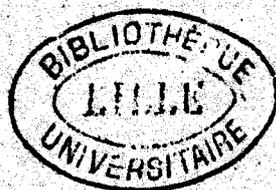


1952
4

Montreuil (Jean)

Etude sur les acides pentose-nucléiques.



50376
1250
1250

Montreuil (Jeans)

Etude sur les acides pentose-nucleiques.

50376

1952

4

PREMIERE THESE

ETUDE SUR LES ACIDES
PENTOSE_NUCLEIQUES



Travail du Service de Chimie Biologique
de la Faculté de Médecine et de Pharmacie
(Professeur P. BOUJANGER) et de
l'Institut de Recherches sur le Cancer,
(Directeur de l'Institut : Professeur J. DRIESSENS)
Lille.

TABLE DES MATIERES

Introduction	Pages I
--------------	------------

CHAPITRE I

Les constituants des acides nucléiques

1° - les bases azotées	4
2° - les glucides	6
3° - les nucléotides	8

CHAPITRE II

Les conceptions anciennes de la structure des acides nucléiques	10
---	----

CHAPITRE III

Les progrès des techniques analytiques et les conceptions modernes de la structure des acides nucléiques.

I. Techniques anciennes d'analyse des acides nucléiques

1° - dosage des bases puriques	18
2° - dosage des bases pyrimidiques	19
3° - résultats	21

II. Techniques d'analyse chromatographique des acides nucléiques.

A - Technique de la chromatographie sur papier

1° - préparation des chromatogrammes	23
2° - préparation des systèmes-solvants	25
3° - séparation chromatographique	25
4° - révélation des taches	26
5° - identification des taches	26
6° - dosage des substances séparées	26

	Pages
B - Séparation chromatographique et dosage des produits d'hydrolyse des acides nucléiques	
1° - séparation des bases	27
2° - séparation des nucléosides	41
3° - séparation des nucléotides	42
C - Conclusions	52

CHAPITRE IV

Travaux personnels

I - Techniques d'analyses des acides ribonucléiques

A - Chromatographie quantitative sur papier des ribonucléotides	59
1° - Préparation des nucléotides hydroxylés par par diazotation	60
2° - Choix des systèmes-solvants	60
3° - localisation des taches	65
4° - reproduction photographiques des chromatogrammes	66
5° - dosage des nucléotides isolés.	66

B - Purification des nucléotides à l'aide des résines à échange d'ions.	69
---	----

II - Composition des acides ribonucléiques de Levure et de Pancréas.

A - Acide ribonucléique de Levure	79
1° - identification des constituants	80
2° - composition	82
B - Acide ribonucléique de Pancréas	
1° - préparation de la ribonucléoprotéine	84
2° - préparation de l'acide nucléique	85
3° - composition de l'acide nucléique	86
4° - composition de la protéine de la nucléoprotéine	86
C - Conclusions	87

INTRODUCTION

Lorsque MIESCHER (1) isola des cellules de pus et des spermatozoïdes de Saumon une substance phosphorée pour laquelle il proposa le nom de "nucléine", il ne présumait certes pas de l'importance de sa découverte ni du nombre considérable de travaux qu'elle allait susciter.

En un demi-siècle, organiciens et physiciens devaient déterminer la structure et les propriétés des constituants de la "nucléine", pendant que cytologistes et biochimistes précisaient sa répartition et son rôle essentiel. Les résultats obtenus montrent d'une façon éclatante combien peut être féconde la collaboration d'hommes de science de formations différentes ; il nous donnent la preuve qu'il ne peut y avoir de cloisons entre les divers départements scientifiques, tant il est vrai que "la Science est une et c'est l'homme seulement qui, en raison de la faiblesse de son intelligence, y établit des catégories".

MIESCHER s'aperçut bientôt que la "nucléine" qu'il avait isolée était une substance complexe, constituée par l'association d'une protéine basique avec un composé organique acide, pour lequel ALTMANN (2) proposa en 1889 le terme d'acide nucléique.

KOSSEL (3) en 1891 reconnaît l'existence de deux acides nucléiques différents par leur origine et par certains de leurs constituants : l'un isolé de la levure (acide zymonucléique ou ribonucléique), l'autre du thymus (acide thymonucléique ou désoxyribonucléique). Longtemps on crut que les deux types d'acides nucléiques se localisaient distinctement, l'acide ribonucléique dans le règne végétal ; l'acide thymonucléique dans le règne animal. Mais à la suite des travaux remarquables de CASPERSSON (4) et de BRACHET (5) on reconnut que les acides ribo- et désoxyribonucléique étaient des constituants constants de la matière vivante et coexistaient, liés à des protéines basiques pour former des "nucléoprotéides", dans toute cellule végétale ou animale. Mais ils sont inégalement répartis dans la cellule elle-même : l'acide désoxyribonucléique se rencontre exclusivement dans le noyau ; l'acide ribonucléique se localise dans le nucléole et dans le cytoplasme, où il se trouve à la fois associé aux mitochondries et aux microsomes, et dissous dans le liquide cytoplasmique.

Le rôle biologique des acides nucléiques est considérable. Il n'est pour s'en convaincre que de rappeler qu'ils forment une partie importante des Virus et de Bactériophages, que l'acide désoxyribonucléique constitue les gènes des chromosomes, que l'acide ribonucléique intervient directement dans la synthèse des protéines et se trouve en quantité élevée dans les tissus qui sont le siège d'une multiplication cellulaire intense comme les tissus embryonnaires et néoplasiques.

Comme il est probable que les acides nucléiques diffèrent suivant leur origine et leur rôle, une telle diversité dans leur répartition ne pouvait s'accommoder seulement de deux types de structure fondamentaux et l'on s'est efforcé de déterminer à quelles modalités structurales un acide nucléique devait sa spécificité.

De nombreuses revues portant sur les acides nucléiques ont été publiées (6) et il n'entre pas dans notre intention de faire un historique complet d'un sujet aussi vaste. Après avoir rapidement présenté les constituants des acides nucléiques, nous résumerons les diverses conceptions de leur structure, auxquelles les techniques d'analyse anciennes, puis modernes, ont conduit.

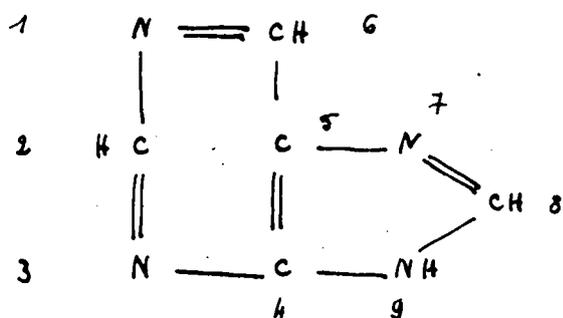
CHAPITRE I

LES CONSTITUANTS DES ACIDES NUCLEIQUES

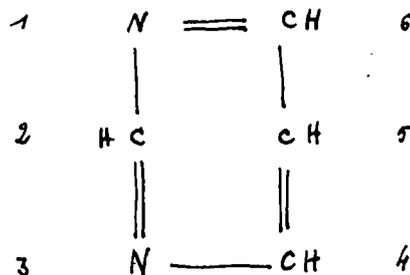
L'hydrolyse complète d'un acide nucléique conduit à trois sortes de composants : des bases azotées, un glucide, de l'acide orthophosphorique.

I° - Bases azotées

Les bases azotées se rattachent aux schémas de la purine (I) et de la pyrimidine (II) dans la molécule desquelles un certain nombre d'atomes d'hydrogène sont substitués par des radicaux aminés ou hydroxylés.

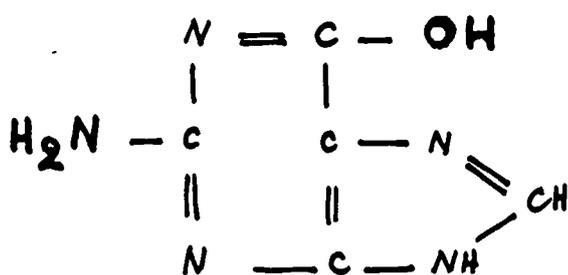


(I)



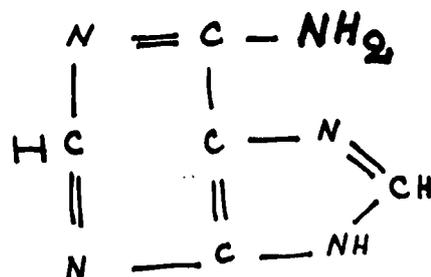
(II)

Les bases puriques obtenues par hydrolyse des acides ribo et désoxyribonucléiques sont la guanine (III) et l'adénine (IV).



(III)
guanine

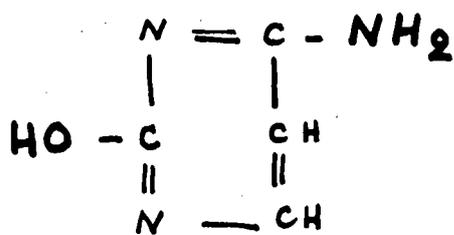
(2-amino, 6-hydroxypurine)



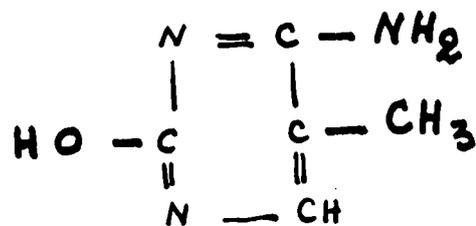
(IV)
adénine

(6-amino-purine)

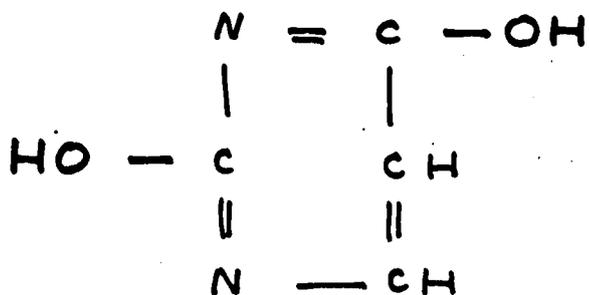
Les bases pyrimidiques sont la cytosine (V), commune aux deux types d'acides, l'uracile (VII), caractéristique des acides ribonucléiques, la thymine (VIII) et la méthyl-cytosine (VI) trouvées dans les acides désoxyribonucléiques.



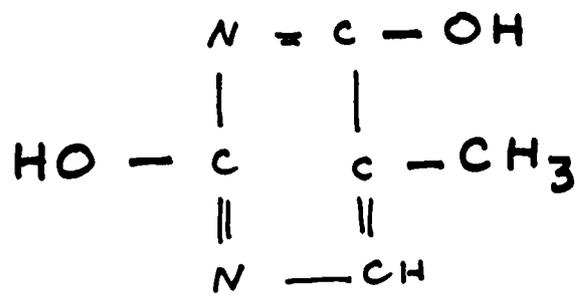
(V)
cytosine
(2-hydroxy, 6-amino pyrimidine)



(VI)
5-méthyl-cytosine



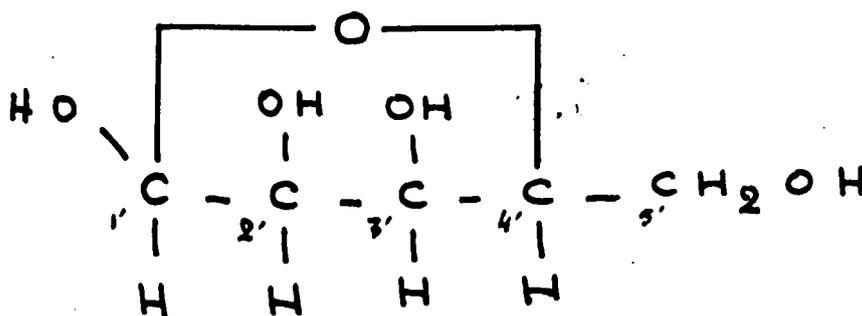
(VII)
Uracile
(2 : 6-dihydroxypyrimidine)



(VIII)
Thymine
(5-méthyl-uracile)

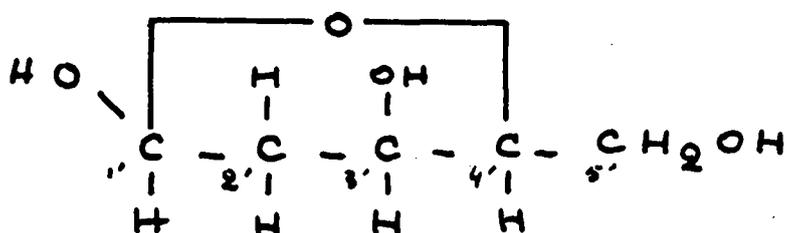
2° - Glucides

LEVENE, en 1909 (7), puis plus récemment BARKER (8) ont montré que ^{le}pentose constituant des acides ribonucléiques était le D (-) ribose (IX) et il semble actuellement bien



(IX)
D-ribose

prouvé d'autre part que le D-2'-désoxyribose (X) est le glucide constituant des acides désoxyribonucléiques



(X) D-2'-désoxyribose

Les deux types d'acides nucléiques diffèrent donc assez nettement l'un de l'autre (tableau I) et tirent leur nom de la nature du pentose qui les constitue. Néanmoins, le doute subsistant quant à la présence certaine de ribose ou de désoxyribose dans les molécules de tous les acides nucléiques; des auteurs ont prudemment proposé les dénominations plus vagues d'acides pentose- et désoxypentose-nucléiques (note I)

Tableau I

Composition des acides nucléiques

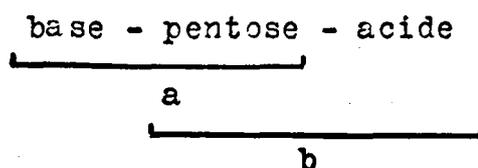
Acide ribonucléique	Acide désoxyribonucléique
Guanine	Guanine
Adénine	Adénine
Cytosine	Cytosine
Uracile	Thymine
D-ribose	D-2'-désoxyribose
Acide orthophosphorique	Acide orthophosphorique

Note I : "It is deplorable that such designations as desoxyribose - and ribose-nucleic acids continue to be used as if they were generic terms. As a matter of fact, only in few cases have the sugars been identified," CHARGAFF (9)

Nos recherches ont porté exclusivement sur la structure des acides ribonucléiques, sur la constitution desquels nous allons donner quelques précisions.

3° - Nucléotides

L'hydrolyse alcaline ou ribonucléasique (note 2) d'un acide ribonucléique fournit quatre nucléotides dans lesquels la base est fixée par une liaison glucosidique au pentose pour former un nucléoside, lui-même estérifié au niveau de l'un de ses groupements alcooliques par une des fonctions acides de l'acide orthophosphorique (schéma XI)



(XI)

Schéma d'un nucléotide

La déphosphorylation des nucléotides fournissant un nucléoside (fraction a) peut être réalisée par l'action de la pyridine à 120° C pendant 6 jours (12) ou d'une phosphatase d'origine prostatique. La structure de chacun des nucléosides a été confirmée par synthèse, les nucléosides puriques étant des N₉ ribosides et les nucléosides pyrimidiques des N₃ ribosides. La fraction b (ester-phosphorique du ribose)

Note 2 : La ribonucléase a été isolée en 1920 par JONES (10) du pancréas. C'est une protéine du type des albumines d'un poids moléculaire de 15.000 Kunitz (11) est parvenu à

l'obtenir cristallisée en 1940.

se prépare à partir des acides guanylique ou adénylique et l'on a démontré (I3) que la ribose était estérifié en C₃ (note 3). A chacune des bases correspond un nucléotide et les quatre nucléotides constituant un acide ribonucléique sont : l'acide guanylique, l'acide adénylique, l'acide cytidylique, et l'acide uridylique.

Un acide ribonucléique est constitué par l'enchaînement d'un certain nombre de molécules de chacun de ces nucléotides. C'est à propos du mode d'enchaînement - et non de la nature des composés identifiés - que ce heurtent les conceptions anciennes et modernes sur la structure des acides nucléiques, que nous allons à présent tenter d'exposer.

Note 3 : Certains nucléotides portent le radical phosphoryle sur leur carbone 5'. Tels sont les acides adénylique et inosinique du muscle. On ne les considérait pas comme des constituants des acides nucléiques. Cependant certains auteurs prétendant les avoir identifiés dans des hydrolysats enzymatiques d'acides nucléiques (cf. page et réf. I4) D'autre part une autre isomérisation a été mise en évidence avec certitude (cf. page et réf. I5) : il s'agit d'une isomérisation α - β de la liaison glucosidique ou d'une isomérisation 2' - 3' de la position du radical phosphoryle.

CHAPITRE II

CONCEPTIONS ANCIENNES DE LA STRUCTURE DES ACIDES NUCLEIQUES

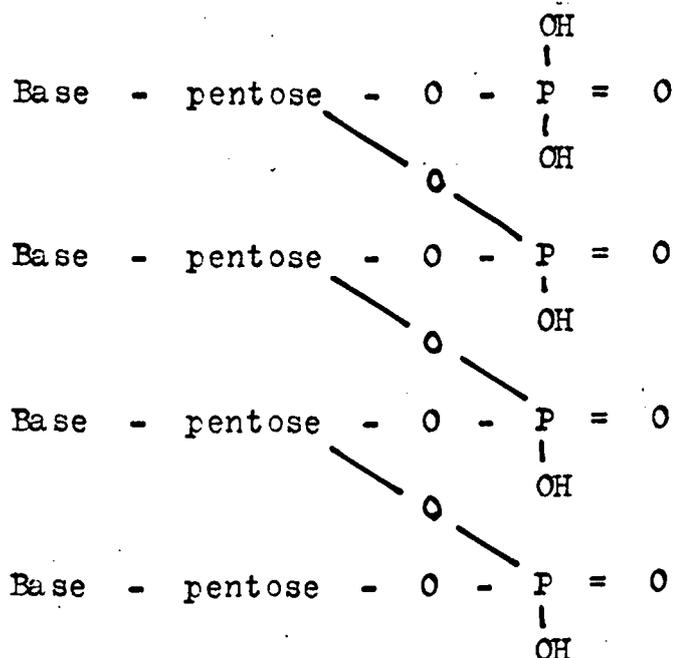
Les conceptions anciennes de la structure des acides nucléiques reposent sur deux hypothèses fondamentales :

- 1°) la molécule d'acide nucléique est formée par l'association de 4 nucléotides dans des proportions équimoléculaires;
- 2°) ces 4 nucléotides s'unissent les uns aux autres par des liaisons esters et forment un tétranucléotide ("statistical tétranucléotide") qui constitue l'unité structurale des acides nucléiques.

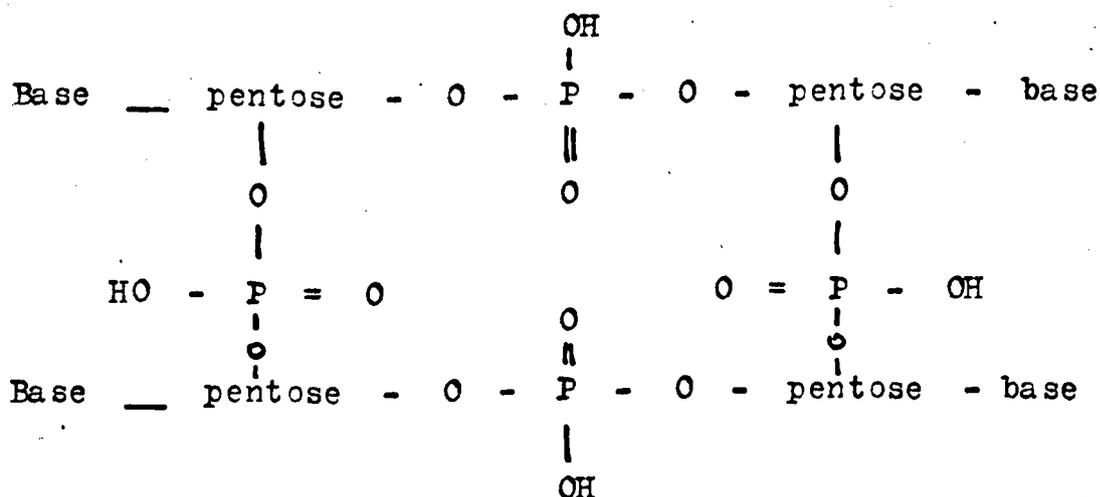
Ces hypothèses s'appuyaient sur les faits expérimentaux suivants :

- 1°) l'action d'un acide dilué sur un acide nucléique porte sélectivement sur les nucléotides puriques et libère leurs constituants : les bases, le ribose et l'acide phosphorique, dont le dosage indique la présence de 50% de nucléotides puriques.
- 2°) la détermination du poids moléculaire des acides nucléiques donne une valeur d'environ 1.300, compatible avec la théorie tétranucléotidique.
- 3°) l'électrotitration révèle l'existence de 4 fonctions acides "primaires" et d'une fonction acide "secondaire" pour

4 atomes de phosphore. Sur la base de ces observations, LEVENE et SIMMS (16) ont proposé le schéma de structure suivant :



En 1932, TAKAHASHI (17) suggère l'existence d'un tétra-nucléotide cyclique après avoir montré que le mélange d'une phosphodi-estérase ^{et} /d'une phosphomonoestérase déphosphoryle complètement un acide nucléique mais que la phosphomonoestérase seule est inactive :



Quelles que soient les modifications apportées dans sa structure, le tétranucléotide demeurait jusqu'à ces dernières années l'entité architecturale avec laquelle se construisait l'édifice nucléaire. Mais la théorie polytétranucléotidique subissait cependant des critiques de plus en plus serrées. BREDERECK (20) avait bien isolé par la dialyse d'un hydrolysat alcalin d'acide ribonucléique une substance d'un poids moléculaire de 1177 qu'il pensait être l'unité tétranucléotidique fondamentale, mais GULLAND (21) n'avait pu répéter ces expériences et avait montré qu'il s'agissait en réalité d'un mélange de composés mal définis. ASTBURY (22) avait bien affirmé que l'étude de la structure moléculaire de l'acide thymonucléique par les rayons X plaidait en faveur d'une séquence régulière de tétranucléotides. Mais une telle structure était incompatible avec maints faits expérimentaux et biologiques. En particulier la détermination des acidités libres et des poids moléculaires variait considérablement avec l'origine de l'acide nucléaire.

D'autre part, les travaux de CASPERSSON et de BRACHET ont montré qu'il existait une relation étroite entre les acides nucléiques et la synthèse des protéines, ceux-là jouant le rôle d'inducteurs, voire de matrices; et il est probable que la spécificité de la protéine est liée à celle de l'acide nucléaire et qu'il correspond à chaque type de protéines un acide nucléaire particulier. Pour cette raison, il faut envisager l'existence d'un nombre considérable de constitutions différentes variant avec les individus, avec

les organes dont proviennent les acides nucléiques et, dans une cellule, avec les fractions auxquelles ils sont associés. Or, les possibilités de combinaisons entre les 4 nucléotides sont restreintes et à peine augmentées par le degré de polymérisation du tétranucléotide, le nombre de nucléotides constituant les molécules d'acides nucléiques, mesuré par des méthodes de dialyse et de diffusion, étant au maximum de 126 (Virus de la Mosaïque du Tabac).

En outre, l'étude de l'action de la ribonucléase sur les acides nucléiques a révélé des anomalies structurales. LORING (23) et SCHMIDT (24) ont montré, en effet, que l'action de l'enzyme est ⁱⁿcomplète et ne libère que 75% de monocléotides, laissant inattaquée une fraction plus résistante. Ce fait expérimental est incompatible avec la répétition uniforme, tout au long de la chaîne polynucléotidique, du même type de liaison.

