

## MÉTABOLISME DE LA GUANINE-8- $^{14}\text{C}$ CHEZ LA LEVURE

J. LAHOU\*

*Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences,  
Université libre de Bruxelles (Belgique)*

### INTRODUCTION

L'adénine est un bon précurseur des deux purines des acides nucléiques chez la levure<sup>1,2,3</sup>. Mais si l'adénine se transforme facilement en guanine, il semble bien que la transformation inverse ne se produise pas, car le  $^{14}\text{C}$  fourni à la levure sous la forme de guanine-8- $^{14}\text{C}$  ne se retrouve pas dans l'adénine des acides nucléiques; seule leur guanine en contient<sup>1</sup>.

Le présent travail a pour but de préciser les transformations subies par la guanine-8- $^{14}\text{C}$  chez la levure, en milieu glucosé dépourvu d'azote assimilable et d'établir, en particulier, le chemin de son incorporation dans les acides nucléiques.

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

*Levure:* mutant "petites colonies" obtenu par traitement à l'acriflavine d'une souche diploïde de "Yeast Foam"<sup>4,5,6</sup>.

*Culture:* 24 heures à 30°C en anaérobiose dans un milieu contenant 50 g de glucose, 3 g d'extrait de levure Difco, 0,5 g NaCl, 0,53 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 1 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,43 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,2 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,005 g FeCl<sub>3</sub> par litre.

*Milieu sans azote:* 40 g de glucose, 0,45 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O par litre.

*Dosage de la guanine des acides nucléiques:* selon LORING *et al.*<sup>7</sup>.

#### *Isolation des composés puriques*

Des volumes connus de la suspension de levure sont versés sur de la glace; la levure est recueillie quantitativement par centrifugation et lavée avec de l'eau glacée. Le liquide surnageant et les eaux de lavage sont congelés et conservés pour l'étude des purines libres du milieu.

La levure lavée est extraite à 0° par une solution d'acide perchlorique N (3 extractions de 10 minutes chacune, avec 5 ml d'HClO<sub>4</sub> N pour 1 g poids sec de levure).

(a) *Purines des acides nucléiques.* Le précipité contient les acides nucléiques; il est chauffé 1 heure à 100°C dans 10 ml d'HClO<sub>4</sub> N. Les purines libérées sont précipitées à l'argent selon ABRAMS<sup>8</sup>.

(b) *Fractionnement des composés puriques acido-solubles.* A 15 ml d'extrait perchlorique, on ajoute environ 150 mg de charbon (Carbo activatus purus siccus Merck No. 2183) sur lequel les composés puriques sont adsorbés quantitativement. Le charbon, lavé à l'eau, est remis en suspension dans 10 ml du mélange éthanol-eau-ammoniaque concentrée (73:24:3 en volumes). Cette opération est répétée cinq fois; dans ces conditions, les composés puriques sont complètement élusés. La solution alcoolique est évaporée à sec au bain-marie et le résidu est redissous dans 50 ml d'eau distillée. La solution ainsi obtenue est versée sur une colonne d'échangeur d'anions (Dowex-1-Cl<sup>-</sup>) de 1 cm × 6 cm. Les nucléotides sont fixés par la colonne, les nucléosides et les purines libres ne sont pas retenus. La colonne est lavée avec 100 ml d'eau; cette eau de lavage est ajoutée à la fraction nucléosides-purines.

Les purines libres sont précipitées à l'argent selon ABRAMS<sup>8</sup>. Le surnageant, qui contient les nucléosides, est acidifié (HClO<sub>4</sub> N) et chauffé 1 heure à 100°C; après évaporation les purines libérées sont précipitées à l'argent<sup>8</sup>.

\* Boursier de l'Institut Interuniversitaire des Sciences Nucléaires.

Les nucléotides sont élusés de la colonne d'échangeur d'anions à l'aide de 100 ml d'HCl 2 N la solution obtenue est chauffée à 100° pendant une heure; les purines libérées sont précipitées à l'argent<sup>8</sup>.

(c) *Purines libres du milieu.* Le milieu extérieur contient des substances réductrices qui détruisent les sels d'argent. On sépare donc les purines par adsorption sur charbon par un procédé semblable à celui qui est décrit plus haut pour les composés puriques acidosolubles intracellulaires.

