

DÉTERMINATION DES ACIDES NUCLÉIQUES DE *SACCHAROMYCES ITALICUS* (CASTELLI) TRAITÉS PAR L'OXYDE DE CARBONE (CO), LE CYANURE DE POTASSIUM (CNK) OU L'AZIDE DE SODIUM (N_3Na)

A. JENEY, A. SZENDREY et E. VIG

Institut d'Hygiène, l'Université de Debrecen, Hongrie

(Received 10 November 1960)

Abstract—Qualitative and quantitative determinations have been made of the nucleic acids in *Saccharomyces italicus* Castelli, subject to the action of CO, KCN, and NaN_3 ; and an analysis using the isotope ^{32}P has been made. According to the results:

- (1) The total quantity of nucleic acids increased only under the influence of CO; under that of KCN it remained constant; while under that of NaN_3 it decreased.
- (2) The quantity of DNA increased 18-19 times under the influence of CO, and 10 times under that of KCN; NaN_3 had only a slight effect.
- (3) The quantity of phosphoproteides (PP) diminished by about 65 per cent under the influence of NaN_3 . It remained constant under the influence of the other materials.
- (4) The quantity of RNA increased by 33 per cent, compared with the controls, under the influence of CO; it was unchanged by KCN; and decreased by 60 per cent under the influence of NaN_3 .
- (5) The amount of phosphorus intermediates (IMP) was greatest in the controls: the decrease was about 35 per cent for cells treated with CO, about 34 per cent for KCN, and about 73 per cent for NaN_3 .
- (6) Phosphorus incorporated in the culture medium decreased on the average from 7 mg per g dry weight for controls to 14.41 mg per g after treatment with CO, and to 5.40 after NaN_3 .
- (7) The results obtained by isotopic analysis agreed with these figures, except for the value of the IMP, which increased moderately (by 10 per cent). It is interesting to note that the DNA increase was more marked in the presence of CO (63 per cent) than in that of KCN.

DANS nos recherches précédentes, nous avons examiné le comportement de *Saccharomyces cerevisiae* et de *Saccharomyces italicus* Castelli sous l'action de CO, de CNK et de N_3Na à l'aide de tubes d'Einhorn, du manomètre de Van Itterson-Kluyver, de l'appareil de Warburg, ainsi que de microcalorimètre.¹⁻⁴ Nous avons également étudié l'action bactério- et fungistatique de CNK et de N_3Na .⁵

MATÉRIAUX ET MÉTHODES

Nous avons utilisé pour nos recherches des cellules séchées de *Saccharomyces italicus* Castelli, cultivées sur gélose au marc (de malt) puis récoltées, lavées plusieurs fois et enfin centrifugées. Dans des Erlenmeyers stériles de 50 ml, nous avons introduit 20-20 ml de milieu de culture au pH 6, contenant 10% de glucose, puis nous les avons

ensemencés par 0,1 g de cellules sèches de levures, âgées de 2 semaines au plus. Les concentrations des réactifs ajoutés au milieu de culture étaient de: mole 1000 pour le CNK et le N₃Na, de 2% pour le gaz CO, donc les mêmes que dans nos expériences précédentes.¹⁻³ Nous avons produit le gaz CO par la réaction de l'acide sulfurique sur l'acid formique, tout deux étant analytiquement purs.

Le gaz ainsi obtenu a été lavé successivement dans une solution de soude caustique, puis dans l'eau distillée pour enlever les impuretés acidiques éventuelles. Le gaz ainsi purifié a été ensuite introduit dans de l'eau distillée stérile de façon à obtenir une solution aqueuse saturée c'est à dire le 2% environ. La concentration de CO a été déterminée par la méthode de Wennesland.⁶ Dans les récipients de contrôle nous n'avons mis que du milieu de culture stérile et 0,1 g de cellules sèches de levures. L'incubation a été de 48 heures à 26 °C. Après ce délai, le contenu des récipients est centrifugé et séché, puis le poids du sédiment sec est mesuré. Nous avons examiné la teneur en acides nucléiques d'environ 440-480 millions de celles de levure (dans 1 ml) traitées par différents réactifs. La détermination des proportions des différentes réactifs. La détermination des proportions des différentes fractions nucléiques a été faite selon la méthode de Schmidt-Tannhauser (S.T.), combinée à celle de Schneider⁷ (Sch.).

