

ACTION DE LA RIBONUCLÉASE SUR LA CROISSANCE NÉOPLASIQUE

V. ASPECTS MÉTABOLIQUES DE L'EFFET CANCÉROSTATIQUE

L. LEDOUX* ET F. VANDERHAEGHE

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

INTRODUCTION

Des travaux récents ont montré que la ribonucléase (RNase) peut traverser les membranes cellulaires de certains organismes vivants et arrêter leur croissance: KAUFMANN *et al.*^{1,2} ont décrit les anomalies produites par la ribonucléase dans les cellules des racines d'oignon et BRACHET^{3,4,5} a étudié les phénomènes biochimiques qui accompagnent l'arrêt de la croissance de ces racines; il a constaté, en particulier, que la synthèse des protéines s'arrête dans les racines traitées à la ribonucléase. Nous avons, d'autre part⁶⁻¹⁰, montré que la RNase enzymatiquement active peut passer à travers les membranes cellulaires des oeufs d'Amphibiens et bloquer leur développement, même à des concentrations très faibles.

Des effets semblables ont également été observés pour la synthèse des protéines ou la croissance dans des organismes très divers: amibes^{11,12}, cellules synthétisant le virus de la mosaïque du tabac¹³ ou de la grippe¹⁴, *B. megatherium*^{15,16}, cultures de fibroblastes ou de myoblastes^{17,18}. La RNase apparaît donc comme un agent inhibiteur puissant de la croissance cellulaire normale et de la multiplication des virus qui contiennent de l'acide ribonucléique.

En ce qui concerne les croissances cellulaires anormales, nous avons signalé, à plusieurs reprises¹⁸⁻²³, l'effet cancérostatique obtenu à l'aide de la ribonucléase, sur un certain nombre de tumeurs solides ou de tumeurs d'ascites.

L'étude biochimique de cet effet cancérostatique est complexe et le choix du matériel cellulaire est très important. Parmi les tumeurs expérimentales utilisables pour une telle étude, il convient de choisir celles qui offrent les meilleures garanties d'homogénéité biochimique et biologique. Les tumeurs d'ascites répondent le mieux à ces exigences: elles sont riches en cellules cancéreuses (80-90%)²⁴ en suspension dans un milieu nutritif très homogène²⁵, continuellement brassé par le péristaltisme.

Nous avons décrit précédemment quelques-uns des caractères biochimiques du matériel utilisé²⁶ (la tumeur de Landschütz) et fait part des résultats préliminaires obtenus *in vitro*^{18,22,27-31}. Ces résultats indiquent que l'action de la ribonucléase s'accompagne de troubles profonds du métabolisme cellulaire caractérisés par une importante synthèse initiale d'acide ribonucléique et par une augmentation considérable de

* Chargé de Recherches du Fonds national belge de la Recherche scientifique.

la teneur en protéines (due en partie tout au moins à l'absorption par la cellule de quantités importantes de protéines extracellulaires).

Nous allons voir que l'étude des phénomènes produits *in vivo* par la RNase permet de confirmer ces résultats et d'en préciser la portée.

MATÉRIEL

Tumeur

Nous avons utilisé des tumeurs d'ascites de Landschütz, implantées dans des souris C⁺. Le temps moyen de survivance des souris dans les conditions de nos transplants, est de 17 jours.

Produits

Ribonucléase Armour ou P.E.V.Y.A.*. La RNase oxydée a été obtenue en oxydant³⁸ le produit avec de l'eau oxygénée, en le dialysant pendant 24 h contre de l'eau distillée et en le concentrant sous vide. Les réactifs minéraux sont tous des produits pour analyse (Merck).

MÉTHODES

a. Isolement des différents constituants du liquide ascitique en vue de l'étude du métabolisme de l'acide ribonucléique (ARN), de l'acide désoxyribonucléique (ADN) et des protéines

Le liquide ascitique est prélevé à l'aide d'une seringue hypodermique munie d'une aiguille No. 12. L'échantillon (0.5 ml en moyenne) est rapidement transféré dans un tube conique et centrifugé à 2,500 tours/min pendant 2 min. Une aliquote de liquide surnageant est alors prélevée et déposée sur une lamelle de microscopie, puis séchée sous une lampe infra-rouge. Le culot de cellules est resuspendu dans 5 ml de sérum physiologique et recentrifugé à 2,500 tours. Le surnageant est éliminé. On ajoute 2 ml d'acide perchlorique 2 % aux cellules et on laisse l'extraction se poursuivre à 0°C pendant 20 min. Après centrifugation, les cellules sont rapidement lavées à l'acide perchlorique 1 % à 0°C et recentrifugées. Les surnageants perchloriques sont réunis: ils constituent la *fraction acido-soluble*.

Les cellules sont alors délipidées et lavées 3 fois à l'alcool, 2 fois avec un mélange d'alcool et d'éther (3:1), 2 fois avec un mélange d'éther et d'alcool (3:1) et finalement à l'éther. Les surnageants sont éliminés.

Les cellules sont extraites par 2 ml de NaOH 0.1 N pendant 18 h à 30°C. On ajoute de l'HCl concentré jusqu'à pH 1, et on centrifuge la suspension. On lave trois fois le culot par HCl N. Les liquides surnageants sont réunis, ils constituent la *fraction ARN*.

Le sédiment est extrait à 100°C pendant 1 h avec de l'HCl N. Le culot de centrifugation est lavé 2 fois par l' HCl N et les surnageants sont réunis pour former la *fraction ADN*. Le culot restant constitue la *fraction protéique* principale.

b. Détermination de la radioactivité spécifique des constituants de ces différentes fractions

1. *Liquide extracellulaire*. La radioactivité du liquide extracellulaire desséché sur des plaquettes de verre est estimée au compteur de Geiger-Müller. On extrait la fraction acido-soluble par HClO₄ 2 % pendant 20 min à 0°C. On lave deux fois par le même acide, avant de passer à nouveau les plaquettes sous le compteur de Geiger. On peut estimer alors la concentration de la fraction acido-soluble en composés puriques ou pyrimidiques au spectrophotomètre Beckman.

2. *Fraction acido-soluble intracellulaire*. La concentration de l'extrait perchlorique en composés puriques et pyrimidiques est mesurée par l'absorption U.V. de la solution à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman. Une aliquote de cet extrait est prélevé immédiatement, déposée sur une lamelle de verre et évaporée sous la lampe infra-rouge. La radioactivité est alors mesurée. Une autre partie aliquote est hydrolysée pendant 30 min à 100°C dans l'acide perchlorique qui a servi à l'extraction, puis chromatographiée sur papier Whatman No. 3 avec le solvant butanol tertiaire-HCl azéotropique décrit par MARKHAM et SMITH⁴³. Les radioactivités spécifiques des différents constituants ainsi séparés sont alors déterminées.

3. *Fraction ARN*. La radioactivité spécifique de l'ensemble de la fraction ARN est déterminée de la façon qui vient d'être décrite pour la fraction acido-soluble. De même, la radioactivité spécifique des bases puriques et des nucléotides pyrimidiques est déterminée après une chromatographie semblable à celle décrite à propos de la fraction acido-soluble.