Mais il apparaît surtout que la conception ancienne de la structure des acides nucléiques est entachée d'une erreur à la base. Elle s'appuie en effet beaucoup plus sur une vue de l'esprit que sur des résultats expérimentaux précis lorsqu'elle conclut à l'association de 4 nucléotides dans des proportions isomoléculaires. En effet, il n'a pas été effectué de dosage de chacun des constituants du tétranucléotide autre que celui des bases puriques en totalité ou du phosphore "purique". Ce dosage aurait cependant permis d'établir avec certitude la notion d'équimolarité. De plus, il avait été postulé que les acides désoxyribo- et ribonucléiques

avaient des structures identiques et que les conclusions apportées par l'expérimentation sur l'un des acides étaient valables pour l'autre.

Nous avons pensé qu'il serait intéressant de citer à ce propos DAVIDSON (25) qui expose de la façon suivante les considérations sur lesquelles les auteurs appuyèrent leur hypothèse : "Since preliminary examination of the nucleic acids had revealed that the units out of which they were constructed were four bases, a sugar and phosphoric acid, and since cold alkaline hydrolysis of yeast ribonucleic acid yielded four different nucleotides, it seemed therefore not unreasonable to conclude that the nucleic acid molecule was a tetranucleotide containing equimolecular amounts of the four different bases".

Les progrès de la technique analytique, dus en particulier à l'application de la chromatographie de partage sur papier, ont bouleversé les anciennes théories et infirmé en premier lieu l'existence de l'unité tétranucléotidique.

CHAPITRE III

LES PROGRES DES TECHNIQUES ANALYTIQUES
ET LES CONCEPTIONS MODERNES
DE LA STRUCTURE DES ACIDES
RIBONUCLEIQUES

Le progrès de la Science est discontinu et la Biologie n'échappe pas à cet aphorisme. Chaque étape de son histoire est marquée par une "grande découverte" qui enrichit l'Homme de connaissances nouvelles. Des esprits supérieurs ont marqué ces étapes, le génie des uns créant des théories hardies et féconde, l'esprit inventif des autres apportant l'aide précieuse d'une méthode expérimentale nouvelle. CONSDEN, GORDON, MARTIN et SYNGE figurent parmi ceux-ci. Leur technique de chromatographie sur papier ouvre une ère nouvelle en augmentant considérablement nos moyens d'investigation. Sa valeur est largement démontrée par l'abondance extraordinaire de travaux qu'elle a suscités et de résultats qu'elle a permis d'acquérir en un temps très court. A l'intérêt qu'elle présente de nécessiter de très faibles quantités de substances, elle ajoute celui d'être une technique précise et simple. Ces qualités apparaîtront à la comparaison des méthodes anciennes et modernes d'analyse des acides nucléiques que nous nous proposons d'exposer brièvement.

I - TECHNIQUES ANCIENNES D'ANALYSE DES ACIDES NUCLEIQUES

L'étude de la composition et de la structure des acides nucléiques se heurte à la difficulté d'obtenir et de séparer quantitativement des produits d'hydrolyse de constitutions et de propriétés extrêmement voisines. Si la labilité des nucléotides puriques a permis rapidement un dosage relativement aisé des bases puriques, au contraire la résistance des nucléotides pyrimidiques aux agents chimiques d'hydrolyse a gêné considérablement la détermination exacte de la composition des acides nucléiques. Nous n'avons pas le dessein d'effectuer une revue complète des nombreuses techniques qui ont été proposées et nous exposerons brièvement le principe des modes opératoires les plus couramment utilisés pour étudier la répartition des bases puriques et pyrimidiques dans les molécules d'acides ribonuculéiques.

1° - Dosage des bases purique. - L'hydrolyse d'un acide nucléique par un acide minéral dilué (HCl ou $\text{SO}_2 \text{H}_2 \text{N}^{\text{I}}$) pendant 1 h. à 100°C libère quantitativement les bases puriques : la guanine et l'adénine, - pour le dosage desquelles de nombreuses techniques ont été proposées (cf. la revue générale de JORPES (26)). On réalise d'abord une précipitation argentique (SALKOWSKI (27) ; SCHMIDT et LEVENE (28) ou

cuprique (KRUGER et SCHMID (29), GRAFF et MACULLA (30), que l'on fait suivre d'une détermination de l'azote du mélange de sels puriques ainsi obtenu.

LEVENE (31) dose individuellement les purines après une hydrolyse acide d'un acide nucléique en précipitant la guanine par l'ammoniaque puis l'adénine par l'acide picrique.

SCHMIDT (32) précipite les purines sous la forme d'un complexe argentique, dose l'azote aminé de la guanine et de l'adénine par la méthode de diazotation de VAN SLYKE, puis l'azote aminé de la guanine seule par désamination ~~et~~ à l'aide d'une guanase extraite du foie de Lapin suivie d'une détermination de l'ammoniac formé.

KALCKAR (33) combine l'action d'enzymes spécifiques (guanase, xanthine-déhydrase, uricase) et la spectrophotométrie en lumière ultraviolette : les variations de l'absorption des dérivés puriques permettent leur estimation.

2° - Dosage des bases pyrimidiques. - Le dosage des bases pyrimidiques peut être réalisé sur un hydrolysât partiel d'acide nucléique, après l'élimination des bases puriques, en déterminant l'azote résiduel. Le dosage individuel des bases pyrimidiques est ensuite effectué par l'une des méthodes suivantes.

La cytosine (2-hydroxy-6-amino-pyrimidine) peut être dosée selon la technique de VAN SLYKE en mettant à profit sa désamination par l'acide nitreux (RUSSO (34)).

Une méthode microbiologique a été mise au point par MERRIFIELD et DUNN (35) : les deux bases pyrimidiques, facteurs de croissance pour Lactobacillus brevis, sont préalablement dosées ; puis on détermine l'uracile seul, facteur de croissance pour Lactobacillus helveticus.

Nous citerons enfin une méthode colorimétrique de dosage de l'uracile et de la cytosine proposée par SOODAK, PIRCIO et CERECEDO (36) : les deux bases, après bromuration et traitement par une solution de cyanure de sodium et d'urée réduisent le réactif à l'arsénotungstate de lithium de NEWTON ; le dosage séparé de l'uracile est ensuite effectué à l'aide du même réactif, après action de la résine Amberlite I.R. 100.H, qui retient la cytosine.

KERR, SERAIDARIA et WARGON (37) ont mis au point une technique d'analyse complète des acides nucléiques après une hydrolyse partielle par l'acide sulfurique dilué : les bases puriques sont précipitées en milieu acide sélectivement par action de l'oxyde d'argent sur l'hydrolysate ; puis les nucléotides pyrimidiques sont isolés de la solution, préalablement alcalinisée par la soude, par l'addition d'oxyde d'argent et d'alcool isopropylique. Après traitement des précipités argentiques obtenus par l'acide chlorhydrique dilué la spectrophotométrie en lumière ultra-violette permet le dosage de la guanine et de l'adénine d'une part, de l'acide cytidylique et de l'acide uridylique d'autre part.

3° - Résultats. - Dès l'application des méthodes de dosage individuel des bases, il apparut que des différences notables existaient entre les molarités des divers constituants des acides nucléiques. Déjà, en 1919, FEULGEN (38) avait remarqué dans l'acide ribonucléique du pancréas un taux de guanine supérieur à celui qu'aurait pu fournir un tétranucléotide. HAMMARSTEN (39) trouva que le rapport guanine-adénine dans le même acide nucléique s'élevait à 3 et en conclut que l'unité structurale était un hexanucléotide. Divers travaux de JORPES (40), malgré la discordance des résultats, confirmaient la présence dans l'acide ribonucléique du pancréas d'un taux de guanine très élevé, incompatible avec un schéma tétranucléotidique. Ces auteurs expliquaient cette augmentation par l'"accrochage" sur le tétranucléotide d'une ou de plusieurs molécules d'acide guanylique ; l'acide nucléique restant constitué par la polymérisation du polynucléotide obtenu. Mais KERR et coll. (41), appliquant leur technique d'analyse complète d'un acide ribonucléique, attribuaient à l'acide ribonucléique du pancréas la constitution moléculaire suivante : guanine : 3,5 - adénine : 1,29 - cytosine : 2,59 - uracile : 1.

MERRIFIELD et coll. (42), à l'aide de leur méthode de dosage microbiologique des bases pyrimidiques, montraient que les taux de l'uracile et de la cytosine dans un acide ribonucléique de Levure étaient respectivement 0,64 et 0,90. Dans l'intervalle les premiers résultats apportés par la chromatographie sur papier achevaient d'infirmier la théorie de la

répartition équimoléculaire des nucléotides dans les molécules d'acides nucléiques.

Nous nous proposons dans le chapitre suivant de rappeler sommairement les détails de la technique de la chromatographie de partage sur papier, puis d'exposer les modalités de son application à l'étude des constituants des acides nucléiques.

II - TECHNIQUES D'ANALYSE CHROMATOGRAPHIQUE DES ACIDES NUCLEIQUES

A - Technique de la chromatographie sur papier (43)

L'appareillage est extrêmement simple. Il comprend, d'une part, un tube à solvant en verre ou en matière plastique, fendu longitudinalement, destiné à recevoir les feuilles de papier-filtre et à contenir la "phase mobile" du système-solvant ; d'autre part, une chambre étanche dont l'atmosphère saturée par les vapeurs du système-solvant empêche l'évaporation de la phase mobile (figure I).

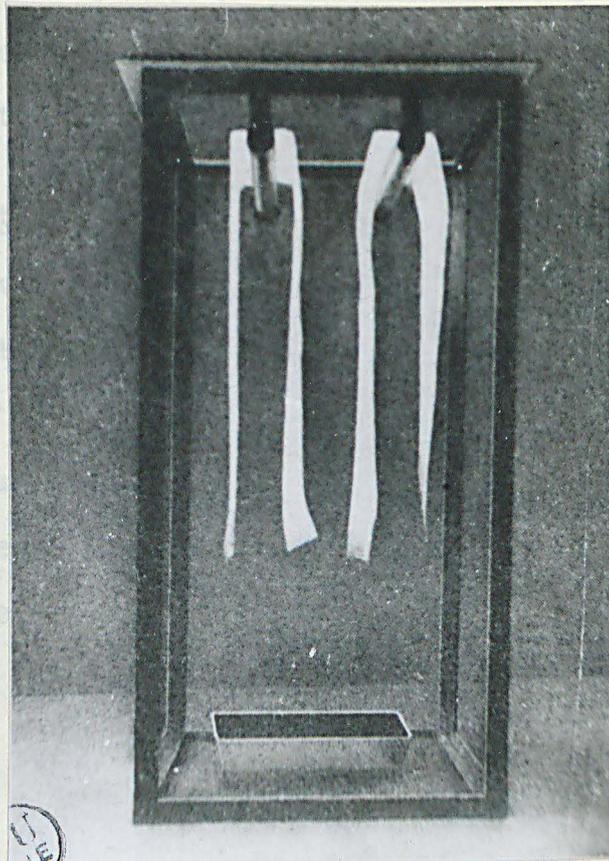
La séparation chromatographique comprend plusieurs opérations :

I° - Préparation des chromatogrammes. -

a) Chromatogrammes unidimensionnels (fig. I2) : la solution contenant les substances à séparer est déposée dans de petits cercles espacés de 3 à 4 cm. sur une "ligne de départ" tracée à 10 cm. environ du bord supérieur de la feuille de papier qui sera plongée dans le liquide constituant la phase mobile. Les quantités de substances soumises à la séparation chromatographique sont de l'ordre de 2 à 10 μ g.

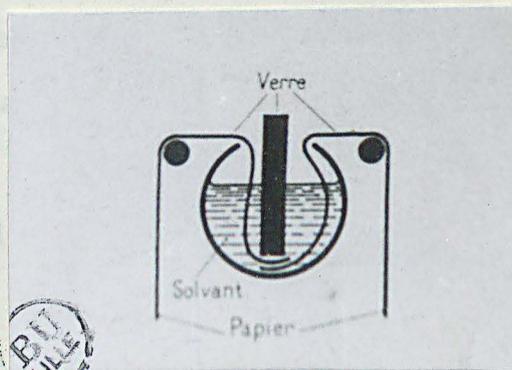
b) Chromatogrammes bidimensionnels (fig. I3) : à l'intersection de deux lignes tracées dans le sens de la largeur et de la longueur à 10 cm parallèlement au bord de la feuille de papier, on dépose la solution à analyser. Un premier système-solvant sépare les composés dans une direction, et un second système-solvant

Figure 1



Cuve à chromatographie

Figure 2



Section transversale d'un tube à chromatographie

fait migrer les substances soumises à la séparation préalable dans le premier système-solvant. Ce mode opératoire permet souvent de mettre en évidence plusieurs composés qui constituaient une tache unique dans l'un des solvants utilisés.

2° - Préparation des systèmes-solvants : la majorité des systèmes-solvants sont constitués en incorporant de l'eau, en général à saturation, à des liquides organiques tels que des phénols, des alcools, des cétones. La composition d'un système-solvant est souvent déterminée empiriquement en tenant compte, néanmoins, de certains principes :

a) - une substance migre d'autant plus facilement qu'elle est plus soluble dans l'une des phases du solvant.

b) - si la substance est ionisable, le pH du solvant joue un rôle considérable dans son comportement chromatographique.

3° - Séparation chromatographique : - Les feuilles de papier sont maintenues dans le tube à solvant suivant le schéma de la figure 2. La phase saturée d'eau (phase mobile) est déposée dans le tube à solvant. L'ensemble est enfermé dans la cuve étanche, au fond de laquelle on a disposé, dans un récipient, la phase aqueuse (phase saturante). Le solvant progresse par capillarité tout au long de la feuille de papier-filtre, formant un "front" que l'on repère aisément. Lorsque ce "front" a progressé d'environ 40cm., pendant un temps variant de 6 heures à 100 heures suivant le système-solvant utilisé, le papier est retiré de la cuve et séché à l'étuve à 80°C.

4° - Révélation des taches. - La localisation des substances séparées est réalisée sur papier à l'aide de réactifs appropriés : solution de ninhydrine pour les acides aminés, d'oxalate d'aniline pour les glucides, de molybdate d'ammonium en milieu acide pour les nucléotides (fig. 12). Des autoradiogrammes peuvent être réalisés si les substances séparées sont radioactives (fig. 19).

5° - Identification des taches. - Dans certains cas, les substances sont identifiées par leur R_F , dont la valeur est fixée par le rapport du déplacement de la tache au déplacement du "front" de la phase mobile. Dans un système-solvant déterminé, le R_F d'une substance est caractéristique (tableau I, page 33). Cependant, le R_F d'un composé est sujet à des variations et il est préférable de l'identifier par comparaison avec des produits purs placés sur le même chromatogramme.

6° - Dosage des substances séparées. - La séparation chromatographique est en général quantitative et la mise au point de techniques particulières permet le dosage des substances soumises à l'analyse chromatographique.

B - Séparation chromatographique et dosage des produits d'hydrolyse des acides nucléiques

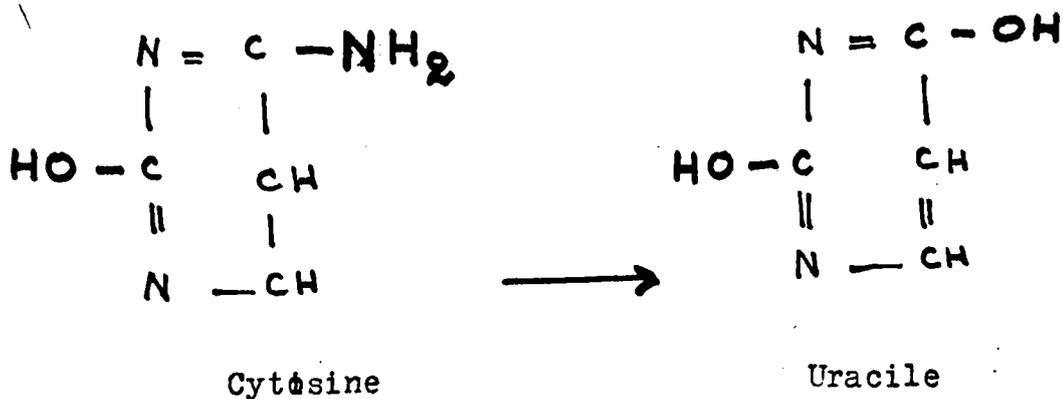
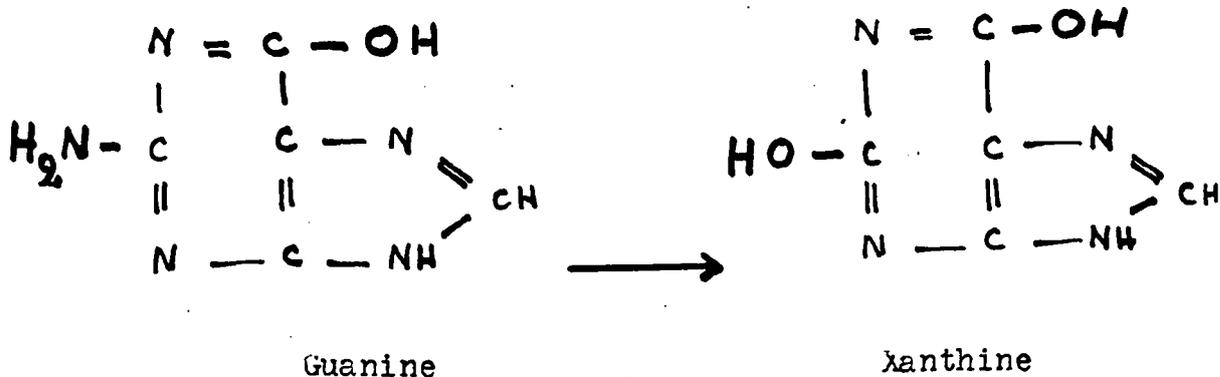
Les difficultés que l'on rencontre dans l'application de la chromatographie sur papier à l'étude des constituants des acides nucléiques proviennent, non pas de la séparation chromatographique elle-même qui n'intéresse qu'un nombre restreint de substances bien définies, mais de la mise au point de procédés d'hydrolyse capable de libérer en totalité sans les altérer, les constituants. C'est donc autant une étude des moyens d'hydrolyse utilisés qu'une étude de l'analyse chromatographique des hydrolysats obtenus que nous allons présenter.

I° - Séparation chromatographique des bases

Il semble que ce soit par une tendance naturelle de l'esprit d'aller du simple au complexe que les auteurs ont d'abord tenté de préciser la structure des acides nucléiques par l'étude de la répartition des bases au sein de leur molécule.

Les différences qui existent dans la structure des bases laissaient présager une rapide mise au point de leur séparation chromatographique. Leurs spectres d'absorption en lumière ultra-violette étaient bien définis et le dosage spectro-

photométrique s'appliquait parfaitement à la détermination de quantités très faibles de substances. Mais les auteurs avaient compté sans la résistance particulière des nucléotides pyrimidiques aux agents chimiques d'hydrolyse dont certains risquaient de désaminer la guanine et la cytosine :



SI la désamination de la guanine n'était pas susceptible de fausser la détermination (il suffirait en effet de doser la xanthine formée, que l'on sépare aisément par chromatographie d'avec les autres bases, et de ramener son taux à celui

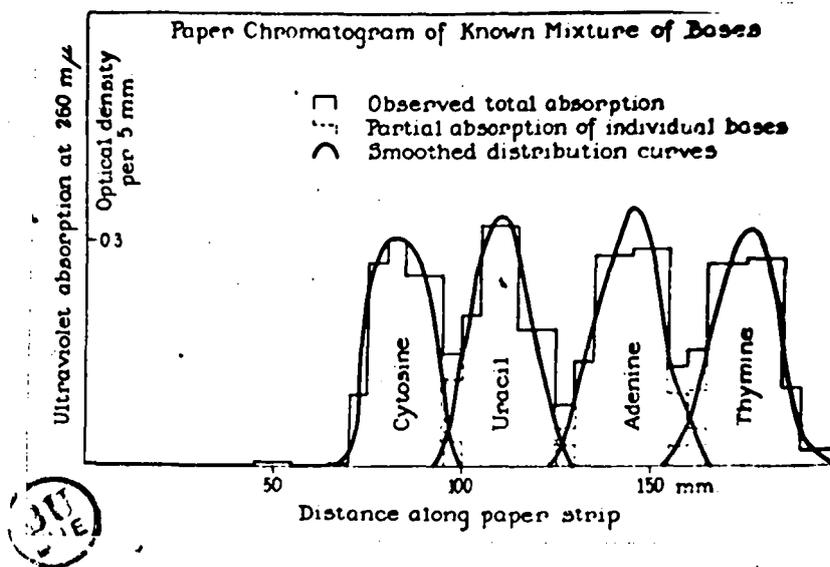
de la guanine), au contraire la désamination de la cytosine en uracile ne permettait pas le dosage précis des bases pyrimidiques.

HOTCHKISS (44) a réalisé la séparation quantitative des bases puriques et pyrimidiques après avoir effectué l'hydrolyse totale des acides ribo- et désoxyribonucleiques par l'acide chlorhydrique concentré à l'autoclave à 120°C pendant 2 heures : après évaporation à siccité sous pression réduite de l'hydrolysate, les bases obtenues sont séparées dans le système-solvant : n-butanol saturé d'eau. Les taches sont localisées en construisant la courbe des densités optiques mesurées en lumière ultra-violette à 2600 Å des éluats de bandes découpées tous les 10 mm le long du chromatogramme. On obtient ainsi une série de sommets dont chacun correspond à une base purique ou pyrimidique (fig.3 et 4). L'identification et le dosage de chacune des bases sont effectués par spectrophotométrie en lumière ultra-violette.

VISCHER et CHARGAFF (45) ont étudié systématiquement le comportement chromatographique de l'ensemble des bases puriques et pyrimidiques : guanine, xanthine, adénine, hypoxanthine, cytosine, uracile, thymine. (figure 5 (note 4)). Après séchage des chromatogrammes, les taches sont localisées de la manière suivante : les chromatogrammes sont imprégnés d'une solution 0,25 M de nitrate mercurique dans l'acide nitrique 0,5 N. Les papiers soigneusement lavés, d'abord dans

Note 4 : on trouvera dans le tableau I page 33 la composition des systèmes-solvants permettant la séparation chromatographique des différentes bases

Figure 3

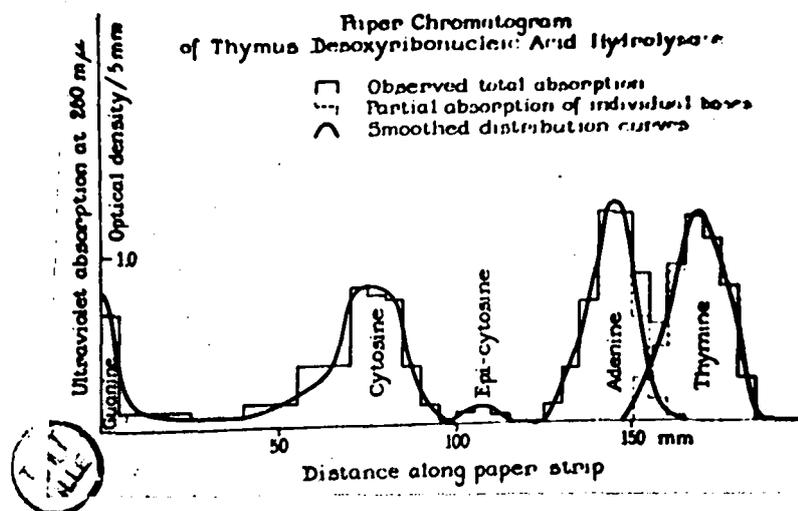


Révélation d'après HITCHKISS (48) de l'emplacement des bases après séparation chromatographique dans le solvant butanol-eau.

