

L'ACTION DE LA RIBONUCLÉASE ET DE LA DESOXYRIBONUCLÉASE
SUR L'INCORPORATION DE GLYCOCOLLE RADIOACTIF DANS LES
PROTÉINES DE LYSATS DE *MICROCOCCUS LYSODEIKTICUS*

par

M. BELJANSKI*

Laboratoire de Morphologie animale, Université libre de Bruxelles (Belgique)

L'étude du rôle de l'acide ribonucléique dans la synthèse des protéines a fait l'objet de nombreux travaux. Une excellente mise au point de ces travaux fut récemment réalisée par BRACHET¹. La plupart d'entre eux portent sur les homogénéisats des organes d'animaux, sur des microsomes et des mitochondries isolés à partir des cellules animales. Moins nombreux sont les travaux consacrés à l'étude de ce rôle chez les microorganismes utilisés en suspension, soit sans aucun traitement préalable, soit après action des ultrasons² ou du lysozyme³.

Récemment, LESTER³ réussit à obtenir des lysats bactériens de *Micrococcus lysodeikticus*, capables d'incorporer *in vitro* dans les protéines des lysats la leucine marquée. En faisant agir du lysozyme sur une suspension de *Micrococcus lysodeikticus* en présence de saccharose (0.64 M) cet auteur a obtenu une masse visqueuse capable d'incorporer l'acide aminé utilisé. Il a constaté, d'autre part, que l'incorporation de la leucine dans les protéines des lysats dépend de la présence d'acide ribonucléique. Si l'on fait agir la ribonucléase (700 µg) sur des lysats (78 mg de bactéries-poids sec-), l'incorporation de la leucine marquée est totalement supprimée. Si l'on fait agir de la désoxyribonucléase (15 µg), l'incorporation est fortement stimulée.

Nous avons étudié l'incorporation du glyocolle radioactif marqué au ¹⁴C dans des lysats de *Micrococcus lysodeikticus* préparés selon la technique de LESTER, ainsi que l'effet de diverses concentrations de ribonucléase et de désoxyribonucléase. L'action de l'azoture de sodium et du 2-4-dinitrophénol a été également étudiée.

MATÉRIEL UTILISÉ

Une souche de *Micrococcus lysodeikticus* cultivée sur milieu solide a été utilisée. (8 g de Bacto-Nutrient Broth dehydrated Difco, 2 g de glucose, 5 g de NaCl et 30 g d'agar pour 1000 ml d'eau, pH 7).

Ribonucléase réduite commerciale (ou purifiée) provenant de la maison Bios Laboratories.

Désoxyribonucléase préparée au laboratoire.

Solution de glyocolle radioactif (¹⁴C) contenant 1 µM de glyocolle (26,000 imp/min).

Lysozyme cristallisé: Armour Laboratories U.S.A.

Compteur Tracerlab, type cloche, à fenêtre mince.

Conditions expérimentales. La souche de *Micrococcus lysodeikticus*, fut cultivée à 37° sur milieu solide dans des boîtes de Roux, pendant 18 à 19 heures. Les bactéries rapidement récoltées, furent

* Adresse: Laboratoire de chimie biologique, Institut Pasteur, Paris.

lavées deux fois à l'eau distillée refroidie et immédiatement utilisées. L'incubation fut réalisée dans des Erlenmeyers (70 à 100 ml) agités au bain marie à 37°. Le mélange incubé renfermait:

30 à 40 mg de bactéries (poids sec)
 160 μM de tampon succinate-Na, pH 6.7
 86 μM de NaCl
 70 μg de $MgSO_4$
 0.64 M de saccharose; volume total 3.4 ml.

Pour l'obtention des lysats bactériens, 200 μg de lysozyme furent utilisés*.