#### *Radioactivité spécifique de composés puriques*

Les précipités argentiques de purines obtenus dans les différentes fractions sont lavés à l'eau, repris dans quelques gouttes d'HCl N et les purines sont séparées l'une de l'autre par chromatographie sur papier à l'aide d'un mélange *N*-butanol-eau-ammoniaque concentrée (100:17:1.17) selon MACNUTT<sup>9</sup>. Il arrive que la guanine et la xanthine soient insuffisamment séparées; on les purifie alors par une nouvelle chromatographie dans un mélange *N*-butanol-eau-acide formique (77:13:10) selon MARKHAM ET SMITH<sup>10</sup>. La radioactivité spécifique des purines isolées est déterminé selon CHANTRENNE<sup>2</sup>.

#### *Dosage des composés puriques acidosolubles*

Ce dosage est effectué par dilution isotopique. Une partie de chacune des fractions sert à la détermination de la radioactivité spécifique des divers composés. A une autre partie de chaque fraction sont ajoutées des quantités connues d'adénine, de guanine, d'hypoxanthine et de xanthine avant la précipitation des purines. La radioactivité spécifique des purines ainsi diluées est déterminée. Il est facile dès lors de calculer la quantité de chacune des purines dans chaque fraction par la relation:

$$Q = Y \frac{1}{(A_s/A'_s) - 1}$$

où  $Q$  est la quantité à calculer

$Y$  est la quantité d'entraineur ajoutée

$A_s$  l'activité spécifique de la substance non diluée

$A'_s$  l'activité spécifique de la substance diluée

#### *Substances marquées*

Guanine-8-<sup>14</sup>C: fournie par la "Nuclear Corporation of America".

Xanthine-8-<sup>14</sup>C: préparée par désamination de la guanine-8-<sup>14</sup>C selon la méthode décrite pour la préparation d'hypoxanthine par CHANTRENNE ET DEVREUX<sup>3</sup>.

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

#### *Incorporation de la guanine dans la levure au repos*

*Expérience.* La levure récoltée et lavée est remise en suspension à raison de 10 mg (poids sec) par ml dans le milieu glucosé sans azote assimilable et la suspension est incubée 60 minutes à 30° sans aération. Après 60 minutes, on ajoute 40 mg de glucose par ml et assez de guanine-8-<sup>14</sup>C pour obtenir une concentration finale de 0.14 micromole et 0.02 microcurie par ml.

Des échantillons de 1 g (poids sec) de levure sont prélevés après 5, 10, 20, 30 et 60 minutes et les composés puriques en sont isolés selon la technique indiquée plus haut. La radioactivité spécifique de ces composés est déterminée et ils sont dosés par dilution isotopique.

Les dérivés de l'adénine et de l'hypoxanthine se sont toujours révélés complètement inactifs dans de pareilles expériences. Au contraire, les dérivés de la guanine et la xanthine libre sont fortement marqués. La Fig. 1a indique l'évolution de la radioactivité spécifique de ces substances au cours du temps. La Fig. 1b montre comment varient les quantités de ces substances dans les cellules et dans le milieu. La figure 1c enfin indique la répartition du <sup>14</sup>C entre les divers composés puriques et permet d'établir un bilan, dont il ressort que 95 % du <sup>14</sup>C ont été retrouvés; cette expérience donne donc une description à peu près complète des produits de transformation de la guanine.