On a vérifié que les chromatogrammes obtenus dans ces conditions ne sont pas contaminés

* Nous remercions très vivement les laboratoires P.E.V.Y.A. (Barcelone) de leur don généreux de RNase cristallisée.

par des acides aminés ou des peptides provenant des protéines intracellulaires. On s'est assuré également que l'extrait ARN n'est pas contaminé par la fraction ADN, en y dosant le désoxyribose et en y recherchant la thymine. Nous avons, enfin, contrôlé les résultats obtenus de cette manière en déterminant la radioactivité spécifique des bases puriques après précipitation de celles-ci sous la forme de sels d'argent⁴⁷. La concordance des résultats était excellente.

4. *Fraction ADN*. L'extrait chlorhydrique est évaporé jusqu'à siccité, repris par l'acide formique concentré et hydrolysé en tubes scellés pendant 2 h à 180°C. Les bases puriques et pyrimidiques ainsi obtenues sont chromatographiées sur papier Whatman No. 3 avec le mélange *iso*-propanol-HCl⁴⁴. La radioactivité spécifique des différentes bases est déterminée de la façon habituelle. Nous avons vérifié que ni l'uracile, ni les acides aminés d'origine protéique ne contaminent les chromatogrammes.

5. *Protéines*. La radioactivité spécifique des protéines a été évaluée selon les procédés suivants: 1. Méthode de VAN SLYKE⁴⁵: décarboxylation des acides aminés (provenant de l'hydrolyse par HCl 6 N à 135°, pendant 12 h, en tubes scellés, des protéines) par la ninhydrine et détermination de la radioactivité spécifique du CO₂ dégagé.

2. Détermination de la teneur en protéines de "la fraction protéique principale" dissoute dans NaOH N à l'aide de la méthode de LOWRY *et al.*⁴⁶ et évaluation de la radioactivité de cette solution.

RÉSULTATS

Afin d'établir un schéma du mode d'action de la RNase, nous avons abordé l'étude du métabolisme des tumeurs d'ascites traitées par cet enzyme en suivant les modifications initiales (premières heures) des vitesses d'incorporation des différents constituants cellulaires.

Les précurseurs employés sont: l'adénine-8-¹⁴C, la glycine-1-¹⁴C, l'acide orotique-2-¹⁴C et le formiate de potassium-¹⁴C. Les animaux ont été traités à des temps variables après l'implantation de la tumeur. Les résultats qui vont être décrits ont été obtenus sur des groupes de 2 souris du même âge traités parallèlement. Les données numériques représentent la moyenne des résultats obtenus.

1. Adénine-8-¹⁴C

Age des tumeurs: 18 jours; quantité de RNase injectée: 2 mg/ml de liquide ascitique; quantité d'adénine: 10 µg/ml de liquide ascitique.

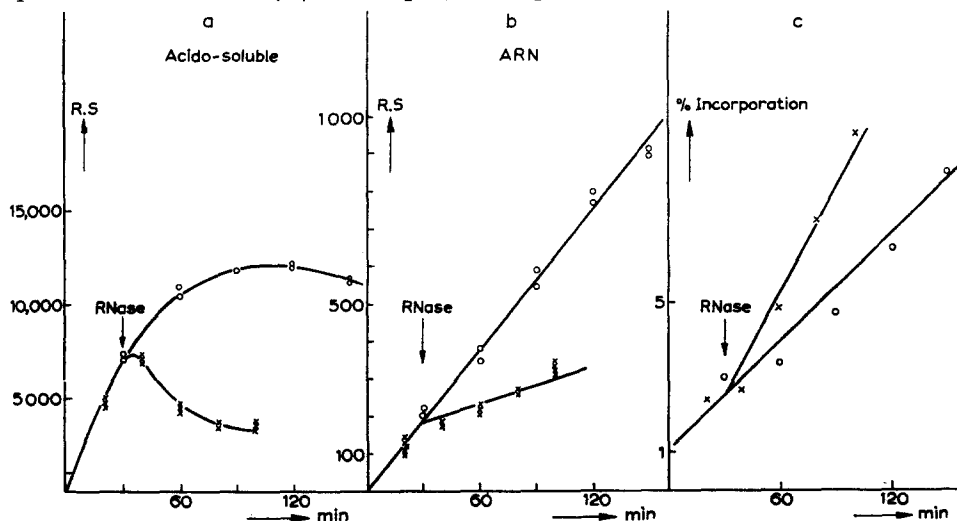


Fig. 1. Incorporation de l'adénine-8-¹⁴C dans les cellules d'ascites *in vivo*. a. Radioactivité spécifique de la fraction acido-soluble. b. Radioactivité spécifique de l'ARN. c. Pourcentage d'incorporation dans l'ARN. ○—○—○ Contrôle; ×—×—× RNase.

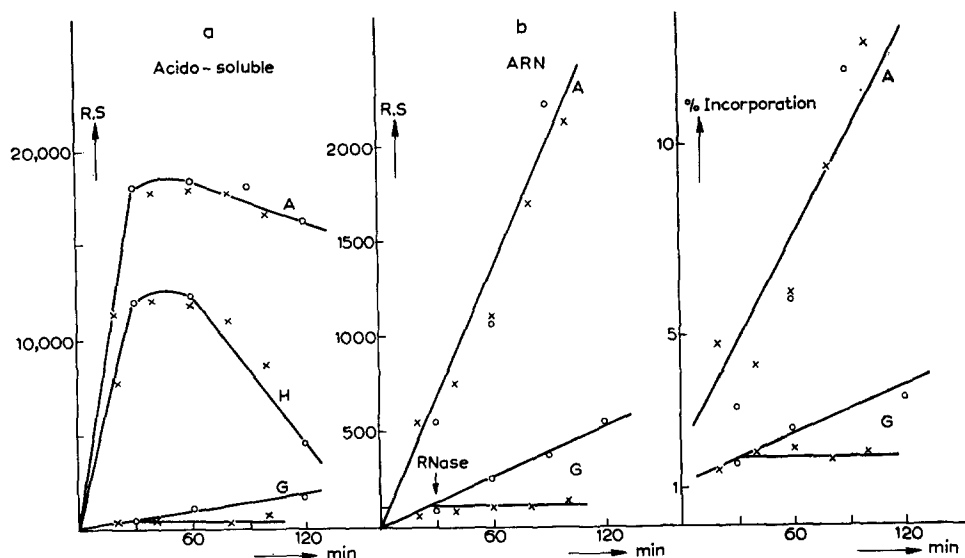


Fig. 2. Incorporation de l'adénine-8- ^{14}C dans les bases puriques intracellulaires. a. Radioactivité spécifique de l'adénine (A), de l'hypoxanthine (H) et de la guanine (G) dans la fraction acido-soluble. b. Radioactivités spécifiques de l'adénine (A) et de la guanine (G) de l'ARN. c. Pourcentage d'incorporation de l'adénine et de la guanine de l'ARN. $\circ-\circ-\circ$ contrôle; $\times-\times-\times$ traité par RNase.

