
CHIMIE BIOLOGIQUE. — *Identification de quatre kinases spécifiques des diphosphonucléosides dans une préparation enzymatique d'origine bactérienne.* Note de M. MIRKO BELJANSKI, présentée par M. Jacques Tréfouël.

Une fraction enzymatique d'origine bactérienne contient quatre kinases distinctes et spécifiques, chacune capable d'échanger un diphosphonucléoside avec le triphosphonucléoside homologue.

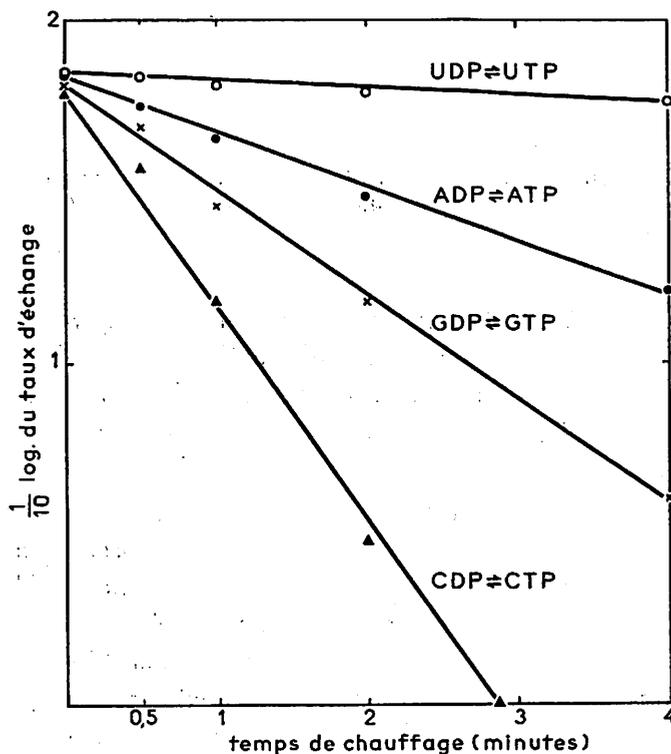
Il a été récemment montré qu'une préparation enzymatique isolée et purifiée à partir des extraits solubles d'*Alcaligenes fæcalis* active l'incorporation des acides aminés dans les protéines des fragments bactériens et des microsomes ⁽¹⁾, ⁽²⁾. Je désignerai provisoirement cette fraction par le sigle EAA.

Après purification, la fraction EAA stimule fortement l'incorporation des acides aminés dans les protéines. De plus elle possède la propriété de catalyser l'échange rapide entre l'adénosine triphosphate (ATP) et l'adénosine diphosphate (ADP), échange déjà observé par Snoke et Bloch avec la synthétase du glutathion ⁽³⁾. Nous avons constaté qu'un échantillon de cette dernière (envoyé par le Professeur Bloch) ne remplaçait pas la fraction EAA dans l'incorporation des acides aminés. Il n'en reste pas moins que les deux systèmes enzymatiques restent très comparables, possédant l'un et l'autre à la fois la capacité d'activer la formation des liaisons peptidiques et de catalyser l'échange entre l'ATP et l'ADP. Nous avons poursuivi l'étude de l'activité transférasique de la fraction purifiée EAA. Il a paru essentiel d'étudier la réaction d'échange avec d'autres nucléotides ne possédant pas l'adénine comme base.

La présente Note résume des résultats montrant que la fraction EAA purifiée, active dans la biosynthèse des protéines, contient quatre enzymes distinctes et spécifiques capables d'échanger les diphosphonucléosides avec les triphosphonucléosides.

Les conditions expérimentales sont les suivantes : 5 μ M de $MgCl_2$, 50 μ M de tampon « Tris » pH 7,3, 0,5 μ M de chaque nucléotide, 3 μ g de fraction EAA. Volume final, 0,5 ml. Température, 34° C. Temps d'incubation, 10 mn. La réaction est arrêtée par l'acide trichloracétique, les nucléo-

tides sont séparés par chromatographie sur papier (4), élués et la radioactivité mesurée. L'ADP était marqué en $8\text{-}^{14}\text{C}$ et le guanosine diphosphate (GDP), l'uridine diphosphate (UDP), et le cytidine diphosphate (CDP) par le phosphore radioactif en position terminale. Nous avons marqué les diphosphonucléosides à l'aide de la phosphorylase des polynucléotides mise à notre disposition par le Docteur Grunberg-Manago. L'absence

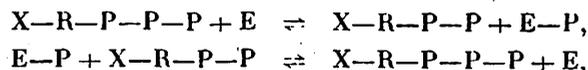


de formation d'ATP en quantité décelable après incubation de la fraction EAA avec l'ADP radioactif nous a montré que celle-ci ne contenait pas de myokinase.

