

CONFÉRENCE.

RIBONUCLÉOSIDETRIPHOSPHATES ET SYNTHÈSES DE PEPTIDES SPÉCIFIQUES PAR DES ENZYMES PURIFIÉS.

par M. BELJANSKI.

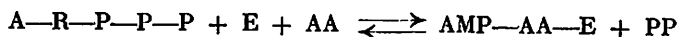
Service de Biochimie cellulaire, Institut Pasteur, Paris (15°).

(Conférence prononcée le 7 mars 1961).

En 1941, LIPMANN a suggéré que des liaisons phosphorées riches en énergie tels que certains dérivés phosphorés de glucides et l'adénosine triphosphate (ATP) (*) conditionneraient le processus de la biosynthèse des protéines [1]. Ce dernier a été considéré le plus souvent comme étant le seul nucléotide ayant la capacité et le privilège de détenir cette énergie. La dégradation de l'ATP libère l'énergie qui est utilisée dans divers processus de biosynthèses, celui des protéines en particulier. Pour expliquer le mécanisme de la biosynthèse des protéines, les biochimistes représentent par des formules chimiques les réactions conduisant à la formation des liaisons peptidiques par lesquelles les acides aminés sont liés dans des chaînes polypeptidiques.

En 1956, HOAGLAND, KELLER et ZAMECNJK [2, 3], ont proposé un schéma précisant les étapes majeures de la synthèse des protéines :

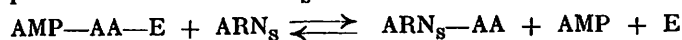
1) Les enzymes spécifiques, présents dans le cytoplasme cellulaire activent uniquement en présence d'ATP, le groupement carboxylique des acides aminés d'après la réaction suivante :



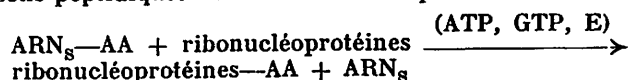
Ce sont les « enzymes activant les acides aminés ». Il existerait vingt enzymes différents, chacun spécifique de l'activation d'un seul acide aminé. Sept d'entre eux ont été déjà purifiés [4].

(*) *Abréviations.* — ATP, adénosinetriphosphate ; GTP, guanosinetriphosphate ; UTP, uridinetriphosphate ; CTP, cytidinetriphosphate ; ADP, adénosinediphosphate ; GDP, guanosinediphosphate ; UDP, uridinediphosphate ; CDP, cytidinediphosphate. ARN_s, acide ribonucléique « soluble » ; FDNB, fluorodinitrobenzène. « Tris », Tris (hydroxyethyl) aminomethane.

2) L'acide aminé ainsi activé est transféré sur un intermédiaire qui, d'après ces auteurs, serait un acide ribonucléique particulier de faible poids moléculaire : ARN_s soluble.



3) L'acide aminé activé est ensuite transféré en présence d'ATP, de GTP ou de GDP sur une matrice localisée au niveau des microsomes. Les liaisons peptidiques ne se formeraient qu'à ce stade :



HOAGLAND écrit en 1960 [5] qu'il reste trois points inexplicables dans ce schéma :

1) Bien que l'acide aminé soit activé, il faut continuer à ajouter de l'ATP au système pour le transfert de l'acide aminé sur les microsomes.

2) Le GTP, n'étant nécessaire ni pour l'activation des acides aminés ni pour le rattachement de ceux-ci sur l' ARN_s est cependant indispensable au transfert des acides aminés sur les microsomes.

3) Le transfert de l'acide aminé activé sur les ribonucléoprotéines nécessite la présence, à côté des « enzymes activant les acides aminés », d'une fraction enzymatique soluble particulière.

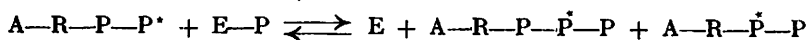
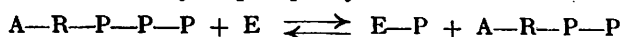
Je vous ai présenté ce schéma afin que vous puissiez plus facilement situer et suivre nos résultats. Je dois m'excuser de ne pouvoir m'appesantir et citer souvent les travaux des nombreux biochimistes qui ont apporté des contributions intéressantes dans ce domaine. La tradition veut que le lauréat du prix « Charles Léopold MAYER » explique ce qu'il a fait et montre sa contribution à la compréhension — ou parfois à la complication — de nos connaissances dans la biosynthèse des nucléoprotéines.

Depuis plusieurs années déjà, nous utilisons des fragments subcellulaires d'origine bactérienne pour l'étude du mécanisme de la synthèse des protéines.