La combinaison des deux méthodes permet d'éliminer plusieurs inconvénients propres à chacune d'elles isolement.⁸ Avec la méthode "Sch.", l'ADN n'influence pas la réaction à l'orcine de l'ARN. D'autre part, les valeurs des phospho-protéines ne sont pas aussi anormalement élevées que dans le cas de la seule méthode "Sch.". Tandis que la méthode "S.T." est basée sur la détermination du phosphore des différentes fractions, la méthode "Sch." distingue le ribose et le désoxyribose par leurs réactions colorées. Les nucléotides sont déterminés par leurs pentoses et non pas par contenu en phosphore.

SCHÉMA DE LA MÉTHODE "S.T."

Le résidu sec, en poudre, des cellules de levure, séchées et mesurées, est dissous dans la soude caustique et mis en incubation pendant un certain temps.

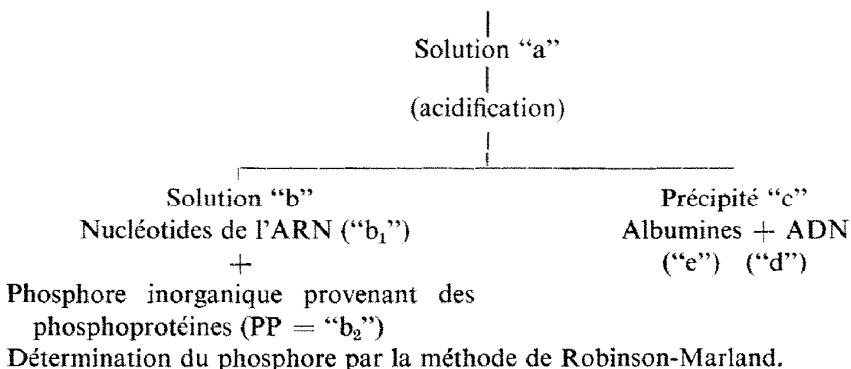
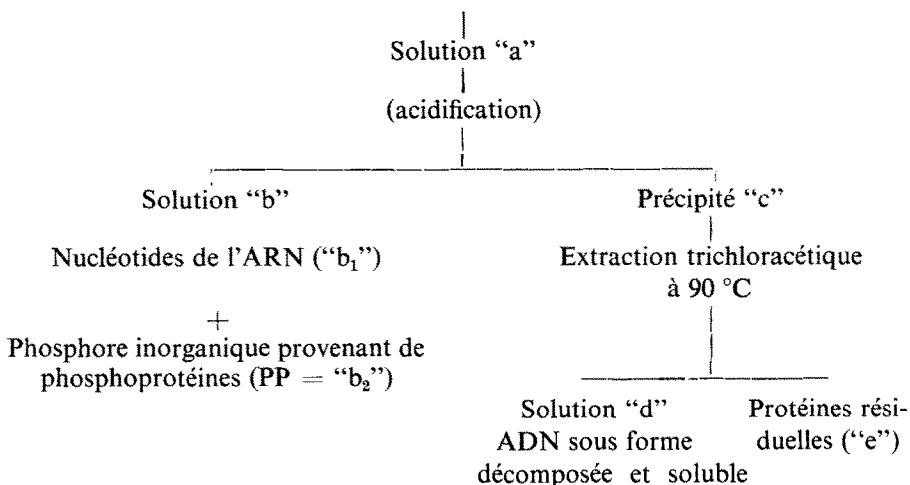


SCHÉMA DE LA MÉTHODE "S.T." ET "SCH." COMBINÉE

Le résidu sec, en poudre, des cellules de levure, séchées et mesurées, est dissous dans la soude caustique.



Nous avons répété nos examens à plusieurs reprises. Nous donnons nos résultats en valeurs moyennes. Ces expériences ont été complétées par des examens exécutés à l'aide de l'isotope ^{32}P . Les cellules de levure ont été cultivées sur un gélose au marc de malt, contenant 5 μc de ^{32}P pour 5 ml de milieu. Les fractions nucléiques des cellules de levure étudiés sont les suivants: (a) tout les acides nucléiques (AN) = ARN + ADN (= "b₁" + "d"); (b) ARN + P inorg.; (c) = ADN ("d") + protéines résiduelles ("e"); (f) phosphore intermédiaire (IMP) = phosphore ne provenant pas d'acides nucléiques (P total = "a"). Phosphoprotéines (PP) = le contenu en phosphore des protéines ("b₂").

