

243. Action de la pénicilline et de la streptomycine sur le catabolisme de l'acide ribonucléique

par F. Gros et B. Rybak¹⁾.

(9 VI 48)

S. S. Cohen a montré²⁾ que la streptomycine est susceptible de former des complexes insolubles avec les acides nucléiques polymérisés, tandis que l'acide désoxyribonucléique dépolymérisé par sa nucléodépolymérase spécifique ne précipite plus en présence de streptomycine. Certains virus ($T_2F.$), dont l'acide désoxyribonucléique est le constituant fondamental, donnent des précipités avec la streptomycine. D'après le même auteur, l'acide ribonucléique peut également former des complexes avec la streptomycine. Pour *Massart* et ses collaborateurs³⁾⁴⁾⁵⁾:

1^o les nucléoprotéines formeraient des complexes électro-adsorptifs avec la streptomycine ou avec certains colorants cytologiques des acides nucléiques, les acridines;

2^o la pénicilline dans les mêmes conditions serait incapable de former des complexes insolubles avec les ribonucléoprotéines de levure, mais agirait sur le métabolisme nucléique en inhibant directement l'activité ribonucléasique. Le substrat utilisé dans ces expériences était de la levure déshydratée à chaud et fixée par l'éthanol à chaud.

Nous avons étudié à notre tour l'action de la pénicilline et de la streptomycine sur la dépolymérisation de l'acide ribonucléique.

Matériel.

Nous avons utilisé un acide nucléique purifié (N: 15%; P: 7%), extrait de levure parfaitement soluble dans l'eau distillée. La ribonucléase fut préparée selon *Kunitz*⁶⁾ et obtenue à l'état cristallisé.

La pénicilline mise en œuvre était, suivant les cas, de la pénicilline G (thermostable) ou de la pénicilline étalon (1650 unités Oxford/mgr.). Nous avons employé le monochlorhydrate de streptomycine (type Bristol).

¹⁾ Communication présentée à l'assemblée d'été de la Société suisse de chimie le 5 septembre 1948 à St-Gall et publiée avec l'autorisation du Comité de rédaction.

²⁾ J. Biol. Chem. **168**, 511 (1947).

³⁾ Exper. **3**, 288 (1947).

⁴⁾ Exper. **3**, 289 (1947).

⁵⁾ Exper. **3**, 494 (1947).

⁶⁾ Methode der Fermentforsch. **2**, 1940 (1941).

L'activité ribonucléasique fut évaluée en dosant, d'après *Dubos et Thompson*¹⁾, la quantité de phosphore organique provenant de la portion nucléique dépolymérisée rendue soluble dans ClH 0,2-n. Les dosages de phosphore furent effectués par la technique de *Macheboeuf et Delsal*²⁾.

I. Action de la pénicilline sur l'activité ribonucléasique.

Nous ne nous étendrons pas sur cette partie de notre travail car, contrairement aux conclusions de *Massart* et collaborateurs, les résultats obtenus avec la pénicilline ont toujours été négatifs.

Nous donnons ci-contre le protocole que nous avons adopté pour ces recherches: on met en présence 0,5 ml. d'une solution de ribonucléase renfermant 100 microgrammes de diastase par ml. et 0,5 ml. d'une solution de pénicilline renfermant des quantités variables d'antibiotique. Ces expériences sont réalisées à deux pH différents, 7,0 et 8,0 (par addition de 0,5 ml. de tampon boraté 0,2-m.).

Une série témoin est constituée, où la pénicilline est remplacée par de l'eau distillée.

Tous les échantillons sont abandonnés pendant 1 heure à la température du laboratoire et chaque tube reçoit ensuite 1 ml. d'une solution d'acide ribonucléique neutralisé, contenant 1 mgr. d'acide nucléique par ml. Les tubes sont ensuite placés dans une étuve à 40° C. pendant 30 minutes. Au sortir de l'étuve, l'acide ribonucléique non dégradé est précipité à basse température par addition d'acide chlorhydrique 2-n. (0,3 ml.; concentration finale: environ 0,2-n). Après un repos de quelques heures à 0° C., le contenu des divers tubes est centrifugé dans un appareil refroidi à 0° C. On prélève dans chaque cas 1 ml. du liquide surnageant pour y effectuer, après destruction sulfonitrique, le dosage du phosphore.