En 1957, lors d'un stage à New York chez le Professeur OCHOA, nous avons fixé notre choix sur une bactérie aérobique, *Alcaligenes faecalis*. Il y avait deux raisons principales à ce choix : premièrement on peut obtenir assez facilement à partir de ces bactéries des fragments subcellulaires capables d'incorporer les acides aminés dans les protéines acido-précipitables. Deuxièmement, ces bactéries sont riches en poly-nucléotide phosphorylase, enzyme capable de synthétiser des polymères qui ressemblent aux acides ribonucléiques [6, 7]. Au cours de ce travail, j'ai observé que des extraits solubles préparés à partir de ces mêmes bactéries stimulaient l'incorporation des acides aminés dans les protéines, lorsqu'on les ajoutait aux fragments bactériens. Cette stimulation est relativement faible. Elle est en partie due à une

fraction thermolabile probablement de nature enzymatique. Il nous semblait important de déterminer si l'activité de ces extraits solubles était due aux enzymes « activant les acides aminés ». Nous avons purifié une fraction enzymatique que j'ai désignée par le sigle « EAA » [8] capable de stimuler l'incorporation de tous les acides aminés dans des fragments subcellulaires [9]. Cependant cette fraction ne possède pas la capacité d'activer les acides aminés d'après le schéma de HOAGLAND [9].

Nous avons cherché à préciser si le rôle fonctionnel de cette fraction était conditionné par la dégradation de l'ATP. La fraction enzymatique s'est montrée capable de catalyser en présence des ions Mg^{++} le transfert du phosphore terminal de l'ATP sur l'ADP. Au cours de cette réaction déjà décrite par SNOKE et BLOCH [10], la concentration des deux nucléotides reste pratiquement constante. L'échange de phosphore entre les deux nucléotides se fait probablement par l'intermédiaire de l'enzyme phosphorylé :



Il ne nous a pas été possible à cette époque [14] de mettre en évidence l'influence d'un mélange d'acides aminés sur la réaction d'échange. D'autre part certaines préparations « EAA » catalysaient activement l'échange ATP—ADP mais n'étaient pas pour autant actives dans l'incorporation des acides aminés dans des fragments subcellulaires [11].

C'est là que notre travail a pris un visage nouveau.

Aujourd'hui les biochimistes savent que les cellules bactériennes ou animales contiennent les quatre types de ribonucléosidetriphosphates et de ribonucléosidediphosphates, nucléotides riches en énergie [12, 13]. D'autre part, dans des conditions physiologiques normales la cosynthèse des acides nucléiques et des protéines se fait simultanément ce qui pourrait s'expliquer par la formation de précurseurs communs. Notre hypothèse était la suivante : la fraction « EAA » serait active dans la biosynthèse des protéines lorsqu'elle est capable de catalyser les échanges du phosphore entre les quatre couples de ribonucléosidetriphosphates et de ribonucléosidediphosphates homologues. Cette hypothèse fut par la suite confirmée par nos expériences (Tableau I) [8]. Si une des réactions d'échange n'est pas catalysée par la préparation enzymatique, celle-ci n'est plus active dans l'incorporation des acides aminés [11]. Nous nous sommes assuré que la fraction « EAA » était dépourvue des enzymes suivants : ATPase, pyrophosphatase, polynucléotide-phosphorylase, myokinase [14]. L'absence de diphosphonucléoside-kinase, enzyme qui, rappelons-le, catalyse le transfert du phosphore entre nucléotides hétérologues dont l'un contient nécessairement l'adénine, suggérait que les échanges entre chaque

TABLEAU I.

TRANSFERT DU PHOSPHORE TERMINAL
DES RIBONUCLÉOSIDETRIPHOSPHATES
AUX NUCLÉOSIDEDIPHOSPHATES HOMOLOGUES.

Milieu d'incubation contient : 50 μ moles de Tris (hydroxyméthyl) aminométhane-HCl, pH 7,3 ; 3 μ moles de $MgCl_2$; 0,5 μ mole de ribonucléosidediphosphate marqué soit en ^{14}C soit par ^{32}P en position terminale ; 0,5 μ mole de ribonucléosidetriphosphate ; 2-5 μ g de protéines de la fraction « EAA ». Volume final 0,5 ml. Incubation 5 minutes à 34°. La séparation des nucléotides et la détermination de leur radioactivité respectives est décrite ailleurs [14].

Substrats	μ moles de P transféré par heure et par mg de protéines
ATP \rightleftharpoons ADP 32	486
GTP \rightleftharpoons GDP 32	483
UTP \rightleftharpoons UDP 32	530
CTP \rightleftharpoons CDP 32	430

couple de nucléotides homologues étaient catalysés par des enzymes différents. La spécificité de la fraction « EAA » pour les nucléotides homologues ne peut s'expliquer que par l'existence de quatre enzymes différents. L'inactivation thermique de l'enzyme à 55° pendant des temps variables montre que l'activité relative à chaque couple de