Les résultats d'un type d'expérience calculés d'après De Moss et Novelli (5) sont présentés dans le tableau. La séparation par chromatographie n'étant pas parfaite des témoins en l'absence d'enzyme révélant un certain degré de contamination ont été retranchés.

L'examen de ce tableau montre que la fraction EAA est capable d'échanger très rapidement les quatre diphosphonucléosides avec les triphosphonucléosides correspondants. Les ions Mg^{++} sont indispensables à la réaction. Au cours de l'échange la concentration de chacun des nucléotides n'est pas modifiée. Une telle réaction ne semble pouvoir se produire

que d'après le schéma suivant :



X, base purique ou pyrimidique du nucléotide.

Contrairement à la kinase des diphosphonucléosides décrite par Berg et Joklik⁽⁶⁾ qui échange des nucléotides hétérologues, l'un contenant nécessairement l'adénine, la fraction EAA n'échange que des nucléotides homologues, ce qui ne peut s'expliquer selon le schéma précédent que par l'existence de quatre enzymes différentes. Nous avons donc cherché à différencier ces quatre activités d'après leurs coefficients d'inactivation thermique en portant une préparation enzymatique à 55° C pendant des temps variables (100 µg de fraction EAA par millilitre de tampon « Tris » pH 7,3, 0,05 M). L'échange pour chaque couple de nucléotides fut déterminé séparément. Les résultats sont présentés dans la figure.

On voit que l'inactivation de la préparation enzymatique EAA suit une loi monomoléculaire simple, mais les coefficients d'inactivation sont très différents pour chacune de ces activités. Ceci confirme directement que ces échanges sont dus chacun à une entité enzymatique distincte. Nous proposons d'appeler ces enzymes : adénosine-diphosphokinase, guanosine-diphosphokinase, cytidine-diphosphokinase, uridine-diphosphokinase.

L'ensemble de ces résultats montre que la fraction EAA, par ses quatre réactions d'échange diffère de la synthétase du glutathion qui, ainsi que nous l'avons observé, n'échange que l'ATP avec l'ADP. Ceci explique aisément l'incapacité de la synthétase du glutathion à remplacer notre fraction enzymatique EAA pour l'incorporation des acides aminés. En revanche il est remarquable de constater qu'un système enzymatique impliqué dans l'incorporation d'un grand nombre d'acides aminés se montre capable d'activer le transfert du phosphore entre les quatre principaux nucléotides. Il est difficile de ne pas supposer qu'il y ait une association nécessaire entre cette activité phosphotransférasique et l'activité responsable de l'incorporation des acides aminés.

Échange diphosphonucléosides \rightleftharpoons triphosphonucléosides.

Temps d'incubation (mn).	Radioactivité (cm).								% d'échanges.	µmoles/mg/prot/h.
	ADP-ATP.	GDP-GTP.	UDP-UTP.	CDP-CTP.						
0...	2506	0	15900	0	16080	0	11820	0	0	0
10...	1670	770	-	-	-	-	-	62	486	
10...	-	-	10810	4806	-	-	-	61	483	
10...	-	-	-	-	10700	5280	-	65	530	
10...	-	-	-	-	-	-	7800 3800	58	430	

- (1) M. BELJANSKI et S. OCHOA, *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 44, 1958, p. 494.
- (2) M. BELJANSKI et S. OCHOA, *Proc. Nat. Acad. Sc.*, 44, 1958, p. 1157.
- (3) J. E. SNOKE et K. BLOCH, *J. Biol. Chem.*, 213, 1955, p. 825.
- (4) H. A. KREBS et R. HEMS, *Biochim. et Biophys. Acta*, 12, 1953, p. 172.
- (5) J. A. DE MOSS et G. D. NOVELLI, *Biochim. et Biophys. Acta*, 22, 1956, p. 49.
- (6) P. BERG et W. K. JOKLIK, *J. Biol. Chem.*, 210, 1954, p. 657.

(Service de Biochimie cellulaire. Institut Pasteur, Paris.)

(Extrait des *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*,
t. 248, p. 1446-1448, séance du 2 mars 1959.)