

Préparation de desoxyribonucléosides marqués au ^{14}C sur la base

R. CARDINAUD ET K. V. VISWANATHAN *

Service de Biochimie, Département de Biologie. Centre d'Études Nucléaires de Saclay. Gif sur Yvette BP. n° 2. (S.-et-O.), France

Reçu le 5 octobre 1965

SUMMARY

*^{14}C -labelled deoxyribonucleosides have been prepared by enzymatic transfer of deoxyribose from a d-nucleoside on to the labelled pyrimidine or purine base selected. The operation is effected in a single stage with a crude enzyme extract of *Lactobacillus helveticus*. With carefully studied reaction conditions donor|base concentration ratio and temperature — the following substances and yields were obtained: d-adenosine (95%); d-guanosine (95%); d-inosine (90%); thymidine (80%); d-cytidine (95%); d-uridine (73%).*

As the method employed has the advantage of not entailing isotopic dilution, the specific activity of the substances obtained is the same as that of the initial labelled base. The purifying technique used ensures a purity of over 99.5%.

The episodic formation of secondary radioactive substances indicates that certain cultures contain a deaminase which acts on purine deoxyribonucleosides. A nucleosidase activity affecting thymidine and d-uridine was demonstrated.

RÉSUMÉ

*On a effectué la préparation de desoxyribonucléosides marqués au ^{14}C par transfert enzymatique de desoxyribose d'un d-nucléoside sur la base pyrimidique ou purique marquée choisie. L'opération se fait en une seule étape avec un extrait enzymatique brut de *Lactobacillus helveticus*. L'étude des conditions de réaction, rapport des concentrations donneur|base et température, a permis d'obtenir les produits suivants avec les rendements respectifs de : d-adénosine (95%); d-guanosine (95%); d-inosine (90%); thymidine (80%); d-cytidine (95%); d-uridine (73%).*

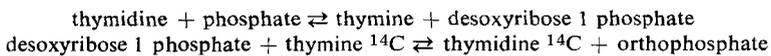
* Stagiaire boursier de l'Association pour l'organisation des stages en France. Adresse actuelle : Radiochemistry and Isotopes Div. Atomic Energy Establishment, TROMBAY, Indes.

La méthode employée présentant l'avantage de ne pas entraîner de dilution isotopique, l'activité spécifique des produits obtenus est celle de la base marquée de départ. La technique de purification employée garantit une pureté supérieure à 99,5%.

La formation épisodique de substances secondaires radioactives indique que certaines cultures contiennent une désaminase active sur les desoxyribonucléoside puriques. Une activité nucléosidasique agissant sur thymidine et d-uridine a été mise en évidence.

INTRODUCTION

La thymidine tritiée a été préparée par FRIEDKIN et ROBERTS ⁽¹⁾ en utilisant l'enzyme desoxyribose phosphorylase de foie de cheval selon la réaction :



Puis REICHARD ⁽²⁾ a montré que les 2 réactions successives ci-dessus pouvaient être réalisées simultanément selon le schéma réactionnel

$\text{thymidine} + \text{thymine } ^{14}\text{C} + \text{orthophosphate} \rightleftharpoons \text{thymidine } ^{14}\text{C} + \text{thymine} + \text{orthophosphate}$
en utilisant une enzyme bactérienne. Cette méthode a été appliquée également par T. SEKIGUCHI *et al.* ⁽³⁾ en utilisant un extrait enzymatique de foie de veau. Ces auteurs indiquent qu'il est possible d'obtenir ainsi de la thymidine ¹⁴C de haute activité spécifique bien que la méthode elle-même conduite inévitablement à une dilution isotopique. Des résultats identiques ont été obtenus dans ce laboratoire avec le même système enzymatique par R. BAILLY*. La méthode de DE VERDIER et VAN POTTER ⁽⁴⁾ qui utilisent la desoxyuridine comme donneur de desoxyribose a été mise à profit par WINAND ⁽⁵⁾ pour préparer la thymidine ³H à partir de thymine ³H sans dilution isotopique. Le système enzymatique est extrait du foie de rat.

Tandis que les préparations enzymatiques décrites précédemment utilisent une phosphorylase, la méthode utilisée par WILLIAM ⁽⁶⁾ fait appel à la trans-N-desoxyribosylase décrite d'abord par MC NUTT et KALCKAR, MC NUTT et HOFF JØRGENSEN ⁽⁷⁾ sous le nom de trans-N-glycosidase, puis étudiée plus en détail par ROUSH et BETZ ⁽⁸⁾. La préparation présente une spécificité limitée au 2-desoxyribose et se révèle utilisable pour le transfert du 2-desoxyribose sur une base purique ou pyrimidique selon la réaction suivante :



Dans le présent travail, les résultats de WILLIAM ont été confirmés avec des rendements sensiblement supérieurs. De plus, la desoxyuridine et la desoxyinosine ont été préparées par voie enzymatique avec des rendements supérieurs à 70%.

* Stagiaire détaché de l'Université de Toulouse.

PARTIE EXPERIMENTALE

EXTRACTION DE L'ENZYME TRANS N-DESOXYRIBOSYLASE. Le *Lactobacillus helveticus* (NDC 0 30)* qui a été le plus souvent employé pour cette étude est mis en culture à 45°C dans le milieu :

Peptone : 10 g ; extrait de viande : 10 g ; extrait de levure : 5 g ; Tween 80 : 1 ml ; phosphate dipotassique : 2 g ; sulfate de sodium ($3\text{H}_2\text{O}$) : 5 g ; citrate d'ammonium : 2 g ; sulfate de magnésium ($7\text{H}_2\text{O}$) : 200 mg ; sulfate de manganèse ($4\text{H}_2\text{O}$) : 50 mg ; eau distillée : 1 l.