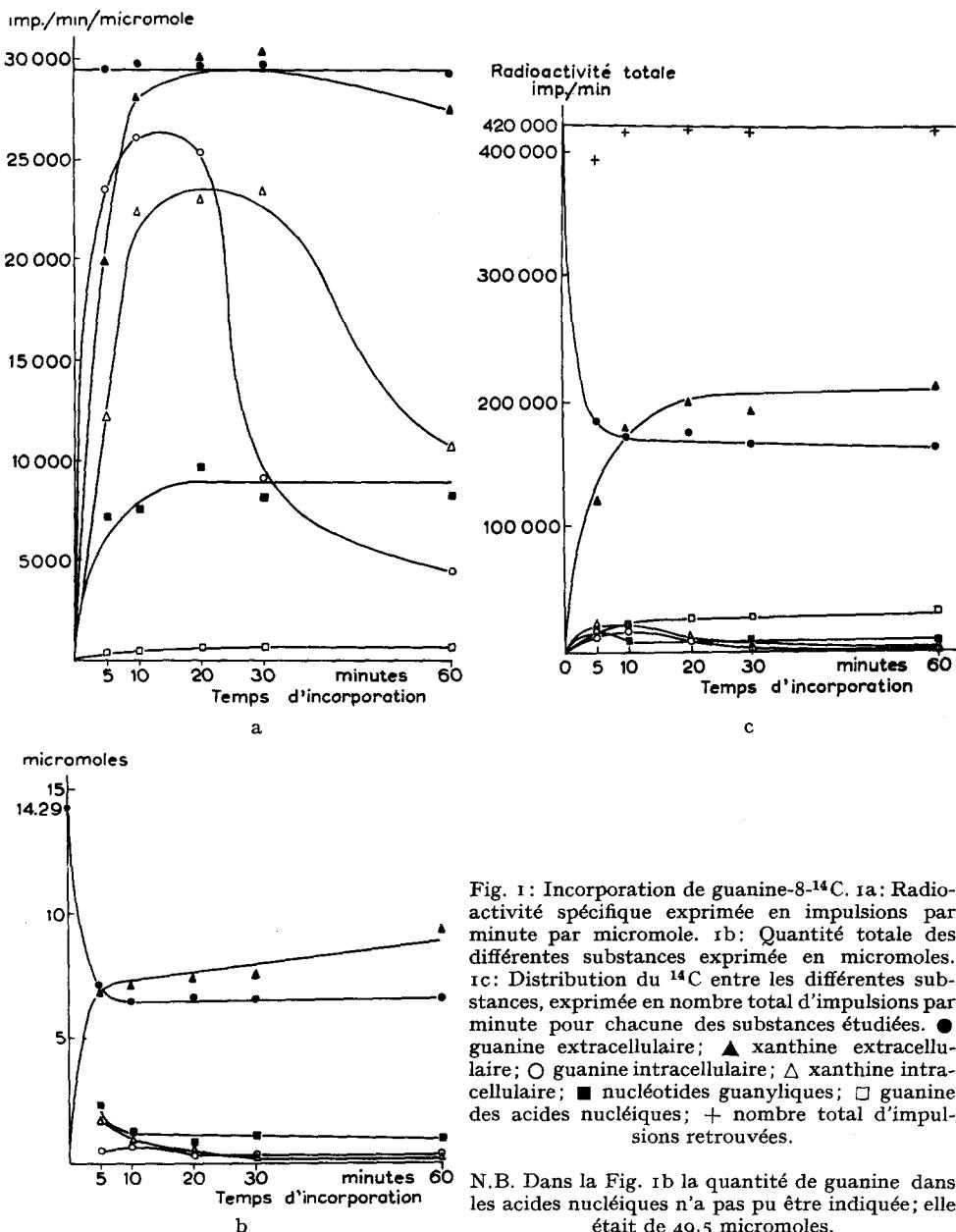


Fig. 1: Incorporation de guanine-8- $^{14}\text{C}$ . 1a: Radioactivité spécifique exprimée en impulsions par minute par micromole. 1b: Quantité totale des différentes substances exprimée en micromoles. 1c: Distribution du  $^{14}\text{C}$  entre les différentes substances, exprimée en nombre total d'impulsions par minute pour chacune des substances étudiées. ● guanine extracellulaire; ▲ xanthine extracellulaire; ○ guanine intracellulaire; △ xanthine intracellulaire; ■ nucléotides guanyliques; □ guanine des acides nucléiques; + nombre total d'impulsions retrouvées.

N.B. Dans la Fig. 1b la quantité de guanine dans les acides nucléiques n'a pas pu être indiquée; elle était de 49.5 micromoles.