Les Fig. 1a et 1b montrent l'évolution de l'incorporation de l'adénine dans la fraction acido-soluble et l'ARN des cellules d'ascites avant et après l'injection de la RNase dans l'animal. La Fig. 1c exprime la variation du pourcentage d'incorporation dans l'ARN, obtenu en divisant la radioactivité spécifique de l'ARN par celle de la fraction acido-soluble. La pente de la courbe en fonction du temps représente alors la vitesse d'incorporation de l'adénine dans l'ARN.

On voit que, dès l'adjonction de la RNase, il y a une augmentation rapide du pourcentage d'incorporation; la vitesse d'incorporation augmente de 100% environ.

Les Fig. 2a et 2b montrent l'incorporation de l'adénine-1- ^{14}C dans l'adénine, l'hypoxanthine et la guanine de la fraction acido-soluble intracellulaire ainsi que dans l'adénine et la guanine de l'ARN. On observe que l'adénine et l'hypoxanthine évoluent parallèlement au cours du temps, dans la fraction acido-soluble. L'expérience montre que la RNase ne modifie pas la vitesse d'incorporation de l'adénine (ou de l'hypoxanthine) dans l'acide adénylique de l'ARN, tandis qu'elle arrête celle de la guanine dans l'acide guanylique.

2. Glycine-1- ^{14}C

Age de la tumeur: 6 jours; quantité de RNase injectée: 2 mg/ml de liquide ascitique; quantité de glycine injectée: 10 μC /ml de liquide ascitique. La glycine est injectée au temps 0 et la RNase après 18 h.

La Fig. 3 montre l'évolution de la radioactivité du milieu extracellulaire (nombre de coups/min/ml de plasma ascitique). On voit que, 16 heures après l'injection de la glycine-1- ^{14}C , la plus grande partie de la radioactivité du plasma ascitique est localisée dans la fraction acido-insoluble, constituée principalement par des protéines²⁶. Les

Fig. 4a et 4b montrent l'évolution de la radioactivité spécifique de la fraction acido-soluble et de l'ARN intracellulaires. Le Fig. 4c décrit la modification du pourcentage d'incorporation dans l'ARN en présence de RNase.

Les Fig. 5a et 5b expériment la variation de la radioactivité spécifique de l'adénine et de la guanine de l'ARN, ainsi que celle des constituants correspondants de l'acido-soluble, La Fig. 5c résume les résultats en décrivant la modification de la vitesse d'incorporation de ces deux constituants dans l'ARN. Les résultats sont comparables à ceux qui ont été obtenus avec l'adénine-8-¹⁴C.

La Fig. 6 montre la modification de la radioactivité spécifique des pyrimidines de l'ARN. Cette radioactivité est faible; les données correspondantes pour la fraction acido-soluble font défaut, ce qui ne permet pas d'établir la vitesse d'incorporation propre de ces constituants. Les résultats décrits dans la Fig. 6 ne donnent donc qu'une indication (qui se verra confirmée par les expériences avec l'acide orotique et le formiate de K) de la modification profonde du métabolisme des pyrimidines de l'ARN en présence de RNase.

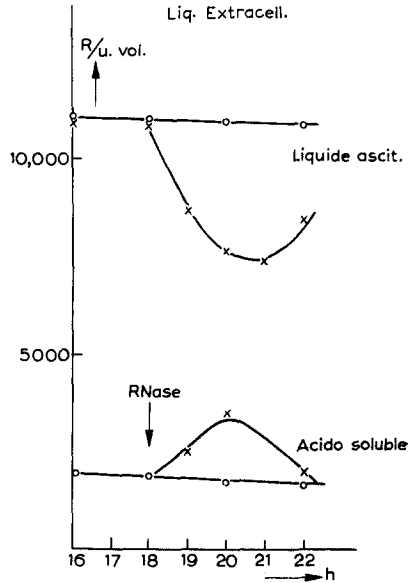


Fig. 3. Incorporation de la glycine-1-¹⁴C dans le liquide extracellulaire: radioactivité totale par unité de volume; radioactivité de la fraction acido-soluble par unité de volume. O—O—O contrôle; x—x—x RNase.

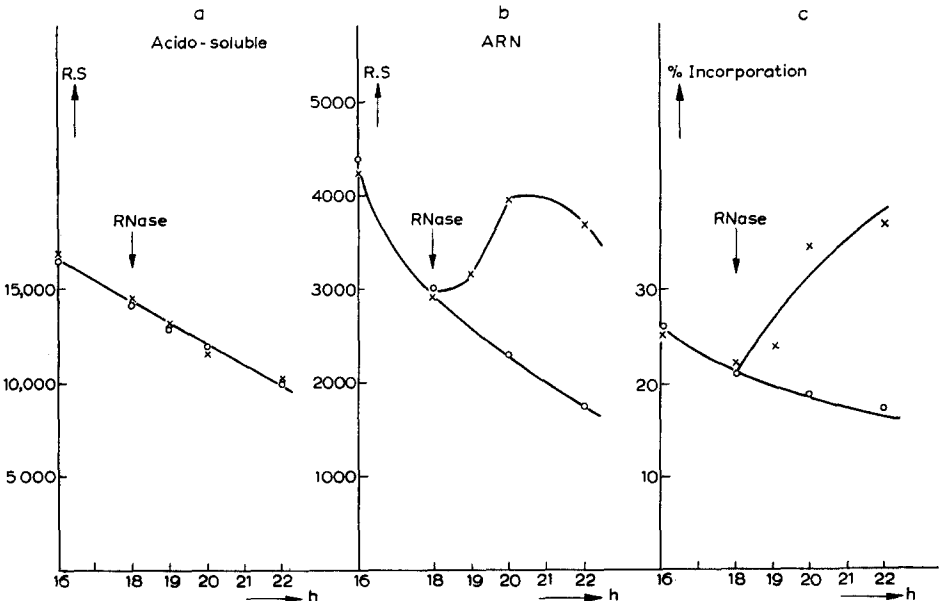


Fig. 4. Incorporation de la glycine-1-¹⁴C *in vivo* dans les cellules d'ascites. a. Radioactivité spécifique de la fraction acido-soluble. b. Radioactivité spécifique de l'ARN. c. Pourcentage d'incorporation de l'acido-soluble dans l'ARN. O—O—O contrôle; x—x—x RNase.