Le pH est ajusté à 6,7 et le milieu stérilisé à 120°C pendant 20 minutes et filtré. On ajoute alors 20 g de glucose et on stérilise 20 minutes à 118°C . Le pH final doit être de 6,1 à 6,2. Les bactéries sont centrifugées, lavées dans un tampon citrate pH 6,0, remises en suspension dans un tampon phosphate pH : 6,0 et l'enzyme est extraite par désintégration sonique** à 9 kc pendant 12 minutes, à 0°C , puis à nouveau 20 minutes dans les mêmes conditions. Le mélange est centrifugé à 8.000 g, 2°C , pendant 30 minutes. La fraction active est extraite selon le procédé simplifié de WILLIAM⁽⁶⁾. Le 1^{er} précipité au sulfate d'ammonium à 35% de la saturation (Lh-a) est éliminé par centrifugation et au surnageant on ajoute de nouveau du sulfate d'ammonium jusqu'à 70% de la saturation. Le précipité est remis en solution dans l'eau distillée (Lh-b) et la solution est dialysée contre de l'eau distillée à 2°C pendant 24 h. Après lyophilisation, le résidu est remis en solution dans l'eau distillée. Cet extrait (Lh-1b) est utilisé dans la majorité des essais décrits ici. Un extrait brut (Lh-3), surnageant après désintégration sonique, a donné des résultats équivalents sauf pour la préparation de la desoxyadénosine, desoxyhypoxanthine et desoxyguanosine (voir discussion).

Conditions de réaction. La réaction a généralement été faite dans un tube à centrifugation dans lequel on met successivement la base marquée soit par le carbone ^{14}C , soit par le tritium, le desoxyribonucleoside donneur, la solution enzymatique et 1 goutte de toluène pour limiter la prolifération bactérienne. Les différents constituants, à l'exception de l'enzymes, sont dissous dans un tampon phosphate (pH 6,0). Le tube fermé par une feuille de « Parafilm » est porté à 37°C pendant le temps choisi, après quoi l'enzyme est précipité par addition de 4 volumes d'alcool bouillant et le tube maintenu ensuite à 65°C pendant 20 minutes. Le milieu est refroidi alors à 0°C et conservé à cette température pendant plusieurs heures avant centrifugation. Le surnageant est lyophilisé, redissous dans l'eau et chromatographié soit sur papier, soit sur couche mince. a) *Chroma-*

* Nous remercions M. AUCLAIR du Centre National de Recherches Zootechniques pour le prêt de cette souche et de nombreux détails sur les conditions de culture et de conservation.

Nous remercions également Madame le Dr. I.U. BOONE, LOS ALAMOS Scientific Laboratory pour l'envoi de la souche *L. helveticus* ATCC 12046 et de précieux conseils pour la culture et l'entretien de cette souche

** Raytheon S. 102 A.

tographie sur papier. Thymidine, desoxyuridine. Les produits de la réaction sont déposés soit par taches, soit sur un trait sur une feuille de papier Whatman III cousue sur une bande de papier Whatman I. La bande de papier Whatman I plonge dans l'augette de solvant et freine le débit de phase mobile réalisant souvent de meilleures séparations. Le développement est fait en chromatographie descendante à 22°C, 15 h environ, à l'aide du solvant acétate d'éthyle; acide formique; eau : 60 : 5 : 35 (solvant 1). b) *Desoxyhypoxanthine* — Ce même procédé a été employé avec l'eau distillée comme solvant de développement (solvant 2). Une substance radioactive formée à partir de l'hypoxanthine a un R_F de 0.70 dans ce système. c) *Desoxycytidine* — Le papier Whatman I a été utilisé en parallèle avec la technique sur couche mince — Sur papier — le solvant est : isopropanol, acide chlorhydrique ($d = 1,19$), eau : 170 : 17 : 49 (solvant 3). Le temps de développement est de 30 heures environ à 22°C (voir tableau des R_F). d) *Chromatographie sur couche mince.* Sur couche de cellulose (MN 300 Merck) épaisseur 0,250 mm (les plaques sont utilisées sans activation préalable). Le solvant de développement est l'eau distillée et la température est celle du laboratoire (21-25°C). Les séparations obtenues sont rassemblées dans les tableaux Ia et Ib.

Identification des produits de la réaction et calcul du rendement. — Les produits de la réaction sont identifiés par comparaison avec les témoins correspondants, chromatographiés dans les mêmes conditions, en alternant les essais et les témoins. Les taches sont décelées en lumière ultra-violette sur les chromatogrammes. La distribution de la radioactivité sur les chromatogrammes est déterminée à l'aide d'un lecteur de radioactivité à compteur 2π sur les plaques et 4π pour les papiers. Le profil radioactif enregistré permet de calculer le rendement avec une précision suffisante en mesurant au planimètre les surfaces respectives de chacun des pics correspondant aux réactifs et aux produits.