L'examen de ces résultats révèle que la plus grande partie de la guanine n'est pas assimilée par la levure dans les conditions de l'expérience. Plus de la moitié de la guanine introduite est en effet transformée en xanthine et rejetée par les cellules. Mais il reste dans le milieu extérieur une quantité considérable de guanine non modifiée et tout se passe comme s'il s'établissait rapidement un équilibre entre la guanine et la xanthine extracellulaires.

D'autre part, la radioactivité spécifique de la guanine intracellulaire après s'être rapidement élevée lors de l'addition de guanine-8-<sup>14</sup>C au milieu, diminue rapidement. Il faut en conclure que de la guanine non radioactive est formée dans la cellule ou libérée par quelque substance préexistante. L'activité spécifique de la xanthine subit des variations identiques, mais avec un certain retard, ainsi qu'on peut s'y attendre si la xanthine provient de la guanine. Les nucléotides guanyliques ne subissent pas cet effet; il semble donc que la réaction qui permet l'incorporation de guanine dans les nucléotides guanyliques soit pratiquement irréversible, comme le serait par exemple la réaction de la guanine avec le 5'-phosphoribosylpyrophosphate<sup>11</sup>.

Deux points restent à éclaircir: l'origine de la guanine non marquée qui dilue la guanine libre dans la cellule et la raison pour laquelle la transformation de guanine en xanthine s'arrête. C'est pour éclaircir ces deux points que les expériences suivantes ont été faites.

#### *Origine de la guanine endogène*

La plus grande partie de la guanine de la levure est sous la forme d'acides nucléiques. Il est donc raisonnable de penser que la guanine qui est libérée dans la cellule et qui dilue la guanine absorbée pourrait provenir des acides nucléiques. Afin de vérifier expérimentalement ce point, nous avons marqué la guanine des acides nucléiques de la levure et étudié l'effet de l'addition de guanine non radioactive.

*Expérience.* La levure est cultivée dans 1 litre de milieu de culture additionné de 0.8 mg de guanine-8-<sup>14</sup>C (environ 5.3 microcuries). Après récolte, la levure est transférée dans un milieu de culture frais non radioactif, de façon à permettre la synthèse de composés puriques non marqués et de réduire ainsi la radioactivité du "pool" des substances acidosolubles. Après centrifugation et lavage, la levure marquée est remise en suspension (10 mg poids sec par ml) dans un milieu glucosé exempt d'azote, et incubée à 30°. Après 60 minutes, de la guanine non marquée est ajoutée de façon à obtenir une concentration finale de 0.034 micromole par ml. Des échantillons sont prélevés 0, 5, 10, 20, 30 et 60 minutes après l'addition de la guanine non marquée. On détermine la radioactivité spécifique de la guanine des acides nucléiques et celle de l'ensemble des acidosolubles (l'extrait perchlorique non fractionné est donc hydrolysé et la guanine libérée est isolée).

Les résultats d'une telle expérience sont rassemblés dans la Fig. 2. La Fig. 2a montre que l'addition de guanine non radioactive fait tomber de moitié la radioactivité spécifique de la guanine des acides nucléiques en moins de 5 minutes. Un tel phénomène peut, en principe, s'expliquer de deux façons: ou bien une quantité d'acides nucléiques à peu près égale à la quantité présente au temps zéro s'est brusquement synthétisée à partir de guanine non marquée lors de l'addition de celle-ci; ou bien une grande partie de la guanine marquée qui se trouvait dans l'acide nucléique a été très rapidement remplacée par la guanine libre exogène.

La première alternative peut être écartée, car aucune synthèse notable d'acide nucléique n'a jamais été observée dans ces conditions. La Fig. 2c montre d'ailleurs que la seconde interprétation est correcte, puisque l'acide nucléique a perdu en moins de 5 minutes la moitié de la guanine marquée qu'il contenait. Une partie de celle-ci se retrouve, après 5 minutes, parmi les substances acido-solubles intracellulaires, d'où elle disparaît bientôt. Ceci se comprend aisément, car d'autres résultats (Fig. 1) nous

