So.376
1967
6

UNIVERSITE DE LILLE
FACULTE DES SCIENCES

50376
1967
6

MEMOIRE PRESENTE
A LA FACULTE DES SCIENCES DE L'UNIVERSITE DE LILLE
POUR L'OBTENTION
DU GRADE DE DOCTEUR-ES-SCIENCES D'ETAT

par
Ram Pratap SINGHAL

RECHERCHES SUR LA COMPOSITION ET LA STRUCTURE PRIMAIRE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES

1° — Etude critique des procédés d'extraction des ARN

2° — Etude des constituants phosphorylés des préparations d'ARN

3° — Description de procédés reproductibles de « finger-printing » des hydrolysats chimiques et enzymatiques des ARN.

4° — Applications biologiques.

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE
Section de SCIENCES
LILLE

Présenté le 29 avril 1967, devant la Commission d'examen :

Président : M. J. MONTREUIL

Assesseurs : MM. E. SEGARD (Rapporteur) et J. GUILLAUME

Membres invités : MM. P. BOULANGER et F. GROS

U N I V E R S I T E D E L I L L E

FACULTE DES SCIENCES.

DOYENS HONORAIRES :

MM. PRUVOST, LEFEBVRE, PARREAU

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. ARNOULT, BEGHIN, CAU, CHAPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DE HEUVELS, DEHORNE, DOLLE, FLEURY, GERMAIN, KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG, MM. MAZET, MICHEL, NORMANT, PARISELLE, PASCAL, PAUTHENIER, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, WIEMANN, ZAMANSKY, KAMPE DE FERIET.

DOYEN :

Monsieur TILLIEU, Professeur de Physique

ASSESSEURS :

MM.	DURCHON	Professeur de Zoologie
	HEUBEL	Professeur de Chimie Minérale

PROFESSEURS :

MM.	BACCHUS	Astronomie, Calcul Numérique
	BECART	Physique
	BERKER	Mécanique des Fluides
	BLOCH	Psychophysiologie
	BONNEMAN-BEMIA	Chimie et Physio-Chimie Industrielles
	BONTE	Géologie Appliquée
	BOUGHON	Mathématiques
	BOUISSET	Physiologie Animale
	BOURIQUET	Botanique
	CELET	Géologie
	CORSIN	Paleubotanique

MM.	DECUYPER	Mathématiques
	DEDEKER	Professeur associé de Mathématiques
	DEFRETIN	Biologie Marine
	DEHORS	Physique Industrielle
	DELATTRE	Géologie
	DELEAU	Géologie
	DELHAYE	Chimie Minérale
	DESCOMBES	Calcul différentiel et intégral
	FOURET	Physique
	GABILLARD	Radioélectricité et Electronique
	GLACET	Chimie
	GONTIER	Mécanique des Fluides
	HEIM DE BALZAC	Zoologie
	HOCQUETTE	Botanique Générale et Appliquée
	LEBEGUE	Botanique
Mme	LEBEGUE	Physique
MM.	LEBRUN	Radioélectricité et Electronique
Mlle	LENOBLE	Physique
MM.	LIEBAERT	Radioélectricité
	LINDER	Botanique
	LUCQUIN	Chimie Minérale
	MARION	Chimie
Mlle	MARQUET	Mathématiques
MM.	MARTINOT-LAGARDE	Mécanique des Fluides
	MENESSIER	Géologie
	MONTARIOL	Chimie Minérale Appliquée
	MONTREUIL	Chimie Biologique
	MORIAMEZ	Physique
	PARREAU	Mathématiques
	PEREZ	Physique Expérimentale
	PHAM MAU QUAN	Mécanique Rationnelle et Expérimentale
	POUZET	Calcul numérique
	PROUVOST	Géologie
	SAVARD	Chimie Générale
	SCHALLER	Zoologie
	SCHILTZ	Physique
Mme	SCHWARTZ	Analyse Supérieure
MM.	TRIDOT	Chimie
	VIVIER	Biologie Animale
	WATERLOT	Géologie et Minéralogie
	WERTHEIMER	Physique

MAITRES DE CONFERENCES :

MM.	ATTEIA	Mathématiques
	BEAUFILS	Chimie Générale
	BELLET	Physique
	BLANCHARD	Chimie Organique
	BUILLET	Physique
	BUI TRONG LIEU	Mathématiques
	CHASTRETTE	Chimie Générale Amiens
	CHERRUAULT	Mathématiques
	COMBET	Mathématiques
	CONSTANT	Radioélectricité et Electronique
	DERCOURT	Géologie et Minéralogie
	DEVRAINNE	Chimie Minérale
Mme	DRAN	Chimie Appliquée
MM.	GOUDMAND	Chimie Physique
	GUILLAUME	Botanique
	HENRY	Physique Amiens
	HERZ	Calcul Numérique
	HUARD DE LA MARRE	Calcul Numérique
	JOLY	Zoologie Amiens
	LACOSTE	Botanique
	LAMBERT	Physique Saint Quentin
	MAES	Physique
	METTETAL	Zoologie Amiens
	MOUVIER	Chimie Saint Quentin
	NGUYEN PHONG CHAU	Mathématiques Saint Quentin
	PANET	Electromécanique
	PARSY	Mathématiques Amiens
	RAUZY	Mathématiques
	SAADA	Physique
	SEGARD	Chimie Biologique
	TUDO	Chimie Amiens
	VAILLANT	Mathématiques
	VAZART	Botanique Amiens
	VIDAL	Physique Industrielle

SECRETAIRE GENERAL, ATTACHE PRINCIPAL

Monsieur LEGROS

मेरे माता - पिता

तथा

बड़े भाइयों को

A mes parents

et

à mes frères ainés

A Monsieur Jean MONTREUIL, Professeur de Chimie Biologique à la Faculté des Sciences de Lille ; Chef du Service de Biochimie Cellulaire à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille

Au cours de ces années vous nous avez guidé constamment dans ce travail avec l'enthousiasme communicatif qui vous caractérise et vous nous avez fait l'honneur de nous accorder le soutien de votre vigilante et souriante amitié.

Nous vous exprimons notre profonde gratitude et notre attachement respectueux pour l'accueil que vous nous avez réservé dans votre laboratoire. Ce long séjour dans votre pays restera le meilleur de mes souvenirs.

A Monsieur Emile SEGARD, Maître de Conférences de Chimie Biologique à la Faculté des Sciences de Lille ; Chef du Service de Biochimie Cellulaire du Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille

Vous avez su être non seulement un guide précieux mais encore et surtout un ami discret dans les épreuves qui ont marqué ces années et c'est à vous que je dois ce mémoire. Ainsi votre bonne humeur, votre patience aussi, resteront pour moi la marque du vrai chercheur que vous êtes.

A Monsieur Jean GUILLAUME, Maître de Conférences de Microbiologie à la Faculté des Sciences de Lille ; Chef du Service de Biochimie Bactérienne à l'Institut Pasteur de Lille

A Monsieur Paul BOULANGER, Professeur de Chimie Biologique à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lille, Directeur de l'Institut INSERM de Recherches sur les Protéines de Lille

A Monsieur François GROS, Directeur de Recherches au Centre National de la Recherche Scientifique ; Chef du Service de Physiologie Microbienne à l'Institut de Biologie Physico-chimique de Paris

qui nous ont fait l'honneur d'accepter de juger ces mémoires et que nous remercions très vivement.

Nous exprimons nos plus vifs remerciements :

à Monsieur le Professeur Jules DRIESSENS, Professeur de Cancérologie à la Faculté de Médecine et Directeur de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, qui nous a fait l'honneur de nous recevoir dans son établissement et qui nous a permis de réaliser ce travail. Nous le prions d'accepter le témoignage de notre profonde reconnaissance.

à Monsieur le Professeur Paul BOULANGER, Professeur de Chimie Biologique à la Faculté de Médecine, Directeur de l'Institut des Protéines et Chef du Service de Biochimie Cellulaire de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, pour l'attention qu'il a portée à notre travail et les conseils qu'il nous a prodigués.

à Monsieur le Docteur Velibor KRSMANOVIC, Attaché de Recherches du C.N.R.S. dans le Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille, qui nous a permis de préparer le second mémoire grâce à ses précieux conseils et à son aide efficace. Qu'il trouve ici l'expression de notre sincère gratitude.

à Messieurs Jean-Pierre KERCKAERT et Gérard SAGNIEZ, Assistants à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, pour leur collaboration précieuse, et à Mesdemoiselles Annick BERNIER et Janine CACHERA pour l'aide efficace qu'ils nous ont apportées dans les études concernant l'isolement des acides ribonucléiques.

à tous ceux qui ont contribué directement ou indirectement à la réalisation de ces mémoires et en particulier à Monsieur André GILKQUIN et Mademoiselle Nadine GARET pour le laborieux travail de photographie ; et Madame A. PUVION pour la typographie.

Je remercie chaleureusement tous mes collègues des Laboratoires de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences et de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille pour les entretiens enrichissants auxquels ils se prêtaient avec bonne humeur et pour la sympathie qu'ils m'ont toujours manifestée. Je garderai de cette équipe dynamique à laquelle j'avais la grande joie d'appartenir le meilleur souvenir.

Ce travail a été effectué dans le laboratoire des hétéroprotéides du service de Biochimie Cellulaire de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille (Directeur : Professeur J. DRIESSENS) et dans le service de Chimie Biologique de la Faculté des Sciences de Lille (Professeur J. MONTREUIL).

Il a pu être mené à bien grâce à l'aide de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique à laquelle nous adressons nos plus vifs remerciements.

TABLE DES MATIERES

Pages

INTRODUCTION 1

GENERALITES 4

LES ACIDES RIBONUCLEIQUES 5

I - REPARTITION ET ETAT MOLECULAIRE 6

A) ARN NUCLEAIRES 6

B) ARN DES MITOCHONDRIES 7

C) ARN RIBOSOMAUX 8

D) ARN DE LA SOLUTION CYTOPLASMIQUE 10

II - COMPOSITION CHIMIQUE 11

A) LES PRODUITS D'HYDROLYSE TOTALE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES 11

B) LES PRODUITS D'HYDROLYSE PARTIELLE 12

III - STRUCTURE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES 19

A) STRUCTURE PRIMAIRE : ENCHAINEMENT NUCLEOTIDIQUE 19

1 - Hydrolyse chimique des polynucléotides 20

2 - Hydrolyse enzymatique des polynucléotides 20

B) STRUCTURE SECONDAIRE DES ARN 24

IV - ROLE BIOLOGIQUE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES 27

LES METHODES D'ETUDE PHYSICOCHIMIQUE DES ARN 32

I - LES METHODES D'EXTRACTION DES ARN 32

A) IMPERATIFS TECHNIQUES 34

1 - Conditions de rendement 34

a - Destruction des structures 34

b - Inactivation des enzymes 34

c - Autolyse 35

d - Pertes au cours des purifications 36

2 - Pureté des préparations 36

a - Délipidation des préparations 36
b - Séparation des ADN 38
c - Déprotéinisation 39

3 - Intégrité moléculaire des préparations 41

a - Dénaturation des ARN 41
b - Dégradation des ARN 42

B) METHODES D'EXTRACTION 43

1 - Les Méthodes indirectes 44

a - Procédés d'isolement des ARN par association des ribonucléoprotéines 45
1) Procédé de KERR et SERAIDARIAN 45
2) Procédé de CHARGAFF et coll. 45
3) Procédé de VOLKIN et CARTER 45
4) Procédé de DAVIDSON et SMELLIE 46
5) Procédé de KAY et DOUNCE 46

b - Procédés de préparation des tissus pour l'étude des ARN sans isolement préalable 47

1) Procédé de SCHNEIDER 48
2) Procédé de OGUR et ROSEN 49
3) Procédé de SCHMIDT et THANNHAUSER 51
Extraction acide et élimination de de la fraction acidosoluble 52
Utilisation de l'acide trichloracétique 52
Utilisation de l'acide perchlorique 55
Délipidation 57
Hydrolyse alcaline des ARN 57

2 - Les Méthodes directes 60

a - Méthodes d'extraction des ARN par les détergents 60

b - Méthodes d'extraction par le phénol 61
1) Pureté des extraits phénoliques 64
2) Intégrité moléculaire des ARN obtenus 65
3) Rendement de l'extraction 67

c - Méthodes d'extraction par le chlorhydrate de guanidine 68

II - LES METHODES DE DETERMINATION DE LA COMPOSITION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES 70

A) L'HYDROLYSE TOTALE DES ARN 70

1 - Hydrolyse acide des ARN 70

2 - Hydrolyse alcaline des ARN 72

a - choix de l'alcali 73

Résistance à l'hydrolyse alcaline 75

Stabilité des nucléotides en milieu alcalin 79
1) cas des nucléotides puriques 79
2) cas des nucléotides pyrimidiques 79

Action des alcalis sur les macromolécules accompagnant les ARN 82

3 - Purification des hydrolysats 83

B) SEPARATION DES PRODUITS D'HYDROLYSE 84

1 - Séparation des bases 84

2 - Séparation du mélange des bases puriques et nucléotides pyrimidiques 85

3 - Séparation des nucléotides 86

a - Chromatographie sur résine 86
1) Les échangeurs de cations 86
2) Les échangeurs d'anions 87

b - Chromatographie sur papier 89

c - Procédés divers 92
1) Chromatographie sur les celluloses modifiées 92
2) Chromatographie en couche mince 92
3) Chromatographie en phase gazeuse 94
4) Electrophorèse 94
5) Autophorèse 95

C) METHODES DE DOSAGE DES NUCLEOTIDES 96

1 - Détermination du phosphore nucléotidique 96

2 - Spectrophotométrie dans l'ultra violet 97

3 - Dosage calorimétrique du ribose 98

4 - Détermination de la radioactivité des nucléotides marqués par le phosphore 32 98

