

- 3 G. WEBER AND H. J. CONVERY, *Science*, 154 (1966) 1357.
- 4 T. BÜCHER AND G. PFLEIDERER, in S. P. COLOWICK AND N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1955, p. 435.
- 5 H. A. KREBS AND L. V. EGGLESTON, *Biochem. J.*, 94 (1965) 3C.
- 6 E. LAYNE, in S. P. COLOWICK AND N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, Vol. III, Academic Press, New York, 1957, p. 450.
- 7 R. E. OLSON AND R. J. HOESHEN, *Biochem. J.*, 103 (1967) 796.

Received October 30th, 1968

Biochim. Biophys. Acta, 171 (1969) 355-357

BBA 63363

Sur une nouvelle forme d'ATP:arginine phosphotransférase, de poids moléculaire 160 000

A l'occasion de travaux récents, il a été établi que certaines ATP:guanidine phosphotransférases (EC classe 2.7.3), la créatine kinase (EC 2.7.3.2) et l'arginine kinase (EC 2.7.3.3), peuvent exister dans la nature à l'état actif non seulement sous plusieurs formes moléculaires (isoenzymes) mais sous plusieurs tailles moléculaires. Ainsi, la créatine kinase, dont le poids moléculaire est d'environ 80 000 chez les vertébrés^{1,2} et chez certains oursins^{2,3}, peut atteindre un poids moléculaire double dans le muscle d'une espèce particulière, *Echinus esculentus*, et dépasser 200 000 dans les spermatozoïdes de cet animal². De même, des arginine kinases de poids moléculaire environ 80 000 ont été mises en évidence dans les muscles d'oursin, de *Travisia*, de siponcle³, de nombreux échinodermes² et de quelques mollusques⁴, alors que l'arginine kinase du muscle d'écrevisse⁵, de homard⁶ et de nombreux mollusques⁴ a un poids moléculaire d'approximativement 40 000. Ces deux types d'arginine kinase, de poids moléculaire simple et double, peuvent coexister dans certains muscles de mollusques⁴.

Nous décrivons ici, à partir du muscle de deux annélides polychètes marines, *Sabella pavonina* et *Spirographis spallanzanii*, la caractérisation d'un troisième type d'arginine kinase, dont le poids moléculaire est sensiblement double de celui de l'arginine kinase d'oursin, de siponcle et de *Travisia*³ et quadruple de celui de l'enzyme des crustacés^{5,6}. Une réactivité particulièrement large vis-à-vis de divers analogues de la L-arginine ayant été signalée pour l'arginine kinase de *Sabella*⁷, nous avons également entrepris d'étudier quelques caractères de spécificité de ces nouveaux enzymes.

Le travail a été exécuté sur des extraits enzymatiques acellulaires bruts de la paroi musculaire des deux vers: les tissus étaient homogénéisés en présence de deux volumes de tampon Tris-HCl 0.05 M (pH 7.5) additionné d'EDTA 0.4 mM et de dithiothréitol 0.4 mM, à 0°, et l'homogénat était centrifugé (10 min à 34 800 × g). Pour l'étude des spécificités, les extraits enzymatiques ont été préalablement fractionnés sur colonnes de Sephadex G-200. Les mesures d'activité ATP:guanidine phosphotransférase vis-à-vis de la L-arginine et des divers substrats guanidiques essayés ont été effectués selon PRADEL *et al.*⁸.

Le poids moléculaire de l'arginine kinase de *Sabella* et de celle de *Spirographe* a été comparé à celui de protéines standard par deux méthodes différentes:

(1) Centrifugation en gradient de densité de sucrose selon MARTIN ET AMES⁹,

Biochim. Biophys. Acta, 171 (1969) 357-359

TABLEAU I

POIDS MOLÉCULAIRE DES ARGININE KINASES DU MUSCLE DE *Sabella pavonina* ET DE *Spirographis spallanzanii*

Calculés d'après la centrifugation en gradient de densité de sucrose et la filtration sur colonnes de Sephadex G-200.

Arginine kinase	Gradient de sucrose		Sephadex G-200	
	Distance de migration	Poids moléculaire calculé	V_e/V_0	Poids moléculaire calculé
Sabella	1.85	150 000	1.49	160 000
Spirographe	1.85	150 000	1.49	166 000

avec un gradient 5–20% de sucrose en tampon Tris-HCl 0.05 M (pH 7.5) additionné d'EDTA 0.4 mM et de dithiothréitol 0.4 mM. Les extraits enzymatiques étaient centrifugés en présence et en l'absence de créatine kinase de lapin (poids moléculaire 81 000, réf. 1) ajoutée comme témoin interne. Les poids moléculaires ont été calculés d'après la formule de FONTAINE ET CONDLIFFE¹⁰, basée sur la distance de migration des protéines. Les résultats sont rapportés dans le Tableau I.