Le tableau I résume une expérience de ce type. Les résultats y figurent en microgrammes d'acide ribonucléique dépolymérisé.

Tableau I

Action de la pénicilline à différentes concentrations sur l'activité ribonucléasique.

Témoins*)		Pénicilline		
pH 7,0	pH 8,0	Quantité de pénicilline en $\mu\text{gr.}$	pH 7,0	pH 8,0
470	510	3600	460	445
		1800	440	490
		900	470	490
		450	470	460
		220	445	445

*) Moyenne arithmétique de 3 déterminations.

On voit que, dans les conditions où nous avons opéré, la pénicilline ne modifie pratiquement pas l'activité ribonucléasique.

Cette conclusion subsiste d'ailleurs si, au lieu d'abandonner la ribonucléase en présence de pénicilline puis d'ajouter le substrat à ce

¹⁾ J. Biol. Chem. **124**, 501 (1938).

²⁾ Bl. Soc. Chim. Biol. **25**, 116 (1943).

mélange, on répartit préalablement la pénicilline dans une solution d'acide ribonucléique pour soumettre ensuite le mélange à l'action de la ribonucléase. On retrouve également les mêmes résultats en opérant sans addition de tampon.

II. Action de la streptomycine.

Formation de complexes insolubles entre la streptomycine et l'acide ribonucléique.

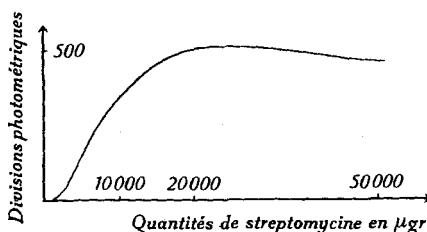
Cohen a montré que, si l'on met en présence une solution d'acide désoxyribonucléique et une solution de streptomycine, le mélange s'opacifie progressivement; pour des concentrations suffisantes en réactif, on peut obtenir un véritable précipité qui ne tarde pas à se déposer. L'intensité de ce phénomène peut être estimée en effectuant des mesures opacimétriques. L'auteur a constaté en outre que le complexe est plus important lorsqu'on s'adresse aux acides désoxyribonucléiques hautement polymérisés, obtenus par des traitements suffisamment doux, que lorsqu'on s'adresse à des acides plus ou moins dépolymérisés, tels que les préparations commerciales obtenues par extraction alcaline.

Mettant à profit ces observations, nous avons donc étudié, dans une première partie, l'influence de divers facteurs pouvant conditionner la formation du complexe entre la streptomycine et un acide ribonucléique de levure.

A) Concentration en streptomycine.

On répartit dans des tubes à hémolyse 3 ml. d'une solution d'acide ribonucléique neutralisé (renfermant 1 mgr. d'acide nucléique par ml.), puis on y ajoute le même volume de diverses solutions de streptomycine renfermant des concentrations variables d'antibiotique. A partir d'une certaine concentration en streptomycine, on observe immédiatement l'apparition dans le mélange d'un trouble homogène qui va s'intensifiant avec le temps. Après 30 minutes à la température ambiante, on évalue l'opacité des différents mélanges, en utilisant un photomètre de type Meunier, dans la lumière rouge.

Voici la courbe montrant comment varie l'importance du complexe en fonction de la concentration en streptomycine.



B) Influence du p_H .

Les expériences furent réalisées soit au sein de tampons de différentes natures, soit en imposant aux solutions d'acide nucléique des p_H déterminés par addition de quantités adéquates d'acide ou d'alcali. Les p_H étaient mesurés (potentiomètre de type Jouan) avant

l'addition de streptomycine aux solutions d'acide ribonucléique, puis 30 minutes après l'addition de cet antibiotique (de manière à vérifier leur stabilité), immédiatement avant d'effectuer les mesures à l'opacimètre.