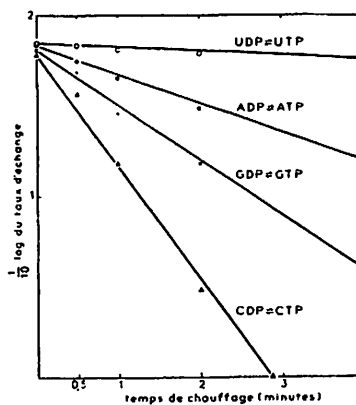


Fig. 1. — Conditions expérimentales pour la mesure des réactions d'échanges, identiques à celles décrites dans la légende du Tableau I.

nucléotides est spécifique (Figure 1) [15, 16]. Nous savons d'autre part aujourd'hui qu'une séparation mécanique de ces enzymes est possible. La présence des acides nucléiques (1 à 3 p. 100) dans la fraction « EAA » semble nécessaire au fonctionnement de ces enzymes.

Les réactions d'échange dont je viens de vous parler sont intéressantes, mais elles ne prouvent pas qu'elles soient essentielles ou directement impliquées dans l'incorporation des acides aminés dans les protéines. Toutefois, ces observations nous ont permis de tirer deux conclusions :

1) Il s'agit de réactions bien spécifiques au cours desquelles le phosphore terminal des ribonucléosidetriphosphates (ATP, GTP, UTP et CTP) est mis en jeu.

2) L'absence d'une des quatre activités d'échange conduit à l'inactivité pratiquement totale de la fraction « EAA » dans l'incorporation des acides aminés dans les protéines acido-précipitables des fragments subcellulaires [11].

Il nous a paru important d'établir si le système enzymatique pouvait en présence d'acides aminés catalyser la libération du phosphore terminal à partir de chaque nucléosidetriphosphate. Il était indispensable de déterminer le rapport de concentrations entre nucléosidetriphosphate et acide aminé. Nous avons démontré que le système enzymatique ne catalyse la dégradation de l'ATP par exemple, qu'en présence d'acide aminé et d'ions Mg^{++} . Une concentration en acide aminé supérieure à celle indiquée (figure 2) inhibe la réaction [15]. Nous avons

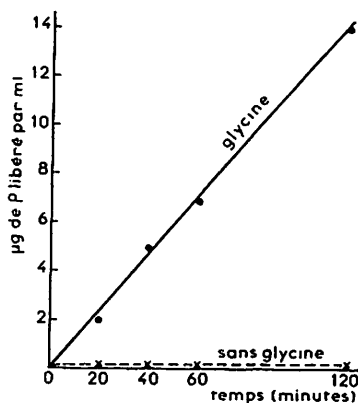


FIG. 2. — Milieu d'incubation contient : 100 μ moles de tampon « Tris » pH 8,1 ; 5 μ mole de $MgCl_2$; 5 μ moles de KF ; 3 μ moles de l-acide aminé ; 1 μ mole de ribonucléosidetriphosphate ; 200 μ g d'enzymes « EAA ». Volume final 1 ml. Incubation 1 heure à 34°. L'orthophosphate est déterminé par la méthode colorimétrique (8).

cherché à déterminer si la fraction « EAA » pouvait catalyser cette réaction en présence d'autres ribonucléosidetriphosphates. Le tableau II montre les résultats relatifs à la libération de l'orthophosphate en présence d'acides aminés à partir des principaux types de nucléosidetriphosphates. Les 18 L-acides aminés testés chacun individuellement,

TABLEAU II.
 µMOLES DE PHOSPHORE LIBÉRÉ PAR HEURE
 ET PAR MG DE PROTÉINES « EAA ».

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

se répartissent en quatre groupes essentiels, chaque groupe spécifique d'un ribonucléosidetriphosphate. Pour certains acides aminés, on observe un chevauchement. Ces résultats illustrent clairement non seulement la spécificité entre chaque enzyme de la fraction EAA et un ribonucléosidetriphosphate particulier, mais aussi la spécificité des acides aminés, activateurs de la libération du phosphore.

Pour comprendre l'inefficacité de certaines préparations dans l'incorporation des acides aminés dans les fragments bactériens il fallait mettre en évidence que ce sont bien les mêmes enzymes qui, en absence d'acide aminé catalysent les réactions d'échanges, et en présence d'acides aminés libèrent l'orthophosphate à partir de nucléosidetriphosphates. Il nous est arrivé de temps à autre, d'obtenir une préparation d'EAA qui ne présentait pas d'activité correspondante à l'échange UTP-UDP par exemple, mais qui catalysait les échanges entre les trois autres paires de nucléotides. Cette même préparation catalysait la libération de phosphore à partir d'ATP, GTP et CTP mais pas à partir d'UTP. Il semble donc que ce sont les mêmes enzymes qui catalysent les échanges et qui libèrent le phosphore à partir de ribonucléosidetriphosphates.