Avant d'ajouter la solution de glyocolle radioactif (26,000 imp/min) le mélange est maintenu trente minutes à 37°, puis agité pendant 2 heures. Les lysats visqueux sont traités avec quelques μg de désoxyribonucléase pour faire disparaître la masse gélatineuse non centrifugeable. On arrête l'incubation en ajoutant 5 ml d'une solution d'acide trichloracétique (ATC) à 10% et en plongeant immédiatement les Erlenmeyers dans un bain de glace. Le précipité centrifugé est lavé une fois avec une solution d'ATC à 10%, puis abandonné à froid 2 à 3 heures en présence d'ATC à 10%. On centrifuge, on lave le précipité 3 fois avec une solution d'ATC à 5% contenant du glyocolle non radioactif (1.4 g par litre). Les acides nucléiques sont extraits à chaud deux fois pendant 15 minutes avec une solution d'ATC à 5%⁴. Les protéines sont séchées sur disque de papier sous vide en pratiquant plusieurs lavages à l'aide d'acétone. Le nombre d'impulsions est enregistré sur le compteur Tracerlab. L'azote protéique est dosé selon Kjeldahl.

RÉSULTATS

Nos résultats, représentant la moyenne de trois à cinq expériences, sont exprimés en nombre d'impulsions par minute et par mg de protéines. Ils peuvent varier selon les expériences, mais sont toujours nettement supérieurs à ceux obtenus par LESTER (3 à 6 imp/min/mg de protéines). Dans les conditions de nos expériences, ce chiffre est de l'ordre de 45 à 100 impulsions/min/mg de protéines pour les lysats dans le saccharose. Nous pensons que les différences obtenues entre les résultats de LESTER et les nôtres sont dues aux différences des conditions expérimentales: acide aminé différent, "âge" des bactéries, vitesse de préparation des suspensions bactériennes, etc.

Effet de la ribonucléase. La ribonucléase ajoutée à une concentration convenable inhibe fortement ou même supprime presque totalement l'incorporation du glyocolle radioactif dans les protéines des lysats (Fig. 1). Elle est sans action sur les suspensions bactériennes intactes (Tableau I). Cet enzyme agit en dégradant l'acide ribonucléique des lysats (Tableau II), mais il ne dégrade pas celui des bactéries non lysées.

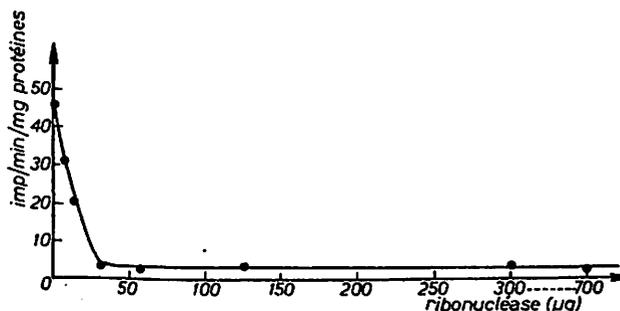


Fig. 1

* Le rôle protecteur du saccharose (0.64 M) vis-à-vis de l'action du lysozyme sur des suspensions de *Micrococcus lys.* fut déjà observé par LESTER³. Les lysats (ne contenant aucune bactérie intacte) constituent une masse visqueuse. Au microscope à contraste de phases, on voit, à la place de la bactérie, une masse centrale noirâtre entourée d'une auréole transparente. Le taux global d'acides nucléiques des lysats ne diffère pratiquement pas de celui des bactéries non lysées. Après deux heures d'agitation à 37°, nous avons trouvé 30% de protéines acidoprécipitables dans des lysats, et 50% dans des bactéries non lysées.

TABLEAU I

	Nombre d'imp/min/mg de protéines
Bactéries intactes	143
Bactéries intactes + saccharose 0.64 M	140
Bactéries intactes + saccharose 0.64 M + ribonucléase (15 ou 700 µg)	145
Lysat	1.8
Lysat + saccharose 0.64 M	47

TABLEAU II

Absorption spectrophotométrique (Beckman) d'une partie de l'extrait trichloracétique à froid.