I) Expériences accomplies à différents p_H , sans addition de tampons

Tableau II.

(Streptomycine: 5 mgr.; acide ribonucléique: 3 mgr.). Les chiffres expriment les divisions du photomètre.

P_H	4,2	5,0	5,5	6,0	6,7	6,9	7,2	7,6	8,3	9,8
Divisions lues au photomètre* .	52	60	65	72	83	100	100	43	25	17

* Témoin: acide nucléique + eau distillée: 17.

On voit que l'optimum de p_H pour la formation du complexe est situé aux environs immédiats du p_H 7,0. Au-dessus du p_H 8,5, le complexe ne se forme plus. Pour des p_H inférieurs à 4,0, les données présentent une certaine incertitude du fait de la faible solubilité de l'acide ribonucléique au voisinage des p_H acides.

II) Expériences réalisées après incorporation de divers tampons.

Dans le tableau ci-contre (No III) nous avons reproduit, à côté des données du tableau No II, celles que nous ont fournies les essais en présence de divers tampons de nature chimique différente. Toutes ces expériences ont été accomplies dans des conditions rigoureusement identiques, leurs données sont donc directement comparables (tableau III).

Tableau III.

Influence du p_H sur la formation du complexe insoluble entre l'acide ribonucléique et la streptomycine.

(Divisions lues au photomètre.)

	pH													
Conditions	4,2	5,0	5,5	5,9	6,0	6,3	6,5	6,6	6,7	6,8	6,9	7,0	7,1	7,2
Sans tampon . .	52	60	65	72						83		100		100
Tampon boraté .					420		500			500			620	
Tampon au véronal								240				240		
Tampon phosphaté (Sörensen) .				80		28				30		24		

Comme on le voit, le phénomène est complexe, car l'intensité de la formation de la combinaison insoluble ne dépend pas seulement du p_H , mais elle varie considérablement, pour un p_H déterminé, avec la nature des sels présents dans le mélange. On peut constater les faits suivants:

1^o Les borates exercent une action fortement activatrice sur la formation du complexe. En présence de tampon boraté, l'optimum du phénomène est encore aux environs de 7,0, comme en absence de tampon.

2^o Au sein d'un tampon phosphaté, le complexe n'apparaît pas au-dessus de p_H 6,3.

S. Cohen ayant signalé que le complexe streptomycine-acide nucléique était soluble en présence de $ClNa$, nous avons recherché si les gros écarts obtenus dans nos essais avec différents tampons n'étaient pas imputables à des solubilités variables du complexe en présence de différents sels neutres.

C) Action de divers sels neutres sur la formation du complexe.

Pour ces recherches, nous avons adopté le protocole suivant: à 3 ml. d'une solution neutralisée d'acide ribonucléique à 0,1%, on ajoute 1 ml. d'une solution de streptomycine contenant 5 mgr. d'antibiotique; après 15 minutes — quand le mélange a atteint son opacité maximum — on ajoute 1 ml. de la solution saline étudiée, rigoureusement neutre et dont la concentration en sel est connue. Après 30 minutes, on effectue les mesures opacimétriques. Des témoins sans addition de sels sont constitués.

Tableau IV.

Solubilités relatives du complexe streptomycine-acide ribonucléique en présence de différents sels neutres).*

Nature des sels ajoutés	Concentrations finales		
	M./500	M./50	M./25
Témoin sans sel .	120		
Chlorures	130	84	48
Acétates	125	90	57
Borates	162	200	330
Citrates	74	39	19
Phosphates	100	45	19
Barbiturates. . . .	128	85	46

*) Les chiffres expriment le nombre de divisions lues à l'opacimètre. Blanc = 19.

On voit que:

1^o A partir de M./50 la plupart des sels, à l'exclusion des borates, dissolvent plus ou moins le complexe streptomycine-acide ribonucléique formé dans les conditions précédemment décrites.