T R A V A U X P E R S O N N E L S 100

RECHERCHE D'UNE METHODE GENERALE D'EXTRACTION DES ARN APPLICABLE A L'ETUDE DE LEUR COMPOSITION 101

I - ETUDE CRITIQUE DES METHODES INDIRECTES D'EXTRACTION DES ARN TISSULAIRES 101

A) DESCRIPTION DES TECHNIQUES 101

1 - Procédés d'extraction 102

a - Procédé de préparation selon SCHMIDT et THANNHAUSER, et BOULANGER et MONTREUIL 102

b - Procédé de FLECK et MUNRO 103

2 - Détermination des rendements 103

a - Dosage de phosphore total selon ALLEN 103

b - Spectrophotométrie dans ultraviolet 104

1) "à double longueur d'onde" 104

2) Détermination du "rendement absolu" des extractions 109

3 - Méthodes d'étude de la composition des préparations 112

a - Analyse électrophorétique des hydrolysats 112

1) l'électrophorèse 112

2) le dosage spectrophotométrique 113

3) la radioactivité spécifique des nucléotides 114

b - Analyse chromatographique des extraits 114

c - Séparation électrochromatographique ou "Finger-Printing" 115

B) RESULTATS DE L'ETUDE CRITIQUE DES CONDITIONS D'EXTRACTION DES ARN PAR LES METHODES INDIRECTES 117

1 - Comparaison des méthodes de SCHMIDT et THANNHAUSER et de FLECK et MUNRO 117

2 - Etude critique des différentes étapes de l'extraction selon le procédé de SCHMIDT et THANNHAUSER 120

a - Influence du temps de contact avec l'acide trichloracétique à 10 p 100 120

b - Influence de la concentration en acide trichloracétique 122

c - Comparaison des acides perchlorique et trichloracétique 126

1) Influence des concentrations d'acide perchlorique 126

2) Etude critique de la modification de STEELE et al. 128

3 - Etude de la pureté des extraits obtenus par la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER modifiée 130

a) Analyse des extraits trichloracétiques par chromatographie sur papier dans le système solvant de BOULANGER et MONTREUIL 131

b) Analyse des extraits par électrophorèse en tampon citrate 0,02 M à pH 3,5 135

c) Analyse électrochromatographique des hydrolysats totaux 139

Conclusions 139

II - RECHERCHE D'UNE METHODE DIRECTE D'EXTRACTION DES ARN 143

A) TRAVAUX CONCERNANT LA PREPARATION DES ARN TOTAUX DU FOIE DE RAT PAR LES METHODES D'EXTRACTION PHENOLIQUE 143

1 - Etude du rendement et de la pureté des préparations d'ARN totaux du foie de rat 144

a - Rendement des préparations 145

b - Pureté des extraits phénoliques 145

2 - Etude du partage des ARN entre la phase aqueuse et la phase phénolique 146

Conclusions 147

B) MISE AU POINT D'UNE METHODE GENERALE D'EXTRACTION DES ARN TISSULAIRES, PAR LE CHLORHYDRATE DE GUANIDINE 149

1 - Mode opératoire 149

a - Extraction de l'ARN 149

b - Purification des extraits 150

c - Hydrolyse alcaline des préparations 150

d - Etude du rendement et de la pureté des préparations 151

2 - Etude du rendement en ARN des extraits obtenus par la méthode à la guanidine 151

3 - Etude de la pureté des préparations obtenues par la méthode à la guanidine 153

a - Propriétés optiques des nucléotides constituant les ARN 153

b - Recherche de contaminants phosphorylés non-nucléotidiques dans les préparations 155

c - Etude électrochromatographique de la composition qualitative des extraits fournis par la méthode à la guanidine 157

4 - Contrôle de l'intégrité moléculaire des préparations obtenues par la méthode à la guanidine 162

5 - Discussion des résultats 165

a - Précipitation des ARN 165

b - Dissolution des ARN à partir du précipité 166

c - Isolement des ARN sous forme de leurs sels de potassium 167

Résumé

III - APPLICATION A L'ETUDE COMPARATIVE DE LA COMPOSITION QUANTITATIVE DES ARN NORMAUX ET CANCEREUX 169

1 - Etude de différentes fractions d'ARN d'origine nucléaire 169

2 - Etude comparative de la composition quantitative des ARN du foie total et de l'hépatome ascitique 175

Conclusion 177

ETUDE COMPARATIVE DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES DES ARN NORMAUX ET CANCEREUX 178

I - CHOIX DE LA METHODE D'HYDROLYSE PARTIELLE 178

A) HYDROLYSES CHIMIQUES 179

B) HYDROLYSE PAR LES NUCLEASES 179

1 - Nucléases 180

a - Endonucléases 180

b - Exonucléases 180

2 - Nucléophosphatases 182

3 - Nucléosidases 182

4 - Nucléodésaminases 182

C) DIGESTION ENZYMATIQUE (mode opératoire) 184

II - RECHERCHE D'UNE METHODE D'ANALYSE DES PRODUITS D'HYDROLYSE PARTIELLE 185

A) CHROMATOGRAPHIE PAR ECHANGE D'IONS 185

1 - Chromatographie sur colonnes de résines 185

2 - Chromatographie sur colonnes de cellulose modifiée 185

3 - Chromatographie sur papier à échange d'ions 187

4 - Chromatographie en couche mince de cellulose modifiée 187/bis

5 - Chromatographie sur colonnes de Séphadex 187/bis

B) CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER 189

1 - Chromatographie bidimensionnelle 189

2 - Electrochromatographie ('finger printing') 190

C) MISE AU POINT D'UNE METHODE ELECTROCHROMATOGRAPHIQUE STANDARDISEE 195

1 - Modification de l'électrophorèse 195

2 - Etude de la migration chromatographique 197

Schéma opératoire général 202

III - APPLICATION A L'ETUDE COMPARATIVE DES PRODUITS D'HYDROLYSE PARTIELLE DES ARN NORMAUX ET CANCEREUX 204

A) ETUDE DES PRODUITS D'HYDROLYSE PARTIELLE DES FRACTIONS CYTOPLASMIQUES 204

B) COMPARAISON DES PRODUITS D'HYDROLYSE PARTIELLE D'ARN NORMAUX ET CANCEREUX 213

1 - Comparaison qualitative 213

2 - Comparaison quantitative 218

CONCLUSIONS GENERALES 220

BIBLIOGRAPHIE (1) à (39)

LISTE DES FIGURES (40) à (42)

LISTE DES TABLEAUX (43) à (44).

ABREVIATIONS UTILISEES

A_{260}	absorbance à 260 mμ
A	mélange de l'adénosine 2'- et 3'- phosphates
Å	angström
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine 5'- diphosphate
AMP	adénosine 5'- monophosphate etc.
APC (ou PCA)	acide perchlorique
APG	acide phosphoglycérique
ARN	acide ribonucléique
ARN - m	acide ribonucléique-messager
ARN - n	acide ribonucléique-nucléaire
ARN - r	acide ribonucléique-ribosomal
ARN - s	acide ribonucléique-soluble (de transfert : ARN - t)
ARN - P	taux de phosphore ARN déterminé par la méthode des doubles longueurs d'onde
ATCA	acide trichloracétique
ATP	adénosine 5' - triphosphate etc.
C	mélange de cytidine 2'- et 3' phosphates (*)
°C	degré centigrade
DEAE-cellulose	diéthylaminoéthylcellulose
D.O.mμ	densité optique en millimicron
E. coli	Eschérichia coli
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
fraction pH = 5	précipité du surnageant cytoplasmique par l'acide acétique à pH = 5
g	force de gravité
G	mélange de guanosine 2'- et 3'- phosphates
Guanidine	aminométhanamidine : $NH = C(NH_2)_2$
h	heure
InDP	inositol diphosphate
InMP	inositol monophosphate

4 N	mélange des quatre ribonucléotides (A, C, G et U)
P	phosphore nucléotidique
Pi	phosphore minéral
ε(P)	absorbance molaire à 260 mμ par atome gramme de phosphore et par litre
Σ(P)	somme de l'absorbance à 260 mμ des nucléotides, exprimée en milligrammes de phosphore et corrigée en fonction de la composition centésimale
RNase	ribonucléase pancréatique(ribonucléase I)
S	constant de sédimentation (unité Svedberg)
SDS	sodium dodécyl-sulfate
T	thymine
TEAE-cellulose	triéthylaminoéthyl-cellulose
t/mn	tours par minute (r. p. m.)
tris	2 - amino - 2 (hydroxyméthyl) propane -1, 3- diol ou Tris (hydroxy méthyl) - amino - méthane
U	mélange de l'uracile 2'- et 3'- phosphates (*)
Ψ U	5-ribosyluracile ou acide pseudouridylique
U.V.	lumière ultra-violette
ε	absorbance molaire d'une solution de nucléotide
Bentonite	acide aluminosilicique: $Al_2O_3, (SiO_2)_4 , 2H_2O$.
Dupanol	SDS, acide 1-dodecane sulfonique : $CH_3(CH_2)_{11}SO_3H$.

(*) : dans le cas des hydrolysats ribonucléasiques, il s'agit uniquement du nucléoside 3'- phosphate.

I N T R O D U C T I O N

Nos recherches s'inscrivent dans le cadre des travaux qui se poursuivent, depuis plusieurs années, à l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, sur la physicochimie des acides ribonucléiques. Les biochimistes cancérologues s'attachent, depuis de longues années maintenant, à préciser les causes premières du déclenchement de l'activité mitotique anarchique qui est la grande caractéristique biologique des cellules cancéreuses.

En 1930, WARBURG et coll. (1) formulaient l'hypothèse selon laquelle les tissus cancéreux présentaient une glycolyse plus importante que les tissus normaux ; ils affirmaient, en 1955, que ces propriétés particulières étaient dues à une lésion irréversible, caractéristique de l'état cancéreux. Cette opinion déclencha une somme considérable de recherches sur le métabolisme énergétique des tissus cancéreux. Ces travaux ont permis d'infirmer la théorie de WARBURG ; il semble que la respiration et la glycolyse sont étroitement liées à l'environnement cellulaire et leur augmentation chez les cellules cancéreuses ne sont pas dues à une variation irréversible du métabolisme énergétique ; elles ne sont qu'une conséquence de l'hyperactivité mitotique. La fréquence des mitoses nécessite une plus grande quantité d'énergie nécessaire aux synthèses qui les déclenchent. Les travaux entrepris depuis plus de 15 années sur la biochimie de la mitose ont permis de démontrer une relation étroite entre la division cellulaire et la biosynthèse protéique. Toutes les cellules qui se divisent activement, et les cellules cancéreuses en particulier, présentent une activation très nette de leurs synthèses protéiques. La Biologie moléculaire a établi les relations cytoplasmiques qui unissent les protéines

aux acides nucléiques ; elles peuvent se ramener au schéma, maintenant traditionnel,

ADN ⟶ ARN ⟶ Protéines ⟶ Mitoses.

La synthèse des protéines spécifiques est dirigée par les ARN (synthétisés au niveau des ADN), en faisant intervenir un mécanisme de complémentarité moléculaire que nous préciserons plus loin. En outre les réactions de synthèse sont contrôlées par un processus de régulation enzymatique, encore mal connu. On envisage actuellement deux hypothèses pour expliquer la cancérisation : le processus mitotique anarchique serait déclenché 1) par un trouble du mécanisme de régulation des synthèses de protéines, ou bien 2) par l'apparition de protéines anormales synthétisées par suite de la présence de molécules d'ARN anormales, d'origine endogène (mutation) ou exogène (virus).

Notre travail, qui se limite aux cas des ARN, constitue une tentative de démonstration chimique de la deuxième hypothèse. Nous avons cherché à caractériser, dans les cellules cancéreuses, des ARN anormaux. Etant donné les difficultés expérimentales qui se posent, nous avons abordé cette question en nous limitant à deux points particuliers :
1) mettre en évidence la présence de composés nucléotidiques anormaux dans les ARN d'origine cancéreuse.
2) caractériser des séquences nucléotidiques anormales, provenant d'une simple différence de structure de ces composés. Ces deux orientations, nous ont imposé la recherche de méthodes d'étude très sensibles et rigoureusement standardisées pour permettre une étude comparative valable entre les ARN normaux et cancéreux de même origine.

Avant de décrire les résultats de nos travaux nous exposerons très succintement :

I - Les généralités sur les ARN, concernant principalement leurs caractéristiques physicochimiques actuellement connues (composition et structure) et leur rôle.

II - Les méthodes d'étude des ARN, en particulier

A - Les procédés d'extraction des ARN

B - Les techniques de détermination de leur composition

Nos recherches personnelles ont poursuivi essentiellement un but comparatif. Nous décrirons ainsi :

I - Une étude critique des méthodes d'extraction des ARN du foie de rat normal. Ce travail nous a conduit à préciser les conditions d'extraction applicables aux études de composition d'une part, et aux études de structure d'autre part.

II - Les applications de ces techniques à l'étude comparative :

- des ARN des fractions cytoplasmiques
- des ARN normaux et cancéreux (foie normal et hépatome ascitique).

"Nous consacrerons une troisième partie aux techniques d'étude comparative des structures primaires des ARN. Nous nous sommes limités, dans notre expérimentation, aux hydrolyses partielles par la ribonucléase pancréatique des ARN des tissus normaux et cancéreux."

G E N E R A L I T E S

=======

LES ACIDES RIBONUCLEIQUES

I - Répartition et Etat moléculaire.

II - Composition chimique.

III - Structure.

IV - Roles biologiques essentiels.

LES METHODES D'ETUDE PHYSICOCHIMIQUE DES ARN

I - Extraction des ARN tissulaires.

II - Détermination de la composition nucléotidique.

LES ACIDES RIBONUCLEIQUES

En 1871 MIESCHER (2) isola des cellules de pus et des spermatozoïdes de saumon, un composé phosphoré qu'il appela nucléine et dans lequel il mit en évidence deux constituants : une protéine basique et un composé phosphoré acide. ALTMANN (3) propos d'appeler acide nucléique le groupe phosphoré acide qu'il réussit à isoler et à purifier. KOSSEL (4), en 1891, mit en évidence deux acides nucléiques : l'un, isolé de la levure, fut appelé acide zymonucléique et l'autre, extrait du thymus, acide thymonucléique. Enfin LEVENE (5) identifia respectivement dans leurs produits d'hydrolyse du ribose et du desoxyribose : on les appela donc acide ribonucléique (ARN) et acide desoxyribonucléique (ADN).