	λ	E
Lysat dans le saccharose 0.64 M	260	1,000
Lysat dans le saccharose 0.64 M + 15 µg de ribonucléase	260	1,600
Lysat dans le saccharose 0.64 M + 700 µg de ribonucléase	260	2,000

Il semble que l'action de la ribonucléase sur des lysats bactériens en présence de saccharose se manifeste par une dégradation de l'acide ribonucléique et non par une fixation de cet enzyme sur un ou des systèmes responsables de la synthèse protéique. Cet enzyme, en dégradant l'acide ribonucléique, arrête donc l'incorporation du glycolle dans les protéines. Ainsi la synthèse protéique serait fortement diminuée. Pourtant, une très faible incorporation a lieu en présence de ribonucléase, ce qui est probablement dû à un résidu nucléique non dégradé intervenant à un rythme très ralenti dans la synthèse protéique. L'activité protéolytique de la ribonucléase semble être nulle, car la chromatographie sur colonne de l'enzyme commercial n'a pas décelé la présence d'une protéine étrangère dans l'enzyme utilisé.

Effet de la désoxyribonucléase. L'action de cet enzyme sur des lysats dans le sac-

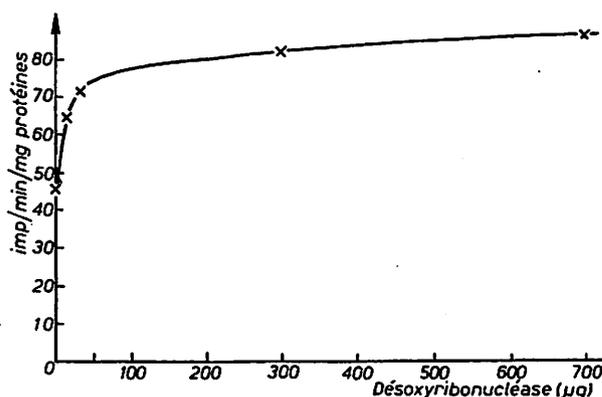


Fig. 2

charose diffère nettement de celle provoquée par la ribonucléase. Cette dernière supprime l'incorporation du glycolle dans les protéines des lysats. La désoxyribonucléase, au

Bibliographie p. 431.

contraire, stimule fortement l'incorporation de l'acide aminé utilisé (Fig. 2) et elle n'a pas d'effet sur les suspensions bactériennes non lysées (Tableau III). Elle dégrade l'acide désoxyribonucléique des lysats en présence de saccharose (Tableau IV), mais elle n'a pas d'action sur les bactéries intactes.

TABLEAU III

	<i>Nombre d'imp/min/mg de protéines</i>
Bactéries intactes	143
Bactéries + saccharose 0.64 M	140
Bactéries + saccharose 0.64 M + 15 ou 700 µg de désoxyribonucléase	148

TABLEAU IV

Absorption spectrophotométrique (Beckman) d'une partie de l'extrait trichloracétique à froid.

	λ	<i>E</i>
Lysat dans le saccharose 0.64 M	260	1,000
Lysat dans le saccharose + 15 µg de désoxyribonucléase	260	1,230
Lysat dans le saccharose + 700 µg de désoxyribonucléase	260	2,000

Ayant observé l'effet stimulant de la désoxyribonucléase dans l'incorporation du glycolle radioactif dans les protéines des lysats dans le saccharose, nous nous sommes demandé si la désoxyribonucléase n'exerçait pas une action stimulante sur la respiration des lysats. Pour cela, nous avons comparé, dans l'appareil de Warburg, la respiration des lysats dans le saccharose en présence et en absence de désoxyribonucléase d'une part, et de ribonucléase d'autre part (Fig. 3).

La respiration des lysats dans le saccharose ne semble pas dépendre de la concentration de désoxyribonucléase, bien que celle-ci exerce une action stimulante. La ribonucléase n'a pas d'effet à une concentration où elle inhibe de plus de 50% l'incorporation.