2^o Les citrates dissolvent cependant le complexe à une concentration très basse (M./500). Il est intéressant de rapprocher ces résultats de ceux de *Pollister et Mirsky*¹⁾ et d'autres auteurs antérieurs qui ont constaté une grande solubilité des nucléoprotéines dans les citrates.

3^o L'addition de borates favorise au contraire considérablement la formation du complexe. Notons que les borates ne donnent lieu à aucun précipité quand ils sont ajoutés soit à une solution de streptomycine soit à une solution d'acide ribonucléique. Cette action des borates dans le cas présent ne doit pas autrement nous surprendre; on sait, en

¹⁾ J. gen. Phys. 30, 101 (1946).

effet, qu'en micrographie sont utilisés les bleus boraciques de *Manson*, de *Sahli* et de *Sénevet*, colorants de la chromatine, où le borate de sodium sert à accentuer l'action du colorant en l'amenant à l'état de suspension.

On peut classer comme suit les sels dans lesquels le complexe se dissout de plus en plus difficilement:

citrates-phosphates-chlorures et barbiturates-acétates. Le complexe est également soluble dans un grand excès de borate.

D) *Action de la streptomycine sur l'activité de la ribonucléodépolymérase.* *Massart* et ses collaborateurs¹⁾ ont signalé que les nucléoprotéines de levure, combinées avec la streptomycine, ne sont plus attaquables par la nucléase. Le substrat utilisé dans leurs expériences était une simple suspension de levure déshydratée.

En travaillant avec un substrat différent et en dosant l'activité de l'enzyme par une technique très différente, nous avons pleinement confirmé leurs résultats. Nous ne nous étendrons pas sur ce chapitre; nous essaierons seulement, en étudiant l'action de quelques facteurs pouvant régir l'inhibition par la streptomycine de la ribonucléase, de montrer que ce phénomène est dû à la propriété dont jouit l'antibiotique de former des complexes insolubles avec l'acide nucléique.

A) Concentration en streptomycine.

Nous avons soumis des mélanges renfermant une quantité identique d'acide nucléique (2 milligrammes) et des quantités variables de streptomycine à l'action de la ribonucléase. La quantité d'enzyme utilisée était de 50 $\mu\text{gr.}$, l'expérience dura 30 minutes à la température de 40° C et à pH 7,0 (sans tampon). Des témoins comportant de l'acide ribonucléique sans streptomycine étaient également soumis à l'action diastasique, dans des conditions rigoureusement identiques.

A la fin de l'incubation, on détermina d'après le procédé préalablement décrit, les quantités d'acide ribonucléique dépolymérisées.

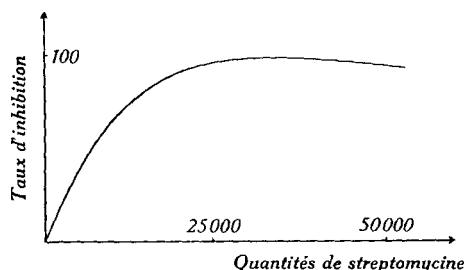


Fig. 2.

La courbe fig. 2 exprime le taux d'inhibition exercée par la streptomycine à différentes concentrations.

L'inhibition exercée par la streptomycine est totale lorsqu'on ajoute 20000 unités de cet antibiotique. Cette concentration est également optimum pour la formation du complexe insoluble avec l'acide nucléique (voir précédemment). D'ailleurs, l'allure générale de la courbe est pratiquement la même que celle de la courbe 1, qui retrace l'intensité de combinaison entre l'acide nucléique et la streptomycine pour des concentrations variables d'antibiotique.

¹⁾ Exper. 3, 494, 1947.

B) *Rôle du pH.*

Nous avons étudié l'activité ribonucléasique à différents p_H (tampons boratés) parallèlement en absence et en présence de streptomycine. La quantité d'acide nucléique était de 2 mgr., celle de streptomycine de 5 mgr. On a utilisé dans ces expériences 50 microgrammes de ribonucléase et l'incubation dura 1 h. à 40° C.