Il m'a semblé important de déterminer si les deux réactions dont nous venons de parler, échange et libération, pouvaient être influen-

cées par le chloramphénicol ; inhibiteur de la biosynthèse des protéines chez les bactéries [16, 17]. Ajouté (100 $\mu\text{g/ml}$) au milieu d'incubation, en même temps que l'enzyme il est sans action sur la réaction d'échange, mais en revanche il inhibe complètement la libération du phosphate en présence d'acides aminés (2 exemples : glycine ; leucine). Cette observation constitue autant que nous le sachions le premier exemple où le chloramphénicol agit sur une réaction enzymatique bien déterminée. Il serait intéressant d'étudier cette inhibition en présence d'autres acides aminés, basiques en particulier.

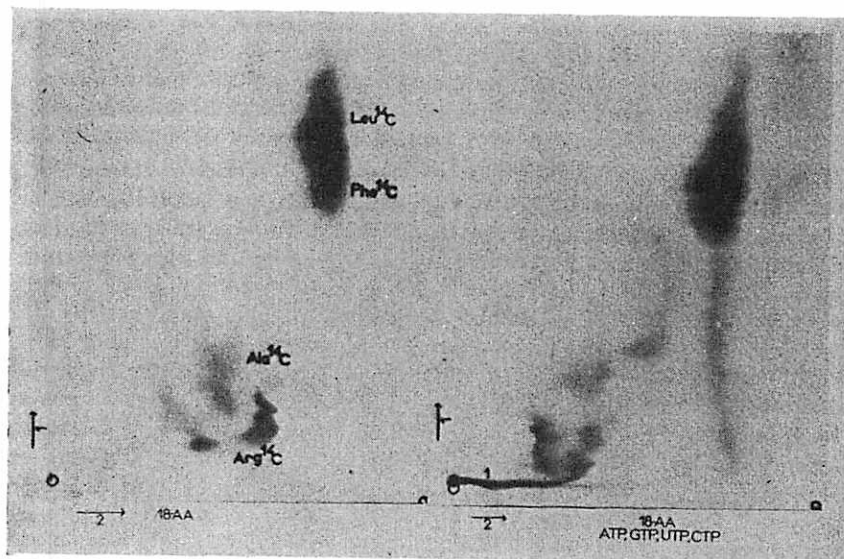


FIG. 3. — Milieu d'incubation : 200 μmoles de tampon « Tris » pH 8,1 ; 10 μmoles de MgCl_2 ; 2 μmoles d'ATP ; 2 μmoles de GTP ; 2 μmoles d'UTP ; 2 μmoles de CTP ; 5 μmoles d'un mélange de 18 L-acides aminés ; 3 μmoles (200.000 CPM) de chacun des acides aminés suivants : L-arginine, L-alanine, L-leucine, L-phénylalanine ; 600 μg de fraction enzymatique « EAA ». Volume final, 1,5 ml. Incubation 2 heures à 34°.

L'ensemble de ces résultats suggère que certaines conditions expérimentales étaient remplies par la fraction « EAA », permettant de tenter la synthèse de liaisons peptidiques en présence de ribonucléosidetriphosphates. Nous avons incubé, outre la fraction enzymatique EAA soit un mélange de 18 L-acides aminés dont quelques uns radioactifs, en présence et en absence des quatre ribonucléosidetriphosphates [15] soit par la suite un seul acide aminé et un seul nucléosidetriphosphate. Dans ce dernier cas, l'acide aminé choisi est celui qui catalyse spécifiquement la libération du phosphate terminal à partir du nucléotide spécifique. La réaction est arrêtée soit par chauffage

soit par l'alcool ou par l'acide perchlorique. Les protéines enzymatiques sont sédimentées et lavées : elles ne contiennent pas de radioactivité. Le surnageant concentré sous vide est chromatographié dans des solvants organiques. L'autoradiographie du chromatogramme a révélé, à côté des acides aminés libres radioactifs de « nouvelles substances » radioactives également dont les Rf diffèrent très nettement de ceux des acides aminés libres (figure 3).

Certaines de ces taches ont été éluées, puis hydrolysées à l'aide d'HCl 6 N pendant 24 heures à 105°, conditions nécessaires pour détruire complètement les liaisons peptidiques. Les hydrolysats furent ensuite rechromatographiés comme précédemment. Les « nouvelles substances » ont disparu et nous retrouvons les acides aminés libres. Avec au départ un seul acide aminé radioactif nous observons le même processus : disparition de l'acide aminé et formation de plusieurs nouvelles taches. Ces taches hydrolysées redonnent l'acide aminé initial.

Pour mettre en évidence que ces « nouvelles taches » étaient formées d'acides aminés liés entre eux par des liaisons peptidiques, j'ai concentré mes efforts sur l'analyse chimique de ces substances. Par définition une chaîne peptidique possède à une extrémité le groupement aminé terminal et à l'autre le groupement carboxylique terminal. Nous avons utilisé la technique au fluorodinitrobenzène (FDNB) de SANGER [18] qui consiste à bloquer spécifiquement le groupement aminé terminal d'une chaîne peptidique puis à hydrolyser le tout à l'aide d'acide chlorhydrique 5,7 N à 105°. L'hydrolyse sépare le complexe formé « DNP—A » du reste hydrolysé, et épargne la liaison chimique formée entre DNP et l'acide aminé N-terminal.