RÉSULTATS

1. Dans nos expériences, exécutées par la *première méthode*, nous avons trouvé, que la quantité totale des acides nucléiques n'augmentait que sous l'action de CO (51%). Elle est restée presque inchangée sous l'action de CNK, tandis que, sous l'action de N_3Na , nous avons constaté une diminution nette (65%).

La quantité de l'ADN n'a changé pratiquement que très peu sous l'action de N_3Na et encore elle a plutôt diminué. Dans les séries traitées par le CNK, la quantité de l'ADN a été presque 10 fois plus grande et, sous l'influence de CO, elle est même devenue 18–19 fois plus grande. Dans les valeurs des phosphoprotéides, nous n'avons trouvé de changement qu'en cas de traitement au N_3Na : il s'agissait d'une diminution de 65%.

La quantité de l'ARN a diminué de 60% par rapport aux contrôles sous l'action de N_3Na . Elle est restée presque invariée sous l'action de CNK, et montrait une augmentation de 33% sous l'influence de CO. La quantité du phosphore intermédiaire la plus élevée a été trouvée dans les contrôles. Nous avons trouvé une diminution de 34% dans les cas des cellules traitées par CNK, de 35% pour celles traitées par N_3Na . La diminution du phosphore incorporé au milieu de culture est montée jusqu'à 7 mg/g de substance sèche dans les contrôles, jusqu'à 5,40 mg/g après un traitement de N_3Na et 10,41 mg/g après celui de CO. L'action de CNK n'a pu être évaluée de ce point de vue (voir Tableaux 1 et Fig. 1).

2. Nous avons complété nos expériences par des examens exécutés à l'aide de l'isotope ^{32}P . Nous avons incorporé $5 \mu\text{c}$ de ^{32}P au milieu au marc de malt gélosé réparti dans des tubes inclinés. Après l'incubation, nous avons enlevé les colonies avec précaution à l'aide d'une anse. Il faut éviter de toucher la gélose elle-même. Nous avons lavé les cellules à plusieurs reprises ou moyen de soluté physiologique,

TABLEAU 1.

	Contrôles	N_3Na (mg/g de substance sèche)	CNK	CO
Nombre des cellules	480×10^6	450×10^6	500×10^6	486×10^6
Quantité totale des acides nucléiques	7,53	2,60	8,07	11,38
ADN	0,11	0,09	1,03	2,11
PP	1,07	0,30	1,25	1,29
ARN	6,91	2,37	6,91	9,21
P intermédiaire	4,91	1,15	3,41	3,05
Teneur en P du milieu au 0 heure	43,50	43,50	43,50	43,50
Teneur en P du milieu au 48 heures	36,42	38,10	Non évaluable	33,09
Diminution du P du milieu	7,08	5,40	Non évaluable	10,41

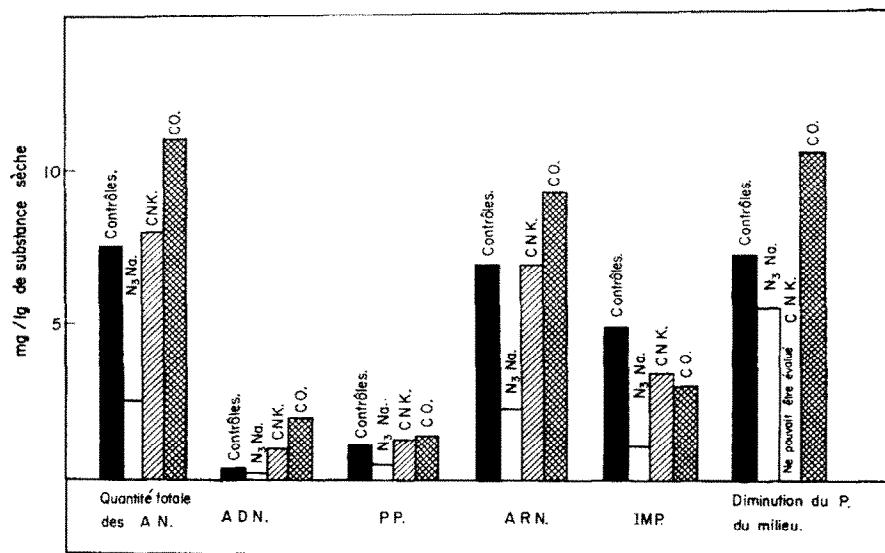


FIG. 1. Examens des acides nucléiques des cellules de levure. Concentrations: N_3Na , mol/1000; CNK, mole/1000; CO, 2%.