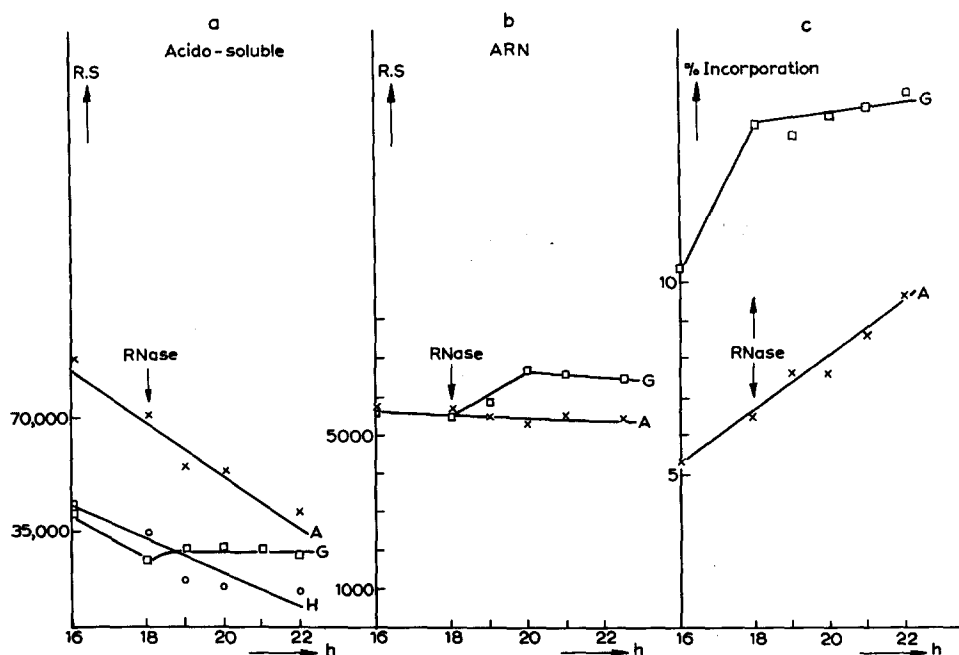


Fig. 5. Incorporation de la glycine-1- ^{14}C dans les bases puriques intracellulaires. a. Radioactivités spécifiques de l'adénine (A), de l'hypoxanthine (H) et de la guanine (G) de la fraction acido-soluble. b. Radioactivités spécifiques de l'adénine (A) et de la guanine (G) de l'ARN. c. Pourcentage d'incorporation dans l'adénine (A) et dans la guanine (G) de l'ARN. Le contrôle est constitué par la même tumeur avant traitement à la RNase.

La Fig. 7 exprime la variation de la radioactivité spécifique des purines de l'ADN et la vitesse d'incorporation (calculée à l'aide des données fournies par la fraction soluble, Fig. 5a). On voit que la RNase n'a aucun effet sur le métabolisme des purines de l'ADN.

Nous avons vérifié également que la radioactivité spécifique des protéines intracellulaires n'est pas modifiée en présence de RNase, bien qu'il y ait probablement pinoctose (Fig. 3). Ceci est dû à ce que les radioactivités spécifiques des protéines intra- et extracellulaires sont équivalentes au moment de l'adjonction de RNase (7,000 c/min/unités Folin).

3. Acide orotique-2- ^{14}C

Age de la tumeur: 14 jours; quantité de RNase injectée: 3 mg/ml de liquide ascitique; quantité d'acide orotique-2- ^{14}C : 4 μC /ml de liquide acitique.

Nous avons déterminé la radioactivité spécifique de l'uracile de l'ARN et celle de la fraction acido-soluble globale. Les Fig. 8a et 8b expriment ces résultats et montrent que le métabolisme de l'uracile est vraisemblablement accéléré par la RNase.

Afin de déterminer la nature du précurseur de l'uracile dans les tumeurs d'ascites et d'étudier de façon détaillée le métabolisme des différents constituants de l'ARN, nous avons utilisé dans une même expérience de l'acide orotique et du formiate de K injectés à des temps différents.

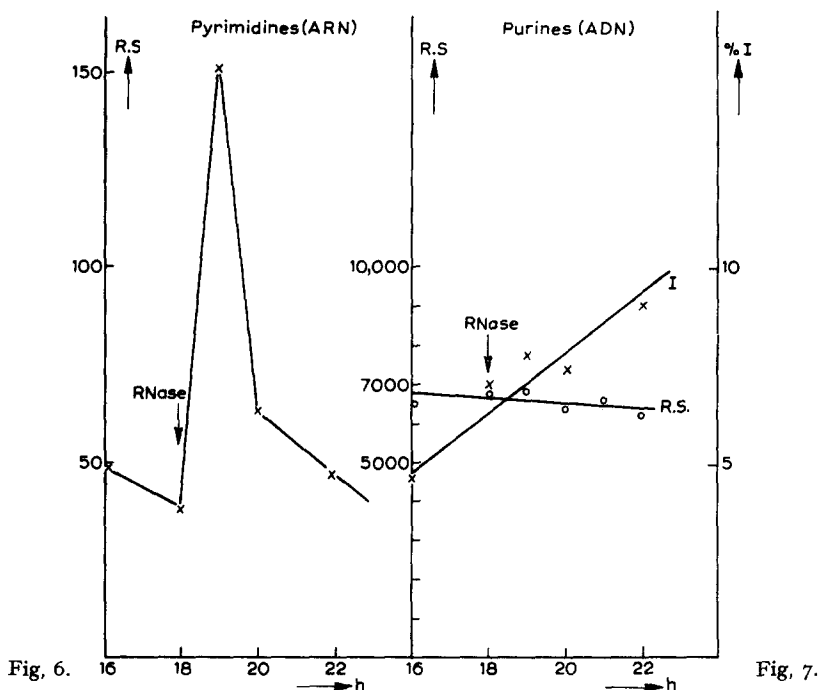


Fig. 6. Incorporation de la glycine-1-¹⁴C dans les bases pyrimidiques de l'ARN intracellulaire. Le contrôle est constitué par la même tumeur avant son traitement par la RNase.

Fig. 7. Incorporation de la glycine-1-¹⁴C dans les bases puriques de l'ADN (cf. pour la radioactivité spécifique des bases acido-solubles, la Fig. 5). Radioactivité spécifique de l'ADN (R.S.) et pourcentage d'incorporation (I) dans l'ADN. Le contrôle est constitué par la même tumeur avant traitement par RNase.

4. Formiate de K-¹⁴C et acide orotique-¹⁴C

Age de la tumeur: 9 jours; quantité de RNase injectée: 3 mg/ml de liquide ascitique; quantité de formiate injectée, *au temps 0*: 15 µc/ml de liquide ascitique; quantité d'acide orotique injectée, *au temps 60 min*: 4 µc/ml de liquide ascitique.

La Fig. 9 exprime la radioactivité spécifique des protéines du plasma ascitique et des protéines intracellulaires. L'augmentation momentanée de la radioactivité spécifique des protéines du milieu intracellulaire peut aisément s'expliquer par des phénomènes de pinocytose déjà décrits²⁷. Ils correspondraient à environ 6% d'augmentation de la masse des cellules dans la population considérée.