Voici une expérience où un seul acide aminé ^{14}C l'alanine a été incubé en absence et en présence d'enzyme et d'ATP (figure 4). L'analyse chimique des bandes détectées par le radioautogramme révèle la formation de peptides :

- 1) alanine libre
- 2) alanyl-alanine
- 3) tétrapeptide (constitué d'alanine)
- 4) octapeptide (constitué d'alanine).

Au cours de cette réaction l'ATP est hydrolysée en ADP et en orthophosphate. Voici le lien stoechiométrique entre la quantité d'ATP dégradée et de liaisons peptidiques formées (Tableau III). Les résultats exprimés en micromoles montrent que pour une micromole d'ATP dégradé une « micromole de liaison peptidique » est formée.

Rappelons que l'alanine catalyse la libération d'orthophosphate à partir d'ATP principalement, mais aussi à partir de GTP et d'UTP. Par contre cet acide aminé est inactif en présence de CTP. Si donc maintenant au lieu d'ATP comme source d'énergie, nous ajoutons au système enzymatique du GTP ou de l'UTP ou du CTP, on observe la

TABLEAU III.

LIEN STOECHIOMÉTRIQUE ENTRE LA DÉGRADATION DE L'ATP
ET LA SYNTHÈSE DE LIAISONS PEPTIDIQUES.

Temps d'incubation (heures)	Phosphore libéré (μ moles)	ADP apparu (μ moles)	AMP apparu (μ moles)	Liaisons peptidiques formées (μ moles)
2	1,10	1,05	0,03	1,32

formation de peptides en présence de GTP et d'UTP mais pas en présence de CTP (fig. 4). Il faut souligner que ces trois ribonucléosidetriphosphates ne sont pas contaminés par de l'ATP, ce qui montre clairement qu'ils sont utilisés comme source d'énergie pour la synthèse des liaisons peptidiques. Les peptides formés en leur présence peuvent

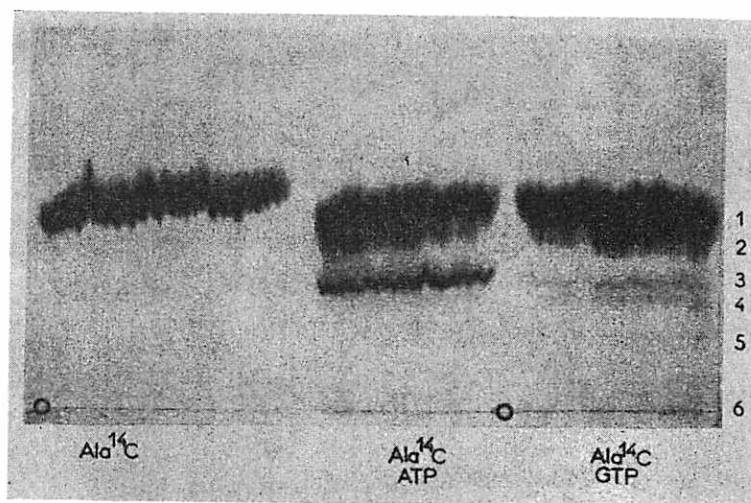


FIG. 4. — Milieu d'incubation : 200 μ moles de tampon « Tris » pH 8,1 ; 10 μ moles de $MgCl_2$; 2 μ moles d'ATP (ou de GTP) ; 6 μ moles de L-alanine ^{14}C (300.000 CPM) ; 500 μ g de protéines « EAA ». Volume final 1 ml. Incubation 2 heures à 34°.

être semblables ou différents de ceux formés en présence d'ATP. Des résultats du même genre sont obtenus en présence d'histidine et de CTP, nucléosidetriphosphate spécifique de cet acide aminé. Nous avons pu obtenir des peptides mixtes formés de deux acides aminés incubés en présence de CTP et du système enzymatique, les deux acides aminés choisis (histidine et phénylalanine) étant spécifiques pour la

libération de l'orthophosphate à partir du CTP. Dans certains peptides, l'histidine occupe la position N-terminale. Dans d'autres, c'est la phénylalanine qui occupe cette position.

D'après le spectre d'acides aminés pour chaque nucléosidetriphosphate nous avons choisi l'alanine et la phénylalanine, ainsi que les deux ribonucléosidetriphosphates spécifiques ATP et CTP, en vue de préciser quelle place dans les peptides formés occuperait respectivement chaque acide aminé selon que la source d'énergie est l'ATP ou le CTP.