Les acides nucléiques sont des constituants constants de la matière vivante. Ils coexistent dans toutes les cellules vivantes, animales et végétales (HAMMARSTEN (6), CASPERSSON (7), BRACHET (8)). Les ADN se localisent essentiellement dans les noyaux cellulaires ; combinés à des protéines basiques (protamines et histones) ils constituent les gênes au niveau des chromosomes ; en outre la présence d'ADN a été soupçonnée récemment au niveau des mitochondries.
Les ARN se répartissent dans toute la cellule ; ils existent, soit sous forme libre, soit combinés à des protéines ; ils présentent une grande diversité moléculaire et possèdent des rôles importants dans la vie de la cellule. Nous limiterons volontairement notre exposé au cas des ARN seuls, en nous bornant à signaler par comparaison certaines caractéristiques particulières des ADN, quand nous le jugerons nécessaire.

I - REPARTITION ET ETAT MOLECULAIRE

Le développement des méthodes de fractionnement cellulaire a permis de caractériser et de localiser dans la cellule plusieurs classes d'ARN qui diffèrent à la fois par leur état moléculaire et leur rôle.

Les ARN existent soit libres, soit sous forme de ribonucléoprotéines ; leurs poids moléculaires sont très variables selon leur état. Les différentes classes d'ARN actuellement connues se répartissent dans les 4 fractions cellulaires essentielles : noyau, mitochondries, ribosomes, solution cytoplasmique.

A - ARN NUCLEAIRES

L'étude des ARN nucléaires a été effectuée à partir des noyaux isolés obtenus par centrifugation différentielle. On a caractérisé essentiellement deux types différents d'ARN dans le noyau : des ribonucléoprotéines qui se localisent essentiellement dans le nucléole et dont on extrait des ARN qui présentent des constantes de sédimentation variables (ARN nucléolaires) et des ARN non combinés à des protéines qui existent sous forme libre (ARN messagers).

Les travaux récents de PERRY (9), SCHERRER et coll. (IO), HENSHAW et coll. (11), NOLL (12), ont permis de caractériser, dans le noyau, des ARN dont les constantes de sédimentation sont respectivement de 45s, 35s, 28 s, 18 s, et 8 à 16 s, ce qui correspond à des poids moléculaires respectifs d'environ $1,7 \cdot 10^6$, $1,5 \cdot 10^6$, $1,3 \cdot 10^6$, et $0,3$ à $0,5 \cdot 10^6$. L'étude des compositions chimiques et de l'activité métabolique de ces molécules permet de distinguer deux groupes différents d'ARN :

- Les ARN "nucléolaires" correspondent aux fraction 35 s , 28 s , et 18 s ;ils possèdent une composition identique aux ARN des ribosomes et leur vitesse de marquage par les radiophosphates est faible. Ces ARN, selon NOLL (13), sont combinés à des protéines et constituent les précurseurs des ribosomes cytoplasmiques.

- Les ARN messagers* correspondent aux fractions 45 s et 8 à I6 s. Leur composition est voisine de celle des ADN ; ils possèdent une vitesse de renouvellement extrêmement rapide et une demi - vie brève (1 à 3 h. chez les cellules animales). La fraction d'ARN 45 s. serait, selon HENSHAW et coll. (14), une molécule mixte, précurseur à la fois des ARN messagers 8 à 16 s. et des ARN ribosomaux. Les ARN messagers existent sous forme libre et sont spontanément diffusibles du noyau (DEFERT-KOBUS et coll. (15)). Ils s'associent dans le cytoplasme avec les ribosomes pour former les polysomes, actifs dans la synthèse protéique.

B - ARN DES MITOCHONDRIES

BONNER (16) et BATES et coll. (17) ont suggéré en 1958, la présence d'ARN dans les mitochondries et les chloroplastes. Depuis ces travaux, on a toujours caractérisé des ARN dans les mitochondries. Leur état moléculaire n'a pas été étudié en détail et on ignore encore actuellement s'ils existent libres ou combinés à des protéines. En outre la localisation intramitochondriale de ces ARN n'a pas encore été clairement démontrée et on ne peut rejeter, a priori, l'existence d'une contamination ribosomale persistante des préparations de mitochondries étudiées. Les ARN de la fraction mitochondriale présentent toutes les caractéristiques physicochimiques et métaboliques des ARN ribosomaux (composition nucléotidique et activité métabolique identiques).

---

* Voir la revue générale récente: SINGER et LEDER (14-bis).

C - ARN RIBOSOMAUX

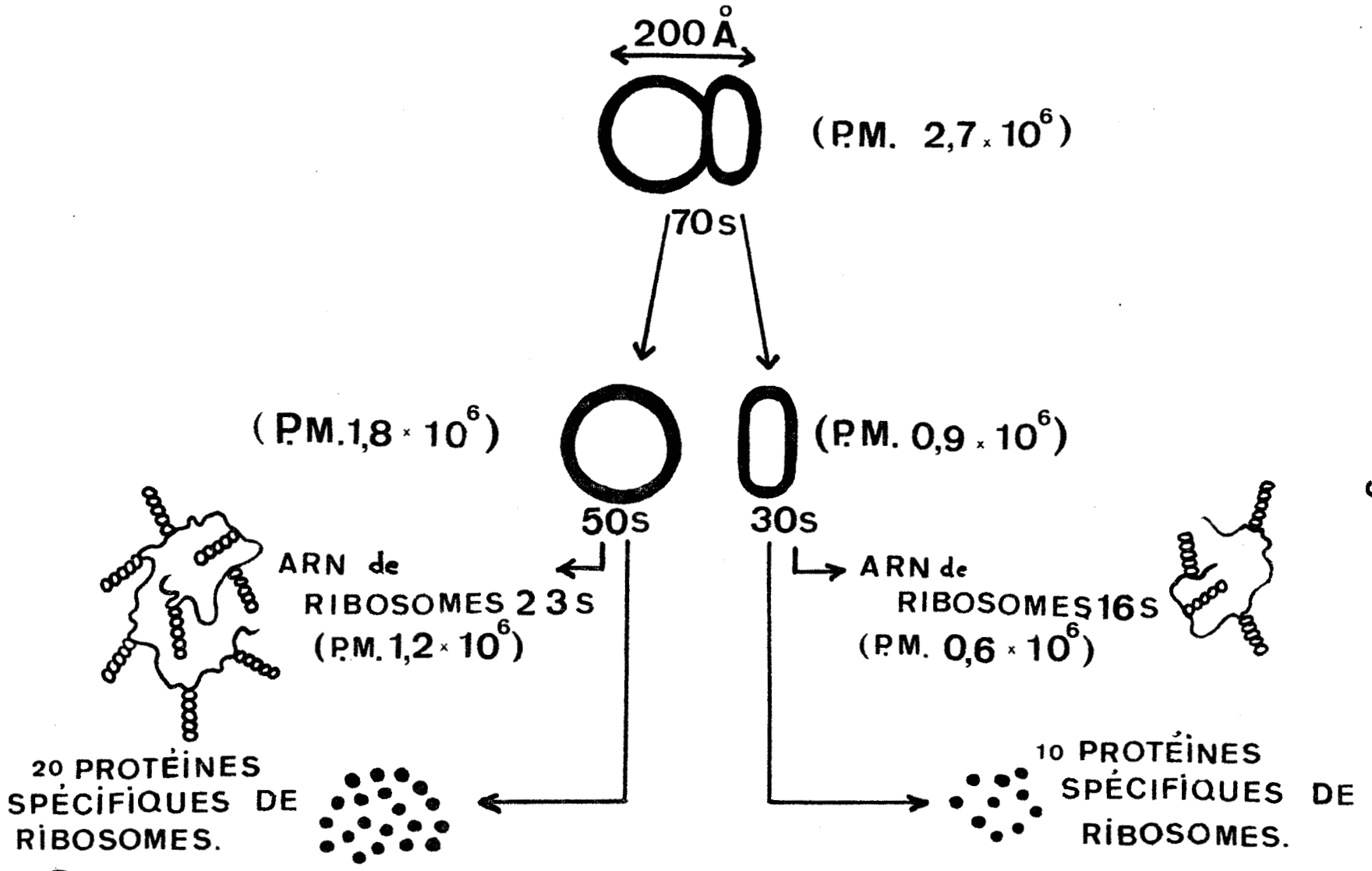
Le sous-fractionnement de la "fraction microsome" de CLAUDE (18) * permet d'isoler une fraction ribosomale , exempte de membranes cytoplasmiques lipoprotéidiques. Cette fraction ribonucléo-protéique, soumise à une ultracentrifugation en gradient de saccharose, pour des concentrations de $MgCl_2$ variant de 0,5 à 4 M, permet de caractériser des fractions dont les constantes de sédimentation sont les suivantes : 180 à 120 s., 70 à 80 s. et 30 s.. Les proportions de ces différentes fractions varient en fonction de la concentration en ions Mg^{++} . Les fractions 180 à 120 s. majeures pour une concentration de 4 mM en $MgCl_2$, correspondent aux polysomes (ou ergosomes) qui résultent de l'association d'ARN messager et de ribonucléoprotéines 70 à 80 s.. La fraction 70 à 80 s. correspond aux ribosomes libres et les fractions 50 et 30 s., qui deviennent majeures pour une concentration en $MgCl_2$ inférieure à 0,5 mM, correspondent à des sous-unités ribonucléoprotéiques. La déprotéinisation des particules 70 à 80 s., 50 s. et 30 s. permet d'isoler des fractions d'ARN purs, qui correspondent aux ARN ribosomaux.

L'organisation moléculaire des ribosomes est résumée dans la figure 1 et les caractéristiques physicochimiques des ARN ribosomaux sont les suivantes (voir les revues générales de SPIRIN (19) et de PETERMAN (20)) :

1 - Les ARN ribosomaux n'existent pas libres ; ils sont toujours combinés aux protéines (64 p.100 d'ARN - 36 p.100 de protéines).

2 - Il s'agit d'ARN de haut poids moléculaire, de deux types différents : ARN 18 s. (PM : $0,6 \cdot 10^6$) et ARN 28 s. (PM : $1,3 \cdot 10^6$) formant respectivement les sous unités ribonucléoprotéiques 30 s. et 50 s. (HALL et DOTY (21)).

(*) La fraction "microsome", obtenue par une centrifugation de 90 mn à 50 000 g du surnageant débarrassé des noyaux et des mitochondries, est un mélange de ribosomes libres (grains de PALLADE), de fragments de membranes lipoprotéidiques (SMOOTH), et de fragments de complexes ribosomes - membranes (ergatoplasme-fraction "rough").



BUS LILLE

FIGURE 1: ORGANISATION MOLÉCULAIRE DES RIBOSOMES. [D'APRES WATSON (22)]

3 - Les ribosomes libres 70 à 80 s. résultent de l'association des ribonucléoprotéides 30 s. et 50 s. Cette association est liée à la concentration en ions magnésium du milieu.

D - ARN DE LA SOLUTION CYTOPLASMIQUE (ARN solubles)

Les ARN de la solution cytoplasmique sont des ARN micromoléculaires, solubles dans le chlorure de sodium 1 M (OTAKA et coll. (23), SMITH (24)). On les isole par précipitation à pH = 5 du surnageant cytoplasmique suivie d'une déprotéinisation (ARN pH = 5 de HOAGLAND (25)). Ils existent libres dans la solution cytoplasmique, non combinés à des protéides, et ils semblent être identiques pour toutes les espèces (CANTONI et coll. (26)). On les a caractérisé également dans le "suc" nucléaire (nucléoplasme). Leurs caractéristiques physicochimiques sont les suivantes (revues générales de SPIRIN (27) et de BROWN (28)). :

1 - Ils possèdent une constante de sédimentation de 4 s. et un poids moléculaire de 25.000 $\pm$ 1.000. Ils résultent de l'association de 80 nucléotides et leur molécule possède une longueur de 100 Å.

2 - Les ARN solubles (ou ARN pH = 5) possèdent la propriété de se lier à des acides aminés, par une réaction d'estérification enzymatique faisant intervenir des aminoacylsynthétases (HOAGLAND (29), BERG et coll. (30), ZAMECNIK et coll. (31)). Chaque acide aminé possède au moins un ARN soluble spécifique ; ces ARN sont responsables du transfert des acides aminés de la solution cytoplasmique vers les ribosomes (ARN solubles ou ARN pH = 5 ou ARN de transfert). (voir figure : 8).

Cette revue rapide des ARN de chaque fraction cytoplasmique permet de faire ressortir dès maintenant la grande hétérogénéité de cette classe de constituants.

1) les ARN se répartissent dans toute la cellule;
2) chaque fraction cellulaire possède des ARN particuliers;
3) ils existent soit libres, soit combinés à des protéines. Un certain nombre de travaux tendent, en outre, à démontrer depuis quelques années l'existence de complexes nucléotides-lipides ou ARN-lipides.

4) Leur état moléculaire est très variable: 4 s. pour l'ARN soluble, 16 et 28 s. pour les ARN ribosomaux, 8 à 45 s. pour l'ARN messager.

Chaque classe d'ARN possède, dans la cellule, une fonction très précise, qui est étroitement liée à sa structure. Avant de préciser ces différents rôles biologiques, nous nous proposons de résumer la composition chimique et la structure de ces différents composés.

II - COMPOSITION CHIMIQUE

Les acides ribonucléiques sont des polymères résultant de l'enchainement d'unités plus simples. L'hydrolyse alcaline (par la soude ou la potasse) libère des unités constituées d'une base hétérocyclique, de ribose et d'acide phosphorique : ce sont les nucléotides. L'hydrolyse totale libère les constituants élémentaires : acide phosphorique, ribose et quatre bases azotées majeures, auxquelles s'ajoute, selon les cas, une proportion faible de bases azotées hétérocycliques particulières (bases mineures).

A - LES PRODUITS D'HYDROLYSE TOTALE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES

1 - L'acide phosphorique

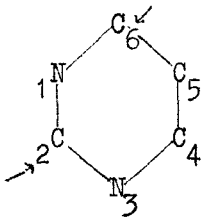
L'acide phosphorique constituant les ARN est l'acide orthophosphorique. Toutefois des complexes d'ARN et de poly - et métaphosphates ont été isolés de la levure par EBEL et coll. (32).