La Fig. 10a se rapporte à la fraction acido-soluble intracellulaire: on constate que seule la radioactivité spécifique de l'uridine augmente brusquement dès l'adjonction d'acide orotique. La Fig. 10b montre l'évolution de la radioactivité spécifique des bases puriques et pyrimidiques de l'ARN cellulaire. On voit que l'uracile, seul, incorpore l'acide orotique de façon appréciable. La Fig. 10c, qui est basée sur ces résultats, montre l'évolution de la vitesse d'incorporation des différents précurseurs dans les constituants de l'ARN en présence de RNase. On voit que le métabolisme de la cytosine est très fortement accéléré dès l'injection de l'enzyme. On constate aussi, chez les témoins, que les vitesses d'incorporation de l'uridine dans l'acide uridylique de l'ARN et de l'acide cytidylique dans le constituant correspondant de l'acide ribonucléique

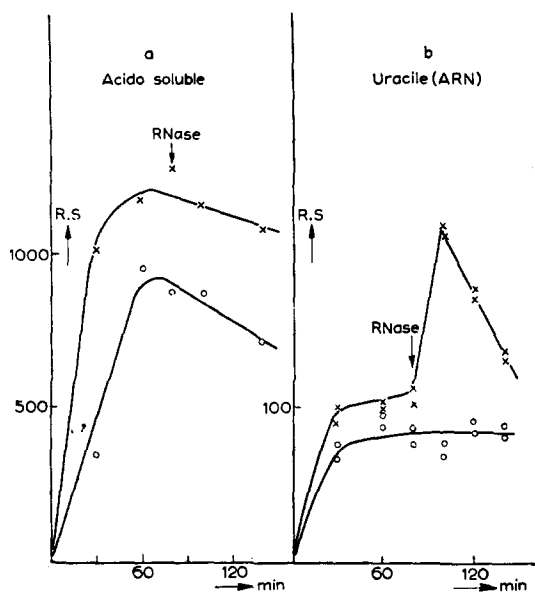


Fig. 8.

Fig. 8. Incorporation de l'acide orotique-2- ^{14}C dans les bases pyrimidiques intracellulaires. a. Radioactivité spécifique de la fraction acido-soluble. b. Radioactivité spécifique de l'uracile de l'ARN.
 ○—○—○ contrôle; ×—×—× RNase.

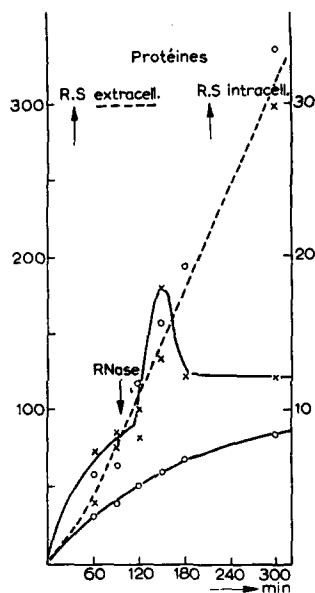


Fig. 9.

Fig. 9. Incorporation du formiate- ^{14}C de potassium dans les protéines extra- et intra-cellulaires. — radioactivité spécifique des protéines intracellulaires; - - - - radioactivité spécifique des protéines extracellulaires; ○—○—○ contrôle; ×—×—× RNase.

restent constants après l'adjonction d'acide orotique. Il faut en conclure que ces constituants de la fraction acido-soluble sont des précurseurs des bases pyrimidiques de l'ARN.

La Fig. 11 montre l'évolution de la radioactivité spécifique des différentes bases de l'ADN en présence de RNase. Seule la radioactivité spécifique de la thymine change dès l'adjonction de l'enzyme. Ce résultat semble indiquer que le métabolisme de l'ADN est, lui aussi, perturbé par la RNase. Des expériences sont en cours pour préciser ce point.

5. Formiate de K, incubation *in vitro*

Afin de vérifier la signification des résultats décrits ci-dessus, nous avons utilisé ensuite des suspensions de cellules d'ascites incubées *in vitro* en présence de RNase. Le témoin, dans ce cas-ci, était constitué de cellules incubées en présence de RNase oxydée, inactive enzymatiquement^{32, 33}. Les cellules utilisées proviennent de tumeurs âgées de 8 jours et incubées préalablement *in vivo* pendant trois heures en présence de 15 μC de formiate de K. Les cellules ont été prélevées, centrifugées et resuspendues dans un plasma ascitique non radioactif, obtenu à partir d'une tumeur du même âge.

Les suspensions sont agitées, à 37°C, en présence de 3 mg/ml de RNase (oxydée ou active).

Les Fig. 12a et 12b montrent les résultats obtenus pour la radioactivité spéci-

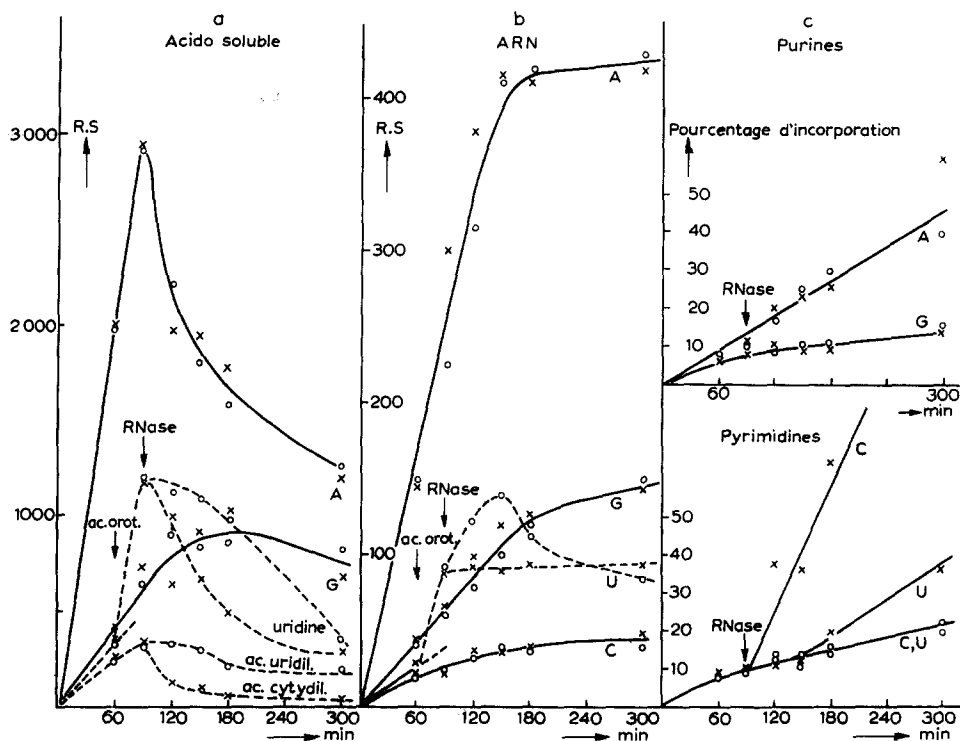


Fig. 10. Incorporation du formiate- ^{14}C et de l'acide orotique- ^{14}C dans les bases puriques et pyrimidiques intracellulaires. a. Radioactivités spécifiques de l'adénine (A), de la guanine (G), des acides cytidylique et uridylique et de l'uridine (U) de la fraction acido-soluble. b. Radioactivités spécifiques de l'adénine (A), de la guanine (G), de l'uracile (U) et de la cytidine (C) de l'ARN. c. Pourcentage d'incorporation des bases puriques et pyrimidiques de l'ARN. $\circ-\circ-\circ$ contrôle; $\times-\times-\times$ RNase.