En abscisses : distances auxquelles ont été effectuées les mesures.

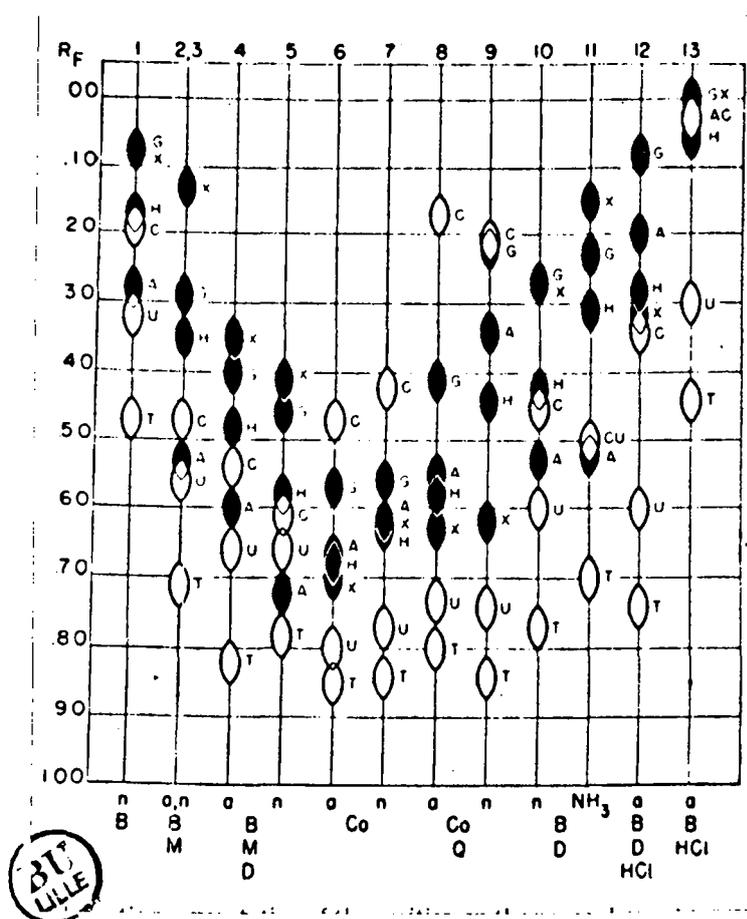
En ordonnées : densités optiques (absorption mesurée à 2600 Å)

Figure 4



Application de la technique à un hydrolysate d'acide désoxyribonucléique

Figure 5

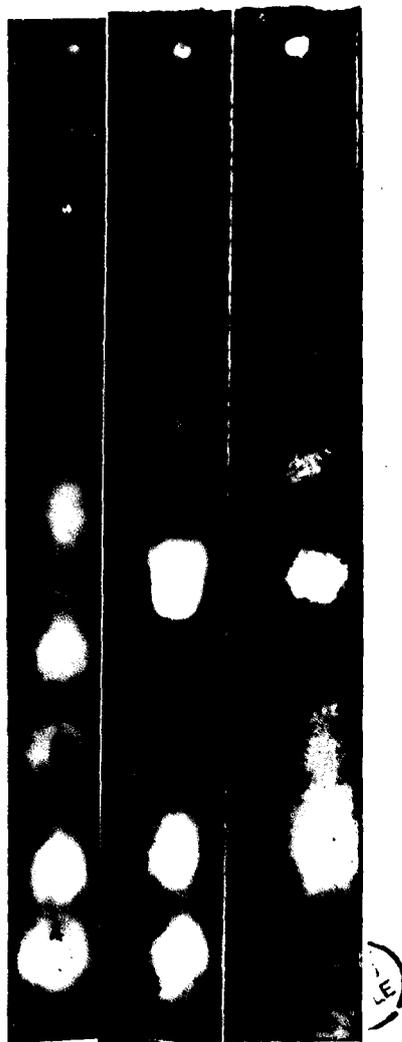


Représentation schématique de la séparation des bases puriques et pyrimidiques dans différents systèmes-solvants étudiés par VISCHER et CHARGAFF (49).

G : guanine, X : xanthine, A : adénine, H : hypoxanthine, C : cytosine, U : uracile, T : thymine.

Les chiffres horizontaux correspondent aux systèmes-solvants indiqués dans le tableau I. Les chiffres verticaux précisent les R_f des différentes bases. Les abréviations horizontales inférieures signifient : n : neutre, a : acide, B : butanol, M : morpholine, D : diéthylèneglycol, Co : collidine.

Figure 6



Séparations chromatographiques de bases dans le système-solvant butanol-acide acétique (54). Révélation : acétate mercurique.

Mélange des 7 bases (1); hydrolysats par HCl conc. à 120°C pendant 2 heures d'un acide ribonucléique de Levure (2) et d'un acide désoxyribonucléique de Thymus (3).

G : guanine, X : xanthine, C : cytosine, U : uracile,

T : thymine.

		Méthyl- Cytosine
1	n-butanol	7
2	n-butanol	5
3		
4	n-butanol	8
5		
6	Collidine-4	5
7	-id'	
8	Collidine-4	0
9	-id'	
10	n-butanol	7
11	-id'	0
12	n-butanol	4
13	n-butanol	4
14	Isopropano	7
15	n-butanol	2
16	n-butanol	5
17	n-butanol	6
18	n-butanol	
19	Alcool amy	0
20	Alcool amy	
21	Alcool amy	
22	Butanol-ac	

0.55



a : solution ie

Tableau I

R_F des bases puriques et pyrimidiques dans

différents systèmes-solvants.

Systèmes-solvants		Références	Adénine	Guanine	Hypo- Xanthine	Xanthine	Uracile	Cytosine	Thymine	Méthyl- Cytosine	
1	n-butanol saturé d'eau	n	50	0.28	0.74	0.17	0.071	0.32	0.19	0.47	
2	n-butanol, morpholine, eau (3:1:4)	(a	"	0.53	0.29	0.35	0.13	0.56	0.47	0.71	
3	-id°-) n	"	0.53	0.29	0.35	0.14	0.55	0.46	0.75	
4	n-butanol, morpholine, diéthylène-glycol, eau	(a	"	0.60	0.40	0.48	0.35	0.66	0.54	0.82	
5	-id°- (4.5 : 1.5 : 1 : 2)) n	"	0.72	0.46	0.58	0.41	0.66	0.61	0.78	
6	Collidine- saturée d'eau	(a	"	0.67	0.57	0.68	0.70	0.80	0.47	0.85	
7	-id°-) n	"	0.62	0.56	0.63	0.63	0.77	0.42	0.84	
8	Collidine-quinoléine-eau (1:2:1.5)	(a	"	0.55	0.41	0.58	0.63	0.73	0.17	0.80	
9	-id°-) n	"	0.34	0.22	0.44	0.62	0.74	0.21	0.84	
10	n-butanol-diéthylène glycol-eau (4:1:1)	(a	"	0.53	0.27	0.42	0.27	0.60	0.45	0.77	
11	-id°- (atmosphère (NH ₃))) n	"	0.52	0.23	0.31	0.15	0.50	0.50	0.70	
12	n-butanol-diéthylène-glycol, 0.1N HCl (4:1:1)	(a	"	0.20	0.08	0.29	0.31	0.60	0.34	0.74	
13	n-butanol (saturé avec HCl 0.1 N)	a	"	0.032	0.006	0.054	0.09	0.30	0.035	0.44	
14	Isopropanol 65% (v:v) eau-HCl (2 N)		51	0.36	0.25	0.31	0.25	0.68	0.47	0.77	0.55
15	n-butanol-eau (86 : 14)		52	0.38	0.15	0.26	0.18	0.31	0.22	0.52	
16	n-butanol-eau (86 : 14) + NH ₃		"	0.28	0.11	0.12	0.05	0.19	0.24	0.35	
17	n-butanol-acide formique-eau (77:10:13)		"	0.33	0.13	0.30	0.24	0.39	0.26	0.56	
18	n-butanol-éthanol-eau (50:15:35)		"	0.55	0.37	-	-	0.46	0.53	-	
19	Alcool amylique saturé d'eau		"	0.28	0.05	0.15	0.10	0.22	0.09	0.40	
20	Alcool amylique saturé d'eau + NH ₃		"	0.16	-	0.02	0.00	0.08	0.09	-	
21	Alcool amylique saturé d'eau-ac.formique (90:10)		"	0.12	0.04	0.19	0.16	0.23	0.07	-	
22	Butanol-acide acétique-eau 40:10:50		53	0.54- 0.55	0	0.45- 0.47	0.33- 0.34	0.49- 0.50	0.40		

a : solution des bases dans SO H N/10; n solution des bases

neutralisée par les vapeurs de NH₃ avant la chromatographie

un bain d'acide nitrique 0,5 N, puis dans l'eau distillée, sont ensuite passés dans une solution de sulfure d'ammonium. Une tache noire de sulfure de mercure localise les bases puriques (46). Par le même principe, on révèle l'emplacement des bases pyrimidiques (47), mais en substituant à la solution de nitrate mercurique une solution tamponnée d'acétate mercurique obtenue par le mélange extemporané de 1 volume d'une solution 0,1 M d'acétate mercurique avec 3 volumes d'une solution M d'acétate de sodium et 6 volumes d'eau. 5 à 10 μ g de base peuvent être décelés de cette manière. La séparation est quantitative et les bases sont dosées par spectrophotométrie dans l'ultra-violet après élution des fragments de papier correspondant aux taches non révélées et repérées par comparaison avec un chromatogramme identique soumis à la révélation mercurielle.

Les auteurs ont ensuite appliqué leur mode opératoire au dosage des bases puriques et pyrimidiques obtenues par hydrolyse des acides ribonucléiques de Levure et de Pancréas (55).

L'hydrolyse comporte deux stades :

- a - libération des bases puriques
- b - hydrolyse des nucléotides pyrimidiques.

L'hydrolyse des nucléotides puriques s'effectue facilement par l'acide sulfurique N en tube scellé à 100°C pendant 1 heure. Après ajustement du pH, la séparation chromatographique est réalisée dans différents systèmes-solvants.

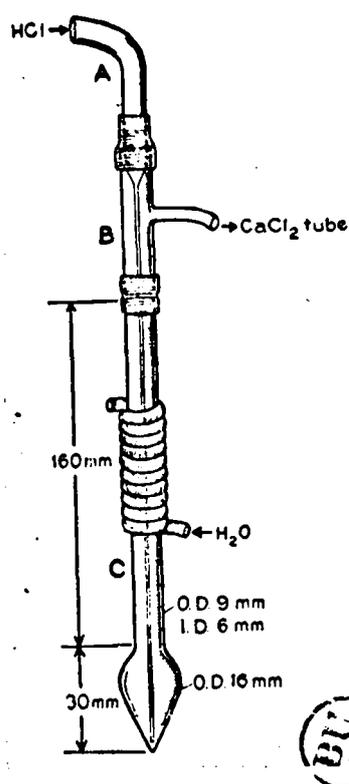
L'hydrolyse des nucléotides pyrimidiques se fait par l'acide formique concentré en tube scellé à 175°C pendant 2 heures. Ces nucléotides sont obtenus au préalable suivant deux modes opératoires différents : soit qu'ils aient été précipités de l'hydrolysât partiel sulfurique sous forme de sels d'urane, - soit qu'ils aient été libérés par le passage de HCl gazeux dans une suspension d'acide nucléique dans le méthanol. Cette dernière opération est réalisée dans un dispositif représenté par la figure 7 ; l'action du gaz chlorhydrique est prolongée 3 à 5 heures à 50°C. Les chlorhydrates de bases puriques précipitent et sont éliminés. Le résidu d'évaporation sous pression réduite de la solution méthylique, exempt d'acide chlorhydrique, est ensuite hydrolysé par l'acide formique. Les résultats obtenus par VISCHER et CHARGAFF sont rassemblés dans le tableau II.

Tableau II

Proportions moléculaires des bases puriques et pyrimidiques d'acides ribonucléiques de Levure et de Pancréas.

Origine de l'acide	Guanine	Adénine	Cytosine	Uracile
Ac. nucléique de Levure	3,1	3,2	3	I
Ac. nucléique de Pancréas	8;8	3.6	4.5	I

Figure 7



Montage réalisé par VISCHER et CHARGAFF (56) pour hydrolyser par ^{un} courant d'HCl gazeux de petites quantités d'acide nucléique en suspension dans de l'alcool méthylique.

Le luxe de précautions dont s'entourent les auteurs, la complexité des opérations d'hydrolyse, sont motivés par le souci d'éviter la désamination de la guanine et de la cytosine.

Et cependant VISCHER et CHARGAFF ont constaté ultérieurement (57) que leur technique était imparfaite, l'acide uridylique résistant à l'hydrolyse formique. Ce caractère explique la faible proportion d'uracile trouvé par ces auteurs dans les acides ribonucléiques. Leur mode opératoire ne pouvait donc être utilisé pour la détermination de la répartition des bases dans les acides ribonucléiques, mais il s'applique parfaitement à l'étude des acides désoxyribonucléiques, où l'acide thymidylque, totalement hydrolysable par l'acide formique, remplace l'acide uridylique.

WYATT (58) a simplifié la technique d'hydrolyse de VISCHER et CHARGAFF en réalisant la libération quantitative des bases par une hydrolyse unique des acides désoxypentose-nucléiques à l'aide de l'acide formique concentré en tube scellé à 175°C pendant 30 minutes.

Bien que les acides désoxyribonucléiques ne constituent pas la matière de notre étude, nous avons rassemblé dans le tableau III la composition de quelques-uns de ces acides pour montrer que la théorie du tétranucléotide isomoléculaire ne peut prétendre représenter leur structure. Ces résultats montrent que la composition d'un acide désoxyribonucléique est constante dans les différents organes d'une espèce

donnée et qu'elle est caractéristique de cette espèce - conclusions qui sont en parfait accord avec la théorie génétique classique.

Récemment, MARSHAK (59) est parvenu à réaliser l'hydrolyse totale des acides pentose- et désoxypentose-nucléiques par l'acide perchlorique 12 N en tube scellé à 100°C pendant 1 heure et à mettre au point une méthode générale d'étude de la constitution des deux types d'acides nucléiques par la détermination de la répartition moléculaire des bases azotées. L'auteur a en outre apporté une simplification considérable à l'analyse des acides nucléiques en effectuant son hydrolyse directement sur le tissu traité selon la technique de SCHNEIDER (60) sans isoler ni purifier préalablement les acides nucléiques. L'auteur s'est particulièrement attaché à l'étude des acides ribonuculéiques obtenus à partir de produits du fractionnement partiel de cellules : acides ribonucléiques du noyau et du cytoplasme (61). Il a montré que l'acide ribonucléique du noyau contenait une proportion d'adénine double de celle de l'acide ribonucléique cytoplasmique (64) et émis l'hypothèse que ce dernier tirait son origine du premier par perte d'une molécule d'acide adénylique qui serait à l'origine des acides adényliques libres du cytoplasme (tableaux IV).

En conclusion, l'hydrolyse totale des acides nucléiques en vue du dosage des bases après leur séparation par chromatographie sur papier est rendue délicate par la résistance des

Tableau III (CHARGAFF 62)

Composition d'acides désoxyribonucléiques
(en molécules de bases pour une molécule de phosphore)

Origine		Guanine	Adénine	Cytosine	Thymine
Organe	Espèce				
Thymus	Boeuf	0.21	0.26	0.16	0.25
Rate	"	0.20	0.25	0.15	0.24
Foie	"	0.20	0.26	-	-
Thymus	Homme	0.19	0.28	0.16	0.28
Sperme	"	0.18	0.29	0.18	0.31
Foie normal	"	0.19	0.27		
Foie cancéreux	"	0.18	0.27	0.15	0.27
	Levure	0.14	0.24	0.13	0.25
	Bacille tuber- culeux aviaire	0.12	0.28	0.26	0.11

Tableau IV.

Rapports moléculaires des bases puriques et pyrimidiques d'acides désoxypentose-nucléiques (ADN) et pentose-nucléiques (APN) (MARSHAK 63)

Origine des acides nucléiques			Adénine	Guanine	Cytosine	Uracile	Thymine
<u>Noyaux</u>	ADN	Foie	I	0.89	0.85		1.04
		Thymus	I	0.89	0.79		0.99
		Rein	I	0.79	0.78		I
		Coeur	I	0.82	0.82		1.01
	APN	Foie	I	I	0.39	0.45	
		Thymus	I	0.88	0.09	0.17	
		Rein	I	0.92	0.25	0.59	
		Coeur	I	0.92	0.19	0.29	
<u>Cytoplasme</u>	APN	Foie	I	1.83	1.22	1.12	
		Thymus	I	1.88	1.44	0.89	
		Rein	I	1.78	1.25	0.94	
		Coeur	I	1.20	0.77	0.03(?)	
APN de Levure			I	1.13	0.71	0.73	

nucléotides pyrimidiques - en particulier de l'acide uridylique - aux agents chimiques d'hydrolyse et par la difficulté d'éviter la désamination de la guanine et de la cytosine. Cependant, l'étude des acides désoxypentose-nucléiques peut être réalisée après hydrolyse formique (WYATT) ou sulfurique-formique (VISCHER et CHARGAFF). L'hydrolyse perchlorique de MARSHAK est d'autre part applicable, en principe, aux deux types d'acides nucléiques.

2° - Séparation chromatographique des nucléosides

La séparation par chromatographie sur papier des nucléosides n'a guère été utilisée. En effet, il n'est pas possible d'hydrolyser quantitativement en nucléosides un acide nucléique par des agents chimiques. Par exemple l'action prolongée de la pyridine pure à 118°C pendant 5 jours suivant la technique de BREDERECK(65) ne libère qu'une partie des nucléosides. Cependant, BEALE, HARRIS et ROE (66) ont récemment mis au point une méthode d'hydrolyse totale des acides ribonucléiques suivie d'un fractionnement quantitatif de ces composés sur des colonnes d'amidon : l'acide ribonucléique purifié est traité par la soude diluée et les nucléotides obtenus sont hydrolysés par la phosphatase acide d'un extrait prostatique. Les nucléosides sont ensuite fractionnés par passage de l'hydrolysats sur une colonne d'amidon et développés à l'aide de n-butanol saturé d'eau.

L'identification et le dosage des nucléosides sont effectués par spectrophotométrie dans l'ultra-violet. Les auteurs ont ainsi établi la constitution d'un acide ribonucléique isolé du Sarcome de la Poule. Les rapports moléculaires de la guanine, de l'adénine, de la cytosine et de l'uracile sont respectivement les suivants : 3,72 - 1,11 - 2,23 - 1. Ces résultats confirment la teneur élevée en guanine des acides nucléiques d'origine néoplasique, déjà observée par certains auteurs (CLAUDE (67), SHERIN (68)).

3° - Séparation chromatographique des nucléotides

La séparation des nucléotides par la chromatographie de partage sur papier constitue la méthode de choix dans l'étude de la constitution des acides ribonucléiques. En effet, l'hydrolyse de ces acides est réalisée très facilement par l'action de la soude N ou N/2 à la température ordinaire pendant 24 heures (68). La soude libère quantitativement les ribonucléotides sans provoquer leur déphosphorylation ou leur désamination.

Néanmoins, certains auteurs sont restés fidèles aux techniques d'hydrolyse acide :

MARKHAM et SMITH réalisent une hydrolyse partielle des acides ribonucléiques par l'acide chlorhydrique N à 100°C pendant 1 heure. Les bases puriques et les nucléotides pyrimidiques libérés sont séparés chromatographiquement (70). Le système-

Solvant utilisé est le suivant : butanol-tertiaire-acide chlorhydrique pur concentré-eau (700 : 132 : 168). Les taches correspondant aux produits de l'hydrolyse sont révélées à l'aide d'une technique qui est applicable à l'identification de tous les dérivés des acides nucléiques et que nous exposerons en détail.

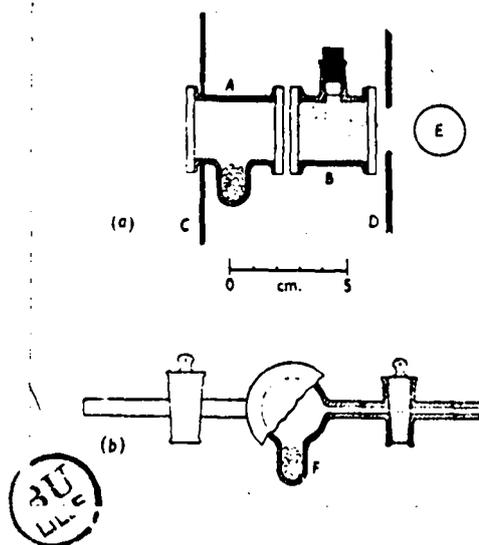
Les auteurs mettent à profit la propriété que possèdent les bases puriques et pyrimidiques d'absorber fortement les radiations ultra-violettes de la bande voisine de 2.600 \AA . HOLIDAY et JOHNSON (71) avaient mis au point une technique "visuelle" : les chromatogrammes étaient exposés au rayonnement ultra-violet et des taches de teinte foncée localisaient les acides nucléiques. MARKHAM et SMITH (72) ont sensibilisé la méthode en utilisant une lumière aussi monochromatique que possible. Ils emploient à cet effet un système de filtres dont l'un contient une solution de sulfates de nickel et de cobalt et l'autre du chlore séché sur chlorure de calcium (fig. 8).

Les chromatogrammes mis au contact d'un papier photographique sont exposés aux radiations ainsi filtrées. Après développement, l'emplacement des dérivés nucléiques est marqué sur la surface sensible par une tache blanche apparaissant sur le fond noir (fig.9). Cette technique de localisation est très sensible et permet de déceler des quantités très faibles de substances (1 μg d'adénine).

Figure 8

Dispositif de filtration de la lumière ultra-violette.

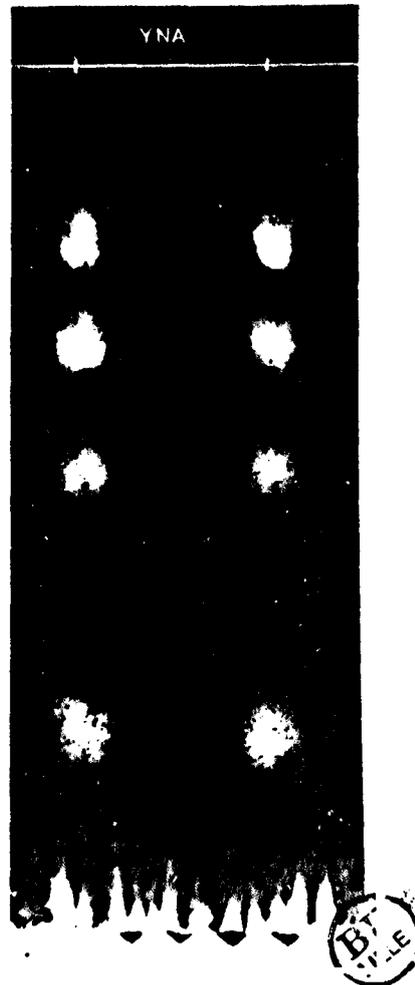
in MARKHAM et SMITH (73)



a - Section longitudinale : A : filtre contenant du chlore,
 B : filtre contenant la solution des sels de cuivre et de
 nickel, C et D : diaphragmes, E : lampe à vapeur de mercure.

b - Section transversale du filtre contenant du chlore
 desséché par du chlorure de calcium (F).