RÉSULTATS

Avec les différentes préparations enzymatiques, nous avons cherché les meilleures conditions expérimentales pour obtenir une conversion aussi complète que possible. L'enzyme a été mis en concentration suffisante pour obtenir un équilibre rapide. Les points suivants ont été étudiés : constante d'équilibre pour un certain nombre de combinaisons possibles (tableau V), influence des temps de réaction (tableau III), influence du rapport molaire donneur/base qui a toujours été pris assez grand pour tendre vers une conversion aussi complète que possible (tableau IV). Un essai à température élevée est également mentionné.

a) *Stœchiométrie de la réaction.* Les travaux précédents ^(6, 8) montrent que les *d*-nucléosides ne fonctionnent pas tous avec la même efficacité comme donneurs. En conséquence, leur aptitude a été évaluée en calculant le rapport : $K = (d\text{-nucléoside } 1) / (\text{base } 2) / (d\text{-nucléoside } 2) / (\text{base } 1)$ pour des réactions dont

les rapports donneur/base initiaux sont voisins de 1. L'étude a été faite avec un système enzymatique purifié (Lh-1b) et avec un système enzymatique brut (Lh-3.) Le dernier est susceptible en particulier de donner avec les bases marquées des produits radioactifs secondaires (voir discussion). On note que les rapports « K » diffèrent sensiblement selon que l'on prend l'une ou l'autre des préparations enzymatiques, la préparation enzymatique purifiée donnant systématiquement une réaction plus complète.

La valeur trouvée pour le système hypoxanthine/*d*-guanosine est en accord avec celle de ROUSH et BETZ (0,34/0,35). Par contre, pour le système cytosine/thymidine, nous trouvons une valeur sensiblement plus élevée (0,26 contre 0,18) et la réaction inverse nous fournit une valeur beaucoup trop faible : 0,03 alors qu'on devrait avoir : $1/0,26 \sim 4$. Cependant, la figure 1 montre clairement que la réaction ne progresse plus ; les chromatogrammes ne portent aucune autre substance radioactive que la base marquée et le *d*-riboside correspondant. On observe donc que dans de nombreux cas la réaction s'arrête avant d'avoir atteint l'équilibre vrai, peut-être parce que l'enzyme est déjà en grande partie devenu inactif. Cette hypothèse est corroborée par le fait que les rapports K varient sensiblement d'une préparation enzymatique à l'autre. Quoiqu'il en soit, les valeurs de K obtenues permettent de faire une estimation de l'aptitude des divers *d*-ribosides à servir comme donneurs, les conditions expérimentales étant identiques pour toute la série d'expériences (tableau II). On observe donc que les *d*-ribosides pyrimidiques sont de meilleurs donneurs que les *d*-ribosides puriques, comme l'avait déjà observé WILLIAM ⁽⁶⁾ et que la thymidine est meilleur donneur que la *d*-cytidine.

b) *Influence des temps de réaction.* Le tableau III montre que de façon générale pour des temps supérieurs à 5 h, la réaction ne progresse plus ou faiblement (thymine/*d*-adénosine, thymine/*d*-cytidine, cytosine/thymidine, uracile/*d*-adénosine) ou régresse surtout pour des temps de réaction supérieurs à 15 h (thymine/*d*-cytidine, thymine/*d*-adénosine). Dans certains cas (guanine/thymidine) une incubation longue donne naissance à une nouvelle substance radioactive. Il est intéressant de noter également que deux extraits enzymatiques différents (Lh-1b, Lh-3) utilisés avec les mêmes substrats (thymine/*d*-cytidine) donnent soit une réaction qui reste au même degré d'avancement (env. 78%, Lh-1b), soit une nette régression de 70 à 51% (Lh-3). Sans doute l'extrait brut Lh 3 contient-il un système enzymatique du type thymidine-hydrolase ou phosphorylase.

c) *Influence du rapport des concentrations donneur/base.* La détermination des « valeurs de K » indique que le donneur doit être en excès pour obtenir une bonne conversion de la base marquée en desoxyribonucléoside correspondant. Le tableau IV résume les résultats obtenus avec quelques variations de ce rapport. En réalité, il apparaît que le degré d'avancement de la réaction présente une limite que l'accroissement du rapport des concentrations donneur/base ne permet pas de dépasser, notamment pour le système thymine/*d*-adénosine. Pour

la réaction thymine/*d*-cytidine, on note également qu'un très grand excès de *d*-cytidine limite la réaction à une valeur beaucoup plus basse.

d) *Influence de la température.* La température d'incubation a été de 37°C en général. Cependant, nous avons noté que la réaction guanine/thymidine est complète avec un rendement de 100% en 45 minutes à 60°C et ne donne pas de substance radioactive autre que la *d*-guanosine. Il en est de même pour la réaction cytosine/thymidine qui donne, dans ces conditions, un rendement supérieur à 90%.

e) *Comportement des préparations enzymatiques.* Une préparation enzymatique Lh-1 b obtenue par la méthode de purification décrite, donne la conversion base → *d*-riboside sans autre produit radioactif. Par contre, une préparation brute Lh-3 donne avec les bases puriques 1 ou 2 substances radioactives en plus des *d*-ribosides (fig. 2). Une autre préparation (même souche, culture différente) Lh-4 fournit 3 fractions : Lh-4a : précipitation par le sulfate d'ammonium à 35% de la saturation ; Lh-4b : 2° précipitation par le sulfate d'ammonium à 70% de la saturation ; Lh-4c : surnageant. Le tableau V montre que la formation