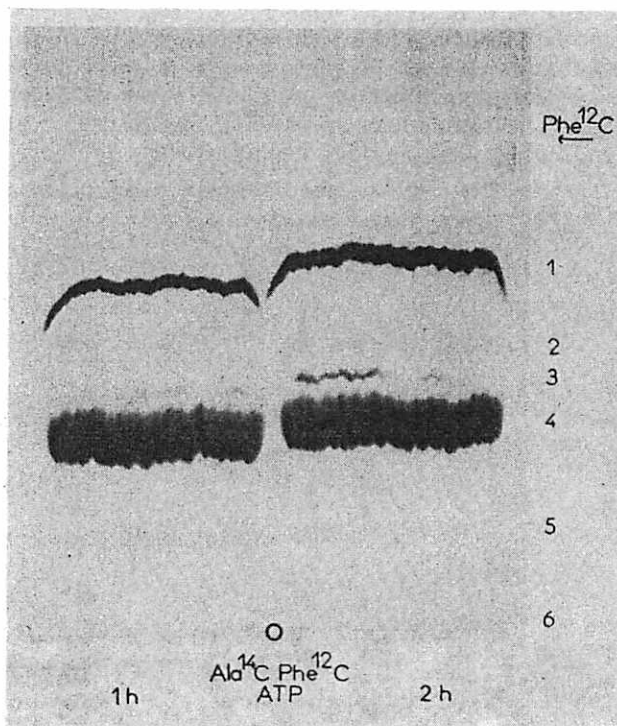


FIG. 5. — Milieu d'incubation : 200 μ moles de tampon « Tris » pH 8,1 ; 10 μ moles de $MgCl_2$; 3 μ moles d'ATP ; 6 μ moles de L-alanine ^{14}C (300.000 CPM) ; 3 μ moles de L-phénylalanine ^{12}C . 500 μ g d'enzyme. Incubation 1 heure et 2 heures à 34°.

Voici les résultats obtenus lorsque l'ATP a été utilisé comme source d'énergie (figure 5). Le dipeptide et le térapeptide précédemment obtenus avec l'alanine seule et l'ATP (figure 4) ne sont pratiquement plus détectables dans le cas présent. Nous voyons maintenant trois nouvelles taches situées entre l'alanine libre et la phénylalanine libre.

Après hydrolyse on retrouve dans ces trois peptides deux acides aminés : alanine et phénylalanine. Le groupement N terminal de ces trois différents peptides a été déterminé et correspond dans chaque cas à l'alanine. Le peptide n° 1 contient deux résidus d'alanine et 1 résidu de phénylalanine (tripeptide). Le peptide n° 3 contient 4 résidus d'alanine et 1 résidu de phénylalanine (pentapeptide).

Voici maintenant un exemple assez voisin. Il s'agit des deux mêmes acides aminés et non plus d'ATP mais de CTP. La phénylalanine est radioactive. L'alanine ne l'est pas. La faible quantité de peptides for-

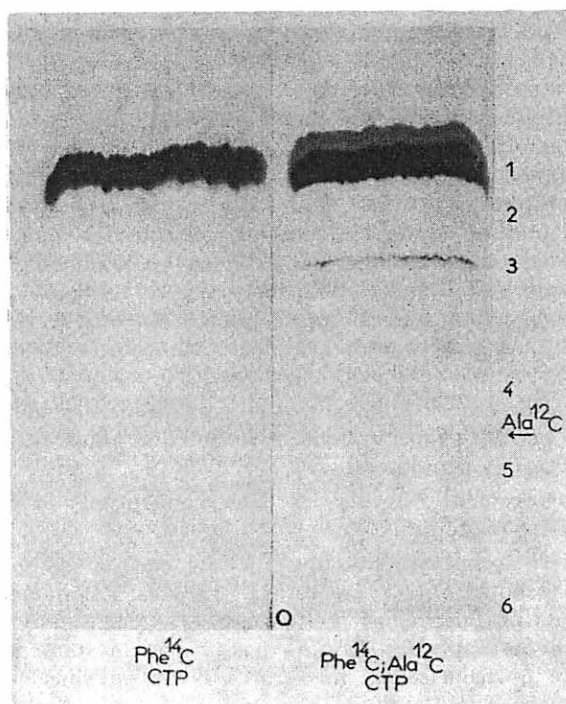


FIG. 6. — Milieu d'incubation : 200 μ moles de tampon « Tris » pH 8,1 ; 10 μ moles de $MgCl_2$; 3 μ moles de CTP ; 6 μ moles de L-phénylalanine ^{14}C (300.000 CPM) ; 3 μ moles de L-alanine ^{12}C . 500 μ g d'enzyme. Volume final 1 ml. Incubation 1 heure à 34°.

més ne m'a pas permis d'effectuer l'analyse complète. Toutefois, j'ai pu démontrer qu'il s'agit de peptides mixtes contenant les deux acides aminés ; c'est la phénylalanine qui occupe la place N terminale (figure 6).