Figure 9



Séparation chromatographique d'un hydrolysate d'acide ribonucléique par HCl N à 100°C pendant 1 heure.

Système-solvant : butanol-tertiaire-acide chlorhydrique-eau.

Révélation par la lumière ultra-violette suivant la technique de MARKHAM et SMITH.

Les taches correspondent de haut en bas aux composés suivants :
guanine, adénine, acide cytidylique, acide uridylique.

(MARKHAM et SMITH (81)).

MARKHAM et SMITH ont appliqué leur mode opératoire à l'étude de la constitution des acides ribonucléiques de la Levure et de différents virus végétaux (74). Les résultats que ces auteurs ont obtenus (tableau V) montrent qu'il existe des disproportions sensibles dans la répartition des nucléotides dans les différents acides ribonucléiques.

Tableau V

Proportions moléculaires des bases puriques et pyrimidiques d'acides ribonucléiques de virus végétaux et de Levure

(MARKHAM et SMITH 80)

Souches	Adénine	Guanine	Cytosine	Uracile
Mosaïque de l'Aucuba	1.20	0.95	0.78	1.05
Mosaïque du Tabac	1.24	1.17	0.62	0.96
Rib-grass	1.17	1.08	0.69	1.05
Concombre 4	1.04	1.03	0.74	1.19
Mosaïque de la Tomate	1.18	1.04	0.73	1.05
Ac. ribonucléique de Levure	1.03	1.25	0.80	0.93

Cependant, MARKHAM et SMITH ont récemment remarqué que l'hydrolyse chlorhydrique, même ménagée, libérait de petites quantités de cytidine et d'uridine (82). Le chromatogramme schématique de la figure 10, empruntée aux auteurs, met en évidence les nucléosides formés au cours de l'hydrolyse acide. Il semble donc que l'hydrolyse acide d'acide nucléique, aussi douce soit-elle, ne puisse éviter l'altération des

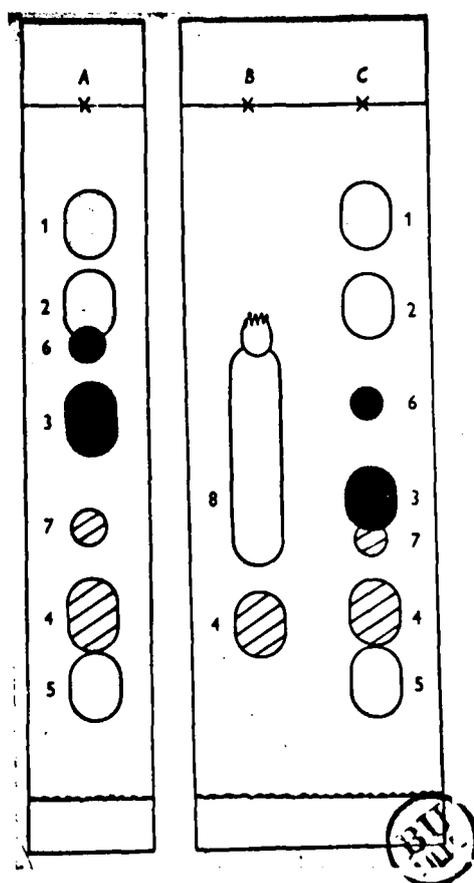
produits formés. La séparation chromatographique des quatre ribonucléotides obtenus par une hydrolyse alcaline constitue donc la méthode la plus précise dans l'étude de la constitution des acides ribonucléiques. Deux procédés de séparation chromatographique des ribonucléotides ont été proposés, l'un par CHARGAFF et coll. (83), l'autre par BOULANGER et MONTREUIL (84).

CHARGAFF et coll. (85) réalisent la séparation des nucléotides à l'aide de deux systèmes-solvants : l'un -"acid system"- consiste en un mélange d'acide isobutyrique et d'eau (11 : 6), l'atmosphère de la cuve étant saturée d'ammoniaque. L'autre -"buffered system" - est constitué par un mélange de 10 volumes d'acide isobutyrique amené à pH 3,6 - 3,7 par l'addition de 6 volumes d'ammoniaque 0,5 N.

Les nucléotides sont localisés par la technique de MARKHAM et Smith ou par l'utilisation d'un réactif chimique : les chromatogrammes sont passés lentement dans une solution aqueuse d'acétate d'urane à 0,15 g p. 100 ml, lavés 20 secondes à l'eau distillée, puis soumis à l'action d'une solution aqueuse à 3 g.p.100 ml. de ferrocyanure de potassium acidifié par l'addition d'HCl N. Des taches brunes révèlent l'emplacement des nucléotides.

Le dosage des nucléotides isolés est effectué par spectrophotométrie dans l'ultra-violet. CHARGAFF et coll. ont appliqué avec succès leur mode opératoire à l'étude de la constitu-

Figure 10



Chromatogrammes d'hydrolysats d'acides ribonucléiques :

A : hydrolyse par HCl N, 1 h. à 100°C. Solvant : butanol
3 aire-acide chlorhydrique.

B : hydrolyse par NaOH N à 20°C. Solvant : isopropanol-eau

C : hydrolyse par HCl N, 1 h. à 100°C. Solvant : sulfate
d'ammonium-isopropanol.

1 : guanine, 2 : adénine, 3 : acide cytidylique, 4 : acide
uridylique, 5 : $\text{PO}_4 \text{H}_3$, 6 : cytidine, 7 : uridine, 8 : mélan-
ge des acides adénylique, guanylique et cytidylique.

Remarquer en A et C la présence de nucléosides pyrimidiques
(in MARKHAM et SMITH (86)).

tion d'un certain nombre d'acides ribonucléiques animaux et végétaux (88). Leurs résultats sont rassemblés dans le tableau VI..

Cependant, l'emploi des systèmes-solvants à base d'acide isobutyrique ne permet pas la séparation des acides uridylique et guanilylique (figure II) qui doivent être dosés ensemble. L'avantage de la technique que nous avons mise au point et que nous exposerons dans la partie consacrée à nos recherches personnelles est de permettre la séparation des 4 nucléotides et de faciliter à la fois les déterminations qualitatives et quantitatives.

Figure II



Séparation chromatographique de mélanges de nucléotides dans le système-solvant : acide isobutyrique - eau (87)

Révélation en lumière ultra-violette suivant la technique de MARKHAM et SMITH.

I : "spot" unique des acides uridylique et guanylique, II : acide cytidylique, III : acide adénylique.

I : mélange des acides uridylique et cytidylique ; 2 hydrolysats alcalins d'un acide ribonucléique de Levure ; 3 : mélange des acides guanylique et adénylique.

Tableau VI

Composition de différents acides ribonucléiques (CHARGAFF 89)

Origine de l'acide ribonucléique	Rapports moléculaires des nucléotides			
	Acide :guanylique	Acide : adénylique	Acide :cytidylique	Acide :uridylique
Levure 1	9.7	10	6.1	7
" 2	9.6	10	7.5	6.7
" 3	10.6	10	8.6	8.2
" 4	10.5	10	8	10.2
Pancréas de Porc	22.5	10	9.8	4.6
Foie de Porc	16.3	10	16.1	7.7
Foie de Mouton	16.8	10	13.4	5.6
Foie de Veau	16.2	10	11.1	5.3
Foie de Boeuf	14.6	10	10.9	6.6
Foie humain	32.9	10	28.8	8.3
Foie humain carcinomateux (métastase)	41.4	10	43.2	7.2

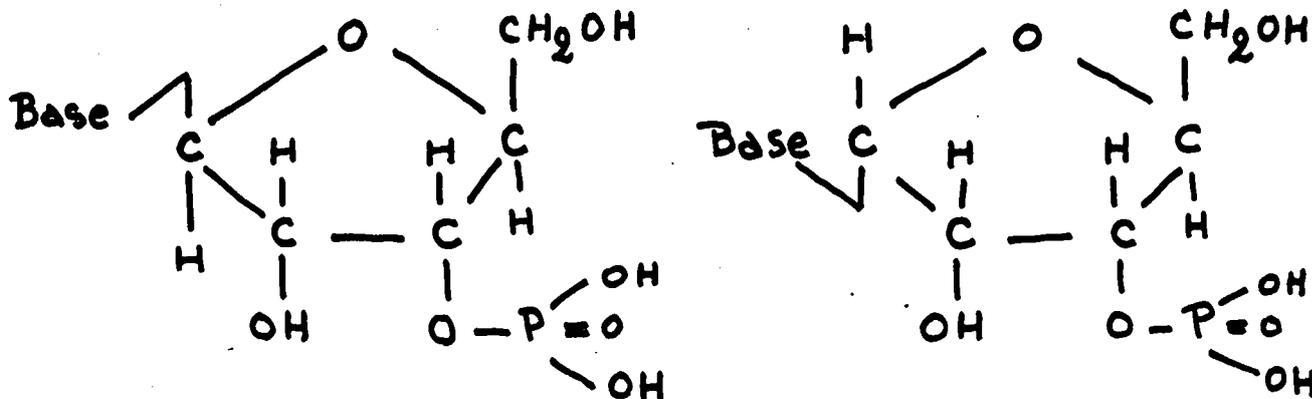
C - Conclusions

Les conceptions modernes de la structure des acides ribonucléiques reposent sur un ensemble de résultats concordants obtenus grâce à des modes d'hydrolyse et des méthodes chromatographiques différents. Les constitutions d'acides nucléiques d'origines diverses ont été précisées. Elle ne s'accordent pas avec la théorie de la répartition équimoléculaire des nucléotides dans un tétranucléotide.

En outre, la chromatographie sur papier a permis de préciser certaines modalités de l'enchaînement des nucléotides. Plusieurs auteurs ont pu montrer que les acides nucléiques n'étaient pas constitués par la répétition uniforme d'une unité structurale, mais que des nucléotides occupaient dans leur molécule des positions particulières et que l'existence de plusieurs types de liaisons entre les nucléotides achevaient de compliquer considérablement leur schéma de structure.

COHN et coll. (90), CARTER et coll. (91) ont mis en évidence une isomérisation des nucléotides en fractionnant des hydrolysats sodiques ou ribonucléasiques d'acides ribonucléiques sur des colonnes d'échangeurs d'ions. Ces auteurs ont obtenu deux isomères a et b de chacun des nucléotides, dont la nature exacte n'est pas encore précisée. S'agit-il d'une isomérisation α - β de la liaison osidique (schéma XII) ou encore d'une isomérisation de position du radical phosphoryle en 2' (isomère a ?) et en 3' (isomère b) de la molécule de

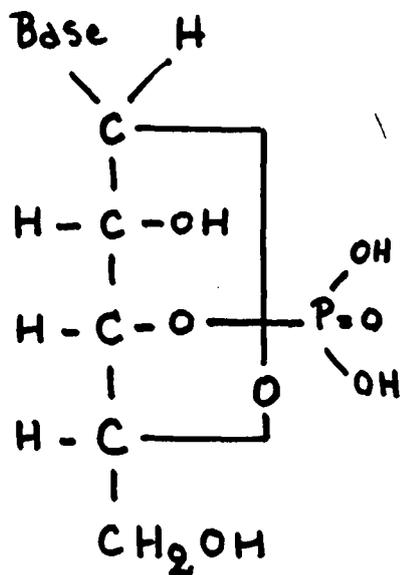
Isomérisie des nucléotides



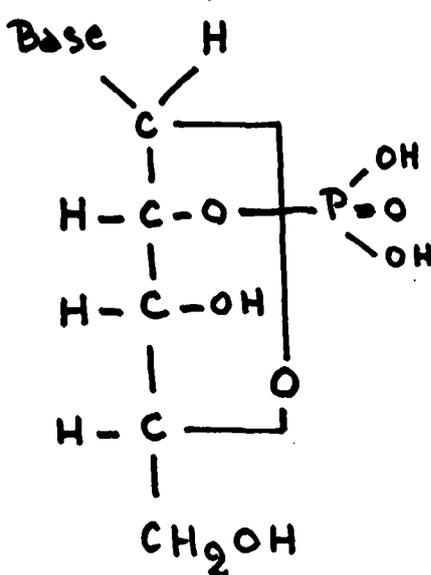
Isomère normal (b) d'un nucléotide
(liaison α glucosidique)

Isomère a
(liaison β glucosidique)

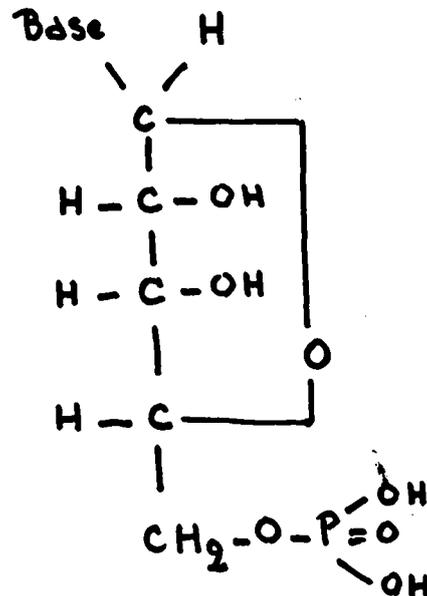
Schéma XII



Isomère normal (b) :
riboside 3'phosphate



Isomère a
riboside 2'phosphate



riboside 5'phosphate

Schéma XIII

Schéma XIV

ribose (schéma XIII) ? Les isomères portant leur radical phosphoryle en position 5' (schéma XIV) ont également été identifiés dans des hydrolysats ribonucléasiques par COHN et VOLKIN (92).

BOULANGER et MONTREUIL (93), Magasanik et Chargaff (94) ont étudié la cinétique de l'action d'agents d'hydrolyse chimiques. Des prélèvements effectués à des temps déterminés permettent de suivre le clivage de la molécule d'acide nucléique. Ces auteurs ont mis en évidence la mobilité particulière de l'acide uridylique et l'existence d'une fraction plus stable de la molécule, riche en nucléotides puriques.

Les travaux de MAGASANIK et CHARGAFF, que nous exposerons brièvement, ont conduit ces auteurs à proposer un schéma de structure des acides nucléiques. L'action de la soude sur un acide ribonucléique est très rapide. On voit d'abord apparaître l'acide uridylique, qui est libéré en totalité dès le début de l'hydrolyse. Le clivage des nucléotides puriques s'effectue plus lentement (tableau VII). Inversement, la fraction plus stable de la molécule s'appauvrit en acide uridylique et s'enrichit en nucléotides puriques (tableau VIII). Ces résultats permettent de conclure que l'acide uridylique occupe une position "extérieure" par rapport au reste de la molécule d'acide nucléique, dont ^{le} squelette est riche en nucléotides puriques.

Action de la soude sur un acide ribonucléique de Levure.
Cinétique de la libération des mononucléotides.

Durée de l'hydrolyse en minutes	Mononucléotides (en molécules pour 100 molécules de nucléotides au départ)				Total
	Acide guanylique	Acide adénylique	Acide uridylique	Acide cytidylique	
15	19	9	*	26	54
35	23	15	*	23	61
27880	29	30	21	20	100

* détermination impossible.

Tableau VIII

Action de la soude sur un acide ribonucléique de Levure:
constitution des résidus polynucléotidiques après hydrolyse incomplète.

Durée de l'hydrolyse en minutes	Mononucléotides (en molécules pour 100 molécules de nucléotides)			
	Acide guanylique	Acide adénylique	Acide cytidylique	Acide uridylique
0	29	30	21	20
15	24	38	26	12
35	21	45	24	10

L'existence d'une fraction résistant à l'action de la ribonucléase a été confirmée par BJULANGER et MONTREUIL (95) et par MAGASANIK et CHARGAFF (96) qui ont étudié à l'aide de la chromatographie sur papier la répartition des nucléotides dans les fractions dialysables et non dialysables d'un acide ribonucléique soumis à l'action de l'enzyme. MAGASANIK et CHARGAFF ont montré que le dialysat contenait des nucléotides libres exclusivement pyrimidiques et des polynucléotides constitués par la presque totalité de l'acide adénylique présent dans l'acide nucléique, par une faible proportion d'acide guanylique et par de petites quantités des acides uridylique et cytidylique (tableau IX). La fraction résistant à l'action de la ribonucléase n'est constituée pratiquement que de nucléotides puriques (tableau X).

Tableau IX

Action de la ribonucléase sur un acide nucléique : composition du dialysat

Fractions	Molécules de nucléotides (pour 100 molécules de nucléotides au départ)				Total
	Acide guanylique	Acide Adénylique	Acide Cytidylique	Acide Uridylique	
Constitution de l'ARN	28	27	23	22	100
Mononucléotides	0	0	14	21	35
Nucléotides totaux	17	19	18	22	76

Tableau X

Composition du résidu de la dialyse

Molécules de Nucléotides pour 100 molécules au départ			
Acide Guanylique	Acide Adénylique	Acide Cytidylique	Acide Uridylique
63	27	7	3

Deux hypothèses permettent donc d'expliquer la spécificité de l'action de la ribonucléase : a) l'enzyme ne peut hydrolyser que les liaisons entre des nucléotides pyrimidiques; b) l'enzyme peut hydrolyser toutes les liaisons inter-nucléotidiques, exceptées celles qui lient l'acide guanylique à un autre nucléotide.

Les schémas de structure XV et XVI, proposés par MAGASANIK et CHARGAFF, essaient de rendre compte des résultats des hydrolyses sodiques et ribonucléasiques : sur une chaîne riche en nucléotides puriques se greffent des chaînes latérales où prédominent les nucléotides pyrimidiques. La position éloignée de l'acide uridylique par rapport à la chaîne purique tient compte de la mobilité particulière de ce nucléotide.

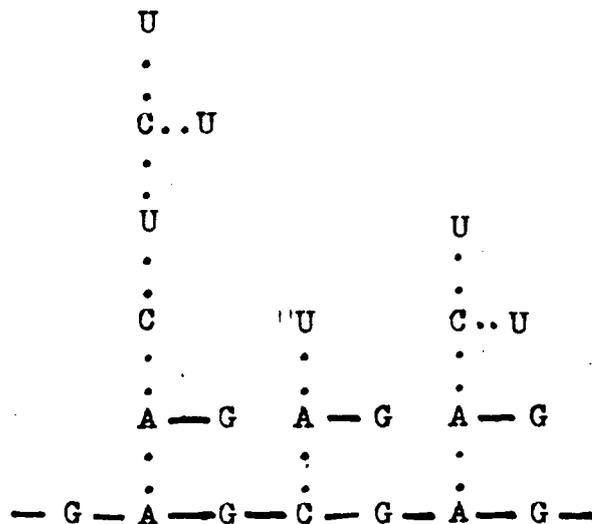


Schéma XV

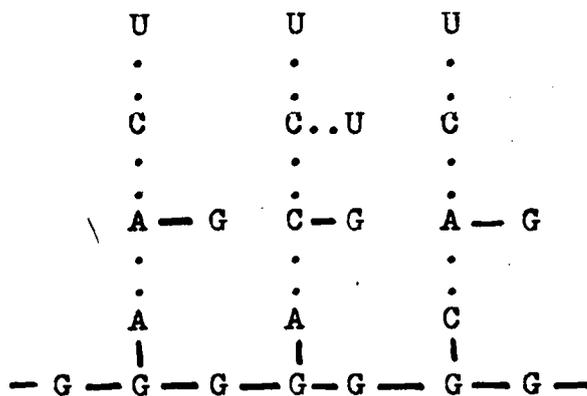


Schéma XVI

En pointillés, les liaisons rompues par la ribonucléase; en traits pleins, les liaisons réfractaires à l'action de l'enzyme.

CHAPITRE IV

TRAVAUX PERSONNELS

I - TECHNIQUES D'ANALYSE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES

A - Chromatographie quantitative sur papier
des ribonucléotides (97)

Nos premiers essais de chromatographie sur papier des dérivés des acides nucléiques avaient porté sur la séparation des bases. Mais les difficultés de l'hydrolyse et la complexité des dosages par mesure de l'absorption dans l'ultra-violet nous ont amené à mettre au point une méthode simple permettant la chromatographie des ribonucléotides suivie de leur détermination quantitative par un microdosage de l'acide phosphorique nucléotidique. Nos essais de séparation chromatographique ont été effectués sur des acides guanylique, adénylique, cytidylique et uridylique provenant de préparations commerciales dont nous avons vérifié la pureté. Mais nous avons été amené à préparer certains nucléotides - tels les acides xanthylique, hypoxanthylique, inosinique - par une technique simple de diazotation des nucléotides aminés correspondants : les acides guanylique, adénosine-3'-phosphorique, adénosine-5'-phosphorique.

1° - Préparation de nucléotides hydroxylés par diazotation des nucléotides aminés correspondants.

On dissout dans un tube à essais 0,05 g. de nucléotide dans 1 ml. d'eau distillée, puis 0,5 g. de nitrite de sodium pur. On ajoute ensuite par petites fractions, sous agitation constante, 1 ml. d'acide formique pur à 97-98%. Quand la réaction de diazotation est terminée, la solution obtenue est évaporée à siccité sous pression réduite, reprise avec 10 ml. d'eau distillée et passée sur une colonne de "Deacidite", résine à échange d'anions dont nous préciserons ultérieurement les modalités d'utilisation. Le nucléotide, fixé sur la résine, est ensuite développé avec une solution aqueuse d'acide formique à 1 pour cent (acide hypoxanthique) ou à 10 pour cent (acides xanthique, inosinique, uridylique). La solution formique est concentrée sous pression réduite à 40°C puis évaporée à siccité dans le vide. Le résidu est constitué par le nucléotide pur.

2° - Choix des systèmes-solvants. Les considérations qui nous ont guidé dans la recherche de systèmes-solvants permettant la séparation des nucléotides ont été de deux ordres :

a) les nucléotides sont solubles dans le phénol ; or , nous avons précédemment signalé que le déplacement d'une substance sur un chromatogramme est d'autant plus rapide que cette substance est plus soluble dans la phase mobile.

b) les nucléotides sont des composés ionisables ; leur migration étant de ce fait liée au pH de la phase mobile, nous avons préparé des systèmes-solvants en y ajoutant différents acides.

Les chromatographies unidimensionnelles, qui permettent la séparation quantitative des quatre nucléotides, sont effectuées avec différents mélanges à base de phénol. Ceux-ci exigent une préparation minutieuse : les R_F et l'homogénéité des taches sont en effet considérablement influencés par les variations de la température ambiante. Les quantités d'acide et d'alcool constituant les différents systèmes-solvants sont exactement mesurées, puis le mélange phénol cristallisable 950 g. + eau 100 g. est ajouté jusqu'à un volume connu. Après saturation par l'eau distillée, on laisse le système biphasique se décanter pendant 24 heures dans un local dont la température ambiante est inférieure de quelques degrés à celle de la chambre de chromatographie. La phase aqueuse, à laquelle on ajoute un peu de cyanure de potassium destiné à complexer les métaux souillant éventuellement le papier à chromatographie, constitue la "phase de saturation" et est déposée dans un récipient au fond de la cuve à chromatographie. La phase phénolique constitue la "phase mobile". Le tableau XI groupe les divers systèmes-solvants que nous avons mis au point. Dans la pratique, nous utilisons principalement le système-solvant n°1, qui nous donne d'excellents résultats, ainsi que le montre la figure 12.