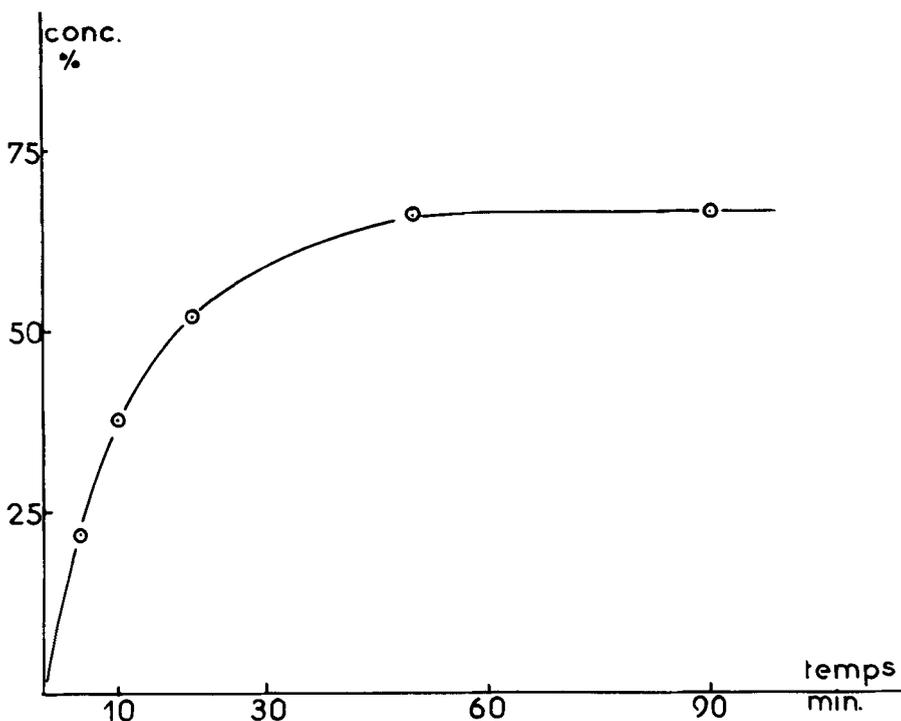


FIG. 1. — Cinétique cytosine/thymidine ; 0,20 μ M cytosine, 0,25 μ M thymidine, enz. Lh-4b. En ordonnée : concentration de *d*-cytidine exprimée en % de conversion.

de substance Y^\ddagger est une particularité de culture, l'activité: adénine* + thymidine $\rightarrow \text{Y}_A^*$ ne se trouvant dans aucune des fractions de la culture Lh-4.

DISCUSSION

Les résultats obtenus sont en accord avec ceux de ROUSH et BETZ ⁽⁸⁾ et de WILLIAM ⁽⁶⁾. Outre le point de vue pratique de la préparation de *d*-nucléosides, trois phénomènes supplémentaires ont été observés.

A. — *Formation de produits secondaires*, Dans certains tests, nous avons obtenu une ou deux substances secondaires radioactives dérivées de la base marquée introduite. Les rendements obtenus dans les conditions de réaction : rapport molaire donneur/base* 10, temps 16-32 h, température 37°C , enz. Lh-3, sont les suivants : $\text{Y}_G = 20\%$; $\text{Y}_H = 25\%$; $\text{Y}_A = 85\%$.

Ce phénomène a donné lieu à une série d'observations complémentaires :

1. Toutes les bases puriques utilisées sont susceptibles de donner des produits secondaires Y.

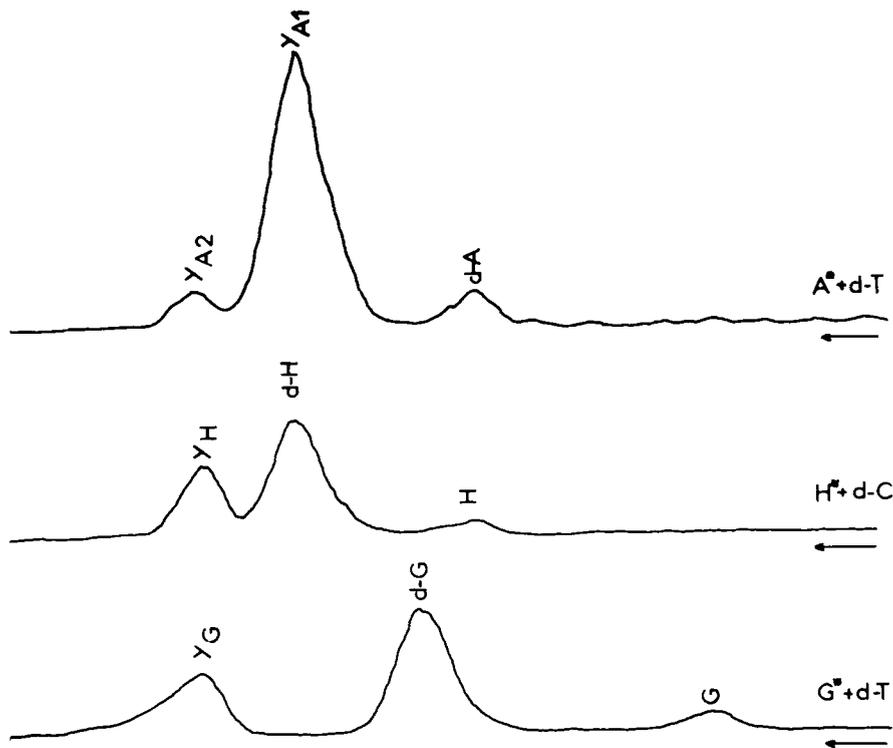
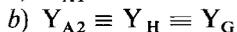
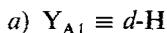


FIG. 2. — Formation de produits secondaires — Profils de radioactivité
Chromatographies sur papier Whatman I-III — solvant eau distillée

‡ Y_A : produit secondaire dérivé de l'adénine; Y_H : produit secondaire dérivé de l'hypoxanthine; Y_G : produit secondaire dérivé de la guanine

2. Les préparations enzymatiques brutes ne donnent pas toujours des produits Y, ainsi aucune des fractions de Lh-4 ne donne de produit Y.— Il en résulte que l'activité enzymatique génératrice de Y est une caractéristique qui ne se retrouve pas dans toutes les cultures.