Il paraît clair qu'en partant d'un même mélange d'acides aminés le système enzymatique est capable de synthétiser des peptides différents

selon que la source d'énergie est l'ATP ou le CTP. Ces résultats montrent que c'est le groupement carboxylique des acides aminés qui est « activé » par le système enzymatique « EAA ».

Essayons maintenant de situer les systèmes enzymatiques spécifiques dans le cadre général de la biosynthèse des protéines. Il est raisonnable de penser que, dans les cellules vivantes animales, bactériennes ou végétales, le mécanisme enzymatique fondamental conduisant à la synthèse des liaisons peptidiques est sinon identique du moins très voisin. En d'autres mots, des enzymes identiques ou voisines de ceux que nous avons mis en évidence dans *Alcaligenes faecalis* devraient se trouver dans d'autres espèces, bactériennes par exemple. En effet, NISMAN et FUKUHARA ont partiellement purifié ces enzymes à partir d'*Escherichia coli*. Une des particularités de ces enzymes est de présenter un spectre d'acides aminés modifié pour chaque nucléosidetriphosphate par rapport à notre système [19]. Une autre observation importante a été publiée par ZALTA [20] qui a trouvé ces enzymes dans les granules ou lysats préparés à partir de microsomes du foie de rats. Ces granules sont actifs dans l'incorporation des acides aminés dans les protéines acidoprécipitables, lorsque les quatre activités d'échange sont catalysées par ce matériel. Le manque d'une de ces activités conduit à l'inactivation du système. Je vous rappelle que nous avons déjà constaté ce même phénomène soit avec la fraction purifiée « EAA » soit avec des fragments subcellulaires d'*Alcaligenes faecalis* [11].

L'ensemble de ces observations et la capacité de ces enzymes à synthétiser des peptides nous autorise à les intégrer dans le processus de la biosynthèse des protéines.

Je dois brièvement résumer les deux conceptions majeures de la biosynthèse des protéines.

La première hypothèse fait appel à une matrice ou « template » qui serait essentiellement constituée d'acides ribonucléiques [21]. Les acides aminés alignés sur cette matrice se polymériseraient d'emblée en protéines spécifiques sans passer par le stade de peptides. L'enzyme de polymérisation ne serait pas un enzyme spécifique. Si une telle synthèse s'effectue en présence d'un acide aminé radioactif, cet acide aminé aurait dans tous les loci de la molécule protéinique la même activité spécifique. Cette hypothèse est celle qui est la plus généralement acceptée.

La deuxième hypothèse est la suivante : une protéine se formerait par étapes. Les peptides entreraient comme intermédiaires et pourraient accepter des acides aminés libres selon les nécessités de la protéine à synthétiser. On admet implicitement que les étapes individuelles seraient contrôlées par des enzymes spécifiques. Dans ces conditions un acide aminé radioactif adjoint au pool d'acides aminés non radioactifs serait inégalement utilisé selon la vitesse de synthèse des

peptides et leur nature. Cet acide aminé radioactif n'aurait pas la même activité spécifique à des endroits différents de la chaîne polypeptidique.

La deuxième hypothèse commence à émerger avec beaucoup de peine. Peu d'expériences sont encore en sa faveur. Pourtant, citons les travaux d'ANFINSEN et de ses collaborateurs [21] qui ont observé un marquage inégal de la ribonucléase ou de l'insuline synthétisées en présence d'un ou de deux acides aminés radioactifs. KRUIH, DREYFUS et SHAPIRA ont obtenu des résultats du même genre en suivant la synthèse de la globine en présence de glycine ^{14}C [22]. SIMPSON a montré que la protéine du cytochrome C_1 synthétisée *in vitro* par les mitochondries des tissus animaux possède deux résidus de valine d'activités spécifiques fortement différentes [23]. Mais il ne faudrait pas pour autant perdre de vue qu'il ne suffit pas de trouver des peptides dans les cellules vivantes (levures, [24, 25, 26] bactéries [27] ou tissus animaux [28, 29]) ou même de les synthétiser *in vitro* par des enzymes spécifiques comme nous l'avons fait nous mêmes pour affirmer qu'ils sont des intermédiaires dans la biosynthèse des protéines. Il faudrait démontrer de façon irréfutable qu'un tripeptide par exemple valyl-leucyl-glycine s'incorpore dans une chaîne polypeptidique sans subir d'hydrolyse ni de modification de la place respective de chaque résidu. Quoi qu'il en soit les enzymes spécifiques dont nous venons de parler existent dans le cytoplasme ainsi que dans les ribosomes et les microsomes de diverses espèces bactériennes ou animales, et ils synthétisent des peptides. Il faudrait déterminer par quel mécanisme le matériel génétique dirige le mode d'action de ces enzymes lors de la synthèse des protéines.

Pour terminer je résumerai l'essentiel de nos résultats.