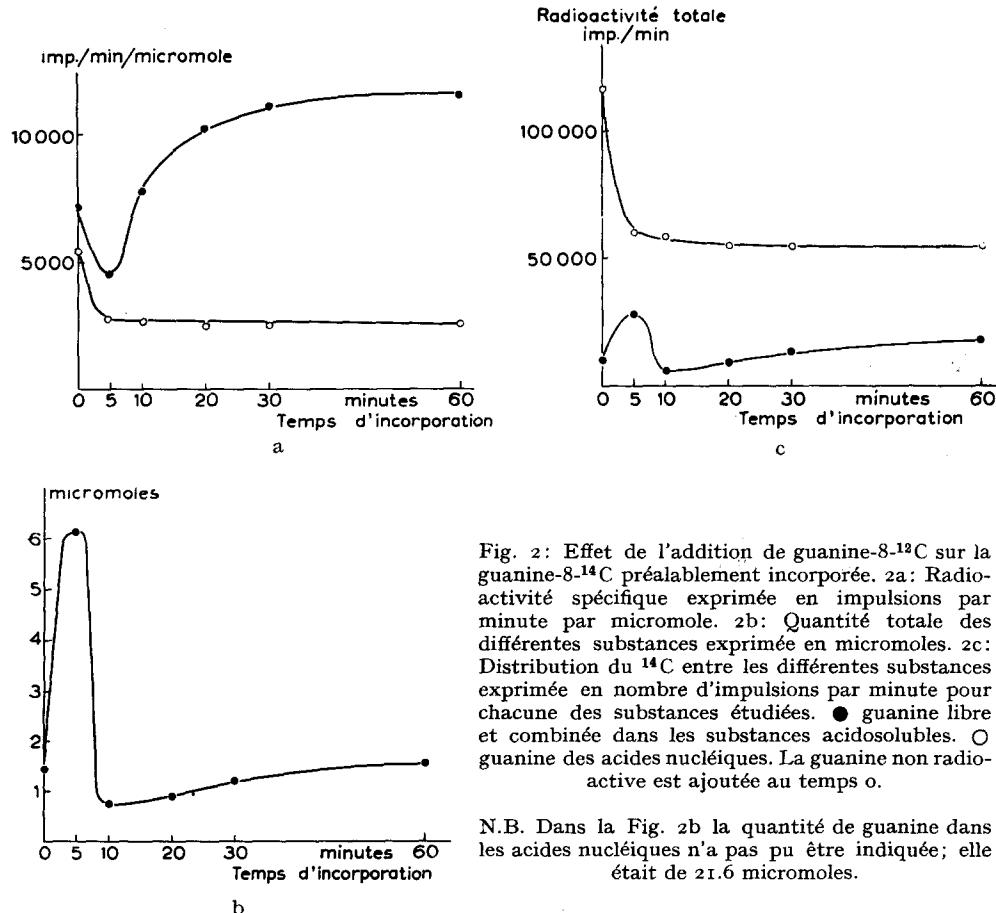


Fig. 2: Effet de l'addition de guanine-8- $^{14}\text{C}$  sur la guanine-8- $^{14}\text{C}$  préalablement incorporée. 2a: Radioactivité spécifique exprimée en impulsions par minute par micromole. 2b: Quantité totale des différentes substances exprimée en micromoles. 2c: Distribution du  $^{14}\text{C}$  entre les différentes substances exprimée en nombre d'impulsions par minute pour chacune des substances étudiées. ● guanine libre et combinée dans les substances acidosolubles. ○ guanine des acides nucléiques. La guanine non radioactive est ajoutée au temps 0.

N.B. Dans la Fig. 2b la quantité de guanine dans les acides nucléiques n'a pas pu être indiquée; elle était de 21.6 micromoles.

ont appris que la guanine est largement transformée en xanthine qui est rejetée par la levure dans le milieu.

Nos résultats établissent donc clairement qu'une fraction très considérable de la guanine des acides nucléiques de la levure au repos peut être remplacée très rapidement par de la guanine exogène sans qu'il y ait synthèse nette d'acide nucléique.