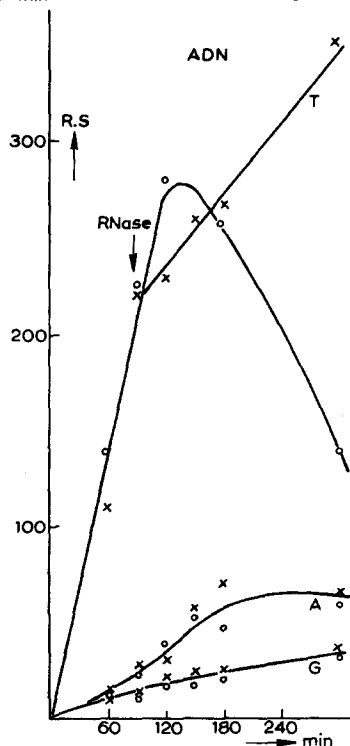


Fig. 11. Incorporation du formiate- ^{14}C et de l'acide orotique- ^{14}C dans l'adénine (A), la guanine (G) et la thymine (T) de l'ADN. $\circ-\circ-\circ$ contrôle; $\times-\times-\times$ RNase.

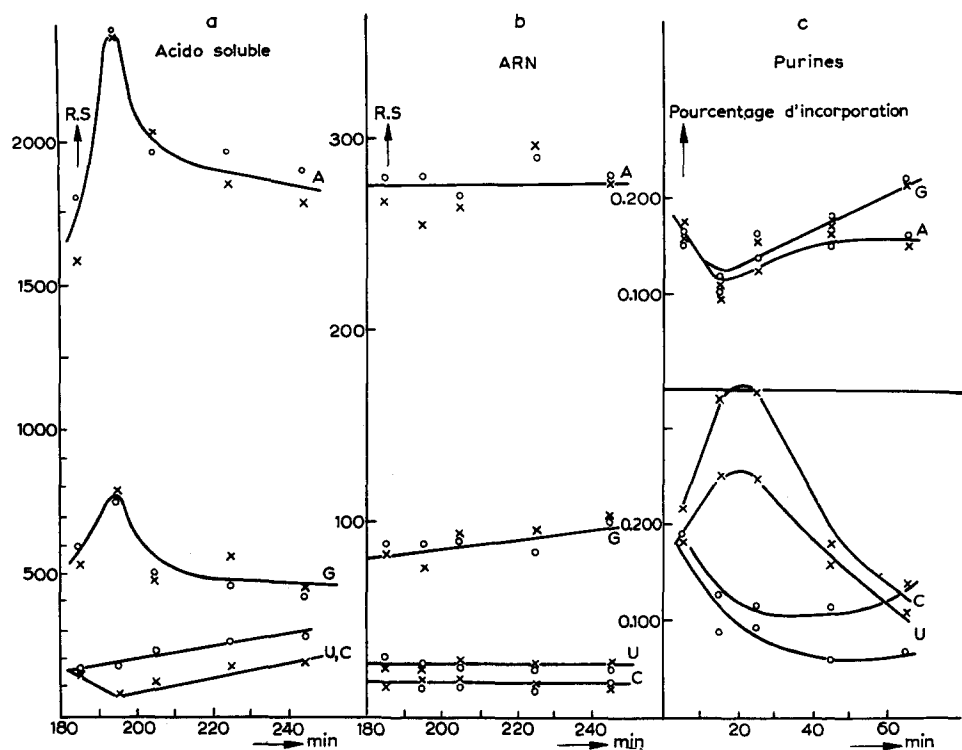


Fig. 12. Incorporation du formiate- ^{14}C dans les cellules d'ascites *in vitro*. a. Radioactivités spécifiques de l'adénine (A), de la guanine (G), de l'uridine (U) et de l'acide cytidylique (C) de la fraction acido-soluble. b. Radioactivités spécifiques de l'adénine (A), de la guanine (G) de l'uracile (U) et de la cytosine (C) de l'ARN. c. Pourcentage d'incorporation des bases puriques et pyrimidiques de l'ARN. $\bigcirc-\bigcirc-\bigcirc$ contrôle; $\times-\times-\times$ RNase.

fique des différentes bases de la fraction acido-soluble de l'ARN intracellulaire. Le Fig. 12c montre la vitesse d'incorporation dans les différentes bases de l'ARN.

On voit que l'allure des résultats obtenus *in vitro* pendant les 30 premières minutes de l'incubation est semblable à celle observée dans les expériences *in vivo*. On voit aussi que les conditions de survie *in vitro* ne sont pas optimales³⁴ et que le métabolisme général de l'ARN s'abaisse rapidement (les vitesses d'incorporation sont nulles ou négatives chez les contrôles dès le début de l'expérience). Il y a cependant, par rapport au témoin, un effet d'activation du métabolisme des pyrimidines par la RNase.

CONCLUSIONS

Le Tableau I résume l'ensemble des résultats obtenus au cours du présent travail. Son examen suscite une remarque générale à propos de l'emploi des isotopes dans l'étude des variations du métabolisme cellulaire. On voit clairement que, dans le cas de l'action de la RNase, il ne suffit pas de suivre l'évolution de la radioactivité spécifique de l'ARN, de l'ADN ou des protéines pour obtenir une image satisfaisante de leur métabolisme. En effet, nous voyons que la radioactivité spécifique de l'ARN, par exemple, augmente, diminue ou reste inchangée suivant les cas (il en est de même d'ailleurs pour les diffé-

TABLEAU I
VARIATIONS DU MÉTABOLISME CELLULAIRE EN PRÉSENCE DE RIBONUCLÉASE
(par rapport aux témoins)

No.	précurs. ajouté	Durée incub. avant RNase	Acido-soluble Rad. spec.	ARN		ADN		Protéines		ARN ADN	Age de la tumeur (jours)
				Rad. spéc.	Vit. incorp.	Rad. spéc.	Vit. inc.	nb. cps/min			
								/mole tyros.	/mole CO ₂		
1	Adénine	30 min	↘↘	↘	↗					↗	18
2	Glycine	18 h	=	↗	↗	=	=	=	=	↗	6
3	Glycine	17 h	=	↗	↗			=	=	↗	6
4	Ac. orot	75 min	=	↗	↗					=	14
5	Formiate	90 min	↘	=	↗				=	↗	7
	ac. orot	30 min									
6	Formiate	0 h	↘	=	↗	↗	=	=	=	=	8
	<i>in vitro</i>										

Bases puriques et pyrimidiques											
Radioactivités spécifiques								Vitesse d'incorporation			
Acido-soluble				ARN				ARN			
Ad	Gu	Ur	Cy	Ad	Gu	Ur	Cy	Ad	Gu	Ur	Cy
1	Adénine	=	↘		=	↘		=	↘		
2	Glycine	=	↗		=	↗		=	↘		
3	Glycine			=						↗	↗
4	Ac. orot			=						↗	↗
5	Formiate	=	=	↘↘	↘			=	=	↗	↗↗
	ac. orot										
6	Formiate	=	=	↘	↘			=	=	↗	↗

rentes bases qui le constituent). La seule mesure de la radioactivité spécifique de l'ARN en présence de RNase conduirait donc à des résultats non reproductibles et même contradictoires. Au contraire, l'étude simultanée de la radioactivité spécifique des précurseurs et des produits finaux du métabolisme cellulaire permet le calcul de vitesses d'incorporation indépendantes des phénomènes de perméabilité ou des fluctuations naturelles du pool des précurseurs intra- ou extracellulaires. C'est d'ailleurs la raison pour laquelle nous avons été forcés d'abandonner l'étude de ces phénomènes à l'aide de la méthode autoradiographique courante³⁵ où les précurseurs échappent à l'examen.