Des chromatogrammes bidimensionnels (fig.13) peuvent être réalisés en utilisant comme premier solvant un des systèmes-solvants alcooliques, dont le tableau XII donne la composition et le pouvoir résolutif ; le second système-solvant étant un des systèmes-solvants phénoliques précédemment décrits.

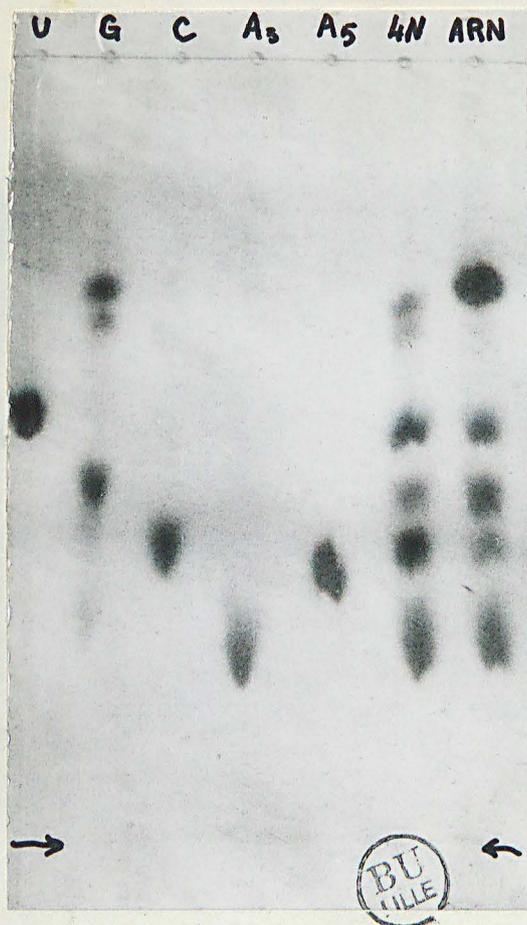
Tableau XI

R_F des ribonucléotides dans différents systèmes-solvants phénoliques (98)

n°	Systèmes-solvants Composition	R _F à 20-22°C								
		P	U	G	C	A ₃	X	H	A ₅	I
1	Phénol-isopropanol- :acide-formique-eau : (85 : 5 : 10 : 100)	0.22 0.23	0.37 0.38	0.49 0.50	0.58 0.59	0.70 0.71				
2	Phénol-isopropanol- :acide formique-eau : (80 : 10 : 10 : 100)	0.17 0.18	0.33 0.34	0.44 0.45	0.50 0.54	0.64 0.65				
3	Phénol-butanol tertiai- :re-acide formique-eau : (84 : 6 : 10 : 100)	0.22	0.35	0.46	0.57	0.70				
4	Phénol-acide formique : eau (90 : 10 : 100)	0.28 0.31	0.41 0.44	0.52 0.54	0.60 0.63	0.70 0.75				

P : Po₄ H₃, U:acide uridylique, G:acide guanilylique, C:acide cytidylique,
A₃ :acide adénosine-3'phosphorique, I:acide inosinique, X:acide xanthylque,
xanthylque, H:acide hypoxanthylque, A₅ : acide adénosine-5(-phosphorique).

Figure 12



Séparation chromatographique unidimensionnelle des ribomononucléotides (99)

Système-solvant: phénol-isopropanol-acide-formique-eau
(85 : 5 : 10 : 100)

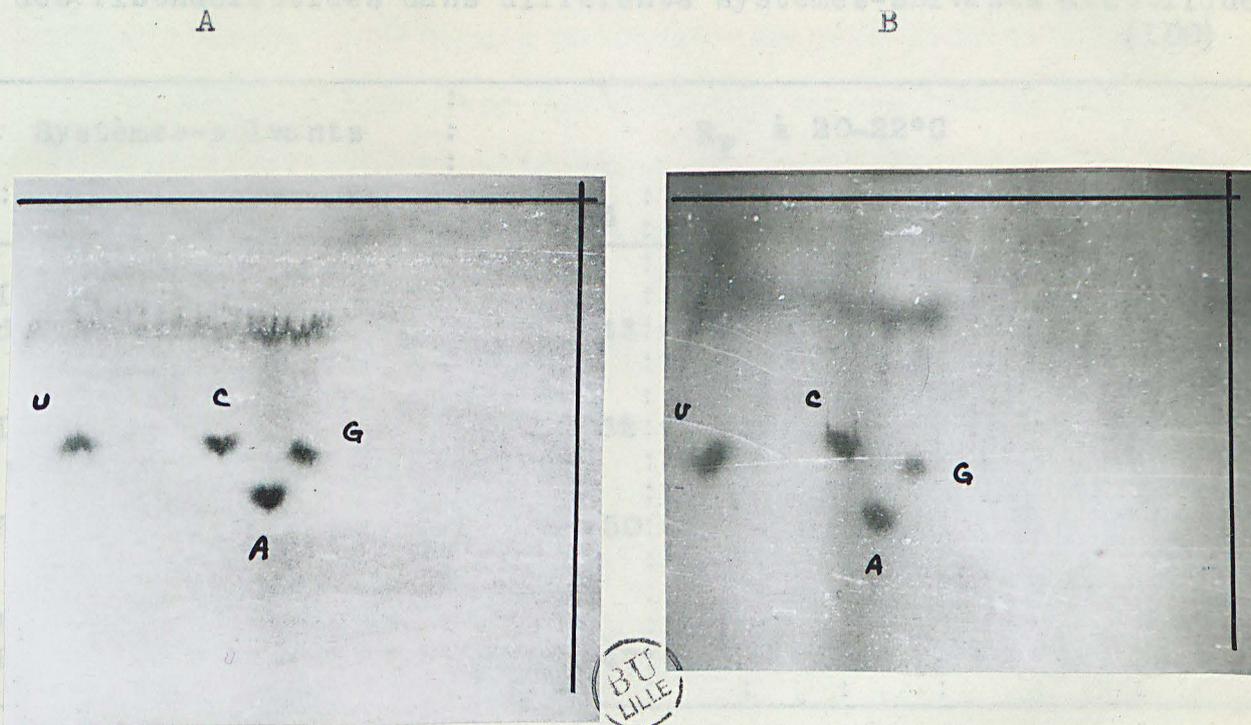
Durée de la séparation : 24 h. à 22°C sur papier WHATMAN n°1.

U : acide uridylique, G : acide guanylique (la tache supérieure est constituée par de l'acide phosphorique), C : acide cytidylique. A₃ : acide adénosine-3'-phosphorique; A₅ : acide adénosine-5'-phosphorique.

4N : mélange des 4 nucléotides + $\text{PO}_4 \text{H}_3$; ARN : hydrolysate ammoniacal d'un acide ribonucléique de Levure + $\text{PO}_4 \text{H}_3$.

Les flèches indiquent le "front" du solvant.

Figure 13



Chromatogrammes bidimensionnels.

A : mélange des 4 nucléotides purs, B : hydrolysat ammoniacal d'un acide ribonucléique de Levure.

1ère dimension (horizontalement) : système-solvant alcoolique n°3.

2ème dimension (verticalement) : système-solvant phénolique n°1.

U : acide uridylique, G : acide guanylique, C : acide cytidylique

A : acide adénylique. Les R_F dans le second solvant sont modifiés à cause de l'acidité chlorhydrique résiduelle du premier solvant.

On remarquera la parfaite identité des deux chromatogrammes.

Nota 5. Solide perchlorique pur (D=1,51) : 5 ml; acide chlorhydrique N/1 : 10 ml; solution de molybdate d'ammonium à 4 g. pour 100 ml : 25 ml; eau bidistillée : 60 ml.

Tableau XII

R_F des ribonucléotides dans différents systèmes-solvants alcooliques (100)

n°/:	Systèmes-solvants Composition	R_F à 20-22°C								
		G	A ₃	C	U	P	X	H	A ₅	I
1	Isopropanol-monochlorhydrique du glycol HCl N (60:30:10)	0.36	0.43	0.43	0.62	0.70				
2	Isopropanol-HCl N (80 : 20)	0.55	0.62	0.66	0.82	0.90				
3 ^(*)	Butanol tertiaire -HCl- eau (70 : 13,2 : 16,8)	0.46	0.50	0.56	0.80	0.90	0,53	0,57	0,57	0,57
4	Butanol tertiaire -SO ₄ H ₂ N (80 : 20)	0.41	0.47	0.81	0.92	0.92				

(*) Smith et Markham (101)

3° - Localisation des taches. La technique de révélation de MARKHAM et SMITH (102) n'est pas applicable à cause de l'absorption de la lumière ultra-violette par le phénol et la localisation des taches correspondant aux différents nucléotides se fait selon le mode opératoire suivant : le chromatogramme est séché dans un courant d'air pendant 24 heures ou dans une étuve à 70-80°C suivant l'"agressivité" de l'acide entrant dans la constitution du système-solvant. On pulvérise ensuite sur le papier à la dose de 1 à 5 ml pour 100 cm² le réactif de HANES et ISHERWOOD (103) que ces auteurs utilisent pour révéler les esters phosphoriques des glucides (note 5) .

Note 5 . Acide perchlorique pur (D=1,61) : 5 ml; acide chlorhydrique N/1 : 10 ml; solution de molybdate d'ammonium à 4 g. pour 100 ml : 25 ml; eau bidistillée : 60 ml.

suyant leur mode opératoire, le chromatogramme est séché à l'étuve à 70°C puis maintenu quelques minutes dans une atmosphère d'hydrogène sulfuré. Des taches bleues apparaissent, qui localisent l'emplacement des nucléotides sur le chromatogramme. Cette technique de révélation est peu sensible ; en outre, le fond du papier brunit sous l'action de l'hydrogène sulfuré. Nous lui préférons le mode opératoire suivant, dont la mise au point a été "accidentelle" : après la pulvérisation du réactif de HANES et ISHERWOOD, le chromatogramme est exposé à la lumière solaire. Les taches de nucléotides apparaissent en bleu sur un fond blanc. La réaction est suffisamment sensible pour que l'on puisse mettre en évidence 2 à 5 µg. de nucléotide (104).

4° - Reproduction photographique des chromatogrammes. La difficulté de reproduire les chromatogrammes sur un film photographique provient du fait que toutes les émulsions sont sensibles à la coloration bleue. Cependant, les films infrarouges "Kodak I.R." permettent d'obtenir d'excellents négatifs, si leur emploi est associé à l'utilisation d'un filtre rouge. Le tirage en positif est réalisé sur papier "Kodak B.G. 5.2".

5° - Dosage des nucléotides isolés. A cause de la propriété que possède le phénol d'absorber les radiations ultra-violettes, le dosage des nucléotides par spectrophotométrie dans l'ultra-violet est impossible. Le principe de la technique de dosage que nous utilisons consiste simplement en la détermination de l'acide phosphorique nucléotidique : les

taches repérées sont découpées et introduites dans des tubes à destruction en verre Fyrex possédant un étranglement avec un trait de jauge à 15 ml. On ajoute 0.5 ml. du mélange destructeur suivant :

) acide sulfurique pur ($D^{\text{é}} = 1,83$) 3 volumes
) acide perchlorique pur ($D^{\text{é}} = 1,61$) 2 volumes,

puis, selon la quantité de papier à détruire, 0,10 à 0,30 ml d'acide azotique pur ($D^{\text{é}} = 1,38$). On chauffe doucement; puis, dès l'apparition de vapeurs blanches, on place un petit entonnoir dans l'orifice du tube. La destruction est prolongée pendant environ 1 heure. Après refroidissement, on ajoute environ 10 ml d'eau bidistillée, 1 ml. d'une solution de molybdate d'ammonium pur à 8,3 g. p. 100 ml. d'eau bidistillée, puis 2 ml. de réactif d'Allen (105) dont la composition est la suivante :

(Amidol (2,4-diaminophénol) : 2 g.
)
 (Sulfite de sodium anhydre : 40 g.
)
 (Eau bidistillée q;s;p; :200 ml.

On complète à 15 ml et au bout de 10 minutes on mesure à l'électrophotomètre de MEUNIER (écran rouge, cuve de 4 cm) l'intensité de la coloration bleue obtenue. Cette technique colorimétrique est à la fois simple et sensible, puisque 1 μ g de phosphore peut être déterminé sans erreur.

Nous avons effectué des mélanges de nucléotides purs soigneusement dosés; puis, nous avons déterminé le taux de chacun

des nucléotides séparés par chromatographie dans différents solvants phénoliques. Comme le montre le tableau XIII, la récupération est quantitative.

Tableau XIII

Récupération quantitative après chromatographie d'un mélange de nucléotides (106).

Systemes-solvants	Nucléotides	Initial (+)	Récupéré (+)	Erreur
Phénol-acide formique-eau (90 : 10 : 100)	U	4,29	4,23	-1,4
	G	5	4,88	-2,4
	C	4,66	4,70	-0,37
	A	3,50	3,63	+3,7
Phénol-isopropanol-acide formique-eau (80:10:10:100)	U	4,29	4,26	-0,7
	G	5	5,29	+5,8
	C	4,66	4,59	-1,5
	A	3,50	3,58	+2,3
Phénol-isopropanol-acide formique-eau (80:5:10:100)	U	4,29	4,26	-0,7
	G	5	5,00	0
	C	4,66	4,63	-0,65
	A	3,50	3,55	+2,3

(+) exprimé en μ g de phosphore nucléotidique.

La technique de chromatographie sur papier des ribonucléotides que nous avons mise au point permet donc de préparer et de doser non seulement les nucléotides qui sont des constituants habituels des acides ribonucléiques (acides uridylique, guanylique, cytidylique, adénylique), mais aussi des nucléotides dont la présence pourrait se manifester à la suite d'hydrolyse d'acides nucléiques naturels ou d'acides nu-

cléiques naturels ou d'acides nucléiques préalablement traités (p.e. diazotés) (acides xanthylique, hypoxanthylique, inosinique, adénosine-5'phosphorique). Des séparations excellentes ont été obtenues à l'aide de solvants phénoliques dont l'emploi était interdit aux auteurs utilisant la révélation et le dosage des nucléotides dans l'ultra-violet.

Notre méthode est simple et la rigueur de ses résultats rend possible son application à l'analyse de très petites quantités d'acide ribonucléique. Cependant, nous nous sommes rapidement aperçu que la présence d'ions minéraux, dans des mélanges de nucléotides gênait leur séparation chromatographique et interdisait leur détermination quantitative; on ne peut obtenir des chromatogrammes parfaits d'hydrolysats sodiques d'acides ribonucléiques sans les avoir privés au préalable des ions Na^+ qu'ils contiennent. L'étude des acides ribonucléiques ne nous a été possible qu'en combinant l'application de la chromatographie sur papier avec l'utilisation de colonnes de résines à échanges d'ions, dont nous allons exposer les modalités.

B - Purification des nucléotides à l'aide des résines à échanges d'ions

Le passage de solutions nucléotidiques sur des colonnes de résines synthétiques à échange d'ions constitue une opération précédant la séparation chromatographique chaque fois qu'un mélange de nucléotides contient des ions minéraux ou

des substances susceptibles de gêner la chromatographie, comme des protéines ou des polypeptides. Nous utilisons deux types différents de résines à échange d'ions : la Permutite 50, résine à échange de cations, et la Deacidite 200, résine à échange d'anions.

1° - Montage des colonnes de résines (figure I4). Un poids déterminé de résine (15 g. de Deacidite ou 30 g. de Permutite) est introduit dans un tube de verre Pyrex de 0,20 cm de largeur et de 0,75 cm de hauteur. A la partie supérieure du tube, un système de siphonnage permet l'alimentation continue de la colonne en liquide. A la partie inférieure, un dispositif à robinet permet de régler l'écoulement et d'éviter que la résine ne reste à sec.

2° - Préparation des résines. Avant leur utilisation, les résines sont "régénérées" par le passage lent a) d'une solution d'acétate de sodium $M/4$ dans le cas de la résine "Deacidite 200" ; ou b) d'une solution d'acide chlorhydrique $N/3$ dans le cas de la résine "Permutite 50". Toute trace des solutions de régénération est ensuite soigneusement éliminée par le passage sur la résine d'une grande quantité d'eau distillée que l'on prolonge jusqu'à ce que la résistivité des eaux de lavage avoisine celle de l'eau distillée. Les colonnes de résines sont alors prêtes à être utilisées.

3° - Purification des nucléotides. Les conditions d'utilisation des deux types de résines sont bien distinctes :

a) la "Permutite" nous sert à purifier les hydrolysats sodi-

Figure . I4.

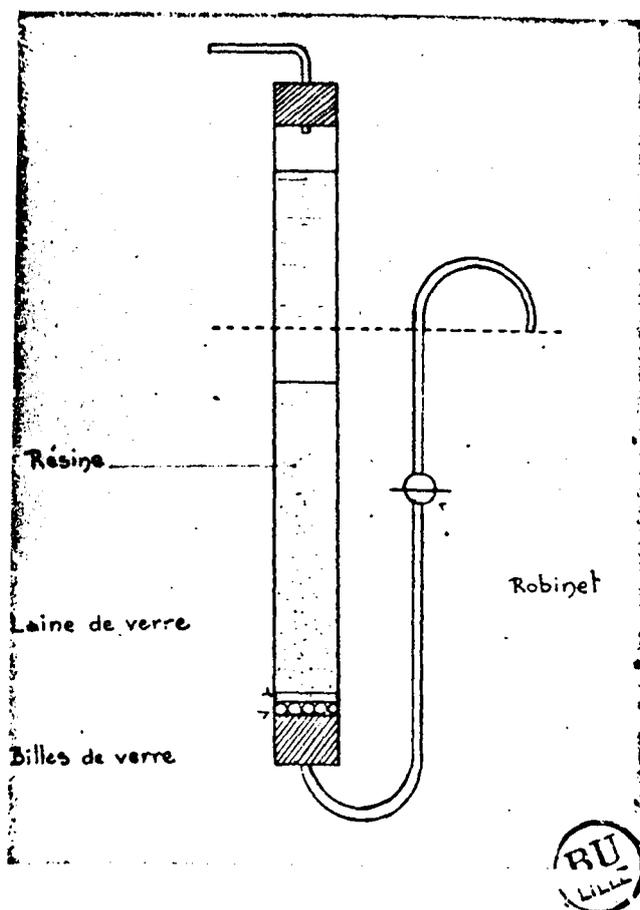


Schéma de montage d'une colonne de résine à échange d'ions.

ques d'acides nucléiques purs (I07);

b) l'emploi de la "Deacidite" est appliqué aux hydrolysats sodiques des acides nucléiques non isolés des tissus (I08).

Dans ce cas, en effet, les solutions de nucléotides obtenues sont souillées d'une grande quantité de protéines et de polypeptides.

a) Purification des nucléotides par la Permutite 50. La Permutite 50, résine polystyrène-sulfonée à caractère acide, fixe les dérivés "basiques" ; en particulier, dans un hydrolysat sodique de ribonucléotides : la soude, l'acide cytidylique et l'acide adénylique. Les acides uridylique, guanylique et phosphorique ne sont pas retenus et constituent la fraction F_1 .

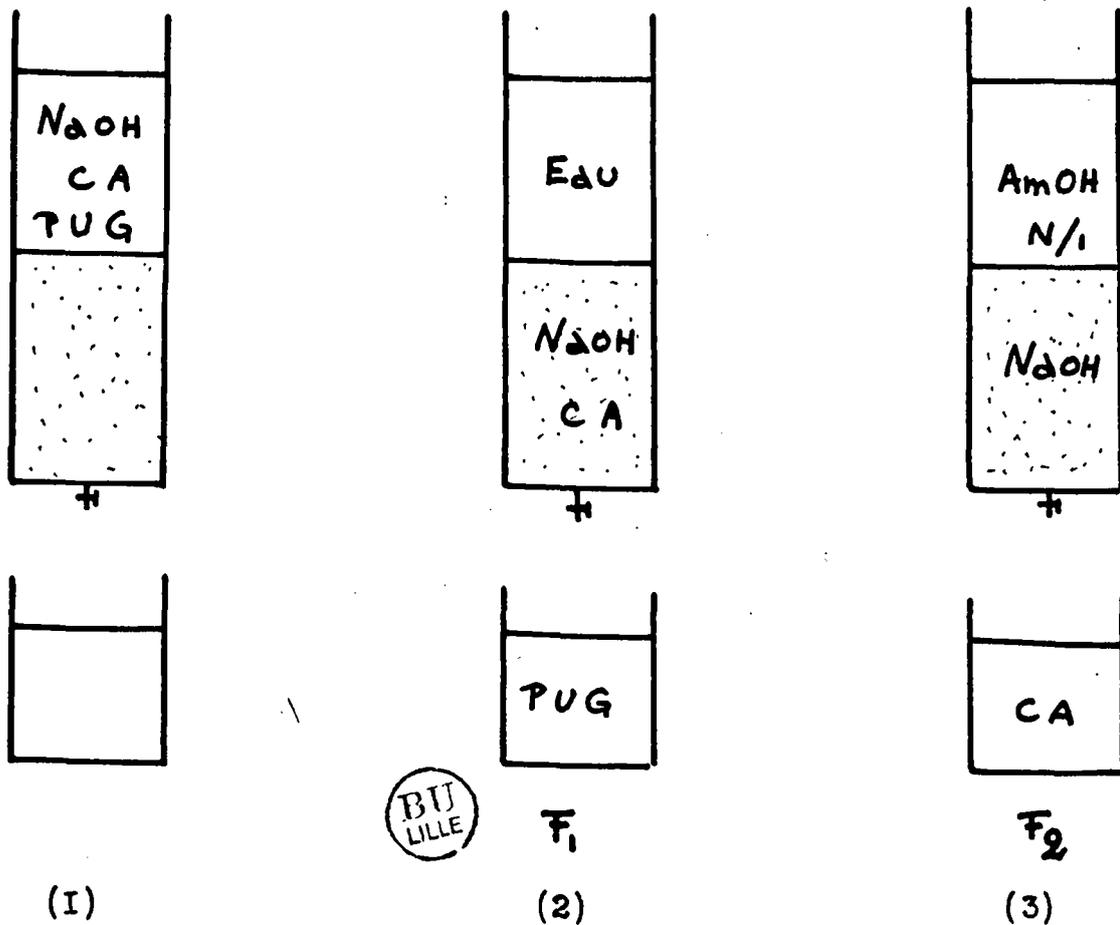
Le développement sélectif des nucléotides retenus par la résine est réalisé avec une solution d'ammoniaque N (fraction F_2). La soude reste fixée par ^{la} Permutite. Il est ensuite aisé de débarrasser les solution d'éluion de l'ammoniaque qu'elles contient en les concentrant sous pression réduite. La récupération des nucléotides est quantitative (voir page 78).

b) - Purification des nucléotides par la Deacidite. La Deacidite 200, résine dont les groupements actifs sont des radicaux azotés : $-NH_2$, $-NH-NH-$, et $-N=N-$, possède un caractère basique et retient tous les nucléotides.