2 - Le ribose

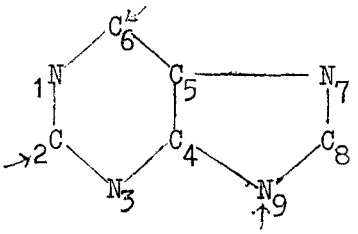
Les ARN des cellules animales renferment exclusivement le D-ribofurannose. On numérote conventionnellement les carbones de 1' à 5' en partant du groupement semi-acétalique.

3 - Les bases azotées hétérocycliques.

Les bases appartiennent à deux séries hétérocycliques purique et pyrimidique dont les squelettes sont indiqués ci-dessous.



Série pyrimidique.



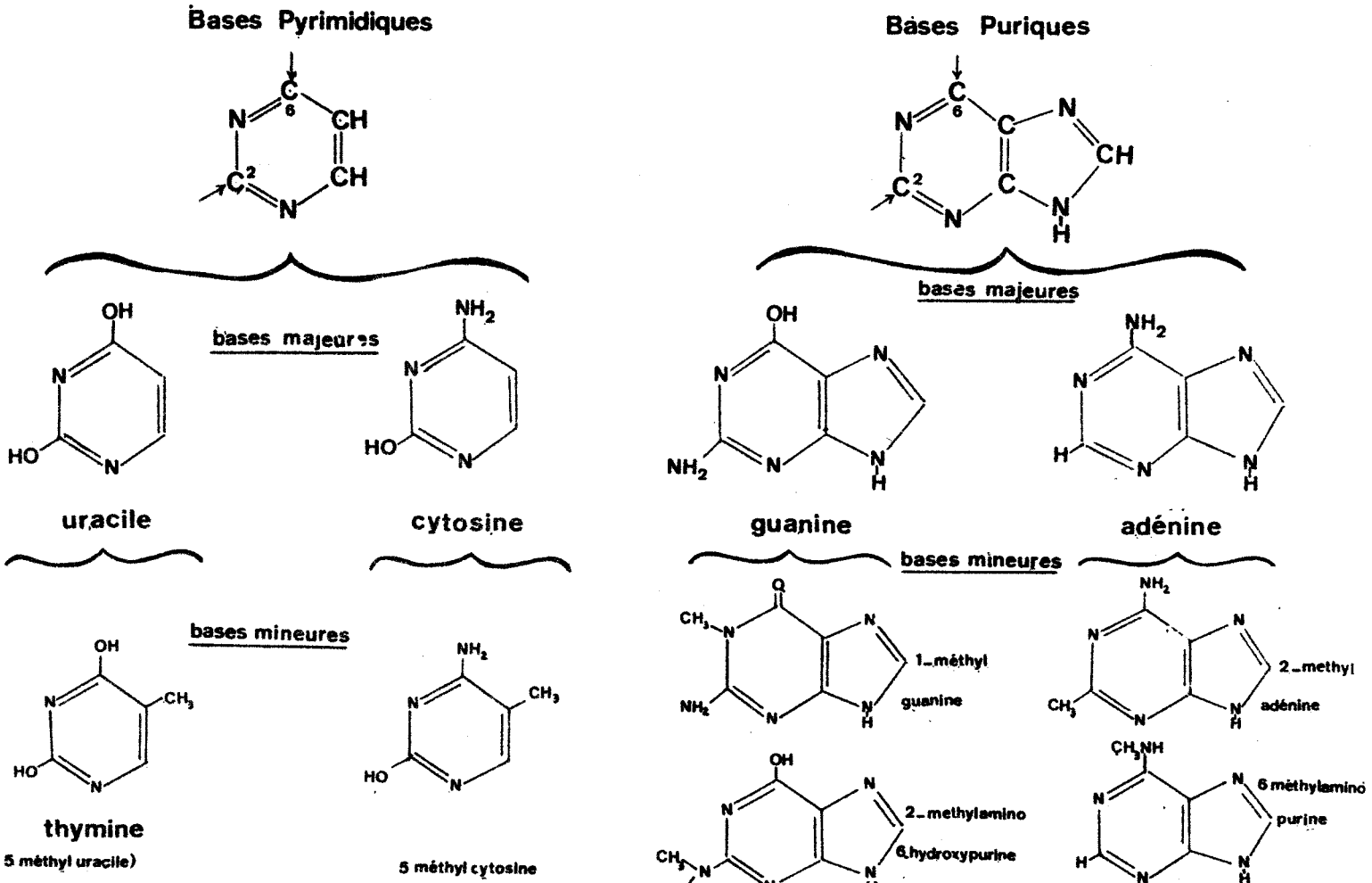
Série purique.

Les positions 2 et 6 des noyaux sont préférentiellement substituées par des fonctions hydroxyles ou amines. On obtient, dans les deux séries, deux bases majeures et des dérivés de substitution plus complexes, qui existent en proportion minime dans les ARN, que l'on appelle, pour cette raison, les "bases mineures". Les formules de ces dérivés sont indiquées dans la figure 2.

Dans les ARN totaux des cellules animales on trouve en général 50 % de chacune des deux bases purique et pyrimidique. Les bases mineures y sont présentes à l'état de traces. Toutefois les ARN solubles par exemple en renferment des quantités non négligeables. La mise au point de procédés de séparation et de dosage de ces composés devient une nécessité absolue. On ne peut exclure à priori l'idée que des ARN anormaux, présents dans les tissus cancéreux, n'en soient particulièrement riches et les premiers résultats acquis dans ce domaine sont en faveur de cette hypothèse (Tableau A).

B - LES PRODUITS D'HYDROLYSE PARTIELLE

L'hydrolyse chimique ou enzymatique des ARN conduit à des produits d'association des bases et du ribose qui sont les ribonucléosides et à des esters phosphoriques de ces derniers qui sont les ribonucléotides.



BUS LILLE

figure 2-

Formules des bases hétérocycliques azotées composant les ARN

TABLEAU - A

TENEUR * APPROXIMATIVE EN CERTAINES BASES PURIQUES METHYLEES DANS LES ACIDES RIBONUCLEIQUES DES FRACTIONS CELLULAIRES DE FOIE DE SOURIS ET DE TUMEUR

(D'après ALLEN (136))

Fractions cellulaires	2-Méthyl-adénine	6-Méthyl-aminopurine	6-Diméthyl-aminopurine	1-Méthyl-guanine	2-Méthylamino-6-hydroxypurine	2-Diméthylamino-6-hydroxypurine
Tumeur Mitochondries	pas déterminé	-	-	0,24	0,78	0,10
Foie Mitochondries	-	-	-	0,10	0,57	0,10
Tumeur Microsomes	0,10	0,10	0,10	0,14	0,82	0,10
Foie Microsomes	0,10	0,10	0,10	0,08	0,60	0,10
Tumeur Fraction soluble	0,10	4,20	1,16	1,03	12,40	3,20
Foie Fraction soluble	0,10	0,78	0,55	0,86	5,20	1,36

* Toutes les valeurs sont en moles pour 100 moles d'Uracile.

1 - Les ribonucléosides

Les nucléosides ne sont pas réducteurs : la fonction semi-acétalique du ribose est engagée dans une liaison glucosidique avec la base. La labilité particulière de celle-ci laisse supposer qu'elle se fait par l'intermédiaire d'un atome d'azote. Les études structurales ont permis d'établir qu'il s'agit de N-β-ribofurannosides ; les nucléosides puriques sont des N-9-ribosides et les nucléosides pyrimidiques des N-3-ribosides. Ils absorbent la lumière ultraviolette, comme les bases correspondantes, et possèdent des maxima et des minima d'absorption caractéristiques. Ces propriétés sont mises à profit dans les méthodes d'identification et de dosage de ces composés. Les ribonucléosides sont stables en milieu basique et leur stabilité en milieu acide dépend de la nature de la base hétérocyclique : les ribonucléosides puriques sont facilement hydrolysés par les acides dilués (SO_4H_2 1 N - 1 heure à 100°C), mais les ribonucléosides pyrimidiques résistent énergiquement à l'hydrolyse acide. Les ribonucléosides sont obtenus par déphosphorylation des nucléotides correspondants, par voie chimique ou enzymatique.

2 - Les ribonucléotides

L'hydrolyse chimique (par la soude ou la potasse) ou enzymatique (par des phospho-diesterases) des ARN conduit aux ribonucléotides, association d'une base, de ribose et d'acide phosphorique. Il existe un grand nombre d'isomères : isomères de position du reste phosphoryle sur le ribose ; isomères cycliques, provenant de la présence d'un ou plusieurs restes "phosphoryle". Les règles de nomenclature sont les suivantes :

a) Les nucléotides contenant le ribose sont les ribonucléotides (ou ribotides). Ceux qui contiennent le desoxyribose seront les desoxyribonucléotides (ou desoxyribotides).

b) Ils seront puriques ou pyrimidiques.

c) Ils seront appelés nucléosides phosphates ou nucléosides - polyphosphates selon le nombre de restes "phosphoryle" ; on précisera, dans ce cas, la position du ou des restes phosphoryles sur le pentose

en utilisant la numérotation en chiffres affectés du signe "prime", que nous avons précisé précédemment. On distinguera ainsi, dans le cas des ARN :

a - les ribosides 2' et 3' phosphates (fig.3a et 3b),

b - les ribosides 5' phosphates (fig. 3c),

c - les ribosides 2' - 3' phosphates (fig. 3d),

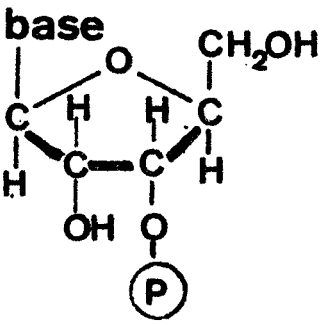
d - les nucléosides - diphosphates (fig. 3e).

Le tableau B résume la nomenclature, la composition et les abréviations concernant les principaux nucléotides rencontrés dans les hydrolysats d'ARN. Une remarque s'impose pour un nucléotide particulier : l'acide pseudo-uridylique. La liaison du ribose et de l'uracile est de type C - C, en position 5 du noyau hétérocyclique : il ne s'agit plus d'un N-3 ribotide mais d'un C-5 ribotide. Il s'ajoute aux nucléotides mineurs qui résultent de l'association des bases mineures du ribose et de l'acide phosphorique. L'acide pseudo-uridylique (Ψ-U) est un constituant des ARN solubles qui en renferment, selon les cas, de 5 à 25 résidus pour 100 résidus d'acide uridylique.

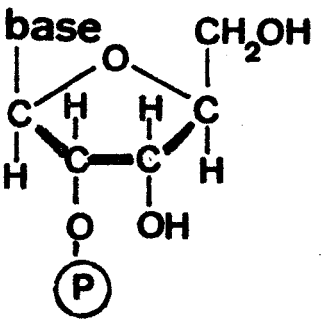
Les nucléotides normaux et mineurs, actuellement connus, sont rassemblés dans le tableau B.

Les nucléotides, comme les nucléosides et les bases, absorbent la lumière ultraviolette et possèdent des spectres d'absorption caractéristiques. Ils sont solubles dans l'eau, les solutions alcalines et les acides dilués (*). Ce sont des acides forts. Ils se déphosphorylent sous l'action de l'ammoniaque concentré à 10 % (180° - 3 H) ou de la pyridine à 50 % pendant 5 jours, ou encore sous l'action de certaines nucléotidases (voir page 70).

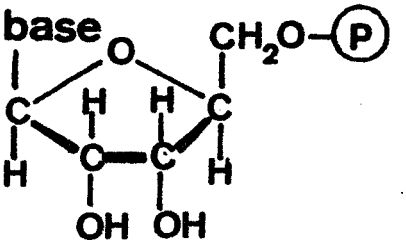
(*) L'acide guanylique est difficilement soluble dans l'eau, dans les solutions ammoniacales et dans l'acide chlorhydrique 0,01 N.



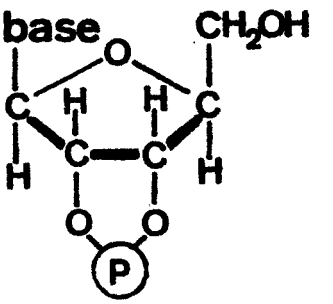
a) Nucléoside 3'-Phosphate



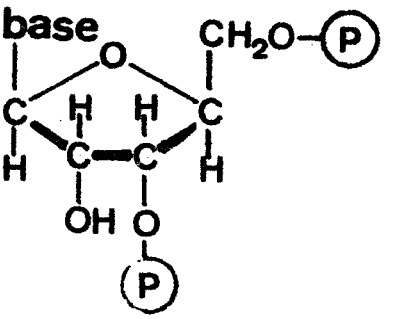
b) Nucléoside 2'- Phosphate



c) Nucléoside 5'- Phosphate



d) Nucléoside 2'-3' Phosphate



e) Nucléoside 3',5'-Phosphate

BUS LILLE

Figure-3: Formules des principaux nucléotides présents dans les hydrolysats d'ARN.