Les enzymes que nous avons isolés et purifiés à partir d'*Alcaligenes faecalis* sont capables de catalyser en présence d'acides aminés la dégradation des quatre ribonucléosidetriphosphates en orthophosphate et en nucléosidediphosphates. Chacun des quatre enzymes est spécifique non seulement d'un type de nucléotide, mais également d'un groupe d'acides aminés. Ces enzymes possèdent le pouvoir de distinguer les acides aminés entre eux. Le processus de libération de l'orthophosphate s'accompagne de la formation de liaisons peptidiques. Une multitude de peptides, combinaisons variées, peuvent être formés par ces systèmes enzymatiques. Les peptides contenant un seul acide aminé peuvent également être formés. Par le mécanisme que nous venons de voir ces enzymes fournissent à partir de ribonucléosidetriphosphates les nucléosidediphosphates qui sont d'excellents substrats pour la polynucléotide-phosphorylase, enzyme capable de synthétiser les acides ribonucléiques. Ces observations suggèrent qu'un lien étroit existerait dans le fonctionnement et l'équilibre entre ces deux systèmes enzymatiques en particulier. Nous revenons à l'idée que des précur-

seurs communs peuvent être formés et utilisés dans la biosynthèse des protéines et des acides ribonucléiques c'est-à-dire des ribonucléoprotéines constituants majeurs des cellules de différentes espèces.

BIBLIOGRAPHIE.

1. LIPMANN, F. — *Advanc. Enzymol.*, 1941, 1, 99.
2. HOAGLAND, M. B., KELLER, E. B. et ZAMECNIK, P. C. — *J. Biol. Chem.*, 1956, 218, 345.
3. HOAGLAND, M. B. et ZAMECNIK, P. C. — *Fed. Proc.*, 1957, 16, 197.
4. NOVELLI, G. D. — *Ann. Rev. Microbiol.*, 1960, 14, 65.
5. HOAGLAND, M. B. — The nucleic acids. III. Chargaff et Davidson, Acad. Press, 1960, p. 349.
6. GRUNBERG-MANAGO, M., ORTIZ, P. J. et OCHOA, S. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1956, 20, 269.
7. OCHOA, S. — *Ann. New-York Acad. Sc.*, 1959, 81, 690.
8. BELJANSKI, M. — *C. R. Acad. Sc.*, 1959, 248, 1446.
9. BELJANSKI, M. et OCHOA, S. — *Proc. Nat. Acad. Sc. U.S.*, 1958, 44, 494.
10. SNOKE, J. E. et BLOCH, K. — *J. Biol. Chem.*, 1955, 213, 825.
11. BELJANSKI, M. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 41, 104.
12. BOLTON, E. T. et coll. — Carnegie Institution of Washington. Year Book, 1955-1956, 55, 127.
13. LOWY, B. A., RAMOT, B. et LONDON, J. M. — *J. Biol. Chem.*, 1960, 235, 2919.
14. BELJANSKI, M. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 41, 111.
15. BELJANSKI, M. — *C. R. Acad. Sc.*, 1960, 250, 624.
16. GALE, E. F. et FOLKES, J. P. — *Biochem. J.*, 1953, 53, 493.
17. MAGER, J. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 38, 150.
18. SANGER, F. — *Biochem. J.*, 1945, 39, 507.
19. NISMAN, B. et FUKUHARA, H. — *C. R. Acad. Sc.*, 1960, 251, 908.
20. ZALTA, J. P. — Réunion sur « The structure of cytoplasmic particles and their role in protein synthesis » Reading (England) 28-29 mars 1960.
21. VAUGHAN, M. et ANFINSEN, C. B. — *J. Biol. Chem.*, 1954, 211, 367. *Science*, 1956, 124, 388.
22. KRUIH, J., DREYFUS, J. C., SCHAFIRA, G. et PADIEU, P. — *J. Biol. Chem.*, 1957, 228, 113.
23. SIMPSON, M. — Réunion sur « The structure of cytoplasmic particles and their role in protein synthesis » Reading (England) 28-29 mars 1960.
24. KONINGSBERGER, V. V., GRINTEN, O. van der et OVERBEEK, T. G. — *K. Nederl. Akad. Wetenschap. Proc.*, 1957, 60, 144.
25. SCHUURS, A. H. W. N., KLOET, S. R. de et KONINGSBERGER, V. V. — *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 1960, 3, 301.
26. HARRIS, G. et DAVIES, J. W. — *Nature (London)*, 1959, 184, 788.
27. GRUNBERGER, D. et coll. — *Experientia*, 1960, 16, 54.
28. DIRHEIMER, G., WEIL, J. H. et EBEL, J. P. — *C. R. Acad. Sc.*, 1958, 246, 3384.
29. LISSITZKY, S. et coll. — *C. R. Acad. Sc.*, 1960, 251, 2794.