La soude de l'hydrolysat et les produits de clivage des protéines ne sont pas retenus par la résine et sont éliminés par un lavage à l'eau distillée. Le développement sélectif des nucléotides est réalisé en deux temps : a) le passage d'une solution aqueuse d'acide formique à 1 p.cent (en volumes) fournit la fraction F_1 (acides adénylique et cytidylique); b) le passage d'une solution aqueuse d'acide formique à 10 p. cent (en volumes) fournit la fraction F_2 (acides guanilylique, uridylique et phosphorique) (figure 19). Nous nous efforçons de rendre quantitative la récupération des nucléotides. L'utilisation des colonnes de Deacidite, associée à la chromatographie sur papier nous permettra alors d'étudier la composition des acides ribonucléiques tissulaires sans effectuer leur isolement et leur préparation préalable. Il est nécessaire pour obtenir une parfaite purification des nucléotides d'effectuer très lentement le passage des hydrolysats et des solutions d'éluion sur les colonnes de résines. D'autre part, la concentration des différentes fractions obtenues sera réalisée à basse température (40-45°C) et sous pression réduite.

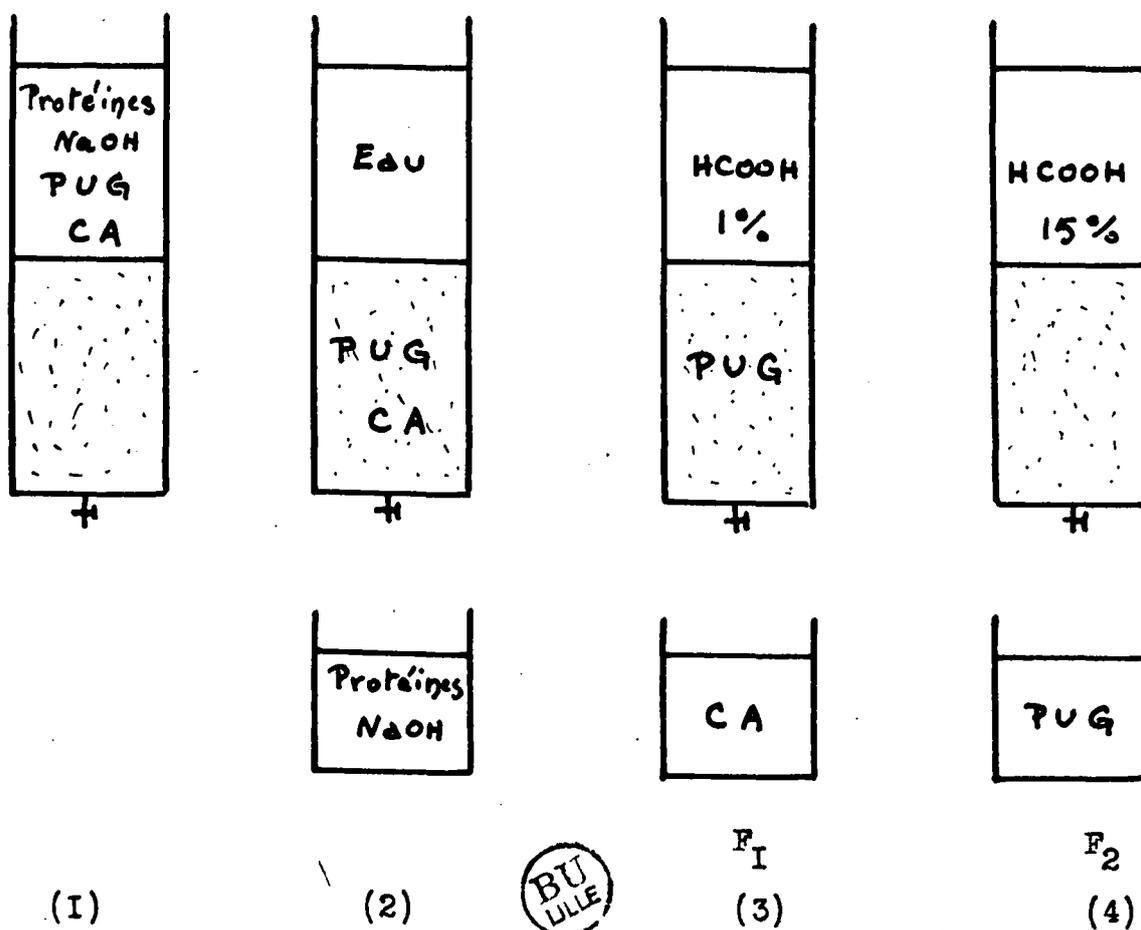
Les diagrammes des figures 15 et 16 illustrent les résultats du passage de solutions nucléotidiques sur les résines Fermitite et Deacidite dont nous venons d'exposer le principe d'utilisation, nous réservant de préciser les détails techniques dans les chapitres ultérieurs.

Figure I5

Schéma de l'utilisation de la Permutite 50

- (1) passage d'un hydrolysate sodique d'acide ribonucléique purifié.
- (2) lavage à l'eau de la résine. Obtention de la fraction F_1 (P : $\text{PO}_4 \text{H}_3$, U : acide uridylique, G : acide guanylique)
- (3) développement par l'ammoniaque N/1 . Obtention de la fraction F_2 (C : acide cytidylique, A : acide adénylique)

Figure I6

Schéma de l'utilisation de Deacidite 200

- (1) passage d'un hydrolysate sodique de tissu
- (2) lavage à l'eau : élimination de la soude et des protéines
- (3) développement par l'acide formique à 1% : obtention de la fraction F_I (acides cytidylique et adénylique)
- (4) développement par l'acide formique à 15% : obtention de la fraction F₂ (acides phosphorique, uridylique et guanylique).

II - COMPOSITION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES DE LEVURE ET DE PANCREAS (109).

Notre technique d'analyse des acides ribonucléiques comporte les phases suivantes :

- a) hydrolyse alcaline de l'acide nucléique en nucléotides;
- b) élimination de l'agent d'hydrolyse ;
- c) chromatographie unidimensionnelle des quatre nucléotides suivant le mode opératoire précédemment décrit ;
- d) détermination quantitative des nucléotides isolés par microdosage du phosphore nucléotidiques.

Hydrolyse alcaline des acides pentose-nucléique.

La résolution quantitative des acides pentose-nucléiques en mononucléotides peut être réalisée soit par une hydrolyse ammoniacale que nous avons mise au point, soit par une hydrolyse sodique suivant la technique de STEUDEL (110).

1° - Hydrolyse ammoniacale. - Pour préparer les ribomononucléotides, LEVENE (111) soumet les acides nucléiques à l'action de l'ammoniaque à 25 p.100 dans un autoclave à 115°C pendant une heure. Nous avons constaté qu'à cette température, même avec des concentrations ammoniacales inférieures, des quantités importantes d'acide phosphorique sont libérées. Par contre, l'hydrolyse par l'ammoniaque concentrée pendant 10 jours à la température du laboratoire (CALVERY et JONES (112)) reste partielle et libère incomplètement les mononucléotides.

Après avoir vérifié avec des nucléotides purs qu'il ne donnait lieu ni à une déphosphorylation des nucléotides ni à une désamination des nucléotides aminés, nous avons adopté le mode opératoire suivant : l'acide ribonucléique est hydrolysé en tube scellé à 45°C pendant 8 jours par une solution d'ammoniaque concentrée ($D^e = 0,925$) ajoutée dans la proportion de 1 ml pour 0,01 à 0,05 g. d'acide ribonucléique. L'hydrolysate est évaporé à siccité dans le vide et le résidu sec, exempt d'ammoniaque, est repris par une quantité d'eau telle que la concentration finale soit de 2 à 3 grammes pour cent de nucléotides totaux.

Les chromatogrammes sont réalisés avec des quantités de 10 à 15 μ l de cette solution, correspondant à environ 50 μ g de chacun des nucléotides.

2° - Hydrolyse sodique . - L'hydrolyse des acides ribonucléiques par la soude N ou N.2 à température ordinaire ou 37°C est totale en 24 heures (II3).

Nous avons vérifié que dans de telles conditions l'action de la soude ne libérait pas d'acide phosphorique et ne provoquait pas de désamination. L'avantage de ce mode d'hydrolyse est d'être plus rapide. Cependant, l'utilisation pour la chromatographie d'une solution sodique entraîne une mauvaise séparation des nucléotides ; des traînées se forment et les déterminations du phosphore nucléotidique sont faussées. Il est donc indispensable de priver l'hydrolysate des ions Na^+ qu'il contient en le faisant passer sur une

colonne de Permutite 50 dont nous avons exposé le principe d'utilisation.

L'hydrolysate est dilué à un volume de 50 ml et passe très lentement à travers la colonne de résine, de façon à recueillir 0,5 ml de liquide effluent par minute. La résine est ensuite lavée à l'eau distillée ; on joint les eaux de lavage au liquide précédent (fraction F_1). Les nucléotides retenus par la résine sont élués par 250 à 300 ml d'une solution d'ammoniaque N (fraction F_2). Le fractionnement sur Permutite 50 n'est pas rigoureux et de l'acide cytidylique est souvent présent dans la fraction F_1 . Aussi, nous réunissons généralement les deux fractions F_1 et F_2 qui sont concentrées sous pression réduite à 40-45°C, puis évaporées à siccité dans le vide. Le tableau XIV montre que le passage des nucléotides sur une colonne de Permutite 50 n'entraîne pas de perte de phosphore nucléotidique.

Tableau XIV

n°	Phosphore contenu dans : 10 ml de l'hydrolysate initial	P récupéré ($F_1 + F_2$)	Erreur p.100
1	22,7 mg	23 mg	+ 1,32
2	21,6 mg	21,2 mg	- 1,85

Séparation chromatographique et dosage des ribonucléotides.

La séparation chromatographique unidimensionnelle des ribonucléotides obtenus par hydrolyse ammoniacale ou sodique des acides nucléiques est réalisée dans le système-solvant : phénol-isopropanol-acide formique-eau (85;5:10:100)

selon le mode opératoire que nous avons décrit, et leur dosage est effectué (fig.I2). Nous avons appliqué notre technique à l'étude des acides ribonucléiques de Levure et du Pancréas de boeuf.

A - Acide ribonucléique de Levure (II4).

Notre étude a porté sur des échantillons commerciaux d'acides ribonucléiques de Levure, souillés d'acide désoxy-pentose-nucléique et donnant une réaction du biuret positive. Nous les avons purifiés selon le procédé décrit par SEVAG (II5) en mettant à profit le gel que forment par agitation les protéines avec le chloroforme, gel que l'on élimine par centrifugation. Ainsi purifiés, les acides nucléiques se présentent sous l'aspect d'une poudre blanche et leurs caractéristiques sont résumées dans le tableau XV

Tableau XV

n°	P p.100	N p.100	Rapport N/P	Phosphore hydrolysa- ble par les acides dilués (phosphore purique) (+)	Rapport <u>Purines</u> <u>Pyrimidines</u>
1	8	14,35	1,79	54,5	1,2
2	9,08	-	-	54,4	1,19

(+) La libération du phosphore purique est réalisée par une hydrolyse par HCL à 100°C en tube scellé pendant une heure.

I° - Identification des constituants de l'acide ribonucléique de Levure. -

a - Glucide. - L'acide nucléique est hydrolysé partiellement par $\text{SO}_4 \text{H}_2 \text{N}$ en tube scellé pendant une heure à 100°C . L'hydrolysats est purifié par passage sur une colonne de Deacidite. Il est ensuite chromatographié dans le système-solvant butanol-acide acétique-eau (40 : 10 : 50). Une tache principale révélée par le réactif à l'oxalate d'aniline de FARTRIDGE (116) correspond exactement au R_F du D-ribose. On note en outre deux taches secondaires très faibles correspondant aux R_F du xylose et de l'arabinose ; mais, eu égard à la quantité infime de glucides que les taches représentent, on peut penser que ces pentoses proviennent d'une épimérisation du ribose au cours de l'hydrolyse. Il faut cependant remarquer que l'action de l'acide sulfurique dilué n'hydrolyse que les nucléotides puriques dont les bases libérées : la guanine et l'adénine, non retenues par la Deacidite, peuvent être mises en évidence par chromatographie dans la même solution qui contient le ribose. Le passage d'une solution aqueuse d'acide formique à 10 p.cent déplace de la résine les deux nucléotides pyrimidiques que nous avons caractérisés en chromatographiant la fraction d'élution, préalablement concentrée sous pression réduite.

b - Nucléotides. - Les chromatographies unidimensionnelles et bidimensionnelles montrent la présence de quatre nucléotides distincts dont les R_F correspondent à ceux des acides uridylique, guanylique, cytidylique et adénylique (figures I2 et I3). Cependant, afin de définir avec certitude la nature de ces différents composés, nous les avons soumis, après séparation par chromatographie unidimensionnelle et élution consecutive suivant la technique de DENT (II7), qui permet l'isolement de plusieurs milligrammes de substance, à une identification chimique et spectrographique.

Les résidus d'évaporation des éluats correspondant à chacun des nucléotides sont hydrolysés par l'acide chlorhydrique concentré à 120°C pendant 2 heures (HOTCHKISS (II8)); le résidu d'évaporation sous vide, débarrassé de l'acide chlorhydrique, est chromatographié dans le système solvant butanol-acide acétique-eau (40:10:50) qui conduit à une parfaite séparation des bases puriques et pyrimidiques (cf tableau I). L'hydrolyse de chacun des nucléotides isolé a fourni la base correspondante.

Les spectres d'absorption des nucléotides dans l'ultraviolet ont confirmé les indications fournies par les essais précédents et ont achevé l'identification certaine des nucléotides constituant l'acide ribonucléique de Levure. Les déterminations spectrographiques ont été effectuées sur des éluats de chromatogrammes unidimensionnels, évaporés à siccité puis repris dans un volume déterminé de tampon phosphatique M/I de

pH 7,0.

Les résultats que nous avons obtenus (tableau XVI) sont en accord avec ceux de CHARGAFF et coll. (119) et de FLOESER et LORING (120) et les spectres ainsi obtenus sont superposables aux spectres fournis par les substances-témoins pures.

Tableau XVI

AUTEURS	Longueur d'onde d'absorption maxima en angströms			
	acide Guanylique	Acide Adénylique	Acide Cytidylique	Acide Uridylique
CHARGAFF et coll. (I)	2.540	2.590	2.700	2.620
FLOESER et LORING (I)	-	-	2.700	2.620
Chiffres personnels (2)	2.550	2.590	2.700	2.620

(I) Chiffres obtenus avec des nucléotides purs.
 (2) Chiffres obtenus avec des éluats

L'acide ribonucléique de Levure est donc constitué exclusivement de 4 nucléotides : les acides guanylique, uridylique, cytidylique et adénylique, et le dosage de chacun de ces nucléotides nous a permis de préciser sa composition (tableaux XVII et XVIII). On remarquera que les chiffres trouvés sont identiques quel que soit le mode d'hydrolyse.

Tableau XVII

Répartition des nucléotides dans des acides ribonucléiques de Levure, exprimée en nombre de molécules de P nucléotidique pour 100 molécules de P ribonucléique initial (I2I).

Acide nucléique n°	Type d'hydrolyse	Acide guanylique	Acide uridylique	Acide adénylique	Acide cytidylique	Purines p.100 (+)	Rapport $\frac{\text{Purines}}{\text{Pyrimidines}}$
1	sodique	30	27	24,2	18,8	54,2	1,18
	ammoniacale	30	26,6	24,8	18,8	54,8	1,21
2	sodique	26,6	22,5	29,2	21,7	55,8	1,26
	ammoniacale	25,5	22,7	29,7	21,9	55,2	1,23

(+) Ces chiffres sont confirmés par les résultats de l'hydrolyse acide partielle (voir tableau XV)

Tableau XVIII

Proportions moléculaires des nucléotides dans l'acide ribonucléique de Levure (I22)

Types d'hydrolyses	ARN n°	Acide Guanylique	Acide Uridylique	Acide Adénylique	Acide Cytidylique
sodique	1	1,59	1,44	1,29	1
ammoniacale		1,59	1,40	1,32	1
sodique	2	1,32	1,04	1,34	1
ammoniacale		1,17	1,04	1,35	1

Le tableau XIX montre que la récupération des nucléotides est quantitative et que la somme du phosphore nucléotidique correspond au phosphore ribonucléique initial

Tableau XIX

Phosphore nucléotidique exprimé en μg pour 15 μl

Expériences:	Hydrolyse:	P : Initial	P : Guany- lique	P : Uridy- lique	P : Adény- lique	P : Cytidy- lique	P : Récupéré	Erreur :p.100
1	Ammoniacale	16,8	5	4,6	4,3	3,2	17,1	+1,8
2	Sodique	22,7	6,8	6	5,4	4	22,2	-2,2

B - Acide ribonucléique du pancréas de Boeuf

L'acide ribonucléique a été préparé à partir de la ribonucléoprotéine du pancréas de Boeuf extraite suivant la technique de JORPES (124).

1° - Préparation de la ribonucléoprotéine du Pancréas. -

1.000 g. de glandes broyées sont traitées pendant 3 heures à -4°C par une solution de chlorure de sodium à 10 p. cent. Après filtration, on ajoute à la solution obtenue 1,5 volume d'alcool à 95 p. cent. Le précipité est séparé au bout de 24 heures puis on le laisse macérer 10 à 14 jours dans de l'alcool à 80 p. cent. Le précipité est alors porté à l'ébullition dans une solution de chlorure de sodium à 10 p. cent et filtré. A la solution on ajoute 2 volumes d'alcool à 95 p. cent. Le précipité obtenu constitue la nucléoprotéine.

La ribonucléoprotéine du Pancréas contient 12,9 p.cent. d'azote et 7,10 g. p.100 de phosphore, dont 2 g. de phosphore ribonucléique. Elle est souillée d'acide désoxypentose-nucléique.

Les clichés d'électrophorèse montrent qu'elle n'est pas homogène et révèlent la présence d'au moins deux constituants

2° - Préparation de l'acide ribonucléique du Pancréas. -

La nucléoprotéine est dissoute dans l'eau et on ajoute à la solution obtenue 1/4 de son volume d'une solution d'acétate de baryum à pH 6,6. Le précipité barytique lavé est traité ~~par l'acide~~ par l'acide chlorhydrique dilué. L'acide nucléique libéré est ensuite dissous par addition de soude dans 50 ml. d'eau. On ajoute à cette solution 1.000 ml. d'acide acétique. L'acide ribonucléique précipite; on le recueille sur un filtre de Büchner, on le lave à l'alcool et on le sèche.

3° - Composition de l'acide ribonucléique du Pancréas. -

La composition de l'acide ribonucléique du Pancréas, soumis à l'hydrolyse sodique, est rapportée dans le tableau XX.

Tableau XX

Composition de l'acide ribonucléique
du Pancréas de Boeuf

Expression des résultats	Acide Guanylique	Acide Cytidylique	Acide Adénylique	Acide Uridylique	Furines p.100	<u>Furines</u> Pyrimidines
p.100 du P initial	49,1	21,2	21,2	8,2		
Proportions moléculaires	6	2,8	2,6	1	70,4	2,38

4° - Composition de la protéine de la ribonucléoprotéine du Pancréas. - La nucléoprotéine est hydrolysée par l'acide chlorhydrique 6 N en tube scellé à 100°C pendant 36 heures. Après centrifugation, l'hydrolysat est passé sur une colonne de Permutite 50 qui retient les acides aminés que l'on développe ensuite par le passage d'une solution d'ammoniaque N. La solution obtenue est soumise à une séparation chromatographique bi-dimensionnelle. Les acides aminés suivants ont été mis en évidence : en forte proportion : acide aspartique, acide glutamique, sérine, glycocholate, alanine, valine, méthionine, lysine, - en proportion moyenne : leucine, arginine, - en faible proportion : thréonine, tyrosine, phénylalanine, proline, histidine, méthionine-sulfone.

C - Conclusions

La présence dans les acides ribonucléiques de quatre nucléotides différents ressort de nos analyses chromatographiques. Après les recherches de KOWALEVSKY (125) et de JONES et PERKINS (126), tendant à prouver que l'acide uridylique se formait au cours des hydrolyses par désamination de l'acide cytidylique, un doute avait plané sur son existence réelle au sein des molécules d'acide nucléique. Malgré des résultats positifs ultérieurs, DAVIDSON et RAYMOND (127) posaient récemment encore la question de savoir si l'acide uridylique était un constituant de l'acide ribonucléique du foie in vivo. Certains auteurs avançaient que l'acide uridylique se for-

mait au cours de l'extraction des acides nucléiques par une désamination de l'acide cytidylique sous l'action de désaminases cellulaires. Nous sommes en mesure d'affirmer avec certitude que l'acide uridylique est bien un constituant normal des acides ribonucléiques ; en effet, les agents d'hydrolyse que nous utilisons ne désaminent pas l'acide cytidylique ; d'autre part, les taux d'acide uridylique obtenus par deux modes d'hydrolyse différents sont remarquablement identiques pour un même échantillon; enfin, son existence in vivo sera prouvée plus loin par la détermination de sa radioactivité, différente de celle de l'acide cytidylique, et par sa présence dans des acides nucléiques étudiés dans des tissus "fixés" par l'acide trichloracétique.

Les chiffres des tableaux XVII, XVIII et XX montrent que la structure de la molécule d'acide nucléique n'est pas conforme au schéma "isonucléotidique" classique. La comparaison des constitutions des acides pentose-nucléiques de Levure et de Pancréas fait apparaître les différences frappantes qui existent entre les deux types d'acides. Les acides nucléiques végétaux paraissent caractérisés par un taux d'acide cytidylique inférieur à celui des autres nucléotides, tandis que les acides ribonucléiques animaux renferment un taux d'acide uridylique très bas. Ainsi se précisent des modalités de structure des acides nucléiques suivant leur origine.

Il faut cependant noter que la constitution d'un acide nucléique d'origine déterminée varie parfois (voir tableaux XVII

et XVIII). Nous pensons que l'action des agents d'extraction des acides nucléiques ou la présence de ribonucléase peut dans certains cas amorcer leur hydrolyse. C'est pour cette raison que nous essayons de mettre au point une technique d'analyse des acides nucléiques tissulaires sans procéder à l'isolement et à la purification préalables de l'acide nucléique.

III - STRUCTURE DES ACIDES NUCLEIQUES

Mise en évidence de différents types de liaisons internu- cléotidiques

Au cours de la mise au point de notre technique d'hydrolyse ammoniacale, ignorant du temps nécessaire à la réalisation d'une hydrolyse totale de l'acide ribonucléique, nous avons été amené à étudier la cinétique de l'action de l'ammoniaque et nous fûmes fort surpris de constater que les différents nucléotides étaient libérés avec des vitesses très variables suivant leur nature. Nous pensions encore, après avoir déterminé la composition des acides nucléiques, que les nucléotides pouvaient s'unir pour former une longue chaîne régulière, mais l'observation que nous venons de relater nous fit soupçonner une structure beaucoup plus complexe dont nous sommes en mesure de préciser quelques aspects. Nous apportons dans notre démonstration 3 sortes d'arguments fournis :

- a' par l'étude de la cinétique d'action des agents d'hydrolyse chimique alcalins;
- b' par l'étude de l'hydrolyse ribonucléasique;
- c' par l'étude de la répartition du phosphore isotopique dans les molécules d'acides ribonucléiques.

A - Etude cinétique des hydrolyses alcalines et ribonucléasi- ques (128)

1° - Action de l'ammoniaque. - 5 g. d'acide ribonucléique de

Levure sont dissous dans 100 ml d'une solution d'ammoniaque concentrée ($D^e = 0,925$). La solution est répartie dans des tubes scellés par fractions de 5 ml, puis maintenue à la température de 45°C . Les tubes sont prélevés à des temps variables échelonnés entre 30 minutes et 8 jours. La solution est évaporée à siccité dans le vide. Le résidu est repris par l'eau et à la solution obtenue, amenée à pH 2,5 par l'addition d'acide formique, on ajoute un volume égal d'alcool absolu. Le précipité, représentant la fraction ribonucléique non hydrolysée, est éliminé par centrifugation. Le liquide surnageant est évaporé à siccité dans le vide. Les résidus secs correspondant aux différents stades de l'hydrolyse sont repris par un même volume d'eau distillée et chromatographiés. Après révélation du chromatogramme, on observe que l'acide uridylique se détache le premier de la molécule d'acide nucléique, puis apparaissent les autres nucléotides, mais les taches correspondant aux nucléotides pyrimidiques s'intensifient beaucoup plus rapidement que les taches des nucléotides puriques, libérés plus lentement.