L'examen de la Fig. 2a révèle de plus que la radioactivité spécifique moyenne des substances acidosolubles (composés guanyliques) en fin d'expérience est deux fois plus grande qu'avant l'addition de guanine et plusieurs fois supérieure à celle de l'acide nucléique dont ces substances marquées doivent cependant provenir. Ceci ne peut guère s'expliquer que par l'hétérogénéité métabolique des acides nucléiques. Il faut bien admettre en effet que les substances qui ont libéré les dérivés guanyliques acidosolubles avaient une radioactivité spécifique au moins égale à celle de ces derniers, donc au moins deux fois supérieure à la radioactivité spécifique moyenne des composés guanyliques précipités par l'acide perchlorique.

#### *Transformation de guanine en xanthine*

Nous avons vu plus haut que la guanine libre est très rapidement convertie en xan-

thine, mais que cette transformation n'est pas complète et qu'elle s'arrête après moins de 10 minutes dans les conditions de nos expériences.

Afin d'établir si l'arrêt de cette transformation est dû à l'inactivation du système qui le catalyse ou à l'établissement d'un état stationnaire, nous avons incubé la levure en présence de guanine non marquée. Après 30 minutes, temps largement suffisant pour établir l'état stationnaire, nous avons ajouté de la guanine-8-<sup>14</sup>C ou de la xanthine-8-<sup>14</sup>C et observé la distribution du <sup>14</sup>C entre la guanine et la xanthine 30 minutes après l'addition des substances marquées.

*Expérience.* 100 mg de levure sont incubés en milieu glucosé en présence de 37 µg (0.245 micromole) de guanine non marquée. Après 30 minutes, on ajoute 32 µg (0.21 micromole) de guanine-8-<sup>14</sup>C. Le milieu est recueilli après 30 minutes. On détermine la distribution du <sup>14</sup>C entre la guanine et la xanthine du milieu.

30 minutes après l'addition de la guanine-8-<sup>14</sup>C, on trouvait la distribution suivante:

nombre total d'impulsions	45,700
nombre total d'impulsions dans le milieu	22,850
nombre total d'impulsions dans la guanine du milieu	3,150
nombre total d'impulsions dans la xanthine du milieu	19,700

On voit donc que la première addition de guanine (non marquée) n'entrave en rien la transformation de la guanine ajoutée ultérieurement. Nous pouvons en conclure que l'arrêt de la transformation de guanine-8-<sup>14</sup>C en xanthine-8-<sup>14</sup>C dans l'expérience I n'est pas dû à l'inactivation du système enzymatique qui l'assure, mais bien à l'établissement d'un état stationnaire.

*Expérience.* 100 mg de levure sont incubés en milieu glucosé en présence de 37 µg (0.245 micromole) de guanine non marquée. Après 30 minutes, on ajoute 27 µg (0.18 micromole) de xanthine-8-<sup>14</sup>C et le surnageant est séparé 30 minutes après cette addition.

Nombre total d'impulsions	41,000
nombre total d'impulsions dans le milieu	40,900
nombre total d'impulsions dans la xanthine du milieu	35,400
nombre total d'impulsions dans la guanine du milieu	5,500

On voit donc que si on ajoute de la xanthine marquée lorsque la transformation de guanine a atteint l'état stationnaire, la xanthine marquée ajoutée au système se transforme partiellement en guanine. Ce résultat montre que la transformation de guanine en xanthine est réversible. L'arrêt de cette transformation correspond à l'établissement d'un équilibre dynamique. Des expériences de ce laboratoire ont d'ailleurs montré que la xanthine-8-<sup>14</sup>C peut servir de précurseur à la guanine des acides nucléiques de levure (H. CHANTRENNE, non publié).

#### DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Nos expériences établissent clairement que la plus grande partie de la guanine absorbée par la levure est rapidement transformée en xanthine et rejetée sous cette forme dans le milieu. La transformation n'est pas complète: elle se poursuit jusqu'à l'établissement d'un équilibre dynamique entre la guanine et la xanthine du milieu.

Une fraction au moins de la guanine des acides nucléiques peut être remplacée par

de la guanine libre sans qu'il y ait synthèse d'acide nucléique. La vitesse élevée de ce renouvellement et la libération de guanine (base libre) par les acides nucléiques indiquent qu'il s'agit sans doute d'un échange direct de la guanine des acides nucléiques avec la guanine libre. MATTHEWS ET SMITH<sup>12 13</sup> étudiant le métabolisme de l'azaguanine chez *B. cereus* ont également observé que la guanine peut remplacer l'azaguanine préalablement incorporée dans les acides nucléiques à une vitesse supérieure à celle de la synthèse de ceux-ci. La guanine des acides nucléiques, chez la levure et chez *B. cereus*, pourrait donc être beaucoup moins inerte qu'on le supposait jusqu'ici.