Comme à l'heure actuelle on pense que la synthèse protéique ou peptidique dépendrait de la respiration en passant par les phosphorylations couplées, nous nous sommes demandé si la désoxyribonucléase n'était pas capable de créer une source d'énergie (et de phosphate), de l'ATP par exemple. Faute de microtechnique sûre et précise, nous n'avons pas pu déterminer le taux d'ATP dans les lysats. Si l'on imaginait que la désoxyribonucléase crée une source d'énergie (ATP), on pourrait espérer stimuler l'incorporation du glycolle dans les protéines des lysats en ajoutant de l'ATP, en absence et en présence de désoxyribonucléase. Là où nous avons ajouté de l'ATP comme source d'énergie (0.01 M), l'incorporation du glycolle radioactif a été fortement inhibée. Ajouté comme transporteur de phosphate (0.001 M), l'ATP ne semble jouer

Bibliographie p. 431.

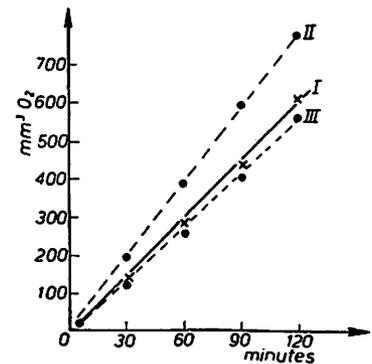


Fig. 3. I. Lysat — saccharose; II. Lysat — saccharose + désoxyribonucléase (15 ou 700 µg) III. Lysat — saccharose + ribonucléase (15 µg).

aucun rôle dans l'incorporation du glycolle radioactif dans les protéines des lysats dans le saccharose.

Effet de l'azoture de sodium et du 2,4-dinitrophénol. Il est bien connu que l'azoture de sodium (0.005 M) inhibe la respiration et les phosphorylations chez les microorganismes⁵. La respiration des lysats en présence et en absence de désoxyribonucléase est presque complètement inhibée par l'azoture ainsi que l'incorporation du glycolle dans les protéines (Tableau V). Le 2,4-dinitrophénol (0.001 M) inhibe moins fortement la respiration des lysats que l'azoture de sodium, mais il inhibe complètement l'incorporation du glycolle dans les protéines (Tableau V). S'agit-il de l'inhibition des phosphorylations non oxydatives? (6).

TABLEAU V

	Nombre imp/min/mg de protéines
Lysat dans le saccharose 0.64 M	48
Lysat dans le saccharose 0.64 M + azoture (0.005 M)	3.7
Lysat dans le saccharose 0.64 M + 2,4-dinitrophénol (0.001 M)	4.0

En ce qui concerne le rôle de la désoxyribonucléase dans l'incorporation du glycolle dans les protéines des lysats dans le saccharose, il nous est difficile à l'heure actuelle de donner une explication satisfaisante. Son rôle semble être complexe. Nous nous bornerons à envisager deux hypothèses qui nous paraissent utiles afin d'expliquer l'effet de cet enzyme dans la stimulation de la synthèse protéique des lysats de *Micrococcus lysodeikticus*:

1. La désoxyribonucléase diminue la viscosité des lysats dans le saccharose et elle facilite ainsi l'incorporation du glycolle radioactif. Si l'on augmente les doses de la désoxyribonucléase, l'incorporation semble devenir plus importante. Des doses fortes de cet enzyme provoqueraient plus rapidement la chute de la viscosité que de petites doses, et l'incorporation de l'acide aminé marqué pourrait ainsi se faire plus rapidement.

2. La désoxyribonucléase augmenterait le taux d'un cofacteur phosphoré qui participerait dans les phosphorylations couplées et dans la stimulation de la respiration. L'existence d'un tel cofacteur fut envisagée par SIEKEVITZ⁷ dans le cas des microsomes du foie du rat. Ce cofacteur stimulerait l'incorporation de l'alanine dans les microsomes.