3. Par chromatographie sur papier (fig. 2), on sépare pour l'adénine deux substances : Y_{A1} et Y_{A2} , pour la guanine une substance : Y_G , pour l'hypoxanthine une substance : Y_H . Les R_F (tableau VI) semblent indiquer que :



4. Les produits Y sont hydrolysés par l'acide formique 1N et chromatographiés sur couche mince de cellulose MN 300, solvant eau distillée. La *d*-adénosine est hydrolysée en adénine, la *d*-inosine en hypoxanthine et la *d*-guanosine en guanine, de plus, Y_{A1} , après hydrolyse donne une substance qui a le même R_F que l'hypoxanthine, Y_{A2} après hydrolyse a le même R_F que le produit d'hydrolyse de Y_H . Par contre, il semble que le produit d'hydrolyse de Y_G ait un R_F différent des produits de Y_H et Y_{A2} .

5. Le produit d'hydrolyse de Y_{A2} et Y_H n'est ni l'acide urique, ni la xanthine, ni l'acide allantoinique.

6. La réaction comportant tous les réactifs sauf le donneur est négative et ne donne pas de produit secondaire marqué.

— De 6, on peut inférer que les produits Y sont des *d*-ribosides ou substances dérivées.

— De 6, 3 et 4, on déduit que :



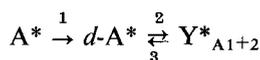
La culture Lh-3 contient donc en particulier une *d*-adénosine-désaminase très active. Ce résultat paraît en contradiction avec une remarque de SCHLENK⁽⁹⁾ qui indique que *L. helveticus* contient une désaminase catalysant la désamination de l'adénosine, mais pas de la *d*-adénosine. Peut-être doit-on admettre que *L. h.* contient toujours une adénine-riboside désaminase et épisodiquement (selon les conditions de culture ?) une autre enzyme qui serait une adénine-desoxyriboside désaminase. Par ailleurs, la nature des substances Y_{A2} (Y_H) et Y_G reste inconnue.

7. L'extrait enzymatique Lh-3 traité à 55°C pendant 10 minutes, donne les mêmes résultats que le témoin non traité¹.

8. La cinétique de la réaction adénine + thymidine montre une évolution des quantités relatives de *d*-adénosine et Y_{A1+2} selon les courbes indiquées dans la figure 3, (rapport molaire donneur/base : 1). a) dans une première période la quantité de Y_{A1+2} croît au détriment de *d*-A. b) dans la deuxième phase, l'équilibre se déplace dans l'autre sens.

¹ Test avec enzyme traitée à 55°C *d*-A = 61 %, $Y_{A1} + Y_{A2} = 38\%$; témoin non traité *d*-1 = 60%, $Y_{A1} + Y_{A2} = 39\%$.

— De 6 et 8a, on conclut que $d\text{-A}$ est précurseur de $Y_{\text{A1+2}}$ et 8b suggère que la deuxième partie de la réaction est réversible selon le schéma :



De plus, il est vraisemblable que $k_2 > k_1$ et $k_3 > k_2$. Les données fournies ici ne permettent pas de discuter des rapports de Y_{A1} et Y_{A2} entre eux et avec $d\text{-A}$. — Par ailleurs, 6 indique que la désamination ne se fait pas sur l'adénine, ce qui confirme les résultats correspondants cités par SCHLENK ⁽⁹⁾.

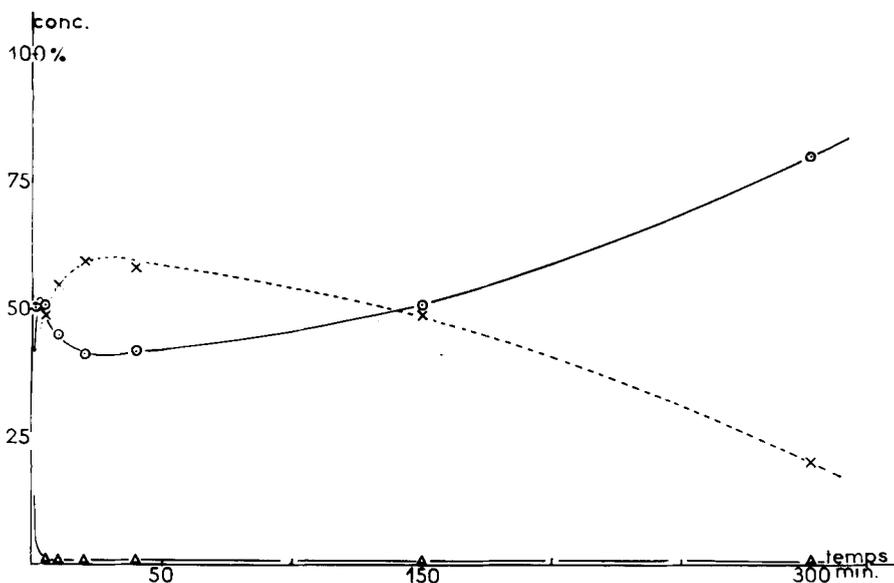


FIG. 3. — Cinétique de formation de $d\text{-A}$ et $Y_{\text{A1+2}}$
 Système adénine/thymidine — rapport molaire 1. $\times = Y_{\text{A1+2}}$, $\circ = d\text{-A}$, $\Delta = \text{Adénine}$

B — Inhibition par un excès de donneur. Les résultats montrent que le rapport des concentrations donneur/base doit être assez grand pour obtenir une conversion rapide et importante base* $\rightarrow d\text{-riboside}^*$. Cependant, une valeur croissante de ce rapport ne permet pas de déplacer la réaction au-delà d'une limite variable selon les substrats, le donneur à forte concentration se comportant même dans quelques cas comme un inhibiteur de la réaction (thymine/ $d\text{-cytidine}$, rapport molaire 100) (tableau IV). A ce phénomène général, s'ajoute une observation supplémentaire.

