

Incorporation du [^{14}C]formiate dans la pyrimidine de la thiamine par *Saccharomyces cerevisiae*

Une publication de M. J. PINE ET R. GUTHRIE¹, traitant du même problème dans le cas de *Bacillus subtilis* et dont nous venons d'avoir connaissance, nous incite à rapporter nos résultats avec la levure *Saccharomyces cerevisiae* dans leur état actuel d'avancement.

Une levure haute, après plusieurs cultures en milieu liquide défini, ne contenant inositol, biotine et pantothénate comme vitamines², produit 1-2 μg de thiamine par g de poids humide. On la transfère au début de la fermentation vigoureuse dans un milieu identique contenant en plus du [^{14}C]formiate de sodium (83 mg/ml). On recueille un poids double après 44 h. L'activité du gaz de fermentation est négligeable. Notre méthode de concentration s'inspire d'un dosage standard³, et de la technique de VINCENT⁴. Nous utilisons en plus l'échangeur IR-120 (Tableau I), et terminons

TABLEAU I
RÉPARTITION DE L'ACTIVITÉ
(10^{-3} comptes/min)

Total introduit	8000
Activité résiduelle du milieu	1600
Extrait acide H_2SO_4 0.1 N des cellules	2700
Fraction "thiamine" retenue sur IRC 50 au pH 6, éluee par HCl 1 N	25
Passage de cette fraction sur IR-120 (H)	
Elué par HCl 1 N	3.8
par HCl 1.2 N	20
par HCl 3 N, (fraction thiamine), calculé par différence	1.2

TABLEAU II
ACTIVITÉ ENTRAÎNÉE PAR LA THIAMINE

	Comptes/min/mg
1-Picrate du fragment thiazole	0.2
2-Acide méthyl-2-amino-4-pyrimidine méthylsulfonique-5, 1ère, 2ème, et 3ème recrystallisations	25, 20, 21
3-Acide méthyl-2-hydroxy-4-pyrimidine méthylsulfonique-5	19
4-Sel de calcium, 1ère et 2ème recrystallisations (autre compteur)	61, 63
Poids de diluant: 10 mg	
Activité liée à la pyrimidine: 117	

par une chromatographie sur papier⁵. Après dilution par de la thiamine inactive, on fait la coupure classique en thiazole (presque inactif) et acide aminopyrimidine-sulfonique, qui est actif et conserve son activité par recrystallisation et désamination hydrolytique. Le sel de calcium de l'acide désaminé, *dérivé neutre*, se comporte de même (Tableau II).

Nous n'avons pas voulu fonder nos conclusions sur un seul groupe de dérivés, car la levure fabrique très peu de thiamine, dont l'activité ne peut être qu'une faible fraction de celle du fond contaminant. Dans une autre expérience, nous purifions la

thiamine par électrophorèse sur papier (pH 3.9) et nous dégradons la thiamine par oxydation en disulfure, puis hydrolyse acide. On obtient ainsi le amino-4 bichlorhydrate de la méthyl-2 aminométhyl-5 pyrimidine. Le taux d'incorporation, non modifié par recristallisation, est du même ordre que précédemment. L'activité de la pyrimidine représentait 24 % de celle du concentré (Tableau III).

TABLEAU III
ACTIVITÉ ENTRAÎNÉE PAR LA THIAMINE

	Comptes/min
Après concentration par chromatographie	2140
Après concentration par électrophorèse	730
Activité du bichlorhydrate de la méthyl-2-amino-4-aminométhyl-5-pyrimidine, par mg, (poids de diluant, 25 mg)	11.3
Activité totale liée à la pyrimidine de la thiamine	173

Le taux d'incorporation moléculaire du formiate est près de 20 %. Or le formiate est un précurseur du méthyle en 5 de la thymine. Le formol est un précurseur de l'hydroxyméthyle de l'hydroxyméthyl-5 cytosine des bactériophages⁶, qui a une structure voisine de celle de la pyrimidine de la thiamine. Si l'essentiel de l'activité

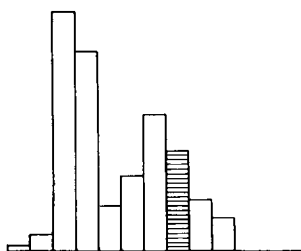
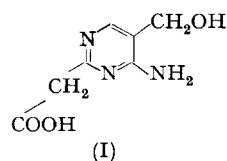


Fig. 1. Chromatogramme du concentré de thiamine. Activités relatives. La thiamine est dans la bande hachurée.



que nous avons trouvée est portée par le méthylène en 5 de nos dérivés, il est possible que la pyrimidine de la thiamine se fasse comme les autres pyrimidines, et que l'hydroxyméthyl-5 cytosine soit un intermédiaire. Pour la méthylation en C₂, il faudrait alors un donneur nucléophile. Une condensation avec l'acétylcoenzyme A donnerait l'acide (I) qui devrait être facilement décarboxylable.

Faculté des Sciences, Université de Nancy (France)

S. DAVID

B. ESTRAMAREIX

¹ M. J. PINE ET R. GUTHRIE, *J. Bacteriol.*, 78 (1959) 545.

² R. S. W. THORNE, *J. Inst. Brewing*, 55 (1949) 18.

³ ANALYTICAL METHODS COMMITTEE, *Analyst*, 76 (1951) 127.

⁴ J. E. VINCENT, *Rec. Trav. Chim.*, 76 (1957) 780.

⁵ D. ET N. SILIPRANDI, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 52.

⁶ J. G. FLAKS ET S. S. COHEN, *Biochim. Biophys. Acta*, 25 (1957) 667.

Reçu le 21 juin, 1960