La détermination d'une vitesse d'incorporation, c'est-à-dire la variation du pourcentage d'incorporation au cours du temps, implique la connaissance des précurseurs. La question a fait l'objet de nombreuses recherches dans différents organismes³⁶⁻³⁹; en nous guidant sur les résultats déjà obtenus, nous nous sommes efforcés de préciser, dans le cas des tumeurs d'ascites, les constituants de la fraction acido-soluble qui sont des précurseurs des bases puriques et pyrimidiques de l'ARN.

Nos résultats indiquent que l'adénine (ou l'hypoxanthine, qui est en équilibre avec l'adénine) et la guanine—ou des dérivés de ceux-ci—peuvent être considérés comme des précurseurs de l'adénine et de la guanine de l'ARN. De même, l'uridine, l'acide uridylique ou cytidylique apparaissent comme des précurseurs de l'uracile et de de la cytosine de l'ARN.

Le Tableau I montre également que le calcul des vitesses d'incorporation permet d'obtenir des résultats qualitativement semblables, quelle que soit la substance marquée injectée (adénine, glycine, acide orotique, formiate). Il montre, en outre, que la RNase agit quel que soit l'âge de la tumeur; mais son action est plus rapide dans le cas de cellules tumorales jeunes que dans celui des tumeurs âgées.

Nos résultats établissent clairement que la RNase modifie le métabolisme des différentes bases nucléiques à des degrés divers. La phase initiale de l'action (qui correspond dans la plupart des cas à une augmentation rapide du rapport ARN/ADN) est caractérisée par une élévation rapide du métabolisme des pyrimidines. Tout se passe comme si la RNase pouvait activer *in vivo* la formation des liens qu'elle est capable de rompre lorsqu'elle agit comme phosphatase. Rappelons que l'action enzymatique *in vitro* de la RNase est limitée aux esters phosphoriques de structure b (-3-P)⁴⁰. La RNase serait donc un enzyme qui intéresse directement la formation ou la rupture de ces liaisons dans les cellules vivantes. HEPPEL *et al.*^{41, 42} ont d'ailleurs montré récemment que la RNase est capable d'activité anabolique *in vitro*.

L'injection de ribonucléase dans une souris portant une tumeur d'ascites provoque une modification rapide de l'incorporation de dérivés puriques et pyrimidiques dans les constituants de l'ARN. Comme la RNase modifie davantage le métabolisme des pyrimidines que celui des purines de l'ARN, on peut s'attendre à ce que la composition de l'ARN synthétisé dans ces conditions soit différente de celle de l'ARN initial. Nous avons d'ailleurs déjà signalé quelques cas de modification significative de la composition de l'ARN²⁹ en présence de RNase. Rappelons qu'il s'agissait d'une augmentation de la teneur relative en cytosine (35%) et d'une diminution de la teneur relative en guanine (20%). De son côté, la composition de l'ADN restait inchangée pendant la phase de synthèse de l'ARN; elle se modifiait progressivement au cours de la phase finale. La variation observée consiste, à ce moment, en une augmentation de la teneur relative en thymine (20%). Dans les expériences présentes, nous observons une modification de la radioactivité spécifique de la thymine seulement.

La modification de la composition de l'ARN semble donc précéder celle de l'ADN qui, elle-même, précède une éventuelle variation du métabolisme des protéines. A ce propos, soulignons qu'au cours de nos expériences d'incorporation, il ne nous a pas été possible de mettre en évidence une variation de la radioactivité spécifique des protéines dans les cellules traitées par la RNase. Ce fait confirme les résultats obtenus au cours d'essais *in vitro*, où la vitesse d'incorporation de la phénylalanine dans les protéines est restée constante en présence de l'enzyme, pendant la première phase de l'action³⁰.

Nos résultats permettent de penser que l'action de la RNase sur la croissance des tumeurs d'ascites s'exerce au niveau du métabolisme des acides nucléiques et que l'origine de l'effet cancérostatique doit être recherché dans le déséquilibre de ce métabolisme et, peut-être, dans l'apparition d'un ARN intracellulaire anormal.

L'effet de la RNase sur les cellules de tumeur d'ascites semble différer de celui observé par BRACHET chez les amibes¹² et les racines d'oignon⁵ où la dégradation de l'ARN est immédiate ou précédée de la formation d'un complexe inactif entre l'enzyme et le substrat. Il faut cependant souligner que ce sont les conditions du milieu extracellulaire (plasma ascitique) qui régissent l'apparition d'un ARN anormal dans les tumeurs d'ascites. Il n'est donc pas étonnant qu'une telle modification de structure ne soit pas décelable, chez d'autres organismes, qui ne disposent pas nécessairement des réserves suffisantes en précurseurs.

RÉSUMÉ

La ribonucléase provoque dans les cellules des tumeurs d'ascites (Landschütz) traitées *in vivo* ou *in vitro*, une modification rapide du métabolisme de l'acide ribonucléique.

Les vitesses d'incorporation de l'adénine ou de la guanine ne sont pas ou sont peu modifiées tandis que les vitesses d'incorporation de l'uracile et de la cytosine sont considérablement augmentées (plus de 100%). Le métabolisme des pyrimidines est donc très accéléré en présence de RNase.

D'autre part, le métabolisme de la thymine de l'ADN est perturbé, et il semble également que, dans ces conditions, c'est-à-dire pendant les premiers temps de l'action, le métabolisme des protéines n'est pas modifié.

Nos résultats indiquent que la RNase provoque l'apparition rapide d'un acide ribonucléique anormal et que l'origine de l'action cancérostatique de cet enzyme doit être recherché dans le déséquilibre du métabolisme des acides nucléiques.

SUMMARY

In the cells of ascites tumours (Landschütz) ribonuclease causes, both *in vivo* and *in vitro*, a rapid alteration in the metabolism of ribonucleic acid.

The rates of incorporation of adenine and of guanine are modified only slightly or not at all, whereas those of uracil and cytosine are considerably increased (more than 100%). Thus the metabolism of the pyrimidines is greatly accelerated in the presence of RNase.

Moreover, the metabolism of the thymine of ADN is disturbed. It also seems that under these conditions, *i.e.* during the first stage of the action, the metabolism of the proteins is not modified.