Le tableau ci-contre indique le taux d'inhibition de l'activité ribonucléasique exercée par la streptomycine à différents p_H .

p_H	6,7	7,0	7,5	8,1	8,7
taux d'inhibition . . .	25	40	40	22	22

L'inhibition atteint son maximum aux environs de p_H 7,0, ce qui concorde avec les conclusions de l'étude de la formation du complexe à différents p_H .

Discussion.

En ce qui concerne la pénicilline, nous n'avons pas trouvé de modifications apparentes de la dépolymérisation de l'acide ribonucléique de levure et nos expériences excluent toute action directe de la pénicilline sur l'enzyme responsable de cette dégradation. Ce résultat est en contradiction avec les conclusions de *Massart* et al., qui trouvent une inhibition très intense de la ribonucléodépolymérase et qui en déduisent un blocage direct de l'enzyme par l'antibiotique. Il reste possible que ces divergences soient dues au fait que nos conditions expérimentales diffèrent sensiblement de celles réalisées par les auteurs belges. Des degrés vraisemblablement très différents de polymérisation entre les préparations utilisées dans ces deux cas, la présence de protéines-supports dans les expériences de *Massart*, leur absence dans nos propres expériences expliqueraient peut-être les écarts dans les résultats. Nous avons remarqué cependant que la pénicilline (acide) ne se combine pas aux protéines basiques (histones) du thymus de veau pour donner des composés insolubles tout au moins.

Il faut rappeler que *Pandalai* et *George*¹⁾ ont indiqué que l'acide nucléique inhibait l'action de la pénicilline, en agissant en quelque sorte comme un détoxifiant pour la cellule soumise à l'action antibiotique. *Faguet*²⁾ reprenant ces expériences au moyen de son appareil turbidimétrique, constate que l'action compétitrice du nucléinate de sodium vis-à-vis de l'antibiotique n'est que très légère. Soulignons encore que dans la mesure où il existerait une action antagoniste véritable, ce fait ne concorderait pas selon nous avec l'hypothèse suivant laquelle l'action de la pénicilline serait liée avant tout à son activité anti-ribonucléasique, car l'addition d'acide ribonucléique dans ces conditions ne saurait lever l'action de l'antibiotique. D'ailleurs, la spécificité de la ribonucléase cristallisée dont nous nous sommes servis est suffisamment stricte pour que la présence possible de protéases (histonases, protaminases plus spécialement) ne vienne changer du tout-au-tout le catabolisme de l'acide ribonucléique.

¹⁾ Brit. med. J. (août 1947), 210.

²⁾ Ann. Inst. Pasteur 74, 75 (1948).

Bien que la pénicilline ne manifeste donc aucune action inhibitrice sur la ribonucléase *in vitro* vis-à-vis de l'acide ribonucléique purifié, elle inhibe cependant le catabolisme de l'acide ribonucléique chez les *bactéries*¹⁾; dans le cadre de notre présent travail nous pensons que cette inhibition n'est que la conséquence d'une interférence antibiotique avec le métabolisme des mononucléotides. *Krampitz* et *Werkman* ont constaté, en effet, qu'en présence de pénicilline le catabolisme des mononucléotides pyrimidiques était inhibé au même degré que le catabolisme des polynucléotides. Or, *Schmidt* et al.²⁾ ont explicité récemment le mécanisme d'action de la ribonucléodépolymérase: c'est un clivage des polynucléotides en fragments plus simples, mais avec libération de nucléotides pyrimidiques. On peut donc parfaitement penser que la pénicilline, en bloquant dans la cellule l'utilisation des nucléotides pyrimidiques, ralentit considérablement par déplacement d'équilibre la dépolymérisation des acides nucléiques. Cette hypothèse est rendue encore plus vraisemblable par les expériences de *Zittle*³⁾, qui ont montré que les mononucléotides inhibaient l'action de la ribonucléase. En somme, l'accumulation de mononucléotides en présence de pénicilline freinerait la dégradation de l'acide ribonucléique.