TABLEAU - B

NOMENCLATURE DES PRINCIPAUX DERIVES PURIQUES ET PYRIMIDIQUES

Nature de la base	NOMENCLATURE	NOMENCLATURE	ABREVIATION *
URACILE	Uracile	2,6-dihydroxypyrimidine	-
	Uridine	3-β-D-ribofuranoside de l'uracile	Urd ou U
	Acide Uridylique	Uridine - 2',3' ou 5' - phosphate	Urd - 2', 3' ou 5' - P, U - 2', 3' ou 5' P ou 2', 3' ou 5' - UMP
	Pseudouridine	5 - ribosyl-uracile	Ψrd ou Ψ
	Diribosyluradile	3, 5 - diribosyluracile	-
	Acide dihydrouridylique	5, 6 - dihydro - 3 - ribosyluracile	-
THYMINE	Thymine	5 - méthyl - 2, 6 - dihydroxypyrimidine ou 5 - méthyluracile	-
	Thymidine	3-β-D-ribofuranoside de 5-méthyluracile	Thd ou T
	Acide (ribo) thymidylique	(ribo)thymidine-2',3' ou 5'-phosphate	Thd-2',3' ou 5'-P, T-2',3' ou 5'P ou 2', 3' ou 5' - TMP
CYTOSINE	Cytosine	2-hydroxy-6-aminopyrimidine	-
	Cytidine	3-β-D-ribofuranoside de cytosine	Cyd ou C
	Acide cytidylique	Cytidine -2', 3' ou 5' - phosphate	Cyd-2',3'ou5'-P, C-2',3'ou5' - P ou 2', 3'ou5' - CMP
	Acide α — cytidylique	α- cytidine - 3' - phosphate	α-Cyd-3'-P, α-C-3'-P ou 3'-α-CMP
	Ribosyl - iso - cytosine	3 ou 5 - ribosyl-iso-cytosine	-
	Méthylcytosine	5 - méthyl - 2,6 - dihydroxypyrimidine	5 - mé.cytosine

ADENINE	Adénine	6 - aminopurine	-
	Adénosine	β - D - ribofuranoside de l'adénine	Ado ou A
	Acide adénylique	Adénosine - 2', 3' ou 5' - phosphate	Ado-2',3'ou5'-P, A-2',3'ou5'-P ou 2',3'ou5' - AMP
	Méthyl adénine	2 - méthyladénine	2 - mé. adénine
	Acide méthyladénylique	2-méthyladénosine-3'-phosphate	2-mé.Ado-3'-P, 2-mé.A-3'-P ou 2-mé. AMP
	Méthyl aminopurine	6 - méthylaminopurine	6 - mé. - NH_2 - Pu
	Acide méthylaminopurique	6-méthylaminopurineribo-3'-phosphate	-
	Méthyl diaminopurine	6 - diméthylaminopurine	6 - dimé. NH_2 - Pu
	Acide diméthylaminopurique	6-diméthylaminopurine-ribo-3'-phosphate	-
GUANINE	Guanine	2 - amino - 6 hydroxypurine	-
	Guanosine	β - D - ribofuranoside de guanine	Guo ou G
	Acide guanylique	Guanosine - 2',3' ou 5' - phosphate	Guo-2',3'ou5'P, G-2',3'ou5' P ou 2', 3' ou 5' - GMP
	Méthylguanine	1 - méthylguanine	
	Acide méthylguanylique	1-méthylguanosine - 3' - phosphate	1-mé. Guo-3'-P, 1-méG - 3' - P ou 1 - mé - GMP
	Hydroxyméthylaminopurine	6 - hydroxy - 2- méthylaminopurine	6 - OH - 2 mé. NH_2 Pu
	Acide hydroxy-méthylamino-purique	6 - hydroxy - 2 - méthylaminopurine ribo - 3' - phosphate	-
	Diméthylaminohydroxy purine	2-diméthylamino-6-hydroxypurine	2 - dimé. NH_2 - 6 - OH Pu
	Acide dimethylamino - hydroxy purique	2 - diméthylamino - 6 - hydroxypurine ribo - 3' - phosphate	-

*Approuvé par "Organic Nomenclature Commission of the International Union of the Biochemistry" (voir J. Biol. Chem., 1966, 241, 10 et Arch. Biochem. Biophys., 1966, 115, 1.

Les nucléotides qui entrent dans la constitution des ARN sont nombreux. Ils diffèrent essentiellement, d'une part par la nature des bases hétérocycliques et, d'autre part, par la position des restes phosphoryles qui estérifient une des fonctions hydroxyles du ribose. Ces composés, par la présence des fonctions acides libres de l'acide phosphorique peuvent s'unir entr'eux par des liaisons phosphodiesters pour former des chaines nucléotidiques.

La polymérisation des ribonucléotides conduit ainsi à la formation du squelette primaire des ARN. La présence de substituants hydroxyles et amines, en position 2 et 6 des noyaux hétérocycliques des bases, sont susceptibles de provoquer, le long de ces chaînes nucléotidiques, la formation de liaisons intra-moléculaires de type "pont hydrogène" qui déterminent la structure secondaire de ces molécules.

Nous nous proposons de résumer très succintement les données élémentaires concernant la structure des ARN.

III - STRUCTURE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES.

A - STRUCTURE PRIMAIRE : ENCHAINEMENT NUCLEOTIDIQUE.

LEVENE (33) en 1926 avait émis l'hypothèse que l'unité structurale fondamentale des ARN était un tétranucléotide constitué par l'union des quatres nucléotides "majeurs" c'est à dire les acides uridylique, cytidylique, guanylique et adénylique. L'hypothèse est depuis longtemps abandonnée, mais les travaux de LEVENE (33) et ceux de FLETCHNER et coll. (34) avaient établi que les nucléotides étaient unis par des liaisons phosphodiester. Les fonctions alcooliques en 2', 3' et 5' du ribose représentent trois points d'attache possibles des liaisons internucléotidiques. Le mode d'union des nucléotides dans les ARN a été établi grâce à l'étude des mécanismes de l'hydrolyse chimique et de l'hydrolyse enzymatique des chaînes polynucléotidiques.

1 - Hydrolyse chimique des polynucléotides.

MARKHAM et SMITH (35) et BROWN et TODD (36) ont démontré le mécanisme de l'hydrolyse alcaline des ARN. Des cinétiques d'hydrolyse des ARN par des solutions diluées de NaOH ou de potasse ont permis de caractériser les dérivés intermédiaires. En présence des alcalis, il se forme dans un premier temps un triester, puis l'hydrolyse de la liaison internucléotique libère des nucléosides cycliques 2' - 3' diphosphates, instables en milieu alcalin. L'ouverture du cycle conduit au mélange des deux isomères a et b correspondant respectivement au nucléoside 3'-phosphate (isomère a) et au nucléoside 2'-phosphate (isomère b). Ce mécanisme est schématisé dans la figure 4. Ces résultats permettaient de penser à l'existence de deux types de liaisons 2'-5' et 3' - 5' phospho-diesters. Les résultats des hydrolyses enzymatiques ont permis de lever l'ambiguité.

2 - Hydrolyse enzymatique des polynucléotides.

Les ribonucléases, comme leur nom l'indique, sont des enzymes susceptibles d'hydrolyser les ARN. La plupart des ribonucléases connues hydrolysent les liaisons phospho-diesters en 5' en libérant des 3'-phosphates. Au contraire, la phosphodiestérase du venin de serpent coupe de façon spécifique en 3' les liaisons phospho-diesters et libère donc des nucléosides 5' phosphate. L'hydrolyse des ARN par ces enzymes fournit des nucléosides 3' et 5'-phosphate. On peut donc conclure que la liaison internucléotidique, dans les ARN, est du type 3' - 5' phospho-diester. Ce type de liaison est schématisé dans la figure 5.

Si le mode d'union entre les nucléotides est bien établi, la connaissance des séquences des nucléotides dans les chaînes des ARN reste un problème très ardu. La théorie des tétranucléotides a été totalement abandonnée, dès 1953, à la suite des travaux de VOLKIN et COHN (37) qui isolèrent à partir d'hydrolysats ribonucléasiques d'ARN, des tri-, tetra- et pentanucléotides renfermant plusieurs fois la même base. On considère maintenant que l'enchaînement des nucléotides

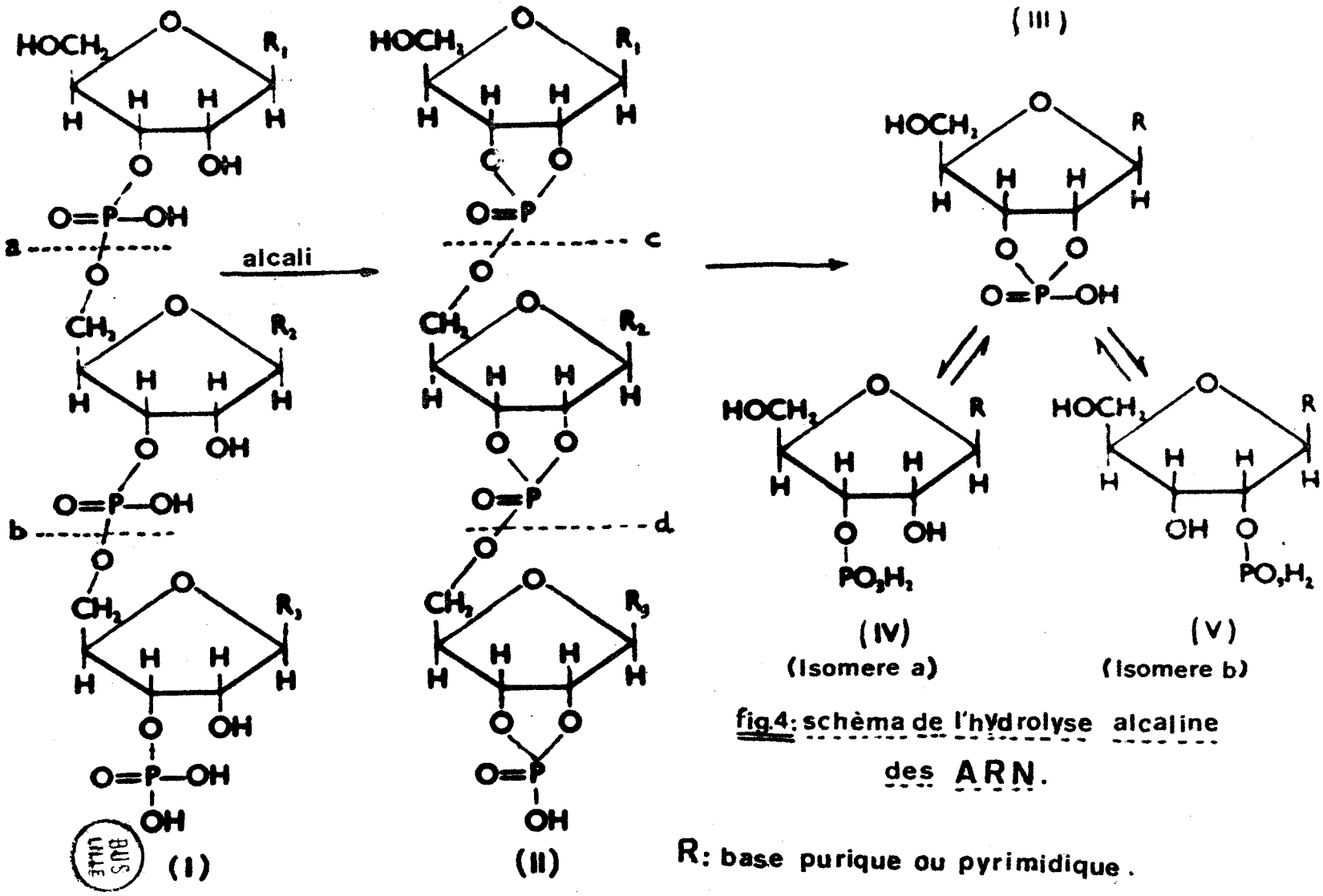


fig.4: schèma de l'hydrolyse alcaline des ARN.

R: base purique ou pyrimidique.

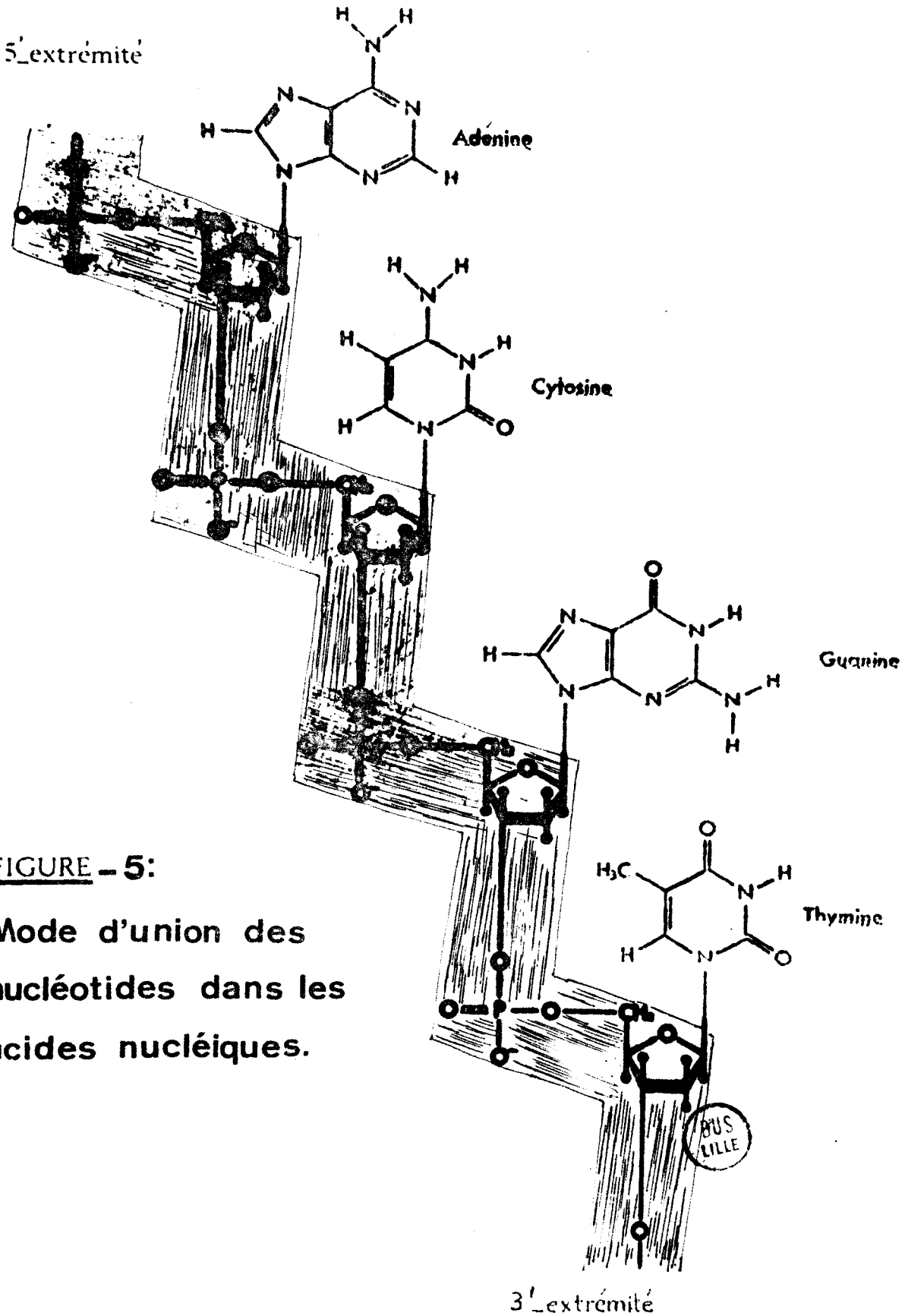


FIGURE – 5:

Mode d'union des nucléotides dans les acides nucléiques.