Our results indicate that RNase causes the rapid appearance of an abnormal ribonucleic acid and that the carcinostatic action of this enzyme must be sought in the imbalance of the metabolism of the nucleic acids.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ B. P. KAUFMANN, M. R. McDONALD, M. H. BERNSTEIN, R. C. VON BORSTEL ET N. K. DAS, *Carnegie Inst. Washington Year Book*, 52 (1953) 238.
- ² B. P. KAUFMANN ET N. K. DAS, *Chromosoma*, 7 (1955) 38.
- ³ J. BRACHET, *Nature*, 174 (1954) 876.
- ⁴ J. BRACHET, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 611.
- ⁵ J. BRACHET, *Biochim. Biophys. Acta*, 19 (1956) 538.
- ⁶ L. LEDOUX, J. LE CLERC ET F. VANDERHAEGHE, *Nature*, 174 (1954) 793.
- ⁷ L. LEDOUX, J. LE CLERC ET F. VANDERHAEGHE, *Arch. intern. physiol.*, 62 (1954) 303.
- ⁸ L. LEDOUX, *Biochim. Biophys. Acta*, 15 (1954) 143.
- ⁹ L. LEDOUX, J. LE CLERC ET J. BRACHET, *Exptl. Cell Research*, 9 (1955) 338.
- ¹⁰ J. BRACHET ET L. LEDOUX, *Exptl. Cell Research*, Suppl. 3 (1955) 27.
- ¹¹ J. BRACHET, *Nature*, 175 (1955) 851.
- ¹² J. BRACHET, *Exptl. Cell Research*, 10 (1956) 255.
- ¹³ C. CASTERMAN ET R. JEENER, *Biochim. Biophys. Acta*, 16 (1955) 433.
- ¹⁴ J. LE CLERC, *Nature*, 177 (1956) 578.
- ¹⁵ D. M. GROTH, 3^{ème} Congr. intern. biochim., Bruxelles, 1955, *Conf. rapp.*, p. 73.
- ¹⁶ R. JEENER, communication personnelle.
- ¹⁷ H. FIRKET, S. CHÉVREMONT-COMHAIRE ET M. CHÉVREMONT, *Nature*, 176 (1955) 1075.
- ¹⁸ L. LEDOUX ET E. BALTUS, *Experientia*, 10 (1954) 500.
- ¹⁹ L. LEDOUX, *Nature*, 175 (1955) 258.
- ²⁰ L. LEDOUX, 3^{ème} Congr. intern. biochim., Bruxelles, 1955, *Compt. rend.*, p. 71.
- ²¹ L. LEDOUX, *Nature*, 176 (1955) 36.
- ²² L. LEDOUX, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 369.
- ²³ L. LEDOUX, *Brit. J. Cancer*, (sous presse).
- ²⁴ G. KLEIN ET L. REVÉSZ, *J. Natl. Cancer Inst.*, 14 (1953) 253.
- ²⁵ G. KLEIN, *Exptl. Cell Research*, 2 (1951) 518.
- ²⁶ L. LEDOUX ET S. H. REVELL, *Biochim. Biophys. Acta*, 18 (1955) 416.
- ²⁷ D. M. EASTY, L. LEDOUX ET E. J. AMBROSE, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 528.
- ²⁸ L. LEDOUX, E. BALTUS ET F. VANDERHAEGHE, *Arch. intern. physiol.*, 64 (1956) 135.
- ²⁹ L. LEDOUX ET F. VANDERHAEGHE, *Arch. intern. physiol.*, 64 (1956) 537.
- ³⁰ L. LEDOUX ET F. VANDERHAEGHE, *Biochim. Biophys. Acta*, (sous presse).
- ³¹ A. HADDOW, *Brit. Empire Cancer Campaign, Ann. Rep.*, 31 (1953) 35.

- ^{31a}L. LEDOUX, *Arch. intern. physiol.*, 64 (1956) 134.
- ³²L. LEDOUX, *Biochim. Biophys. Acta*, 23 (1957) 121.
- ³³L. LEDOUX, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 121.
- ³⁴G. A. LEPAGE, *Cancer Research*, 13 (1953) 178.
- ³⁵F. GAVOSTO ET A. FICQ, *Nature*, 172 (1953) 406.
- ³⁶R. M. S. SMELLIE, dans E. CHARGAFF ET J. N. DAVIDSON, *The Nucleic Acids*, Vol. II, Academic Press, Inc., New York, 1955, p. 392.
- ³⁷G. B. BROWN ET P. M. ROLL, dans E. CHARGAFF ET J. N. DAVIDSON, *The Nucleic Acids*, Vol. II, Academic Press, Inc., New York, 1955, p. 000.
- ³⁸R. V. POTTER, L. I. HECHT ET E. HERNERT, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 439.
- ³⁹C. HEIDELBERGER, *Biochim. Biophys. Acta*, 20 (1956) 445.
- ⁴⁰R. MARKHAM ET J. D. SMITH, *Biochem. J.*, 60 (1955) 8.
- ⁴¹L. A. HEPPLE ET P. R. WHITFIELD, *Biochem. J.*, 60 (1955) 1.
- ⁴²L. A. HEPPLE, P. R. WHITFIELD ET R. MARKHAM, *Biochem. J.*, 60 (1955) 8.
- ⁴³R. MARKHAM ET J. D. SMITH, *Biochem. J.*, 49 (1951) 401.
- ⁴⁴G. R. WYATT, *Biochem. J.*, 48 (1951) 584.
- ⁴⁵D. D. VAN SLYKE, D. A. MACFADYEN ET P. HAMILTON, *J. Biol. Chem.*, 141 (1941) 671.
- ⁴⁶O. K. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, L. FARR ET R. J. RANDALL, *J. Biol. Chem.*, 193 (1951) 265.
- ⁴⁷S. E. KERR, K. SERAIDARIAN ET M. WARGON, *J. Biol. Chem.*, 181 (1941) 761.

Reçu le 6 décembre 1956

CRYSTALDIMINE: THE PRODUCT OF OXIDATION OF CYSTAMINE BY DIAMINE-OXIDASE

D. CAVALLINI, C. DE MARCO AND B. MONDOVI

*Institute of Biological Chemistry, University of Rome, and Centro di Enzimologia del C.N.R.,
Rome (Italy)*

INTRODUCTION

It has been shown that cystamine is oxidized by diamine-oxidase extracted either from pig kidney cortex or from pea seedlings¹. The rate of oxidation of this sulfur-containing diamine is in the range of that found, under the same conditions, using a typical substrate such as cadaverine. Although the analytical values are in agreement with a typical diamine-oxidase reaction, the total O₂ uptake, with cystamine as substrate, is higher than that obtained with cadaverine. This probably indicates a high reactivity of the reaction product of cystamine which is further metabolized.

Cadaverine and putrescine have been shown to be oxidized by diamine-oxidase to the cyclized internal Schiff bases instead of their free amino-aldehyde derivatives^{2,3}. In this paper we present evidence on the analogous intermediate formation of a cyclized disulfide-containing azo-methine derivative, by the interaction of cystamine with diamine-oxidase.

METHODS AND MATERIALS

Diamine-oxidase extracted from pea seedlings, according to the method of KENTEN AND MANN⁴, has been used as enzyme throughout this work. 20 mg of the final acetone powder, or higher proportional amounts, have been homogenized with 2 ml of 0.1 M phosphate buffer, at the ap-