jusqu'au moment où les eaux mères ne montraient plus d'activité radioactive. En mesurant l'activité propre des cellules même, nous avons trouvé qu'elle correspondait à une activité de $2 \mu\text{c}$. Les traitements par les divers réactifs ont été les mêmes que dans les expériences précédentes. Après avoir établi le nombre des cellules et leur résidu sec, nous avons séparé les acides nucléiques par la méthode combinée Schmidt-Tannhauser-Schneider, puis nous avons mesuré l'activité des différentes fractions.

RÉSULTATS

Nos résultats sont représentés dans le Tableau 2 et la Fig. 2. (Ce sont des valeurs moyennes de quatre examens parallèles, exécutés en deux séries d'expériences.)

Les changements produits dans les différentes fractions sous l'influence des traitements de N_3Na , de CNK et de CO figurent au Tableau 2, où ils sont indiqués par rapport au contrôle pris chaque fois comme unité.

TABLEAU 2

	Contrôles	N_3Na	CNK	CO
Quantité totale des acides nucléiques	1,000	— 0,660	+ 0,151	+ 0,315
ADN	1,000	— 0,523	+ 1,130	+ 2,280
PP	1,000	— 0,661	— 0,054	+ 0,040
ARN	1,000	— 0,669	+ 0,025	+ 0,088
IMP	1,000	+ 0,109	— 0,092	+ 0,098

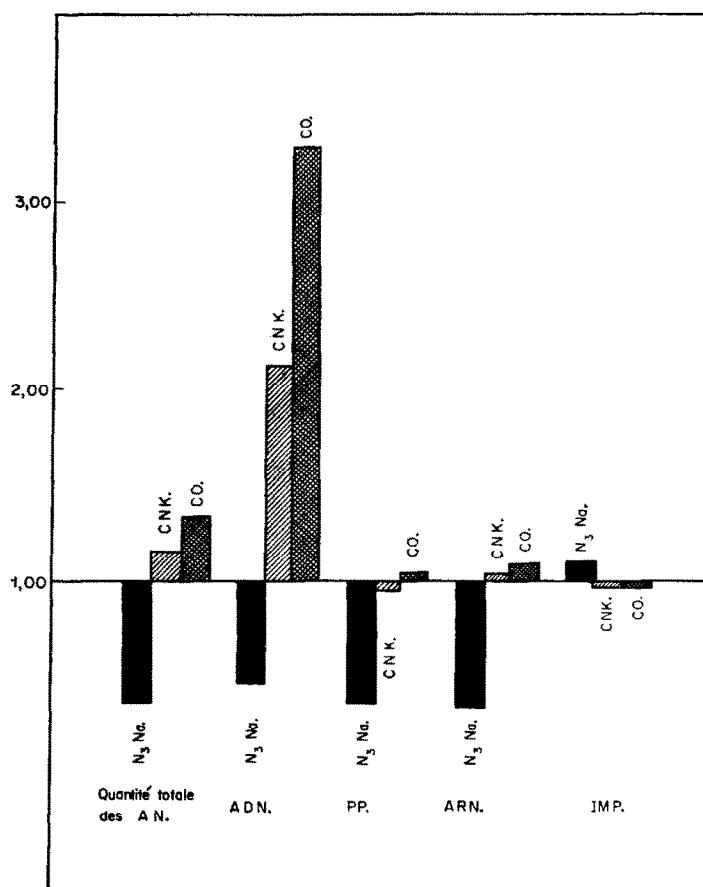


FIG. 2. Examens de *Saccharomyces cerevisiae* à l'acide de l'isotope ^{32}P . changement des résultats par rapport aux contrôles.