2° - Action de la soude. - 5 g. d'acide ribonucléique de Levure sont dissous dans 100 ml. de soude N°2. Des prélèvements de 5 ml. sont effectués à des temps échelonnés entre 1 minute et 24 heures. Aux hydrolysats, amenés à pH 2,5 par l'addition d'acide formique, est ajouté 1 volume d'alcool absolu. Le précipité est éliminé par centrifugation et la solution surnageante est débarrassée des ions Na^+ par passa-

ge sur une colonne de Fermutite 50 suivant le mode opératoire précédemment décrit. Après concentration des solutions de développement, les hydrolysats sont chromatographiés et l'on observe, comme dans l'hydrolyse ammoniacale, une libération préférentielle des nucléotides pyrimidiques.

3° - Action de la ribonucléase. - Les travaux de LÖRING (129) de SCHMIDT (130), de KERR (131) concernant l'action de la ribonucléase sur les acides ribonucléiques révèlent des différences sensibles de stabilité entre les nucléotides puriques d'une part, et les nucléotides pyrimidiques, d'autre part. Ces auteurs ont établi que les mononucléotides libérés par l'action de l'enzyme étaient principalement des nucléotides pyrimidiques et que l'hydrolyse incomplète par la ribonucléase laissait une fraction enrichie en nucléotides puriques. Ainsi est née la notion d'un "noyau" purique au sein de la molécule d'acide ribonucléique.

L'utilisation de notre technique de chromatographie nous a permis d'étudier la cinétique de l'action de la ribonucléase sur les acides nucléiques : 600 mg. de ribonucléate d'ammonium purifié sont dissous dans 25 ml. d'eau distillée. La solution obtenue amenée à pH 7,5 et additionnée de 6 mg. de ribonucléase cristallisée, est mise à incuber à 37°C. A des temps déterminés, variant entre 30 minutes et 24 heures, des prélèvements sont effectués. On amène l'hydrolysats à pH 2,5 par addition d'acide formique et on y ajoute 1 volume d'alcool absolu. Le précipité obtenu est éliminé par centrifugation et la solution surnageante, contenant des mononucléotides et des oligonucléotides, est soumise à la séparation chromatographique.

En suivant le clivage de la molécule, on voit apparaître sur le chromatogramme d'abord l'acide uridylique. On observe ensuite l'accroissement rapide des taches correspondant aux nucléotides pyrimidiques, tandis que les nucléotides puriques se détachent plus tardivement et plus lentement. Quand l'action de la ribonucléase est terminée, le chromatogramme des nucléotides libres montre des taches intenses de nucléotides pyrimidiques, et des taches nettement plus faibles de nucléotides puriques. Mais le chromatogramme de l'hydrolysât sodique du "noyau" est inversé. Nous rapportons dans le tableau XXI la répartition du phosphore nucléotidique dans l'acide ribonucléique initial, dans le mélange des nucléotides libérés et dans le "noyau".

Tableau XXI

	Proportions moléculaires			
	:Acide Uridy- :lique:	:Acide Cytidy- :lique:	:Acide Adény- :lique:	:Acide Guanylique
Acide ribonucléique initial:	1.44	1	1,3	1,6
Nucléotides libérés	4	2	2	1
Nucléotides constituant le "noyau" précipité à pH 2,3	1	1	4	5

L'étude des produits de l'hydrolyse ménagée des acides ribonucléiques par la soude; par l'ammoniaque ou par la ribo-nucléase conduit donc à des résultats identiques : d'une part certains nucléotides occupent des positions particulières dans la molécule d'acide ribonucléique ; d'autre part, les liaisons des nucléotides entre eux sont inégalement stables, celles des nucléotides pyrimidiques paraissant les plus labiles.

B - Nucléotides à ^{32}P

"Mobilité" du phosphore nucléotidique (I32)

Il nous a paru intéressant de préciser, grâce au phosphore radioactif, si les acides ribonucléiques des cellules vivantes possédaient également des liaisons inégalement labiles. Il était en effet logique de penser que l'intégration du phosphore radioactif serait plus rapide dans le radical phosphoryle d'un nucléotide "mobile" que dans celui d'un nucléotide appartenant à des fractions plus stables de la molécule. La difficulté et la longueur des opérations d'isolement et de purification des acides nucléiques nous ont amené à mettre au point une technique de séparation par chromatographie sur papier des ribonucléotides radioactifs obtenus par hydrolyse directe du tissu sans isoler au préalable l'acide nucléique. La "vie" de l'élément radioactif que nous utilisons est en effet très courte ; sa période est d'environ 15 jours. Il

était donc indispensable d'effectuer l'ensemble des opérations dans un temps suffisamment bref pour que les radioactivités restent mesurables.

Choix de la dose de P_{32} à injecter. - Nous avons vérifié dans un premier temps que la radioactivité spécifique des nucléotides était proportionnelle à la quantité de phosphore isotopique injectée. Nos résultats sont rassemblés dans le tableau XXII et illustrés par la courbe de la figure 17.

Tableau XXII

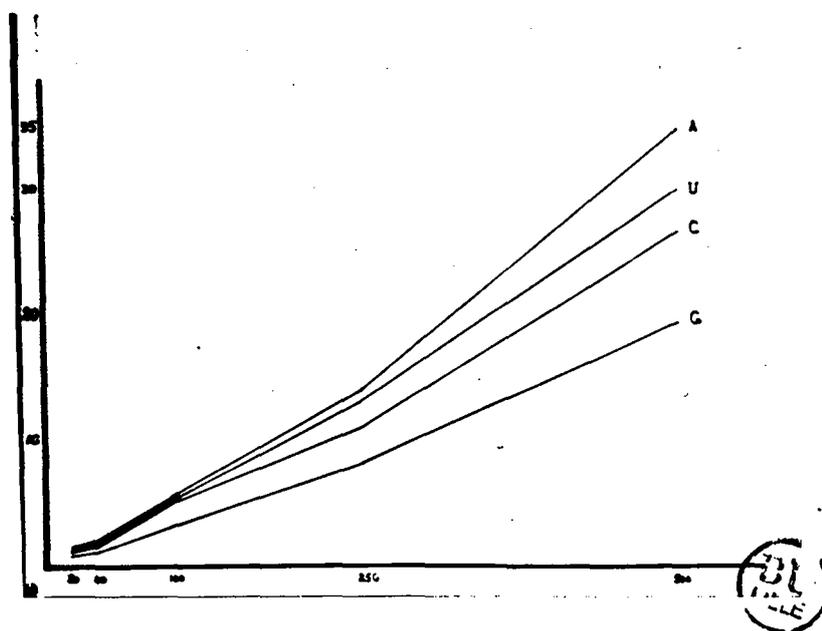
Quantité de ^{32}P injectée par 100 g. d'animal, en μC	20	40	100	250	500
Radioactivité spécifique en coups - minute par mg. de F. (prélèvement 2 h. après l'injection)					
:Ac. Adénylique	1.611	2.124	5.616	13.847	34.161
:Ac. Uridylique	1.394	1.823	5.308	12.993	29.516
:Ac. Cytidylique	1.303	1.628	5.075	10.865	26.188
:Ac. Guanylique	877	1.196	3.255	8.116	19.113

Pour obtenir la précision maxima dans nos mesures de radioactivité nous administrons une dose relativement élevée de ^{32}P : 250 μC pour 100 g. d'animal.

1° - Cinétique de l'échange du phosphore radioactif dans les ribonucléotides du foie de Rat

Mode Opératoire. - Des rats de 200 g. sont injectés par

Figure 17



Abcisses : Quantité de ^{32}P injectée par 100 g. d'animal, en μC .

Ordonnées : Radioactivité spécifique en milliers de coups-minute par mg. de phosphore

A : acide adénylique

U : acide uridylique

C : acide cytidylique

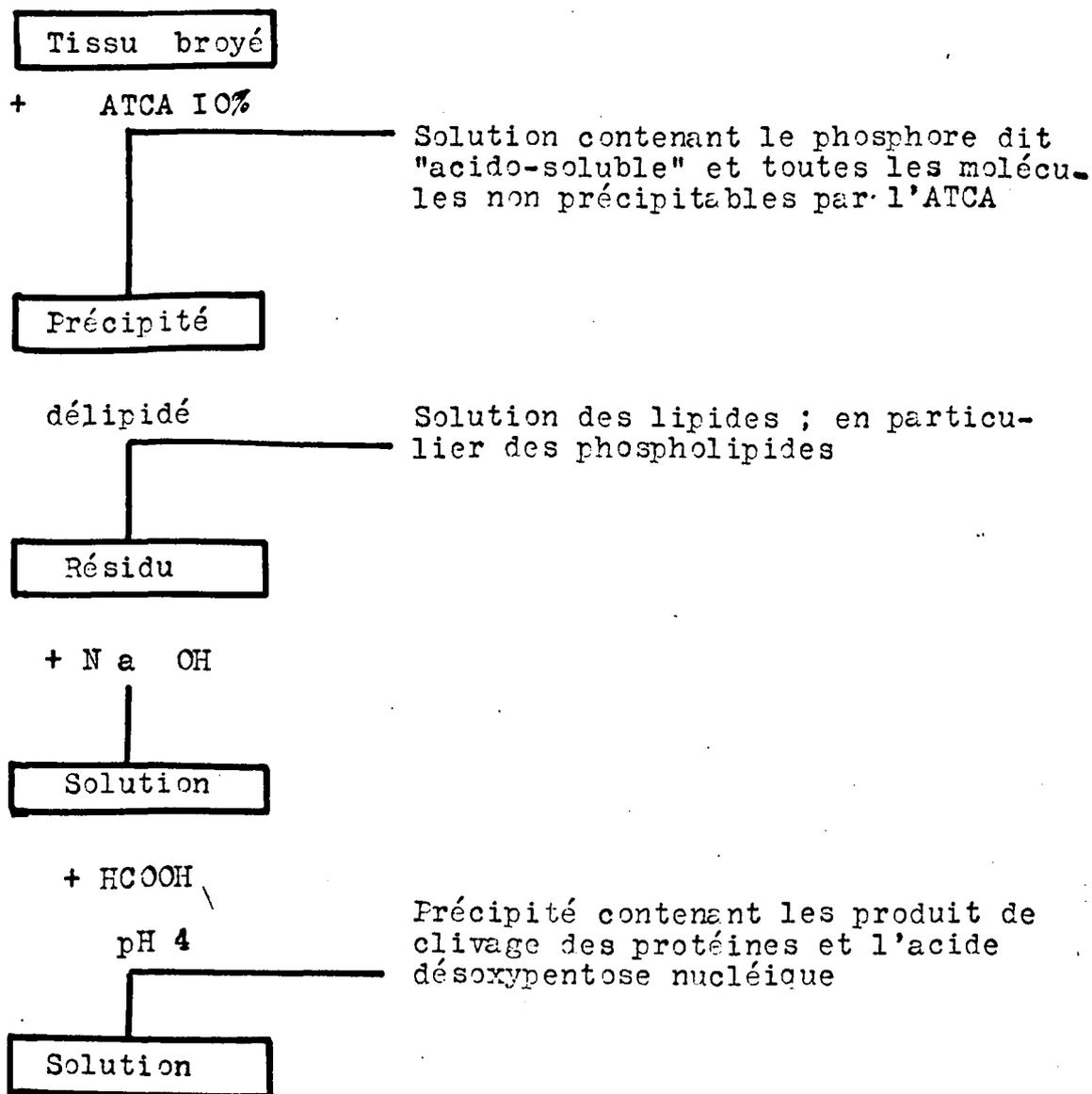
G : acide guanlylique

voie intrapéritonéale et sacrifiés à des temps variant entre 15 minutes et 10 jours. Les foies sont rapidement prélevés, broyés puis homogénéisés 3 fois dans une solution aqueuse d'acide trichloracétique à 10 g. pour 100 ml. à l'aide d'un homogénéiseur du type POTTER et ELVEHJEM (133), constitué par une masselotte en acier inoxydable tournant rapidement dans un cylindre creux de même métal (Figure 18). Le précipité, lavé trois fois par ~~un mélange~~ alcool absolu froid, est ensuite délipidé trois fois par un mélange alcool-éther (v:v) bouillant. Enfin, on hydrolyse par la soude N°2 (60 ml pour 2 foies de rat) à 37°C pendant 18 heures. La solution refroidie est amenée à pH 4,0-4,2 par l'addition d'acide formique concentré. Après un repos d'une heure, le précipité, constitué par l'acide désoxypentose-nucléique et par les produits d'hydrolyse sodique des protéines, est éliminé par centrifugation. Le diagramme de la page 98 résume les opérations que nous venons de décrire. La solution surnageante, amenée à un volume de 100 ml, est passée lentement sur une colonne de Deacidite. Nous avons exposé à la page 70 le principe de l'utilisation de cette résine et nous préciserons à présent le mode opératoire permettant la purification des nucléotides : un lavage par 500 ml d'eau distillée élimine les ions Na^+ et la majeure partie des substances d'origine protéique. Le développement sélectif par 400 ml d'une solution d'acide formique à 1 p.100 fournit une fraction F_1 contenant les acides adénylique et cytidylique. Ensuite le passage de 1.000 ml d'acide formique à 15 p.100 fournit une fraction F_2 qui comporte,

Figure 18



Homogénéiseur.



Contenant : $\text{PO}_4 \text{ H}_3$ des phosphoprotéines

4 ribonucléotides

substances X

Quelques produits de clivage des protéines.

Na OH

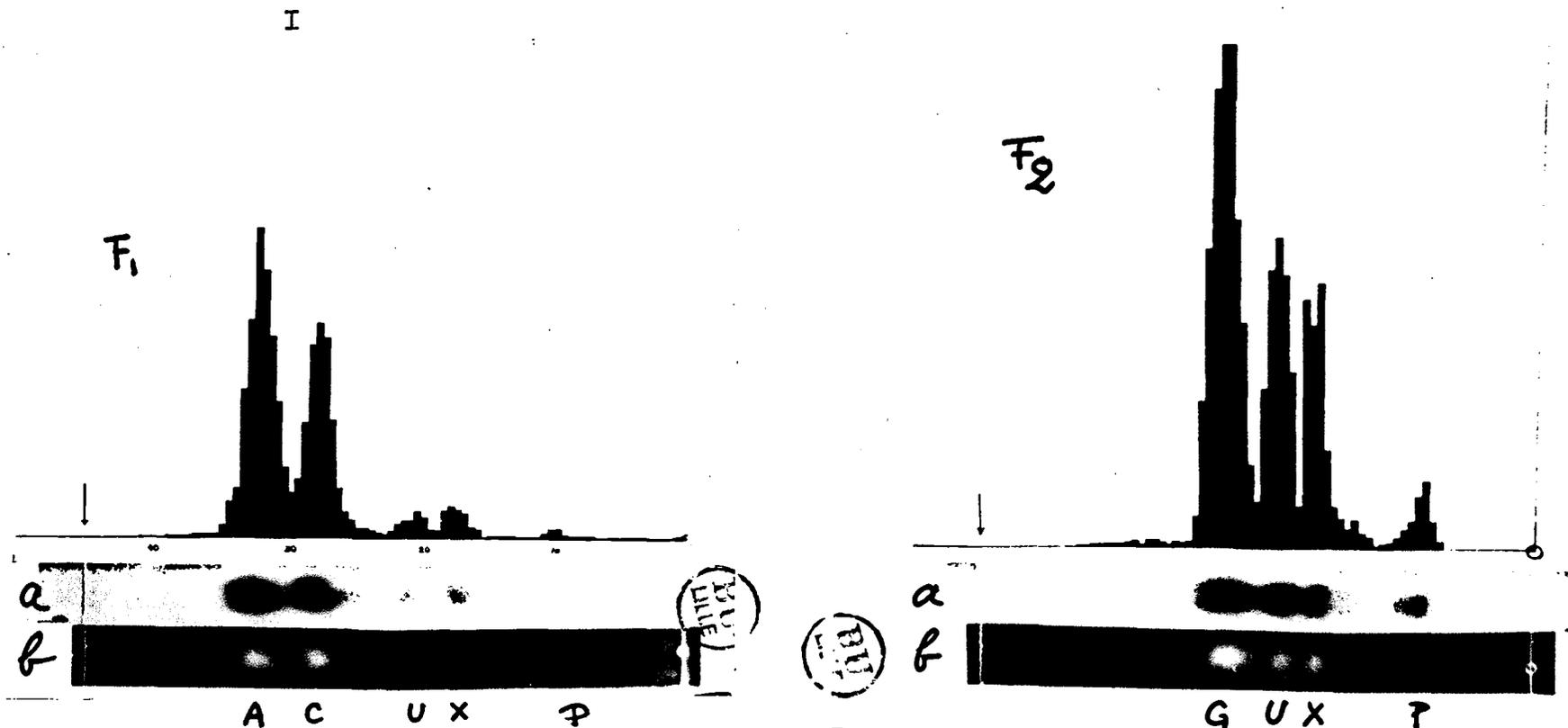
L'élimination de NaOH et des protéines, puis le fractionnement sont effectués sur colonne de Deacidite 200 selon le schéma de la page 75.

outre les acides phosphorique, uridylique et guanylique, une ou plusieurs substances X contenant de l'acide phosphorique et dont l'identification est en cours (figure I9).

Les fractions sont concentrées séparément sous pression réduite à 40-45°C, puis évaporées à siccité dans le vide. Les résidus secs de chacune des fractions sont repris avec 1 à 2 ml d'eau ammoniacale à 25 p.100. Après centrifugation, 6 à 12 μ l des solutions obtenues sont soumis à la séparation chromatographique.

Autoradiogrammes (figure I9). - Pour vérifier l'absence de composés autres que ceux que relève le réactif de HANES et ISHERWOOD, nous avons effectué des autoradiographies de nos chromatogrammes en les appliquant sur un film Kodak Super XX pendant 1 mois, chaque tache "émettant" initialement environ 2.000 coups minute. En outre, nous avons mesuré la radioactivité de bandes de 5 mm. découpées successivement depuis le "spot" de départ jusqu'au "front" atteint par le solvant. En traçant les courbes correspondant aux radioactivités mesurées, on obtient une série de "pics" dont chacun correspond à un composé phosphoré radioactif (figure I9). Nous avons pu ainsi vérifier la valeur de notre technique de séparation chromatographique : en effet les taches sont nettement individualisées et aucune perte de phosphore ne se produit dans le courant de la chromatographie, ce qui se traduirait par une "trainée" prenant naissance au "spot" de départ.

FIGURE I9



Courbes de la répartition de la radioactivité (^{32}P) dans des chromatogrammes d'un hydrolysate d'acide ribonucléique du foie de rat purifié sur Déacidite 200.

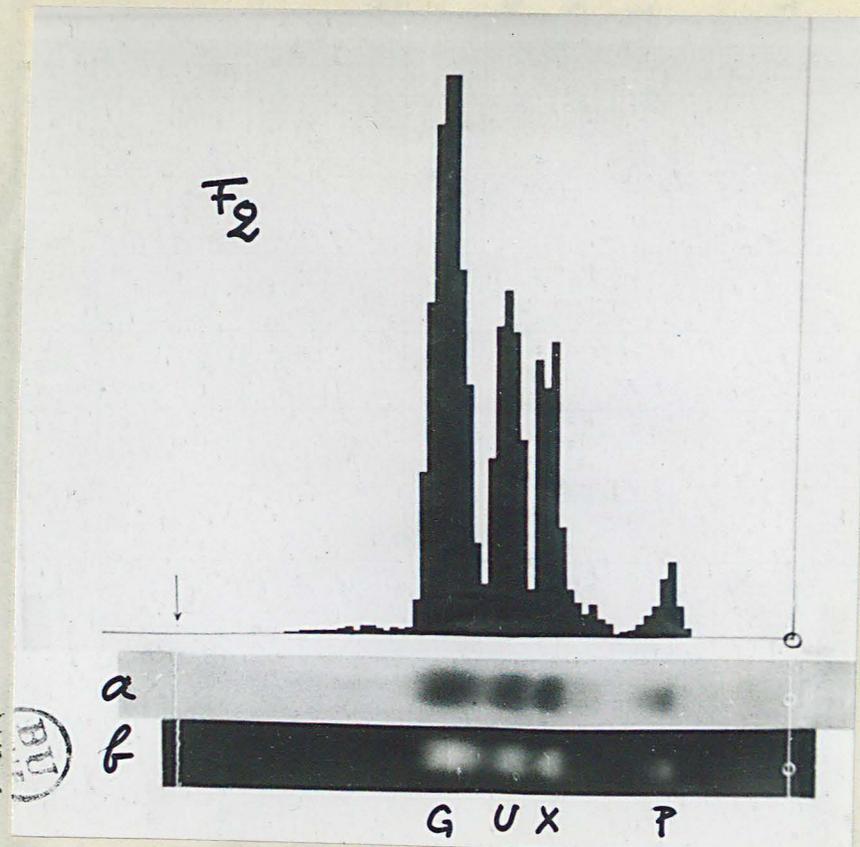
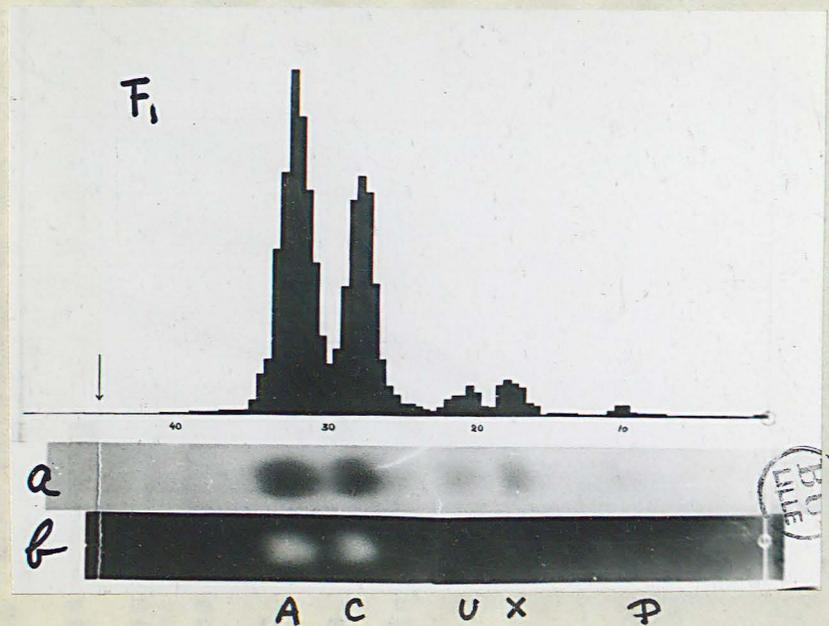
I: fraction F_1 , fraction F_2

En abscisses: distances en cm auxquelles ont été effectuées les mesures de radioactivité;

En ordonnées: nombre de coups-minute.

Au dessous des courbes, autoradiogrammes de chacune des fractions; a: négatif, b: positif.