Il est vrai que la désoxyribonucléase que nous avons utilisée n'était pas très purifiée. Pourtant, l'effet stimulant de cet enzyme dans l'incorporation du glycolle correspond à celui observé par LESTER, dans le cas de la leucine. Nous pensons que la désoxyribonucléase pourrait, en plus de son rôle normal, soit contenir une nucléotidase, soit activer celle-ci qui libérerait le phosphate à partir des nucléotides pour le céder au succinate par exemple. Ce dernier serait alors oxydé. Cette hypothèse nous paraît d'autant plus probable que l'existence d'un complexe succinate-phosphate labile a été démontrée dans l'oxydation du succinate à l'aide d'un extrait d'*Escherichia coli*⁸.

DISCUSSION

On pense à l'heure actuelle que la synthèse protéique et peptidique dépend de la respiration, ayant comme étape intermédiaire importante les phosphorylations cou-

Bibliographie p. 431.

plées^{9,10}. Une source de phosphate et d'énergie serait donc nécessaire. PETERSON ET GREENBERG¹¹ ont observé que l'ATP et Mg^{+2} stimulent l'incorporation de certains acides aminés dans les mitochondries des homogénéisats du foie du rat. Pour SIEKEVITZ⁷, l'ATP aurait un rôle secondaire dans l'incorporation de l'alanine marquée dans les microsomes isolés à partir du foie du rat. Selon cet auteur, l'ATP fournirait le phosphate pour la formation des cofacteurs (α -ceto-glutarate ou succinate-phosphorés) qui stimulent l'incorporation de l'alanine dans les protéines.

En ajoutant de l'ATP aux lysats dans le saccharose, en présence et en absence de désoxyribonucléase, nous n'avons observé aucune action stimulante de ce composé. Si les ions orthophosphoriques sont indispensables à la synthèse protéique, il faudrait que la désoxyribonucléase crée dans les lysats une source plus riche en phosphate, puisque cet enzyme stimule notablement l'incorporation du glyocolle. Le phosphate nécessaire à la formation d'un cofacteur phosphoré stimulant l'incorporation du glyocolle pourrait, pensons-nous, provenir de certains nucléotides par exemple, libérés sous l'action de la désoxyribonucléase. D'après SPIEGELMAN ET KAMEN, le phosphate utilisé dans la synthèse protéique pourrait provenir des acides nucléiques¹².

Dans les lysats de *Micrococcus lyso*, que nous avons étudiés, la présence d'acide ribonucléique polymérisé semble être nécessaire pour la synthèse des protéines. Si l'on accélère la désintégration de cet acide par la ribonucléase, la synthèse protéique est presque totalement bloquée. Il ne serait pas impossible que les ribonucléotides libérés en grande quantité inhibent l'incorporation du glyocolle dans les protéines des lysats en présence de saccharose.

Quant à l'ac. désoxyribonucléique, sa dépolymérisation par la désoxyribonucléase ne provoque pas l'arrêt de l'incorporation du glyocolle dans les protéines des lysats. Au contraire, elle stimule notablement cette incorporation.

Nous remercions vivement Messieurs les professeurs J. BRACHET et H. CHANTRENNE de leurs suggestions et des facilités de travail qu'ils nous ont données.

RÉSUMÉ

1. Nous avons observé une forte incorporation du glyocolle radioactif dans les protéines de *Micrococcus lysodeikticus* non lysé et lysé avec du lysozyme en présence de saccharose.
2. La ribonucléase dégrade l'acide ribonucléique des lysats et supprime presque totalement l'incorporation du glyocolle dans les protéines. Elle n'agit pratiquement pas sur les suspensions bactériennes intactes.
3. La désoxyribonucléase stimule notablement l'incorporation du glyocolle dans les protéines des lysats, tout en dégradant l'acide désoxyribonucléique de ces derniers; elle active leur respiration. Cet enzyme ne semble pas avoir d'action sur les suspensions bactériennes intactes.
4. L'ATP ajouté comme source d'énergie diminue l'incorporation du glyocolle. Comme transporteur de phosphate, il n'agit pas sur la synthèse protéique.
5. Deux hypothèses sont envisagées afin d'essayer d'expliquer l'effet stimulant de la désoxyribonucléase sur l'incorporation du glyocolle dans les protéines des lysats en présence de saccharose.