9. La proportion de $d\text{-A}$ par rapport à $Y_{\text{A1+2}}$ est dépendante ¹ du rapport

¹ Pour la réaction adénine- $d\text{-cytidine}$, rapport molaire : 10, on obtient $Y_{\text{A}} = 85\%$, $d\text{-A} = 10\%$, pour un rapport molaire de 1 on obtient $Y_{\text{A}} = 50\%$, $d\text{-A} = 40\%$ et il reste environ 10% d'adénine. Le même phénomène est observé pour le système adénine-thymidine pour lequel les rendements dans les dernières conditions citées sont : $Y_{\text{A}} = 30\%$, $d\text{-A} = 60\%$.

moltaire donneur/base. Pour une valeur élevée de ce rapport, la quantité relative de Y_A est plus élevée.

10. Un rapport molaire élevé ⁽⁹⁾ donne une cinétique plus rapide et la réaction ne progresse plus après une heure, tandis que la proportion de Y_A est beaucoup plus élevée.

— Ces observations ne peuvent être raisonnablement interprétées sans une étude plus rigoureuse de la cinétique et en particulier jusqu'à l'obtention d'un équilibre véritable.

C — *Rétrogradation pour des incubations prolongées.* Le phénomène peut être expliqué par l'intervention d'enzymes du type desoxyriboside nucléosidase. Selon MANSON et LAMPEN ⁽¹⁰⁾, *E. Coli* contient une pyrimidine desoxyriboside nucléosidase active sur thymidine, mais non sur *d*-cytidine, ce que nous observons également pour la préparation Lh-3. De plus, nous mettons en évidence que le même extrait contient également une enzyme active sur la *d*-uridine. Cette activité n'est pas gênante car la réaction est sensiblement plus lente que la conversion base → *d*-riboside.

En conclusion, les résultats obtenus montrent qu'il est possible d'obtenir avec de très bons rendements (tableau VII), la conversion des bases en desoxyribonucléosides correspondants en s'adressant en particulier aux bases pyrimidiques comme donneur, les difficultés de séparation qui avaient empêché WILLIAM d'utiliser ce groupe de donneur ayant été surmontées. Le rendement n'est pas sensiblement amélioré par des incubations longues qui, dans le cas des bases puriques, peuvent donner des produits secondaires radioactifs ou, pour les bases pyrimidiques, une rétrogradation de la réaction.

Le rapport des concentrations donneur/base ne permet pas à lui seul de déplacer la réaction au-delà d'une certaine limite variable selon les substrats, le donneur à forte concentration déplaçant parfois la réaction dans le sens opposé à celui qui est attendu.

La formation épisodique de substances secondaires est un phénomène qui dépasse l'objectif pratique qui est celui du présent travail. Il paraît néanmoins établi que certaines cultures de la souche employée contiennent une désaminase active sur les desoxyribonucléoside puriniques non observée jusqu'à présent par les auteurs chez cet organisme. De plus, une activité nucléosidasique agissant sur thymidine et *d*-uridine a été mise en évidence.

Nous remercions M. FROMAGEOT pour la discussion de ces résultats ainsi que M. le Professeur COURSAGET, Chef du Département de Biologie pour l'intérêt avec lequel il a suivi ce travail. Nos remerciements vont à M. MAIER-HUSER pour d'utiles conseils dans la technique chromatographique. Nous remercions également M. René BUISSON pour une très efficace collaboration technique et M^{lle} M. TSCHERNING pour la culture du *L. helveticus*.

TABLEAU Ia. R_F (*) des bases et *d*-nucléosides dans diverses conditions

Bases et <i>d</i> -nucléosides	Conditions 1	Conditions 2	Conditions 3	Conditions 4
adénine	0,09	0,38	0,38	0,27
<i>d</i> -adénosine	0,10	0,53	0,28	0,51
guanine	0,12	0,33	—	0,23
<i>d</i> -guanosine	—	0,59	—	0,57
cytosine	0,05	—	0,48	0,45
<i>d</i> -cytidine	0,04	0,78	0,62	0,72
thymine	0,45	0,70	0,72	0,75
thymidine	0,32	0,81	0,78	0,80
uracile	0,38	—	—	0,71
<i>d</i> -uridine	0,28	—	—	0,71
hypoxanthine	—	0,55	—	0,58
hypoxanthine <i>d</i> -riboside	—	0,65	—	—
xanthine	—	0,88	—	0,52

* Valeurs moyennes avec une fluctuation de 0,01-0,03 principalement à cause des variations de température.

Conditions 1 : papier Whatman I -III (voir texte)-solvant 1 — température $22^\circ\text{C} \pm 1$.

Conditions 2 : papier Whatman I-III — solvant 2 — température $22^\circ\text{C} \pm 1$.