BUS LILLE

dans les ARN peut s'effectuer suivant n'importe quelle séquence. L'étude des séquences nucléotidiques s'effectue grâce à l'application de techniques d'hydrolyse partielle et de fractionnement chromatographique que nous développerons dans le chapitre suivant. Les hydrolyses partielles (voir page179) libèrent des oligonucléotides (di-, tri-, tetra- et penta nucléotides) et des polynucléotides (nombre de nucléotides supérieurs à cinq). On représente conventionnellement les chaînes nucléotidiques, en désignant le nucléotide par les lettres A, G, C, U (pour les acides adénylique, guanylique, cytidylique et uridylique), affectées de la lettre p à gauche pour les liaisons 5' phosphate et à droite pour les liaisons 3' phosphate. Un tétranucléotide, en liaison 3' - 5', se représentera donc de la façon suivante : Ap Ap Gp Up Cp quand l'acide phosphorique terminal de C est en position 3'.

Les séquences nucléotidiques des ARN restent inconnues. La seule molécule dont l'enchaînement a été totalement élucidé est l'ARN soluble spécifique de l'alanine, grâce aux remarquables travaux de HOLLEY et coll. (38). Nous détaillerons plus loin les résultats et les techniques décrits par ces auteurs(voir page185). Nous nous bornerons ici à faire ressortir l'énormité du travail qui reste à accomplir dans ce domaine, en égard à la grande diversité des molécules d'ARN présentes dans les cellules.

1 - Les ARN diffèrent d'une classe à l'autre, par leur composition en nucléotides. C'est ainsi que les ARN solubles se caractérisent par leur richesse exceptionnelle en nucléotides mineurs.

2 - Les ARN d'une même classe possèdent en général la même composition en nucléotides et ne diffèrent les uns des autres que par l'enchaînement des nucléotides. La mise en évidence d'ARN anormaux dans les cellules nécessitera donc l'application de techniques comparatives qui permettent de mettre en évidence : 1 - une variation de composition en nucléotides

2 - l'existence de séquences nucléotidiques anormales.

Ce double problème fait l'objet de notre travail.

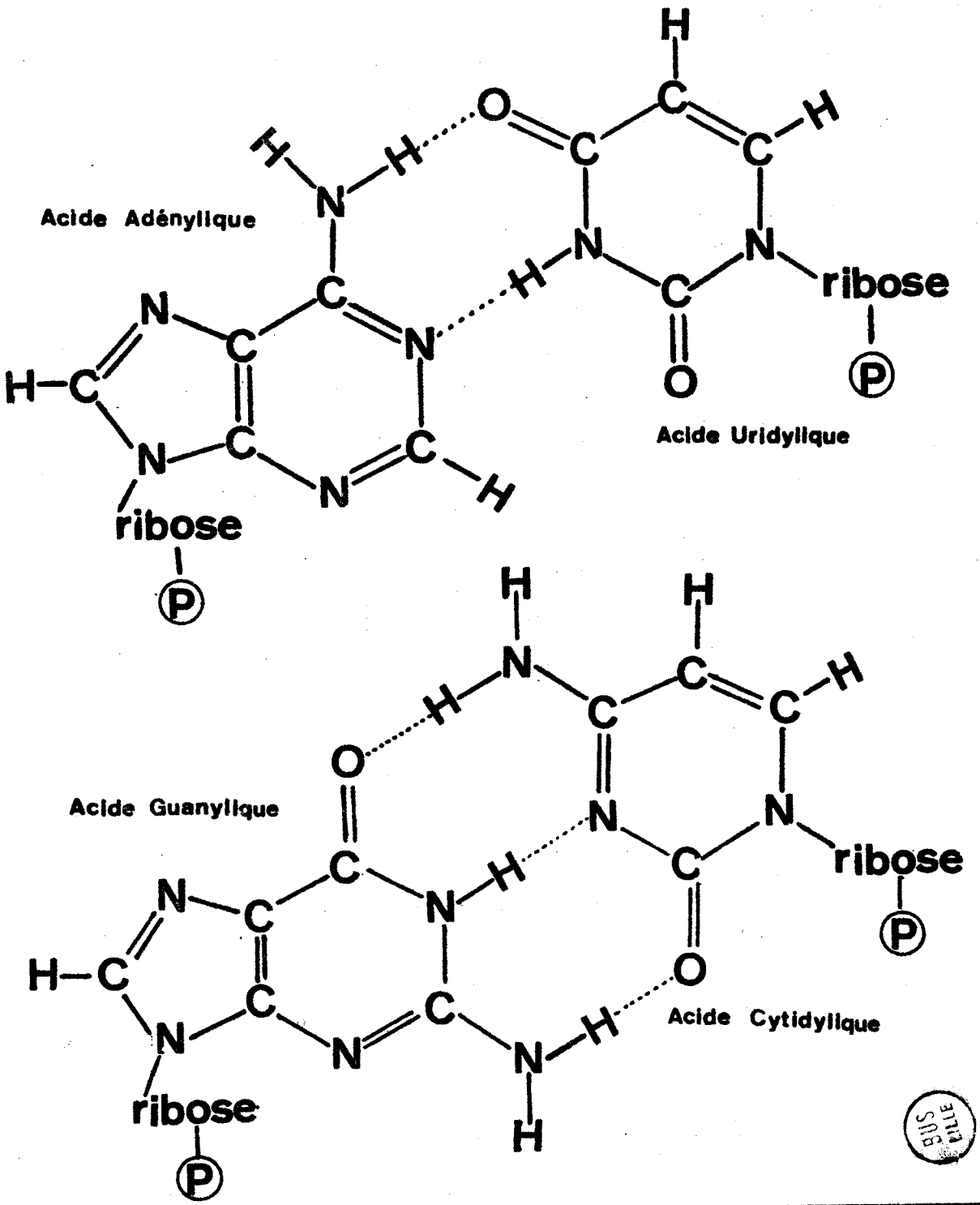
B - STRUCTURE SECONDAIRE DES ARN

Depuis les travaux de WATSON et CRICK (39), un grand nombre d'expérimentations physiques ont été effectuées sur les polynucléotides, pour préciser le mode d'association de ces derniers par l'intervention de liaisons "pont hydrogène". L'appariement des nucléotides s'effectue par l'intermédiaire des bases, selon des doublets nucléotidiques résultant de la formation de liaisons "pont hydrogène" entre les substituants en position 1, 2 et 6 des bases puriques et pyrimidiques. Les deux seuls doublets nucléotidiques stables sont, comme dans le cas des ADN, les doublets G - C et A - U ; la figure 6 indique les liaisons qui interviennent dans ces deux cas. La formation de doubles chaînes nucléotidiques dans les ARN sera donc conditionnée à la présence de séquences nucléotidiques complémentaires dans les chaînes.

Les ARN ne possèdant pas de séquences nucléotidiques complémentaires formeront des molécules en chaîne simple (monocaténaire) : ce serait le cas des ARN messagers, dont les caractéristiques physicochimiques correspondent à des ARN monocaténaires.

Les ARN ribosonaux de haut poids moléculaire présentent des spectres de diffraction des rayons X qui semblent démontrer l'existence d'une structure partielle en double hélice. La figure 7-a illustre les conceptions actuelles concernant ces structures.

Dans le cas des ARN solubles, la molécule, de faible poids moléculaire (25.000), est constituée de 80 nucléotides et les caractéristiques physiques montrent l'existence de fragments bicaténaires. La figure 7-b montre les schémas de structure actuellement admis pour cette molécule. Selon HOLLEY et coll. (40), le repliement de la chaîne nucléotidique serait provoqué par la présence de nucléotides "mineurs" s'opposant à l'appariement en doublets. On conçoit ainsi le rôle fondamental que jouent ces bases mineures dans la configuration spatiale de ces molécules. Il n'est pas déraisonnable de penser à l'intervention de ces composés mineurs dans la formation de molécules d'ARN stériquement anormales.



BUS FILLE

fig. 6 : Appariement des Nucléotides dans les ARN

STRUCTURE SECONDAIRE DES ARN

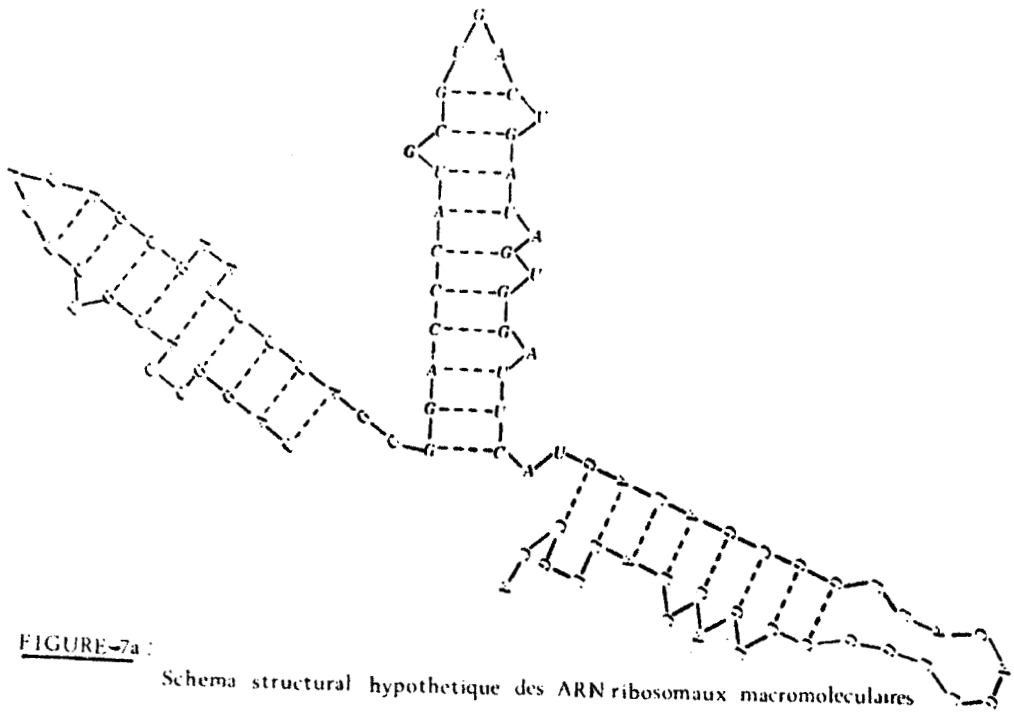


FIGURE-7a :
Schema structural hypothetique des ARN ribosomaux macromoleculaires
(d'apres FRESCO et al (41))

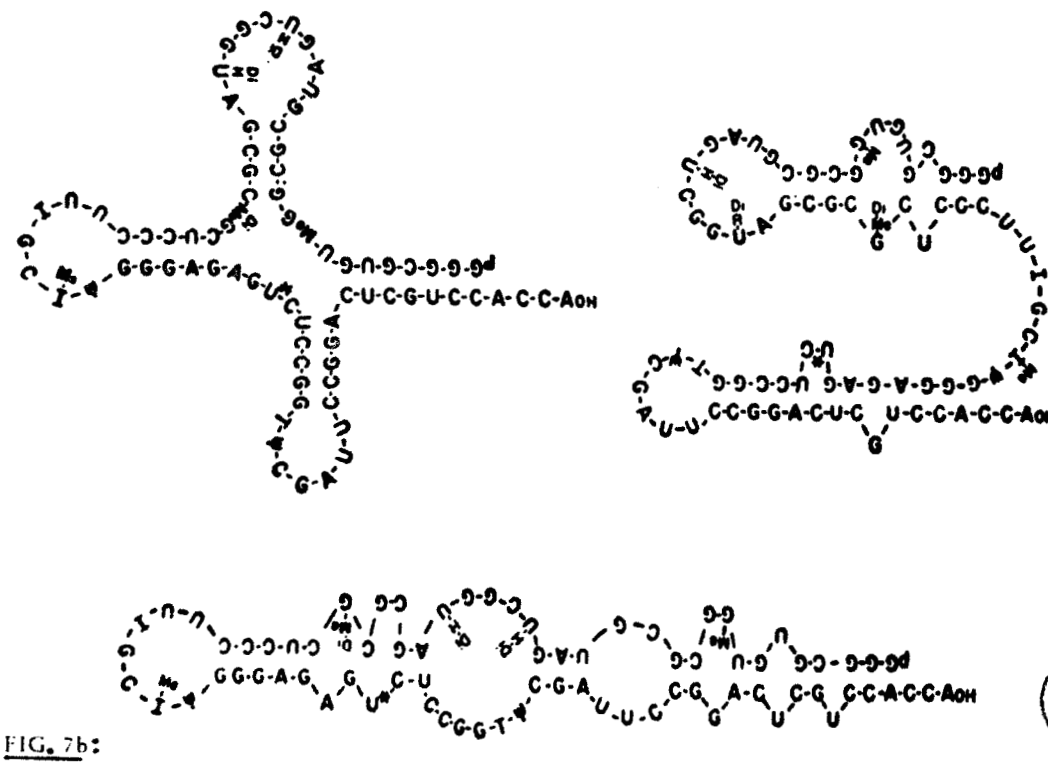


FIG. 7b:
Schemas de structure d'ARN_alanine [d'aprés HOLLEY et al (42)]

BUS LILLE

Ces conceptions restent néanmoins très hypothétiques et l'évolution des connaissances dans le domaine de la structure fine des ARN est conditionnée à la mise au point de méthodes d'extraction d'ARN pur et d'analyse des séquences nucléotidiques de ces produits d'hydrolyse partielle. Avant d'aborder la revue générale de ces techniques, nous préciserons les conceptions actuelles concernant le rôle de ces composés dans la cellule de façon à bien situer l'intérêt biologique de notre expérimentation.