Nous avons par contre, dans le cas de la streptomycine, confirmé les résultats de *S. Cohen* et de *Massart*: la streptomycine donne lieu à des complexes insolubles en présence d'acide nucléique et l'acide nucléique ainsi combiné échappe à l'action dépolymérisante de la ribonucléase. Il est donc possible que la streptomycine se fixe sur les fragments d'acide nucléique qui sont les points d'attaque de la ribonucléase. Rappelons une fois encore les travaux de *Schmidt* et al. sur le mécanisme d'action de la ribonucléodépolymérase: l'enzyme détache outre des fragments dépolymérisés de polynucléotides, des mononucléotides pyrimidiques libres.

On peut penser qu'en empêchant l'acide nucléique d'être résolu en mononucléotides, la streptomycine entraîne des perturbations dans les systèmes oxydo-réducteurs de la cellule. D'après *v. Euler* et *Salodkowska*⁴⁾, les acides nucléiques fonctionnent comme sources de mononucléotides agissant comme cofacteurs d'oxydo-réduction. La streptomycine, en empêchant le réapprovisionnement de la cellule en mononucléotides cofacteurs de nombreuses déshydrases, inhiberait indirectement les processus de réductions indispensables aux synthèses. On expliquerait ainsi les résultats de *Mule*⁵⁾, qui constate chez les cellules soumises à la streptomycine une augmentation du r_H .

¹⁾ Arch. Bioch. **12**, 57 (1947).

²⁾ J. Biol. Chem. **170**, 759 (1947).

³⁾ J. Biol. Chem. **160**, 527 (1945).

⁴⁾ *H. von Euler* et *W. Solodkowska*, Bl. Soc. Chim. biol. **29**, 382 (1947).

⁵⁾ Exper. **4**, 115 (1948).

Dans une certaine mesure, on serait amené à admettre qu'il se produit une véritable substitution métabolique des protéines basiques (supports des acides nucléiques dans les nucléoprotéines) par la streptomycine ou des colorants du type trypaflavine; dans ces conditions, la nouvelle molécule n'étant plus métabolisable enrayerait le métabolisme des nucléoprotéines. A cet égard, les résultats de *McIlwain*¹⁾ relatifs au rôle anti-acridine de l'acide ribonucléique nous paraissent conformes; soulignons qu'ils excluent également l'hypothèse de complexes d'adsorption du type (NP^{X-}) (xH ou acridine ou streptomycine⁺) (*Massart*) et justifient notre conception de la formation d'un sel²⁾.

RÉSUMÉ.

Retenant les études de *S. Cohen* et de *Massart* sur l'action de la streptomycine et de la pénicilline sur les acides nucléiques:

1^o nous n'avons pu confirmer sur l'acide ribonucléique purifié de levure, que la ribonucléase cristallisée soit inhibée par la pénicilline;

2^o nous avons précisé les conditions de formation des complexes insolubles entre la streptomycine et l'acide ribonucléique (concentration en antibiotique, influence du pH et de la présence des sels).

Institut Pasteur, Paris.

244. Di-tosylierung der Glucose

von E. Hardegger, R. M. Montavon und O. Jucker.

(10. IX. 48.)

Vor einiger Zeit wurde gezeigt³⁾, dass bei der Behandlung von wasserfreier α , β -Glucose mit 1 Mol Tosylchlorid in Pyridin und nachfolgender Acetylierung vorwiegend die primäre Oxy-Gruppe am C-Atom 6 des Glucose-Moleküls tosyliert wird.

In Fortsetzung dieser Arbeiten fanden wir, dass die Umsetzung von Glucose mit 2 Mol Tosylchlorid, nach Acetylierung, in präparativ erträglicher Ausbeute von ca. 20% der Theorie zu der noch unbekannten, gut krystallisierten α -1,3,4-Triacetyl-2,6-ditosyl-glucose (I) führt⁴⁾.

¹⁾ Bioch. J. **35**, 1311 (1941).

²⁾ B. Rybak et F. Gros, Exper. (sous presse).

³⁾ Vgl. E. Hardegger und R. M. Montavon, Helv. **29**, 1199 (1946).

⁴⁾ Vgl. J. Compton, Am. Soc. **60**, 395 (1938).