Tout en admettant, que la séparation des différentes fractions des acides nucléiques peut ne pas être parfaitement exacte, il apparaît, néanmoins, que la quantité totale des acides nucléiques a augmenté sous l'effet de CNK de 15% et sous celui de CO de 32%, tandis qu'elle a diminué de 66% environ sous l'effet de l'azide. De même, sous l'action de N_3Na , il y a une diminution de l'ADN, de PP et de l'ARN (de 52, de 66 et de 67%, respectivement). La valeur de l'IMP est cependant augmenté de 11%. Sous l'action de CNK, la quantité de l'ADN augmente de 113%, tandis que celle l'ARN n'est augmentée que de 2,5%. Les quantités de PP et de l'IMP diminuent de 5,4 et 9%, respectivement. Sous l'action de CO la quantité d'ADN augmente de 228%, celle de PP, de 4% et l'ARN de 9%, tandis que l'IMP diminue de 9,8%. Par conséquent, nous pouvons conclure que l'action de CO est à peu près égale à celle de CNK, tandis que N_3Na exerce une action toute opposée. Il est remarquable, que, sous l'effet du traitement par CO, l'augmentation de l'ADN soit de 63% plus grande que sous l'action de CNK.

DISCUSSION DES RÉSULTATS

Au cours de nos propres expériences nous avons remarqué une différence nette entre les actions de N_3Na , CNK et surtout CO, sur le métabolisme nucléinique des cellules de levure. N_3Na provoque une diminution de la quantité totale des acides nucléiques, de l'ADN, de l'ARN et du phosphore protéinique. Seule la valeur du phosphore intermédiaire montre une légère augmentation. Le contraste entre l'action de N_3Na et celle de CNK a été déjà traité dans un article précédent. CNK n'inhibe pas la réduction des nitrates et ne possède guère d'effet bactériostatique ou fungistatique, contrairement à N_3Na . CNK empêche la réduction du fer ferrique, tandis que N_3Na inhibe l'oxydation du fer ferreux. D'après nos expériences, nous pouvons ajouter à ces différences celle qui se traduisent nettement par l'influence exercée sur le métabolisme nucléinique. Du fait que l'action de CNK est semblable à celle de CO, on pourrait supposer que les deux substances réagissent de la même façon, c'est à dire qu'elles empêchent la respiration, l'oxydation directe du glucose, ainsi que la formation d'acide gluconique en présence d'oxygène. On pourrait chercher la cause des différences existant entre l'action de ces deux substances, d'une part, et celle de N_3Na , d'autre part, dans le fait que ce dernier inhibe la synthèse des hydrates de carbone mais n'inhibe pas la fermentation anaérobie.

Étant donné, cependant, que l'action de CO est beaucoup plus évidente que celle de CNK, il faut chercher d'autres explications aussi. Selon nos connaissances actuelles, CO_2 est utilisé par tout organisme pour la formation du noyau pyrimidique par l'intermédiaire de phosphate de carbamyle ($NH_2COOP_3H_2$). La réduction de CO_2 ou des bicarbonates par la déhydrogénase formique ubiquitaire conduit à la formation des formiates. C'est le DPNH qui joue ici le rôle de donneur de H_2 .

Pour nos recherches futures, nous avons adopté l'hypothèse suivante: la formation des formiates peut se faire aussi bien à partir de CO qu'à partir de CO_2 . Pour la formation du soi-disant "formiate actif", c'est l'acide tétrahydrofolique qui est responsable (THFA).⁹ A côté de "l'acétate actif" (acétyl CoA), c'est cette substance qui joue un rôle primordial au cours des biosynthèses. Il est connu, que le "formiate actif" occupe une place centrale au cours du métabolisme de l'acide formique, de la sérine, du glycocolle, de l'acétone, de la méthionine (créatinine) et des nucléotides.

Les publications récentes de Goldwait,¹⁰ de Levenberg et Buchanan^{11, 12} prouvent aussi le rôle de la formylation dans la formation des noyaux puriques.

Nos propres expériences prouvent aussi que la biosynthèse des acides nucléiques peut être facilitée non seulement par la présence du formaldéhyde ou des formiates ou, éventuellement, de "formiate actif" provenant de ceux-ci, mais aussi par CO, qui peut être également la source de la formation de formiates.

Sous l'influence de CO, c'est surtout la production d'ADN qui a augmenté. L'augmentation correspondant obtenu par l'action de CNK est deux fois moindre.