Conditions 3 : papier Whatman I — solvant 3 — température $22^\circ\text{C} \pm 1$.

Conditions 4 : couche mince — cellulose MN 300 — température $22-24^\circ\text{C}$ — solvant : eau distillée.

TABLEAU II. Étude des conversions base* \rightarrow *d*-riboside*

Base μM	Donneur μM	Système enzymatique **	Temps de réaction	% de conversion	K***
Hypoxanthine 1 μM	<i>d</i> -adénosine 1 μM	Lh-1b	4 h	36	0,32
Hypoxanthine 1 μM	<i>d</i> -adénosine 1 μM	Lh-3	5 h	34	0,26
Hypoxanthine 1 μM	<i>d</i> -cytidine 1 μM	Lh-1b	4 h	52	1,17
Hypoxanthine 1 μM	<i>d</i> -cytidine 1 μM	Lh-3	5 h	44	0,62
Hypoxanthine 1 μM	<i>d</i> -guanosine 1 μM	Lh-1b	4 h	37	0,34
Hypoxanthine 1 μM	<i>d</i> -guanosine 1 μM	Lh-3	5 h	27	0,14
Hypoxanthine 1 μM	thymidine 1 μM	Lh-1b	4 h	61	2,45
Hypoxanthine 1 μM	thymidine 1 μM	Lh-3	5 h	51	1,08
Cytosine 1 μM	<i>d</i> -adénosine 1 μM	Lh-1b	4 h	13	0,02
Cytosine 1 μM	<i>d</i> -adénosine 1 μM	Lh-3	5 h	13	0,02
Cytosine 0,22 μM	thymidine 0,25 μM	Lh-1b	4 h	37	0,26
Cytosine 1 μM	thymidine 1 μM	Lh-3	5 h	21	0,07
Uracile 1,11 μM	<i>d</i> -adénosine 1 μM	Lh-1b	5 h	11	0,02
Uracile 1,11 μM	<i>d</i> -cytidine 1 μM	Lh-1b	5 h	26	0,14
Thymidine 0,84 μM	<i>d</i> -cytidine 1 μM	Lh-1b	5 h	17	0,03

* Marqué par ^{14}C ou ^3H .

** Voir texte.

*** Voir texte.

TABLEAU Ib. Exemples de séparations (R_F entre parenthèses)

Base ^a	Donneur	Produit ^a	Résidu	Séparation ^b
	Chromatographies sur couche mince. Conditions 4			
Adénine	Thymidine (0,25)	<i>d</i> -adénosine (0,47)	Thymine (0,75)	Très bonne
Guanine	<i>d</i> -adénosine (0,23)	<i>d</i> -guanosine (0,57)	Adénine (0,25)	Suffisante
Guanine	Thymidine (0,23)	<i>d</i> -guanosine (0,57)	Thymine (0,75)	Très bonne
Cytosine	<i>d</i> -adénosine (0,44)	<i>d</i> -cytidine (0,72)	Adénine (0,25)	Très bonne
Cytosine	Thymidine (0,44)	<i>d</i> -cytidine (0,72)	Thymine (0,75)	Très bonne
	Chromatographies. Conditions 1			
Thymine	<i>d</i> -adénosine (0,58)	Thymidine (0,46)	Adénine (0,13)	Très bonne ^c
Thymine	<i>d</i> -cytidine (0,58)	Thymidine (0,46)	Cytosine (0,08)	Très bonne ^c
Uracile	<i>d</i> -adénosine (0,38)	<i>d</i> -Uridine (0,28)	Adénine (0,09)	Très bonne ^d
Uracile	<i>d</i> -cytidine (0,38)	<i>d</i> -Uridine (0,28)	Cytosine (0,05)	Très bonne ^d
	Chromatographies. Conditions 2			
Hypoxanthine	<i>d</i> -cytidine (0,51)	Hypoxanthine d.r. (0,63)	Cytosine (—)	Suffisante
Hypoxanthine	<i>d</i> -adénosine (0,51)	Hypoxanthine d.r. (0,65)	Adénine (0,38)	Suffisante
Hypoxanthine	Thymidine (0,51)	Hypoxanthine d.r. (0,63)	Thymine (0,70)	Suffisante
	Chromatographies. Conditions 3			
Cytosine	<i>d</i> -adénosine (0,48)	<i>d</i> -cytidine (0,62)	Adénine (0,38)	Très bonne

^a Substance marquée au ¹⁴C ou ³H.

^b Les appréciations portées ici tiennent compte essentiellement de la séparation des produits radioactifs entre eux et des autres substances : [donneur et résidu.

^c Température 24°C environ.

^d Température 22°C environ.

