ZAMECNIK, *J. Biol. Chem.*, 218 (1956) 345.
- 13 E. W. DAVIE, V. V. KONINGSBERGER ET F. LIPMANN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 65 (1956) 21.
- 14 M. KUNITZ, *Arch. Biochem. Biophys.*, 92 (1961) 272.
- 15 L. A. HEPPEL ET R. J. HILMOE, *J. Biol. Chem.*, 192 (1951) 87.
- 16 E. W. DAVIE, EN S. P. COLOWICK ET N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol. V, Academic Press, New York, 1962, p. 718.
- 17 A. N. BALDWIN ET P. BERG, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 831.
- 18 E. H. ALLEN, E. GLASSMAN ET R. S. SCHWEET, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 1061.
- 19 R. W. HOLLEY ET J. GOLDSTEIN, *J. Biol. Chem.*, 234 (1959) 1765.
- 20 E. MOUSTAFA, *Biochim. Biophys. Acta*, 91 (1964) 421.
- 21 R. STERN, M. DE LUCA, A. H. MEHLER ET W. D. McELROY, *Biochemistry*, 5 (1966) 126.
- 22 N. DE LUCA ET W. D. McELROY, *Federation Proc.*, 24 (1965) 217.
- 23 P. R. KRISHNASWAMY ET A. MEISTER, *J. Biol. Chem.*, 235 (1960) 408.
- 24 G. MARKUS, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 54 (1965) 253.
- 25 D. C. POLAND ET H. A. SCHERAGA, *Biopolymers*, 3 (1965) 401.
- 26 J. R. CANN, *Biochemistry*, 4 (1965) 2368.
- 27 L. STRYER, *J. Mol. Biol.*, 13 (1965) 482.
- 28 A. N. BALDWIN ET P. BERG, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 839.
- 29 M. HAYASHI ET K. I. MIURA, *Nature*, 209 (1966) 376.
- 30 P. HELE, *Biochim. Biophys. Acta*, 87 (1964) 449.
- 31 J. M. RAVEL, S. F. WANG, C. HEINEMEYER ET W. SHIVE, *J. Biol. Chem.*, 240 (1965) 432.
- 32 N. SHARON ET F. LIPMANN, *Arch. Biochem. Biophys.*, 69 (1957) 219.

*Biochim. Biophys. Acta*, 132 (1967) 155-164