Nous avons constaté, au cours de nos expériences précédentes, que CO favorise la fermentation du glucose. Son activité sur le métabolisme nucléinique est encore plus marquée. Ceci est d'autant plus important que nous ne connaissons pas d'autres substances qui provoquent un aussi grand changement dans la répartition des acides nucléiques et qui entraînent, notamment, une telle augmentation de l'ADN.

Nos constatations ouvrent dès lors une nouvelle voie et donnent un aspect nouveau non seulement au métabolisme des cellules de levure, mais aussi à celui d'autres micro-organismes, et même à celui des cellules végétales et animales.

Nos recherches portant sur le même sujet, mais poursuivies avec un matériel très différent, des tissus tumoraux provenant de tumeur d'ascites d'Ehrlich son actuellement en cours.

SOMMAIRE

Les auteurs ont déterminé, par des essais quantitatifs et qualitatifs, les acides nucléiques de *Saccharomyces italicus* Castelli soumis à l'action de CO, CNK et N₃Na. Ils ont complété leurs examens par des essais exécutés à l'aide de l'isotope ³²P. Selon leurs résultats :

(1) La quantité totale des acides nucléiques n'a augmenté que sous l'influence de CO. Sous l'influence de CNK elle est restée constante, tandis que sous celle de N₃Na elle a diminué.

(2) La quantité d'acide désoxyribonucléique (ADN) a augmenté de 18 à 19 fois sous l'influence de CO et de 10 fois sous celle de CNK. Pratiquement, N₃Na n'a influencé que très peu la quantité d'ADN.

(3) La quantité des phosphoprotéides (PP) a diminué de 65% environ sous l'influence de N₃Na. Elle est restée à peu près constante sous l'influence des deux autres produits.

(4) La quantité d'acide ribonucléique (ARN) a augmenté (par rapport aux contrôles) de 33% sous l'influence de CO, elle n'a pas changé sous celle de CNK et elle a diminué de 60% sous celle de N₃Na.

(5) Le taux de phosphore intermédiaire (IMP) était le plus élevé chez les contrôles. La diminution était d'environ 35% pour les cellulés traitées au CO, de 34% pour celles traitées par CNK et de 73% pour celles traitées au N₃Na.

(6) Le phosphore incorporé au milieu de culture a diminué, en moyenne, de 7 mg/g de substance sèche dans les cas des contrôles, de 10,41 mg/g après traitement au CO et de 5,40 mg/g après traitement au N₃Na.

(7) Les résultats moyens des essais exécutés avec du phosphore isotope ³²P correspondaient aux précédents, à l'exception de la valeur du phosphore intermédiaire, qui a montré dans cette série d'expériences une augmentation modérée (11%). Il

convient de remarquer que l'augmentation de l'ADN a été plus accentuée sous l'action de CO (63%) que sous celle de CNK.

BIBLIOGRAPHIE

1. E. JENEY, S. SZENDREY et É. DÁVID, *Acta Physiologica Acad. Sci. Hung. Suppl.* **5**, 51 (1954).
2. E. JENEY et S. SZENDREY, *Gigienia i Sanitarija* No. 11, 36 (1956).
3. E. JENEY et S. SZENDREY, *Egészségtudomány* **3**, 59 (1959).
4. E. JENEY, B. PAZONYI et S. SZENDREY, *Zbl. Bakt. II Orig.* (1960). Sous presse.
5. E. JENEY et T. ZSOLNAI, *Zbl. Bakt. I Orig.* **171**, 117 (1957).
6. R. WENNESLAND, *Acta Phys. Scand.* **1** (1940).
7. W. C. SCHNEIDER, *J. Biol. Chem.* **161**, 293 (1945).
8. B. TANKÓ, *Magyar Kémikusok Lapja* **12**, 277 (1957).
9. G. K. GREENBERG, *J. Biol. Chem.* **190**, 611 (1951).
10. D. A. GOLDTWAIT, *J. Biol. Chem.* **221**, 555, 569, 1071 (1956); *Ibid.* **222**, 1051 (1956).
11. B. LEVENBERG et J. M. BUCHANAN, *J. Amer. Chem. Soc.* **78**, 504 (1956).
12. B. LEVENBERG et J. M. BUCHANAN, *J. Biol. Chem.* **224**, 1015, 1019 (1957).