TABLEAU III. Influence des temps de réaction sur le rendement de conversion

Base	Donneur	Temps	Rendement %	Conditions expérimentales
thymine	<i>d</i> -adénosine	5 h 30 15 h 00	23-29 30-33	rapport molaire donneur/base : 5 prép. enz. Lh-1b — température 37°C
thymine	<i>d</i> -adénosine	4 h 00 7 h 00 16 h 00 32 h 00	34 36 30 32	rapport molaire donneur/base : 10 enz. Lh-1b — température 37°C
thymine	<i>d</i> -cytidine	4 h 00 7 h 00 16 h 00 30 h 00	77 81 79 76	rapport molaire donneur/base : 10 enz. Lh-1b — température 37°C
thymine	<i>d</i> -cytidine	4 h 00 16 h 00 32 h 00	70 51 51	rapport molaire donneur/base : 10 enz. Lh-3 — température 37°C
cytosine	<i>d</i> -adénosine	4 h 00 16 h 00 32 h 00	23 25 17	rapport molaire donneur/base : 10 enz. Lh-3 — température 37°C
cytosine	thymidine	4 h 00 6 h 30 16 h 00 32 h 00	> 95 > 95 > 95 > 95	rapport molaire donneur/base : 10 enz. Lh-1b — température 37°C
uracile	<i>d</i> -adénosine	5 h 30 15 h 00	40 44,5	rapport molaire donneur/base : 10 enz. Lh-1b — température 37°C
uracile	<i>d</i> -cytidine	4 h 00 16 h 00 32 h 00	73 48 45	rapport molaire donneur/base : 10 enz. Lh-3 — température 37°C
adénine	thymidine	4 h 00 7 h 00 16 h 00 38 h 00	80 > 95 > 95 > 98	rapport molaire donneur/base : 10 enz. Lh-1b — température 37°C

TABLEAU IV. Influence du rapport donneur/base* sur le rendement de conversion

Base *	Donneur	Rapport molaire donneur/base *	Rendement	Conditions expérimentales
thymine	<i>d</i> -adénosine	2	22,3	temps de réaction 15 h enz. Lh-1b — température 37°C
		3	26,5	
		4	27,6	
		5	31,7	
		6	28,2	
		7	33,2	
		10	31,4	
	15	33,3		
thymine	<i>d</i> -cytidine	10	79,0	temps de réaction 16 h enz. Lh-1b — température 37°C
		100	25,0	
thymine	<i>d</i> -cytidine	5	51,1	temps de réaction 4 h enz. Lh-3 — entre parenthèses : enz. Lh-1b — température 37°C
		10	88,0	
		(10)	(76,0)	
		50	70	
		(100)	(30)	
uracile	<i>d</i> -adénosine	5	40,2	temps de réaction 5 h 30 enz. Lh-1b — température 37°C
		6	46,1	
		7,5	44,1	
		8,5	44,1	
adénine	thymidine	2,5	36,7	temps de réaction 2 h température 37°C
		5,0	61,1	
		7,5	> 95,0	
		10,0	> 95,0	

* Substance marquée

TABLEAU V. Système adénine* → thymidine *d*-adénosine* + thymine

Fraction enzymatique	Rapport molaire donneur/base *	<i>d</i> -A* %	Y _{A1} * %	Y _{A2} * %
Lh-3	10	10	75	5
Lh-3	1	60	30	10
Lh-1b	10	80	0	0
Lh-4a	1	50	0	0
Lh-4b	1	80	0	0
Lh-4c	1	1	0	0
Lh-4b**	1	79	0	0

* Substance marquée.

** Réaction en milieu sans phosphate (enzyme dialysée, eau distillée, non tamponnée). Dans tous les cas la réaction a cessé de se développer au bout de 4 heures.

TABLEAU VI. Chromatographie des substances Y

Substance	R_F^*	
Y_{A1}	0,65	0,78
Y_{A2}		
Y_H	0,66	0,74
Y_F		0,74
$d\text{-H}$		

* Chromatographie sur papier Whatman I/III — solvant eau distillée.

TABLEAU VII. Résultats obtenus dans les conditions optimales

Donneur	<i>d</i> -adénosine		thymidine		<i>d</i> -cytidine	
	temps	température	temps	température	temps	température
Base	rapport	rendement	rapport	rendement	rapport	rendement
Adénine	[shaded]					
Guanine	45'	60°C	45'	60°C		
	10	> 95%	10	100%		
Hypoxanthine	4 h	37°C	5 h	37°C	16 h	37°C
	5	80%	5	> 90%	10	70%
Thymine	7 h	37°C	[shaded]		7 h	37°C
	10	36%	[shaded]		10	81%
Cytosine	16 h	37°C	4 h	37°C	[shaded]	
	10	25%	10	> 95%	[shaded]	
Uracile	5 h 30	37°C			4 h	37°C
					10	73%

BIBLIOGRAPHIE

1. FRIEDKIN, M. et ROBERTS, D. — *J. Biol. Chem.*, **207** : 257 (1954).
2. REICHARD, P. — *Acta Chem. Scand.*, **9** : 1275. (1955)
3. SEKIGUCHI, T., et YOSHIKAWA, H. — *J. Biochem.*, **46**, 11, 1505 (1959).
4. DE VERDIER, C. H., et VAN POTTER, R. — *J. Nat. Cancer Inst.*, **24**, 13, (1960).
5. WINAND, M., et GOUVERNEUR, L. — Proc. Conf. in Methods of Preparing and Storing Marked Molecules. Brussel Nov. 1963. Euratom 1625^e, p. 1147.
6. WILLIAM, D.L. — *Can. J. of Chemistry*, **40**, 1742, (1962).
7. a) MC NUTT, W.S. — *Biochem. J.*, **50**, 384, (1952)
b) KALCKAR, H. M., MC NUTT, W.S., et HOFF JØRGENSEN, E. — *Biochem. J.*, **50**, 397, (1952).
8. ROUSH, A. H., et BETZ, R. F. — *J. Biol. Chem.*, **233**, 261, (1958).
9. SCHLENK, F., in *The Nucleic Acids*. E. CHARGAFF, E., et DAVIDSON, I. N. — Vol. II, p. 322. Academic Press. (1955.)
10. MANSON, L.A. LAMPEN, J.O. — *J. Biol. Chem.* **193** : 539 (1951).