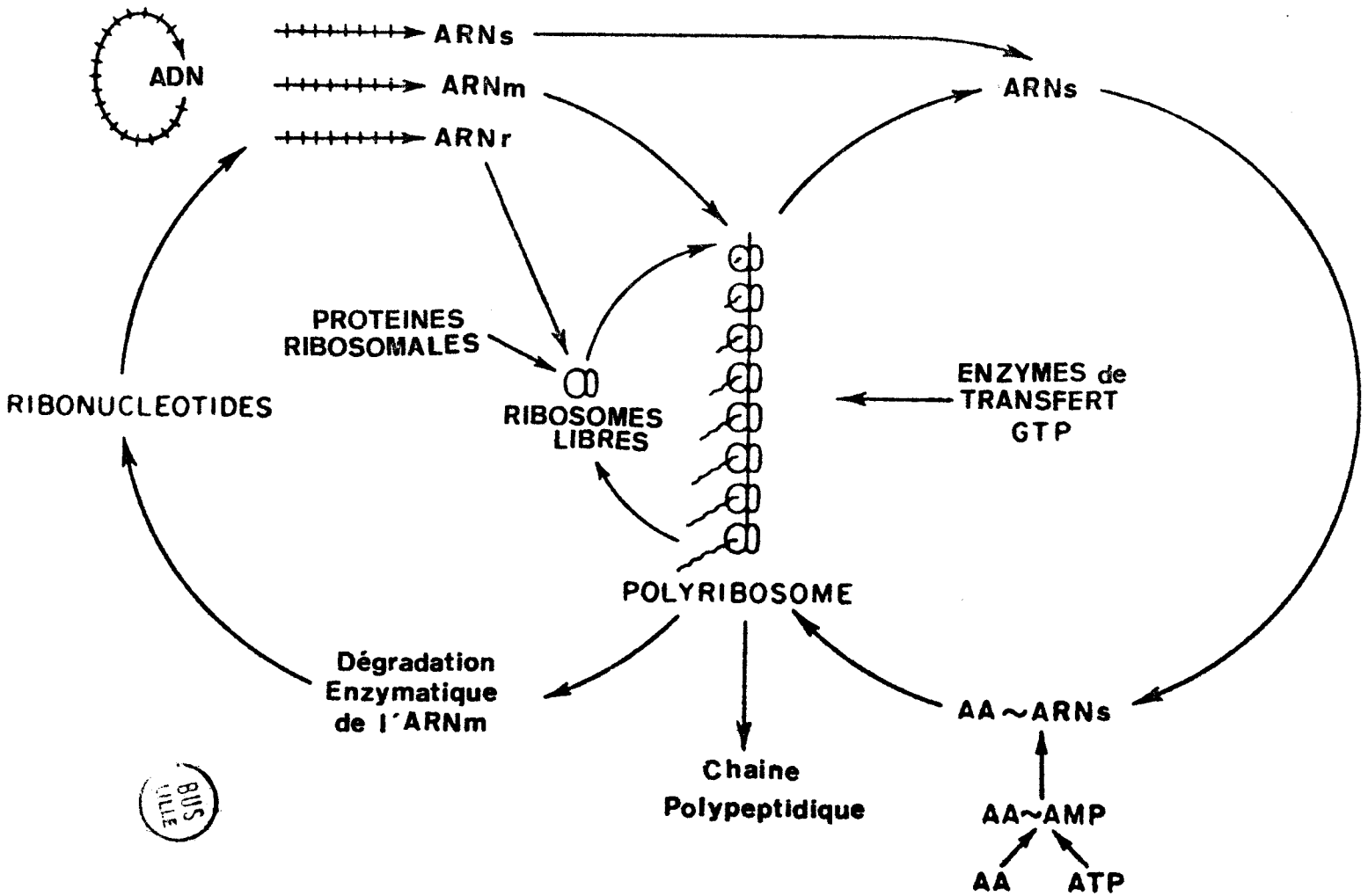
IV - ROLE BIOLOGIQUE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES.

Les recherches de CASPERSSON et de BRACHET (43) puis celles de nombreux auteurs, ont démontré "qu'il existait une corrélation étroite entre la teneur en ARN d'une cellule et son aptitude à synthétiser des protéines". D'autre part "l'intégrité de l'ARN est, dans les cellules vivantes, indispensable pour que la croissance, l'activité mitotique, l'incorporation des acides aminés dans les protéines et la synthèse même de celles-ci puissent se produire". C'est sur ces deux notions fondamentales que repose la démonstration que les ARN interviennent d'une part directement dans la biosynthèse des protéines et d'autre part, indirectement, dans la mitose.

Les travaux concernant les mécanismes de la biosynthèse protéique dans la cellule peuvent se résumer dans le schéma de la figure 8. Nous renvoyons pour le détail aux très nombreux ouvrages concernant cette question. Nous nous bornerons à faire ressortir les points suivants :

1 - Les ARN messagers se "démoulent" sur les ADN par un mécanisme de complémentarité moléculaire, faisant intervenir les ARN polymérases. Ils possèdent des séquences nucléotidiques complémentaires des ADN gêniques.

2 - Les ARN messagers, passant dans le cytoplasme, se combinent aux ribosomes pour former des polysomes, siège de la synthèse protéique.



BUS LILLE

FIGURE 8: Rôle des differentes classes d'ARN dans la biosynthèse protéique.

(d'après WATSON (22))

3 - Les acides aminés, libres dans le cytoplasme, sont transférés vers les polysomes par des ARN solubles, spécifiques de chacun d'eux.
4 - Les protéines se synthétisent au niveau des ribosomes par la fixation des ARN solubles sur des triplets complémentaires de l'ARN messager, selon les conditions d'appariement des nucléotides indiquées à la figure 6. Le code génétique des ADN est traduit sur les ARN messagers sous forme de triplets nucléotidiques (codons). Les ARN solubles possèdent sur une boucle de leur molécule un triplet nucléotidique complémentaire du codon (anticodon). La séquence en aminoacides de la protéine est donc imposée par celle des codons de l'ARN messager. Chaque ARN messager conduit ainsi à la synthèse d'une protéine spécifique correspondant à un fragment gênique. Ainsi apparaît l'explication chimique de l'axiome "un gêne - un enzyme" qui avait été établi par BUTENANDT (45). En outre, les travaux de HENDLER (46) et de HUNTER et GODSON (47) suggèrent l'existence d'un autre système protéosynthétique qui ferait intervenir les membranes intracytoplasmiques et qui serait, selon ces auteurs, beaucoup plus actif que le système polysomes-ARN soluble.

Les ARN interviennent donc directement dans la biosynthèse des protéines. De nombreux arguments expérimentaux pourraient être décrits pour démontrer qu'ils interviennent également dans la mitose. Nous nous bornerons à citer ceux qui sont les plus sûrs et les plus démonstratifs:

1°) La vitesse d'échange des acides aminés dans les protéines est plus élevée dans les tissus qui sont le siège de synthèses actives (Tableau C).
2°) Les tissus qui possèdent une activité mitotique importante sont riches en ARN (Tableau D).
3°) Il existe un parallélisme étroit entre les mitoses, la teneur en ARN et la synthèse des protéines (par exemple chez les bactéries en phase logarithmique, dans les tissus en régénération).
4°) Les vitesses d'échange de l'azote protéique et du phosphore ARN sont plus grandes dans les cellules des tissus qui sont le siège des mitoses actives.

TABLEAU - C

VITESSE * D'ECHANGE DE L'ALANINE MARQUEE DANS LES PROTEINES DE TISSUS DIVERS

(D'après ZAMECNIK et coll. voir MONTREUIL (48))

Foie normal	foie en régénération	Foie foetal	Hépatome	Fraction non néoplasique de l'hépatome
38	91	179	255	91

* en coups par minute.

TABLEAU - D

TENEUR EN ACIDE RIBONUCLEIQUE * DE DIFFERENTS TISSUS DU RAT ET DE LA SOURIS

(D'après SCHNEIDER (49))

Origine	Tissu examiné	Teneur en ARN*
Rat	Rein	27,2
	Rate	42,5
	Foie	63,4
	Pancréas	179,0
	Muscle	6,9
	Coeur	12,4
	Cerveau	17,5
	Poumon	18,0
	Sarcome de Jensen	53,2
Souris	Poumon	22,6
	Tumeur du poumon	59,6

* exprimée en mg de phosphore pour 100 g de tissu frais.

BUS LILLE

5°) La ribonucléase inhibe les synthèses protéiques et arrête les mitoses.
6°) La plupart des facteurs antimitotiques, qu'ils soient de nature physique (radiations ionisantes, rayonnement ultra-violet) ou chimique (moutardes azotées, antimétabolites nucléiques) sont des agents de dénaturation des acides nucléiques (pour plus de détails voir MONTREUIL (50)).

Ainsi les interrelations qui unissent les ARN aux facteurs biologiques essentiels à l'équilibre vital de la cellule (hérédité et mitose) suffisent à faire ressortir l'importance des travaux concernant les ARN. Dans notre cas particulier, cet exposé succinct démontre que l'hypothèse du cancer, maladie des ARN, permet d'envisager une explication du phénomène néoplasique.

La structure des ARN détermine leur activité biologique dans la biosynthèse des protéines spéfifiques et dans l'équilibre des mitoses. L'intervention de molécules d'ARN anormaux pourrait valablement déclencher une hyperactivité mitotique. Etant donné l'hétérogénéité extrême de cette classe de composés et les problèmes posés par leur étude chimique, l'identification de composés anormaux dans les tissus cancéreux ne pouvait être abordée que sous un angle comparatif. Cette orientation nécessitait la recherche de méthodes fines et rigoureusement reproductibles d'extraction et d'analyse de ces composés.

Avant d'exposer nos résultats personnels, nous présenterons une revue générale des techniques d'étude physicochimique des ARN.

LES METHODES D'ETUDE PHYSICOCHIMIQUE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES

Le problème de l'identification d'ARN anormaux dans les tissus néoplasiques impose, dès l'abord, de rechercher parmi l'ensemble des techniques proposées - I) les méthodes qui fournissent des préparations pures d'ARN (problème de l'extraction)

et - 2) les procédés d'analyse de la composition et de la structure primaire de ces molécules d'autre part (problème de la recherche de nucléotides anormaux et de séquences nucléotidiques anormales). Nous avons donc entrepris d'effectuer une mise au point des méthodes d'extraction et d'étude de la composition, avant d'aborder notre expérimentation.

I - LES METHODES D'EXTRACTION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES

Comme nous l'avons vu page -6 , les ARN se présentent dans les cellules sous deux formes essentielles : soit libres, soit combinés à des protéines. Dans les ribonucléoprotéines, le reste protéique n'est pas lié à l'ARN par des liaisons covalentes. L'union de la protéine avec le groupement prosthétique s'effectue par l'intervention de forces de Coulomb entre ions de charges opposées, entre dipôles ou par liaison hydrogène. Ces liaisons ne sont pas spécifiques et provoquent le plus souvent la formation spontanée de complexes ARN - protéines dans des conditions d'ionisation appropriées. Dans ce cas, il est évident que cette liaison entre les ARN et les protéines peut intervenir au cours de l'extraction même si l'ARN préexiste à l'état libre dans la cellule. Un des principes de base des méthodes d'extraction d'ARN pur sera donc la dissociation du complexe ARN - protéine.

En outre que l'on s'adresse à des tissus ou à des fractions cytoplasmiques isolées, le matériel de départ sera toujours un mélange complexe comprenant, outre les ARN, des micromolécules (ions, produits du métabolisme intermédiaire, nucléotides - peptides), des lipides (simples ou complexes : graisses neutres, phospholipides, lipoprotéides et liponucléoprotéides (*)), des ADN (libres ou combinés) et des protéines.

Nous distinguerons deux groupes de procédés d'extraction : les méthodes indirectes qui s'effectuent en trois étapes distinctes

1°) précipitation des macromolécules,

2°) extraction des ARN du précipité,

3°) purification de l'extrait.

et les méthodes directes qui se ramènent à deux étapes

1°) extraction des ARN à partir de l'homogénat,

2°) purification de l'extrait.

Avant d'envisager les différentes techniques appartenant à ces deux groupes, nous pouvons dès maintenant poser les impératifs essentiels à respecter dans la pratique des méthodes d'extration des ARN.

(*) L'existence de ces complexes a été suggérée notamment par KUFF et coll. (51), CHAUVEAU et coll. (52), HANSON et coll. (53) HUNTER et GODSON (54), DAVIES et HARRIS (55) et DE LUCA et coll.(56). Nous avons précisé (page 141) l'importance biologique de ces composés, conformément aux travaux de HENDLER et coll. (57), COLLINS (58) et MAC FARLANE (59).

A - IMPERATIFS TECHNIQUES

Les trois impératifs à considérer sont : 1) le rendement, 2) la pureté des préparations, et 3) l'intégrité moléculaire des ARN obtenus.

1 - Conditions de rendement.

Destruction des structures

Pour obtenir un rendement optimum, il faut, tout d'abord, effectuer une destruction totale des structures cellulaires de façon à libérer les constituants dans le milieu et à obtenir un contact intime des substances avec l'agent de précipitation. On a utilisé successivement la pulvérisation des tissus préalablement congelés dans des mortiers en présence de sable ou de billes de verre, puis les mixers rotatifs (type Waring Blendor), enfin l'homogénéisation des tissus préalablement broyés dans l'appareil de POTTER-ELVEJHEM. Seul l'appareil de POTTER permet une destruction convenable des structures en présence de l'agent chimique de précipitation. Néanmoins de nombreux auteurs préfèrent associer l'homogénéisation à un traitement par les ultrasons, qui provoquent seuls l'éclatement des structures cytoplasmiques les plus fines. En outre les ultrasons présentent l'avantage de dénaturer simultanément les protéides enzymatiques, évitant ainsi une hydrolyse nucléasique des ARN au cours de ces opérations mécaniques.