(2) Filtration sur colonne (volume utile 2.5 cm × 51 cm) de gel de Sephadex G-200, à 3°, selon la technique d'ANDREWS¹¹. La colonne était préalablement équilibrée en présence de tampon Tris-HCl 0.05 M (pH 7.5), KCl 0.1 M, EDTA 0.4 mM, dithiothréitol 0.4 mM et étalonnée à l'aide de protéines standard (catalase du foie de boeuf, poids moléculaire 240 000; γ -globuline humaine, poids moléculaire 160 000; lactate déshydrogénase de levure, poids moléculaire 145 000; créatine kinase de lapin, poids moléculaire 81 000; sérum albumine de boeuf, poids moléculaire 65 000). Les extraits enzymatiques, additionnés de bleu de dextrane pour la détermination du V_0 , étaient filtrés sur la colonne en présence et en l'absence de témoins internes. L'effluent était recueilli par volumes de 2 ml et l'activité ATP:arginine phosphotransférase des fractions était mesurée afin de déterminer le volume d'exclusion de l'enzyme. Celui-ci correspondait à la fraction d'activité spécifique maxima. Le poids moléculaire de l'arginine kinase était calculé à partir du rapport V_e/V_0 , en fonction du log du poids moléculaire. Les résultats sont portés dans le Tableau I; ils correspondent sensiblement à ceux déterminés à partir des gradients de sucrose, ce qui donne pour les deux enzymes un poids moléculaire voisin de 160 000.

L'étude de la spécificité des arginine kinases de *Sabella* et de *Spirographe* vis-à-vis de divers substrats guanidiques a donné les résultats suivants:

(1) La stéréospécificité des deux enzymes vis-à-vis des formes L et D de l'arginine était nulle dans les conditions de l'essai. Toutefois, les valeurs des constantes de Michaelis mesurées pour l'arginine kinase de *Sabella* à concentration fixe d'ATP-Mg²⁺ (5 mM) et à concentration variable d'arginine (entre 0.6 et 3.0 mM pour la forme L; entre 0.8 et 10 mM pour la forme D), soit 0.52 mM et 2.00 mM vis-à-vis de la L- et de la D-arginine respectivement, montrent que l'affinité de l'enzyme pour son substrat naturel est environ 4 fois plus forte que pour l'isomère D.

(2) Leur spécificité vis-à-vis de divers analogues de la L-arginine était également assez large. L'activité mesurée avec l'acide arginique, l'agmatine et l'acide δ -guanido-valérianique respectivement était pour l'arginine kinase de *Sabella* 50.0, 26.0 et

12.0% de celle trouvée avec la L-arginine et pour l'enzyme de Spirographe 65.0, 34.0 et 0.0% de cette même activité.

(3) Par contre, leur réactivité avec certaines bases guanidiques (créatine, glyco-cyamine, taurocyamine) susceptibles d'être phosphorylées par d'autres phosphokinases était nulle.

En résumé, la comparaison avec des protéines de poids moléculaire connu montre que les muscles de *Sabella pavonina* et de *Spirographis spallanzanii* renferment un nouveau type d'arginine kinase, dont le poids moléculaire est environ 160 000 (Tableau I), soit 2 fois (réf. 3) ou 4 fois (réfs. 5 et 6) supérieur à celui des ATP:arginine phosphotransférases connues jusqu'ici.

Une autre caractéristique de ces nouveaux enzymes est leur large spécificité vis-à-vis de divers analogues de la L-arginine, en particulier vis-à-vis de la D-arginine; cette propriété les différencie de la plupart des arginine phosphokinases, dont la spécificité vis-à-vis de la L-arginine est extrêmement stricte, et contraste avec leur manque total de réactivité vis-à-vis des substrats guanidiques des autres ATP:guanidine phosphotransférases.

Cette particularité n'est toutefois pas en rapport avec le poids moléculaire élevé des arginine kinases de *Sabella* et de *Spirographe*, car l'enzyme d'écrevisse, dont le poids moléculaire est sensiblement 4 fois plus faible, se montre lui aussi actif sur la D-arginine⁵. Il n'est pas non plus possible d'établir un rapport entre le poids moléculaire des arginine kinases et les valeurs de leurs constantes de Michaelis vis-à-vis de la L-arginine.

Seule une étude approfondie de la structure et des propriétés cinétiques de ce groupe d'enzymes permettra peut-être de comprendre la signification biologique des différentes tailles moléculaires sous lesquelles se présente l'arginine kinase dans les muscles des invertébrés.

Nous remercions Mlle YVONNE GUILLOU pour son excellente collaboration technique.

*Laboratoire de Biochimie Marine,
Ecole Pratique des Hautes Etudes et
Laboratoire Maritime du Collège de France,
Concarneau (France)*

Y. ROBIN
C. KLOTZ
N. V. THOAI

- 1 L. NODA, S. A. KUBY ET H. A. LARDY, *J. Biol. Chem.*, 209 (1954) 203.
- 2 B. MORELAND, D. C. WATTS ET R. VIRDEN, *Nature*, 214 (1967) 458.
- 3 N. V. THOAI, N. V. THIEM, G. LACOMBE ET J. ROCHE, *Biochim. Biophys. Acta*, 122 (1966) 547.
- 4 B. MORELAND ET D. C. WATTS, *Nature*, 215 (1967) 1092.
- 5 P. ELÖDI ET E. SZORÉNYI, *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.*, 9 (1956) 367.
- 6 N. V. THOAI, R. KASSAB ET L. A. PRADEL, *Biochim. Biophys. Acta*, 110 (1965) 532.
- 7 R. VIRDEN ET D. C. WATTS, *Comp. Biochem. Physiol.*, 13 (1964) 161.
- 8 L. A. PRADEL, R. KASSAB, F. REGNOUF ET N. V. THOAI, *Biochim. Biophys. Acta*, 89 (1964) 255.
- 9 R. G. MARTIN ET B. N. AMES, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 1372.
- 10 Y. A. FONTAINE ET P. G. CONDLIFFE, *Biochemistry*, 2 (1963) 290.
- 11 P. ANDREWS, *Biochem. J.*, 96 (1965) 595.

Reçu le 9 Septembre, 1968