SUMMARY

1. The author has observed a strong incorporation of radioactive glycine into the proteins of *Micrococcus lysodeikticus* non-lysed or lysed with lysozyme in the presence of saccharose.
2. Ribonuclease degrades ribonucleic acid in the lysates and nearly totally suppresses the incorporation of glycine into the proteins. It does not act on intact bacterial suspensions.
3. Desoxyribonuclease stimulates noticeably the incorporation of glycine in the proteins of the

Bibliographie p. 431.

lysates, degrading desoxyribonucleic acid in the latter; it activates their respiration. This enzyme does not appear to act on intact bacterial suspensions.

4. ATP added as source of energy diminishes the incorporation of glycine. As phosphate carrier, it does not act on the protein synthesis.

5. Two hypotheses are put forward to try to explain the stimulating effect of desoxyribonuclease on the incorporation of glycine in the proteins of lysates in the presence of saccharose.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Wir haben einen starken Einbau von radioaktivem Glykokoll in die Proteine von *Micrococcus lysodeikticus* beobachtet — sowohl nicht lysiert wie lysiert mit Lysozym in Anwesenheit von Saccharose.

2. Die Ribonuklease erniedrigt die Ribonukleinsäure der Lysate und unterdrückt beinahe vollständig den Einbau von Glykokoll in die Proteine. Sie ist praktisch wirkungslos auf Suspensionen von intakten Bakterien.

3. Die Desoxyribonuklease stimuliert den Einbau von Glykokoll in die Proteine des Lysats bedeutend, wobei sie die Desoxyribonukleinsäure der Lysate vollständig abbaut.; sie aktiviert ihre Respiration. Dieses Enzym scheint keine Wirkung auf die Suspensionen intakter Bakterien zu haben.

4. Als Energiequelle hinzugefügtes ATP verkleinert den Einbau von Glykokoll. Als Phosphatüberträger wirkt es nicht auf die Proteinsynthese.

5. Schliesslich werden zwei Hypothesen ins Auge gefasst, die den stimulierenden Effekt der Desoxyribonuklease auf den Einbau von Glykokoll in die Proteine der Lysate in Anwesenheit von Saccharose zu erklären versuchen.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. BRACHET, *Actualités Biochimiques*, No. 16 (1952).
- ² F. GALE ET J. P. FOLKES, *Biochem. J.*, 55 (1953) XI.
- ³ R. L. LESTER, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953) 5448.
- ⁴ SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.*, 161 (1945) 293.
- ⁵ H. BORSOOK, *Adv. in Protein Chem.*, 8 (1953) 128.
- ⁶ W. F. LOOMIS ET LIPMANN, *J. Biol. Chem.*, 173 (1948) 807.
- ⁷ P. SIEKEVITZ, *J. Biol. Chem.*, 195 (1952) 549.
- ⁸ D. F. HERSEY ET S. J. AJL, *J. Gen. Phys.*, 34 (1950) 295.
- ⁹ F. LIPMANN, *Adv. in Enzymol.*, 1 (1941) 99; idem, 6 (1946) 231.
- ¹⁰ H. CHANTRENNE, *Recherches sur le mécanisme de la synthèse des protéines*, 1951.
- ¹¹ E. A. PETERSON ET D. M. GREENBERG, *J. Biol. Chem.*, 194 (1952) 359.
- ¹² S. SPIEGELMAN ET M. D. KAMEN, *Science*, 104 (1945) 581.

Reçu le 1 juillet 1954