Nous ignorons si le cas de la guanine est unique ou si les autres bases des acides nucléiques ont un comportement analogue. Nos expériences ne permettent pas non plus de dire si toutes les molécules de guanine des acides nucléiques sont facilement échangeables, ni si tous les acides nucléiques de la levure participent à cette réaction. De nouvelles expériences seront nécessaires pour répondre à ces questions.

Remarquons enfin que la substitution rapide de guanine-8-<sup>14</sup>C à la guanine non marquée des acides nucléiques chez la levure au repos montre bien qu'on doit se garder de considérer la vitesse d'incorporation d'un précurseur dans une macromolécule comme une mesure de la vitesse de synthèse de celle-ci. Des réactions d'échange comme celle que nous avons observée expliquent sans doute en partie pourquoi les données de la littérature concernant la vitesse de synthèse des acides nucléiques sont souvent discordantes et dépendent de la nature du précurseur choisi.

#### REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier l'Institut Interuniversitaire des Sciences Nucléaires de l'aide qu'il nous a apportée et qui nous a permis de réaliser ce travail.

#### RÉSUMÉ

La guanine fournie à des levures au repos pénètre dans les cellules et s'y transforme rapidement en xanthine. Celle-ci est ensuite éliminée par la cellule et apparaît dans le milieu. La transformation se poursuit jusqu'à l'établissement d'un équilibre dynamique entre la guanine et la xanthine.

La guanine des acides nucléiques est partiellement remplacée par la guanine libre exogène. Il s'agit probablement d'une réaction d'échange direct.

#### SUMMARY

Guanine is taken up by resting yeast and is very rapidly transformed into xanthine. The xanthine then leaves the cells and appears in the medium. This transformation continues until a dynamic equilibrium is established between guanine and xanthine.

Part of the nucleic acid guanine is readily replaced by exogenous free guanine, probably by a direct exchange reaction.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> S. E. KERR, K. SERAIDARIAN ET J. B. BROWN, *J. Biol. Chem.*, 188 (1951) 207.
- <sup>2</sup> H. CHANTRENNE, *Arch. Biochem. Biophys.*, 65 (1956) 414.
- <sup>3</sup> H. CHANTRENNE ET S. DEVREUX, *Biochim. Biophys. Acta*, 21 (1956) 385.
- <sup>4</sup> B. EPHRUSSI, H. HOTTINGUER ET A. M. CHIMENES, *Ann. Inst. Pasteur*, 76 (1949) 351.
- <sup>5</sup> P. P. SLONIMSKI, *Ann. Inst. Pasteur*, 76 (1949) 510.
- <sup>6</sup> P. P. SLONIMSKI ET B. EPHRUSSI, *Ann. Inst. Pasteur*, 77 (1949) 47.
- <sup>7</sup> H. S. LORING, J. L. FAIRLEY, H. W. BORTNER ET H. L. SEAGRAN, *J. Biol. Chem.*, 197 (1952) 809.
- <sup>8</sup> R. ABRAMS, *Arch. Biochem.*, 30 (1951) 44.
- <sup>9</sup> W. S. MACNUTT, *Biochem. J.*, 50 (1952) 384.
- <sup>10</sup> R. MARKHAM ET J. D. SMITH, *Biochem. J.*, 45 (1949) 294.
- <sup>11</sup> A. KORNBERG, I. LIEBERMAN ET E. S. SIMMS, *J. Biol. Chem.*, 215 (1955) 417.
- <sup>12</sup> R. E. F. MATTHEWS ET J. D. SMITH, *Nature*, 177 (1956) 271.
- <sup>13</sup> J. D. SMITH ET R. E. F. MATTHEWS, *Biochem. J.*, 66 (1957) 323.

Reçu le 1 août, 1957