FIGURE I9



Courbes de la répartition de la radioactivité (^{32}P) dans des chromatogrammes d'un hydrolysât d'acide ribonucléique du foie de rat purifié sur Déacidite 200.

I: fraction F_1 , fraction F_2

En abscisses: distances en cm auxquelles ont été effectuées les mesures de radioactivité;

En ordonnées: nombre de coups-minute.

Au dessous des courbes, autoradiogrammes de chacune des fractions; a: négatif, b: positif.

Résultats. - Nous avons déterminé la radioactivité directement sur des rondelles découpées à l'emporte-pièce dans le milieu des taches correspondant à chacun des nucléotides. Après microdosage du phosphore nucléotidique, la radioactivité spécifique, définie par le rapport $\frac{^{32}\text{P}}{^{31}\text{P}}$, est calculée et exprimée en coups-minutes par milligrammes de phosphore. Nous avons rassemblé nos résultats dans le tableau XXIII

Tableau XXIII

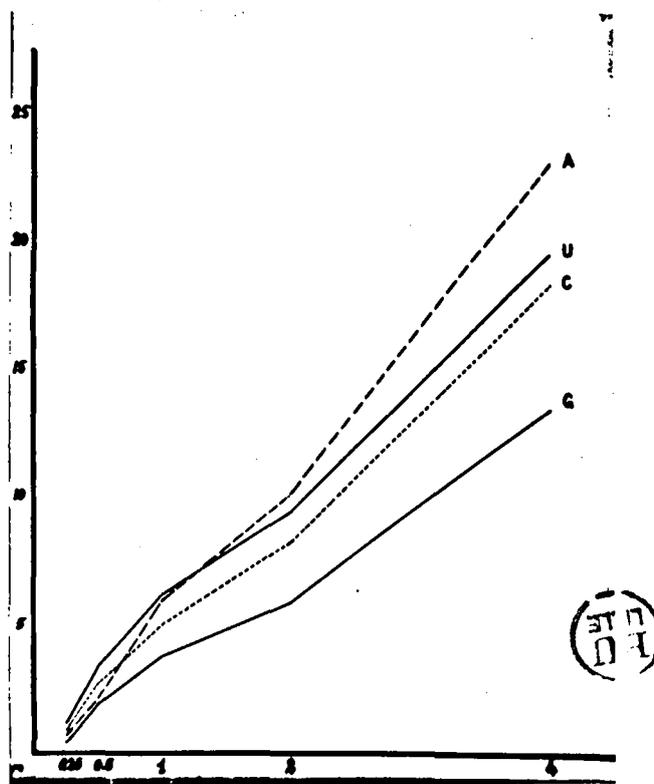
Radio-activités spécifiques (en coups-minutes par mg de phosphore)

Temps écoulé après l'injection de P^{32}	15 min.	30 min.	1h.	2 h.	4 h.	24 h.	2 j.	5 j.	6 j.	8 j.	10 j.
Acide Uridylique	1.100	3.350	6.150	9.280	19.300	38.400	63.300	72.100	78.700	45.600	42.270
Acide Cytidylique	830	2.680	4.980	8.120	18.040	28.500	65.300	78.900	84.800	50.000	41.900
Acide Adénylique	697	2.117	5.945	10.010	22.820	41.300	64.800	79.800	84.300	48.200	41.600
Acide Guanylique	375	1.950	3.770	5.820	13.350	27.400	64.800	76.400	84.400	49.000	43.700

La figure 20 reproduit la partie la plus caractéristique de la cinétique, celle qui va de 15 minutes à 4 heures.

Dans les 30 premières minutes, l'échange porte principalement sur les nucléotides pyrimidiques et plus spécialement sur l'acide uridylique; puis au bout de 2 heures, la radioactivité de l'acide adénylique rattrape et dépasse celle des autres nucléotides. Jusqu'à la 24^{ème} heure l'acide guanylique

Figure 20



Courbe de l'échange du radiophosphore en fonction du temps dans le radical phosphoryle des ribonucléotides du foie de Rat.

En abscisses : temps en heures ;

En ordonnées : radioactivités spécifiques en milliers de coups-minutes par mg. de phosphore.

demeure le nucléotide le moins radioactif. A partir du second jour les radio-activités s'égalisent, croissent jusqu'au 6ème jour, puis diminuent lentement.

Nos constatations s'écartent de celles de MARSHAK (134) et de VOLKIN et CARTER (135) : ces auteurs ne trouvent pas de différences sensibles entre les radio-activités spécifiques des différents ribonucléotides, ce qui tient sans doute à leur mode opératoire (MARSHAK n'observe pas non plus de variations sensibles dans le temps). Par contre, des résultats superposables ont été obtenus par SMELLIE et DAVIDSON (136) après séparation des nucléotides par électrophorèse sur papier ; mais leurs mesures n'ont porté que sur des foies prélevés 2 heures après l'injection.

Conclusions. - Cette étude relève le comportement spécial de l'acide guanylique, dont le radical phosphoryle apparaît le moins labile. Ainsi s'affirme la notion d'un "noyau" purique et plus spécialement "guanylique", qu'avait déjà mise en évidence l'étude des hydrolyses chimiques et enzymatiques des acides ribonucléiques. La grande labilité des liaisons des nucléotides pyrimidiques est confirmée par la mobilité plus grande de leur radical phosphoryle. Plus particulièrement la grande vitesse d'échange de l'acide uridylique confirme sa position "externe" dans la molécule d'acide ribonucléique telle que la représente le schéma de KAGASANIK et CHARGAFF (voir page 58).

**2 - Mobilité du phosphore des
isomères a et b des nucléotides**

Il était intéressant d'étudier la vitesse d'incorporation du ^{32}P dans les isomères a et b, découverts par COHN et par CARTER (dont nous avons précédemment exposé les travaux), non seulement pour affirmer la notion de l'existence de liaisons de stabilités différentes entre les divers nucléotides, mais aussi pour tenter de préciser la nature exacte de ces isomères. Nous avons séparé les isomères a et b par chromatographie sur papier en utilisant le solvant de MARKHAM et SMITH (137), constitué par le mélange d'une solution saturée de sulfate d'ammonium, d'alcool isopropylique et d'eau (79 : 2 : 19). Le tableau XXII reproduit les résultats des mesures de radioactivités spécifiques des isomères.

Tableau XXII

Isomères	R_F	Radioactivité spécifiques en coups-minutes par mg. de P (2 h. après l'injection)
Acide adénylique (a	: 0,25	: 10.675
) (b	: 0,16	: 8.170
Acide guanylique (a	: 0,50	: 4.700
) (b	: 0,40	: 2.715

Cependant cette théorie n'explique pas les différences entre les radioactivités des deux isomères constitués à partir du même radical phosphoryle.

Il faudrait donc admettre : a) ou bien que les nucléosides 2' et 3'-phosphate préexistent dans la molécule d'acide nucléique; b) ou bien qu'ils se forment au cours de l'hydrolyse, suivant la liaison ester sur laquelle porte cette hydrolyse. Les schémas XVIII et XIX montrent que suivant le point d'attaque on a un isomère 2' ou 3' dont les radicaux phosphoryles ont des origines différentes :

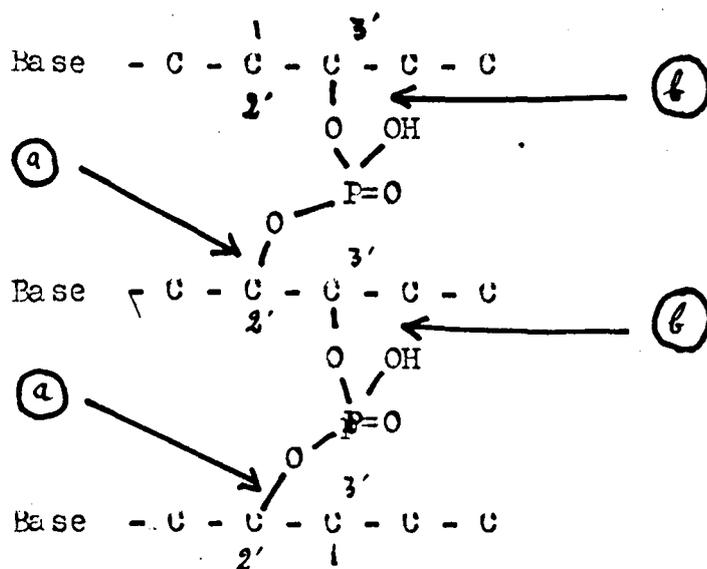
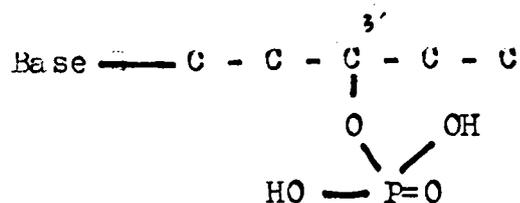


Schéma XVIII

L'hydrolyse en (a) donne un nucléotide 3' :



L'hydrolyse en (b) donne un nucléotide 2' dont le groupe-
ment phosphoryle est différent du premier

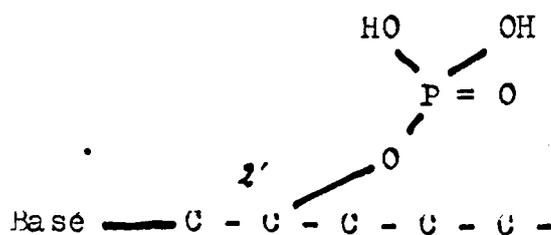


Schéma XIX

Conclusion

Il est maintenant bien établi que les différents acides ribonucléiques contiennent, selon leur origine, des proportions très variables des différents nucléotides. En outre, des constatations expérimentales d'une concordance remarquable, - résultats de l'hydrolyse partielle in vitro des acides ribonucléiques et de la cinétique de l'échange du ^{32}P , - sont en faveur d'une structure ramifiée dont les schémas de MAGASANIK et CHARGAFF donnent des exemples : sur une chaîne principale, où prédominent des nucléotides puriques et surtout l'acide guanylique, se grefferaient des chaînes latérales dont la longueur ne peut encore être précisée, et qui seraient formées d'une proportion importante de nucléotides pyrimidiques. Nos résultats sont d'autre part favorables à l'existence de plusieurs types de liaisons inter-nucléotidiques de stabilités inégales : la comparaison des isomères a et b est à cet égard très démonstrative.

Ainsi, l'hypothèse d'une macromolécule ribonucléique constituée par une chaîne linéaire unique formée de la répétition uniforme d'un tétranucléotide doit être abandonnée. Faut-il pour autant jeter la pierre à ceux qui l'avaient édiflée sur des bases expérimentales trop fragiles ?

"..... En faisant des hypothèses, et même des hypothèses très hardies, pour tenter d'expliquer ce qu'il est donné d'observer,

on ne sort nullement de la Science. Puissants instruments de travail, ces hypothèses provisoires que sont les théories permettent seules au chercheur de formuler de façon précise les questions qu'il doit poser à la Nature".

Il n'en reste pas moins que nos prédécesseurs ont laissé entre nos mains les instruments qui nous permettront peut-être de résoudre l'un des problèmes fondamentaux de la Biochimie. Nous le devons à la perfection des techniques analytiques de LEVENE, de GULLAND, de HAMMARSTEN, de BREDERECK, de JONES. Ces auteurs ont isolé, identifié, synthétisé tous les éléments constituant la molécule d'acide nucléique ; s'ils n'ont pu éclaircir les modalités de leur enchaînement, il n'en reste pas moins qu'ils ont réalisé le travail le plus difficile, grâce auquel nous pourrons franchir des étapes nouvelles. A leur oeuvre s'applique parfaitement la phrase de PASCAL :

"Les premières connaissances que les anciens nous ont données ont servi de degré aux nôtres, et dans ces avantages nous leur sommes redevables de l'ascendant que nous avons sur eux; parce que s'étant élevés jusqu'à un certain degré où ils nous ont portés, le moindre effort nous fait monter plus haut, et, avec moins de peine et moins de gloire, nous nous trouvons au-dessus d'eux. C'est de là que nous pouvons découvrir des choses qu'il leur était impossible d'apercevoir".

BIBLIOGRAPHIE

- ALLEN R.J.L. Biochem. J. 34 858 (1940) (105)
- ALTMANN R. Archiv. Anat. Physiol. 524 (1889) (2)
- ASTBURY W.T. Symp. Soc. Exp. Biol. I 66 (1947) (22)
- BARKER G.R., FARRAN K.R., GULLAND J.M.
J.Chem. Soc. 2I (1947) (8)
- BARKER G.R., GULLAND J.M. J. Chem. Soc. 525 (1943) (8)
- BEALE R.N., HARRIS R.J.C., ROE E.M.F.,
J.Chem. Soc. 288 1397 (1950) (66)
- BOULANGER P., BISERTE G. Exp. Ann. Bioch. Med. II 53 (1950)
(43)
- BOULANGER P., MONTREUIL J., Bull. Soc. Chim. Biol. 33 784-791
(53-54-84-97-98-99-100-104-106-107-109-114-
121-122)
- BOULANGER P., MONTREUIL J., MASSE L. C.R.Ac. Sc. 232 1256 (1951)
234 565 (1951) (93-95-108-128-132)
- BOULANGER P., MONTREUIL J., Bioch. Bioph. Acta (1952) 132
sous presse
- BRACHET J. Enzymologia 10 87 (1941) Arch. Biol 53 207 (1941)
(57)
- BREDERECK H., HOEFTNER E. Bre. 75 1086 (1942) (20)
- BREDERECK H., MARTINI A., RICHTER F.
Ber. Chem. Ges. 74 338, 694 (1941) (12-65)
- CALVERY H.O., JONES W. J.Biol. Chem. 73⁷³ (1927) (112)
- CARTER C.E. J.Am. Chem. Soc. 72 1466 (1950) (15-97)
- CARTER C.E., COHN W.E., Feder. Proc. 8 190 (1949) J.Am Chem.
Soc. 72 2604 (1950) (15-80)
- CASPERSSON T. Naturwiss. 29 33 (1941) (4)
- CASPERSSON T., BRANDT K. Protoplasma 3 507 (1941) (4)
- CASPERSSON T., Nyström C., SANTESSON L. Naturwiss 29 29 (1941)
(4)

- CASPERSSON T., SCHULTZ J. Nature 143 602 (1939) (4)
- CHARGAFF E., Experientia 6 201 (1950) (9-62-88)
- CHARGAFF E., MAGASANIK B., DONIGER R., VISCHER E.,
J. Am. Chem. Soc. 71 1513 (1949) (83-85-88)
- CHARGAFF E., VISCHER E., MAGASANIK B., GREEN C., DONIGER R., ELSON D
J. Biol. Chem. 186 51 (1950) (57-83-85-88-89)
- CHARGAFF E., VISCHER E., Ann. Rev. Biochem. 17 201 (1948) (6)
- CLAUDE A. Science 90 213 (1939) (37)
- COHN W.E. Science 109 377 (1949) J. Am. Chem. Soc. 72 1471
1811 (1950) J. cell. Comp. Physiol. 38 21 (1951)
(15-90).
- COHN W.E., VOLKIN E. Nature 167 483 (1951) (14-92)
- Cold Spring Harbour Symposium on Quantitative Biology 12 (1947) (6)
- DAVIDSON J.N. Edin. Med. J. 52 344 (1945) (6)
Ann. Rev. Biochem. 18 155 (1949) (6)
Methuen's Monographs on biochemical subjects (1950)
(13-25)
- DAVIDSON J.N., Mc Indoe W.M., SMELLIE R.M.S.
Biochem J. XXXVI (1951) (136)
- DAVIDSON J.N., RAYMOND W. Biochem. J. 43 XXIX (1948) (127)
- DAVIDSON J.N., WAYMOUTH C.
Nutrition Abs. and Rev. 14 1 (1944-5) (6)
- DENT C.E., Biochem. J. 43 169 (1948) (117)
- FEULGEN R., Z. Physiol. Chem. 106 249 (1919) 108 147 (1919-20) (38)
- FLETCHNER W.F., GULLAND J.M., JORDAN D.O.
J. Chem. Soc. 33 (1944) (19)
- GRAF S., MACULLA A., J. Biol. Chem. 110 71 (1935) (30)
- GREENSTEIN J.P., Adv. Prot. Chem. 1 210 (1944) (6)
- GULLAND J.M., J. Chem. Soc. 1722 (1938) 208 (1944) (6)
- GULLAND J.M., BARKER G.R., JORDAN D.O.
Ann. Rev. Biochem. 14 175 (1945) (6)

- GULLAND J.M., SMITH H. J.Chem. Soc. 338 (1947) (21)
- HAMMARSTEN O. J.Biol. Chem. 43 243 (1920) (39)
- HANES C.S., ISHERWOOD F.A. Nature 164 1107 (1949) (103)
- HEVESY G., Adv. in Biol. and Med. Physics I 409 (1948) (6)
- HOLIDAY E.R., JOHNSON E.A. Nature 163 216 (1949) (71)
- HOTCHKISS R. J.Biol. Chem. 175 315 (1948) (44-48-II8)
- JONES W. The nucleic acids (Longmans, GREEN and Co, London (1920) (6)
- JONES W. Amer. J. Physiol. 52 203 (1920) (10)
- JONES W., PERKINS M.E., J. Biol. Chem 62 291 (1924-25) (126)
- JORGES E. ~~Rixxhem~~ Acta Med. Scand. 68 503 (1928) (124)
 Biochem. ~~xxxxx~~ J. 28 2102 (1934) (40)
 in Bamann E. et Myrbäck K. Die Methoden der Ferment
 forschung, Leipzig (1941) p. 1090 (26)
- KALCKAR H.M. J.Biol. Chem. 167 429, 445 (1947) (33)
- KERR S.E., SERAIDARIAN K., WARGON M. J.Biol. Chem. 180 761-773
 (1949) (37-41-131)
- KERR S.E., WARGON M. SERAIDARIAN K. Abst. I° Cong. Int. Bioch.
 Cambridge p. 625 (1949) (37-41)
- KOSSEL A. Arch. Anat. Physiol; Physiol. Abt 181 (1891) (3)
- KOWALEVSKY K. Z.Physiol. Chem. 69 240 (1910) (125)
- KRUGER M., SMID J. Z.Physiol. Chem. 45 I (1905) (29)
- KUNITZ M. J.gen. Physiol. 24 15 (1940) (11)
- LEHMANN-ECHTERNACHT H. Ztschr. Phys. Chem. 269 201 (1941) (18)
- LEVENE P.A. J.Biol. Chem 33 425 (1918) 40 415 (1919) (III).
- LEVENE P.A., BASS L.W. J.Biol. Chem. 53 441 (1922) (31)
- LEVENE P.A., BASS L.W., Nucleic Acids, A.C.S. Monograph n° 56,
 (1931) (6)
- LEVENE P.A., HARRIS S.A. J.Biol. Chem 98 9 (1932)

- LEVENE P.A., JACOBS W.A. Ber.dtsch. Chem. Ges 42 2102, 2469,
2474, 2703 (1909) (7)
- LEVENE P.A., SIMMS H.S., J.Biol. Chem. 70 332 (1926) (16)
- LORING H.S., CARPENTIER F.H., ROLL F.M.
J.Biol. Chem. 169 601 (1947) (23-129)
- MAGASANIK B., CHARGAFF E. Biol. Biophys. Acta 7 396 (1951) (94-
95)
- MAGASANIK B., VISCHER E., DOMIGER R., ELSON D., CHARGAFF E.
J. Biol. Chem. 186 37 (1950) (83-85-88-119)
- MARKHAM R.? SMITH J.D. Nature 163 250 (1949) (72-102)
Biochem J. 45 XXXII (1949) (70)
45 294 (1949) (52-72-75-102)
46 513 (1950) (72)
49 401 (1951) (74-80-82-86-137)
- (138)
- MARSHAK A. Am. J. of Physiol 163 (34) (1950) (59-64)
Biol. Bull. 99 332 (1950) (59-61-63)
J.Biol. Chem. 189 607 (1951) (59-61)
- MARSHAK A., VOGEL H.J. Feder. Proc. 9 85 (1950) (59-61)
- MERRIFIELD R.B., DUFFY M.S. Arch. Biochem 16 339, 341 (1948)
J.Biol. Chem. 186 331 (1950) (35-42)
- MIESCHER F. Hoppe Seyler's Med-Chem. Untersuch 441, 502 (1871)
Die histochemischen und physiologischen arbeiten Leipzig
(1897) (1)
- MIRSKY A.E., Adv. in Enzymol. 3 1 (1943) (6)
- MONTREUIL J., BOHLINGER P., C.R. Ac. Sc. 231 247 (1950) (97-107)
- PARTRIDGE S.M. Partition chromatography. Bioch. Soc. Symposia
3 (1949) (116)
- FLOESER V.R., ELVEHJEM C.A. J.Biol. Chem. 178 431 (1949) (120)
- POTTER V.R. ELVEHJEM C.A. J.Biol. Chem. 114 495 (1936) (135)
- RUSSO G. Boll. Soc. Ital. Biol. sper. 2 177 (1927) (34)
- SALKOWSKI E., Arch. Ges. Physiol. 69 268 (1897-98) (27)
- SCHLENK F. Adv. in Enzymol. 9 455 (1949) (6)
- SCHMIDT G. Z.physiol. Chem. 219 191 (1933) (32) Ann. Rev. Biochem
19 149 (1950) (6)
- SCHMIDT G. CUBILES R., SWARTZ B. THAMMHAUSER S.J. J. Biol. Chem.
170 759 (1947) (24-30)

- Schmidt G., LEVENE P.A. J. Biol. Chem. 126 423 (1938)
- SCHNEIDER W.C. J. Biol. Chem. 161 293 (1945) (60)
- SEVAG M.G., LAKMANN D.B., SMOLENS J.
J. Biol. Chem. 124 425 (1938) (115)
- SHEMIN, SPRUOL, JOBLING J. Exp. Med. 72 697 (1940) (68)
- SMELLIE R.M.S., DAVIDSON J.M., Biochem J. 49 XV (195D) (136)
- SMITH J.D., MARKHAM R., Biochem. J. 46 509 (1950)(70-71-81-100)
- SMITH J.D., WYATT G.R., Biochem. J. 49 144 (1951) (51-58)
- SOODAK M., PIRCIO A., CERECEDO L.R. J. Biol. Chem. 181 713 (1949)
(36)
- STENDEL H., PEISER E. Z. Physiol. Chem. 120 292 (1922) (69-110-113)
- Symposia of the Society for Experimental Biology 12 (1947) (6)
- TAKAHASHI H. J. Biochem(Tokio) 14 25 (1931)15 19 519329 16 447
(1932) (17)
- TIPSON R.S. Adv. Carbo. Chem. 1 193 (1943) (6)
- VISCHER E., CHARGAFF E. J. Biol. Chem. 168 781 (1947)
Feder. Proc. 7 197 (1948)
J. Biol. Chem. 176 703-715 (1948)
45-46~~47~~-47-49-50-56.
- VISCHER E., MAGASANIK B., CHARGAFF E., Feder. Proc. 8 263 (1949)
(83)
- VOLKIN E., CARTER C.E., J. Am. Chem. Soc. 73 1519 (1951) 135
- WYATT G.R., Nature 166 237 (1950) Biochem. J. 48 581-584 (1951)
(51-58)

SECONDE THESE

PROPOSITIONS DONNEES PAR LA FACULTE :

- 1° - Les gisements et l'origine des phosphates sédimentaires
- 2° - Les virus végétaux.

Vu et approuvé;

LILLE, le

Le Doyen

H. LEFEVRE.