Inactivation des enzymes

L'inactivation des enzymes est le deuxième impératif de rendement. Il se pose dès le prélèvement des tissus à traiter. Ces derniers doivent être refroidis instantanément (congelés dans la neige carbonique si cela est nécessaire) et plongés le plus rapidement possible dans l'agent de précipitation. Dans le cas où on utilise l'appareil de POTTER, l'homogénéisation des tissus doit être précédée d'un broyage, dont le temps nécessaire est suffisant pour provoquer

une hydrolyse par les ribonucléases ; ces dernières possèdent une activité "explosive". Les différents agents préconisés pour inactiver les ribonucléases sont les suivants : l'acétone en milieu acide dilué (BACHER et ALLEN (60)), la bentonite (FRAENDEL CONRAT (61)), les ions Zn^{++} ou l'association Zn^{++} Bentonite (BROWHILL et coll. (62)), le dodécylsulfate de sodium (KAY et DOUNCE (63)), le chlorhydrate de guanidine (SELA et coll. (64)), l'urée (ibid.) ou le phénol (KIRBY (65)). L'inhibition de la ribonucléase par le phénol n'est pas immédiate et le degré d'inhibition dépend du type de ribonucléase. Par contre, la bentonite, l'urée ou le chlorhydrate de guanidine provoquent une inhibition totale et immédiate. Cependant il est intéressant de remarquer que l'inhibition par le phénol est plus lente mais irréversible; Ce qui n'est pas le cas de la bentonite. Nous verrons plus loin l'utilité d'ajouter la bentonite au phénol dans certains cas.

Autolyse:

Les ARN sont des molécules particulièrement labiles et des phénomènes d'autolyse viennent s'ajouter à l'action des enzymes. Pour contrecarrer simultanément cette autolyse et l'hydrolyse par les nucléases, il est indispensable de conduire les opérations de prélèvement et d'homogénéisation à une température la plus proche possible de 0^{oC}. La solution de l'agent de précipitation doit être maintenue à 0^{oC} et l'homogénéisation est effectuée à cette température, le tube de POTTER étant placé dans de la glace fondante pour éviter les échauffements provoqués par la rotation du piston. En outre, le pH de la solution de précipitation doit être contrôlé (notamment dans le cas des solutions salines) de façon à éviter des pH occasionnellement trop extrêmes. Les liaisons phosphodiesters ---- internucléotidiques sont particulièrement labiles en milieu alcalin. Inversement un pH trop acide déclencherait des déphosphorylations sensibles, notamment dans le cas des nucléotides puriques accessibles dans la molécule, qui sont très sensibles à l'action des acides dilués.

Pertes au cours des purifications

Enfin la purification des extraits (délipidations, reprécipitations, lavages) est parfois très préjudiciable au rendement par suite des pertes inévitables au cours de ces opérations. Pour certaines études chimiques, il est parfois préférable d'écourter les purifications pour travailler sur une préparation encore souillée de traces protéiques mais dont l'intégrité des ARN est préservée au maximum.

2 - Pureté des préparations.

Pour obtenir des préparations d'ARN pur il convient de se débarasser des autres composés macromoléculaires présents dans le matériel de départ, c'est à dire essentiellement des lipides, des ADN et des protéines.

Délipidation des préparations.

Dans les méthodes directes d'extraction des ARN (voir page 60) les lipides sont dénaturés ou émulsionnés par l'agent de déprotéinisation utilisé (cas du phénol ou des détergents (voir pages 60 et 61). Par contre, dans les méthodes indirectes (voir page 44), la délipidation est effectuée en traitant le précipité macromoléculaire par des solvants organiques, à différentes températures. Le choix des solvants est conditionné par la présence d'une proportion importante de phospholipides qui proviennent de toutes les membranes cellulaires. Trois groupes de phospholipides sont présents : les lécithines (solubles dans l'éthanol ou l'éther à froid) les céphalines (solubles dans l'éther) et les sphingomyélines (insolubles dans l'éthanol ou l'éther à froid, solubles dans l'éthanol à chaud). En tenant compte de ces caractères de solubilité les traitements préconisés ont été les suivants : la technique de SCHNEIDER (66), couramment appliquée, consiste en trois traitements par l'éthanol à 95 % et à froid, suivis de trois traitements à reflux par le mélange éthanol - éther (3 - 1); SMILLIE et KROTKOV (67) utilisent l'éther seul. SCHMIDT et THANNHAUSER (68) ont conseillé le

mélange méthanol - chloroforme et TSANEV et MARKHOV (69) le mélange méthanol - éther. DAVIDSON, FRAZER et HUTCHISON (70) ont vérifié que l'acétone permettait d'éliminer totalement l'eau, l'acide trichloracétique et les pigments, mais les phospholipides ne sont pratiquement pas extraits. Par contre le chloroforme est très efficace, et les mêmes auteurs ont préconisé l'emploi du mélange chloroforme - éthanol (1 - 3). Enfin HUTCHISON et MUNRO (71) préconisent les étapes suivantes : un traitement à l'éthanol puis deux traitements par le mélange éthanol - chloroforme (3 - 1) suivis de deux traitements par l'éthanol - éther (3 - 1). On sèche enfin à l'éther. L'ensemble de ces traitements est effectué à froid pour éviter une dégradation des ARN au cours de la délipidation. Ces différentes méthodes ne permettent cependant pas d'éliminer certains dérivés d'origine lipidique qui persistent dans les préparations : DAVIDSON et coll. (72), CROSBIE (73) et HUTCHISON (74) ont caractérisé un acide inositol - phosphorique dans les préparations d'ARN. MONTREUIL et coll. (75) ont en outre démontré l'existence d'acide glycérophosphorique et HAWTHORNE (76) celle d'inositol et de glycérol. Des délipidations très poussées (voir DERUMEZ(77)) ne permettent pas d'éliminer ces produits de dégradation des phospholipides, dont la présence introduit de graves causes d'erreurs dans les dosages et la détermination du renouvellement du phosphore ribonucléique.

Nous démontrerons, en outre, dans nos travaux personnels (voir page 120) que les opérations de délipidation provoquent la perte d'une fraction d'ARN qui est entraînée avec les lipides et qui pourrait correspondre à un complexe ARN - lipide dont l'importance biologique pourrait être fondamentale. Ces résultats personnels confirment les résultats de VENKATARAMAN (78) qui constatèrent une perte de 30 % des ARN par un traitement avec l'éthanol. SCHNEIDER (79), HUTCHISON et coll. (80), GREENBAUM et SLATER (81), COOPER et LORING (82) et HALLINAN et coll. (83) n'ont pas constaté une chute du rendement en ARN à la suite des opérations de délipidation.

Séparation des ADN.

Deux groupes de procédés sont applicables pour séparer la fraction désoxyribonucléique : éliminer les désoxynucléoprotéines avant d'extraire les ARN (cas des procédés indirects) ou séparer les ADN des ARN pendant ou après la déprotéinisation (cas des procédés directs).

Dans les deux cas on se fonde sur les caractères de solubilité des ADN et des désoxynucléoprotéines, pour des forces ioniques et des pH déterminés : FRICK (84) a étudié les caractères de solubilité des désoxynucléoprotéines dans l'eau et les solutions salines diluées. Les désoxynucléoprotéines sont très peu solubles dans l'eau et les solutions salines diluées (ClNa 0,I4 M) pour des pH légèrement alcalins, tandis que les ribonucléoprotéines et les ARN libres sont très solubles dans ces conditions. Par contre dans les solutions molaires de chlorure de sodium, les désoxynucléoprotéines sont deux fois plus solubles que dans l'eau. Nous détaillerons plus loin les différentes méthodes qui se fondent sur ces propriétés.

Dans les procédés directs d'extraction, l'élimination des ADN se fonde également sur les différences de solubilité en fonction du pH. Les ADN libres, étant donné leur très haut poids moléculaire, forment dans l'eau des gels de haute viscosité qui se séparent des ARN libres. Nous envisagerons successivement plus loin le cas particulier de chaque agent de déprotéinisation employé (phénol, dodécylsulfate de sodium, chlorhydrate de guanidine etc...).

Cependant quelles que soient les conditions, il est pratiquement impossible d'éliminer totalement les ADN des préparations en se fondant uniquement sur ces caractères de solubilité. Il se produit immanquablement un partage qui laisse subsister des traces d'ADN dans les extraits d'ARN. Leur séparation totale des ARN ne peut être effectuée que par un fractionnement des extraits, par chromatographie ou par ultracentrifugation en gradient de saccharose. De très nombreux procédés chromatographiques ont été appliqués pour séparer les ADN des ARN,

citons en particulier le phosphate de calcium à différents pH (MAIN et coll. (85), CANELLAKIS et HERBERT (86)), les celluloses modifiées (Ecteola, DEAE ou nitrocellulose) (BRADLEY et RICH (87)) ; GOLDTHWAIT (88) KLAMERTH (89)), l'amidon modifié (cato 2 ou cato 8) (SMITH et coll. (90)), la protamine absorbée sur Kieselghr (LEGAULT DEMARE et coll. (91)) ou encore la sérum-albumine méthylée sur Kieselghr selon la technique de MANDELL et HERSHEY (92). Cette dernière méthode est le plus couramment utilisée. La filtration sur gel de Sephadex permet également de purifier les solutions d'ARN obtenues (HYMER et coll. (93), SEBRING et coll. (94). La sédimentation en gradient linéaire de saccharose conduit d'autre part à une bonne séparation des ADN (gradients de 5 à 20 % , BRITTEN et ROBERTS (95) ou de 10 à 40 %, KRSMANOVIC (96)).

Déprotéinisation.

La déprotéinisation nécessitera l'intervention d'agents physiques et chimiques capables de détruire les forces de coulomb qui interviennent dans la formation des complexes ARN protéines (voir page 32). On opère par augmentation de température, par recul d'ionisation ou déplacement ionique, ou encore par dénaturation totale des protéines.

CHARGAFF et coll. (97), DAVIDSON et WAYMOUTH (98) ont préconisé un traitement à 90°C pendant 30 minutes, dans le chlorure de sodium à 10 %. Ce procédé fut repris par TSUBOI et STOWELL (99) et par DAVIDSON et SMELLIE (100). COHEN et STANLEY (101) ont appliqué un chauffage de une minute à pH neutre. Ces procédés ont été abandonnés, car on sait maintenant qu'un traitement thermique même très court, détruit la structure secondaire des acides nucléiques et provoquent au refroidissement des remaniements moléculaires profonds conduisant à la formation de molécules hybrides (ADN - ARN, ARN - ARN) -(voir SPIEGELMAN (102).

Pour éviter cette dénaturation thermique, la déprotéinisation est effectuée à froid sous l'action de différents agents ionisés et polaires. CRESTFIELD SMITH et ALLEN (103) ont utilisé des solutions de

chlorure de sodium 1 M à 0°. Le chauffage à 100° dans les solutions de chlorure de sodium 1 à 1,7 M provoque une dégradation profonde et conduit à l'obtention de poly - et oligonucléotides (TRIM et coll. (104). VOLKIN et CARTER (105) ont obtenu une déprotéinisation très poussée par le chlorhydrate de guanidine. Cet agent se combine aux ARN pour donner un complexe insoluble et permet ainsi l'isolement direct des ARN à partir de l'homogénat total (voir page 68). Les protéines restent en solution et ne sont pas dénaturées.

Les agents de dénaturation des protéines le plus couramment utilisés maintenant sont le phénol (voir page 61) et les détergents (voir page 60). Ces deux groupes de composés ont permis la mise au point de très nombreuses méthodes directes d'extraction. Néanmoins, quel que soit le procédé de déprotéinisation appliqué, il n'a pas encore été possible d'obtenir des préparations d'ARN totalement dépourvues de protéines. Il convient à nouveau d'effectuer un fractionnement (chromatographique ou physique) pour obtenir une classe d'ARN pur. On peut également purifier les préparations par la précipitation des ARN, ce qui permet d'éliminer rapidement les restes protéiques. L'éthanol (LITTAUER (106), KIRBY (107), le sulfate d'ammonium et le chlorure de sodium (COLTER (108)) sont les agents de précipitation les plus utilisés. D'autres agents de plus grande polarité ont été récemment préconisés (*) :

- Bromure de cétyltriméthylammonium (RALPH et BELLAMY (109))
- Sels de triethyl et tetremethylammonium (KIRBY (110), EBEL (111))
- Sulfate de Protamine (PHILLIPS et coll. (112))
- Trichlorure d'indium (SAMIS et coll. (113))
- Trihexylamine ou 2-2'-diéthyldihexylamine (KIDSON et coll. (114)).

Ces différentes opérations de purification provoquent toujours des pertes appréciables d'ARN.

La présence d'impuretés protéiques peut ne pas être gênante pour les études de structure des ARN ; elle diminuera considérablement, par contre, l'intérêt des expérimentations portant sur l'activité

(*) voir DERUMEZ (115).

biologique propre des ARN, notamment dans l'étude des "ARN infectieux". On voit donc que le problème de la pureté des préparations d'ARN est extrêmement complexe. L'extraction des ARN provoque, pour la plupart des procédés, des pertes d'ARN qui peuvent être sélectives. En outre les procédés d'extraction sont susceptibles de modifier plus ou moins profondément les ARN en altérant la structure secondaire et même la structure primaire dans certains cas. Le dernier problème technique est donc celui de l'intégrité moléculaire des préparations obtenues.

3 - Intégrité moléculaire des préparations.

On peut distinguer deux types d'altération macromoléculaire : la dénaturation qui est par définition la modification des propriétés physiques par suite d'une altération de la configuration spatiale de la molécule (dans le cas des ARN les dénaturations résultent d'une rupture des liaisons "pont hydrogène" de la molécule); la dégradation qui s'accompagne de la libération de fragments de la molécule par suite d'une altération de la structure primaire. Cette dégradation se manifeste par une diminution du poids moléculaire. Elle s'accompagne de la libération d'oligo - et polynucléotides micromoléculaires qui seront perdus au cours de l'extraction.

Dénaturation des ARN.

La dénaturation thermique est la plus importante. Les travaux les plus détaillés dans ce domaine ont été effectués sur les ADN que l'on obtient plus facilement à l'état natif.

L'effet thermique sur les ARN de haut poids moléculaire (température critique : 70 à 85° selon la force ionique) est cependant différent de celui des ADN, du point de vue des variations de viscosité et de densité optique (voir à ce sujet SPIRIN (116)). L'effet thermique détruit les liaisons hydrogène qui assurent les structures hélicoïdales et l'abaissement progressif de la température rétablit la structure secondaire, ce qui n'est pas le cas des ADN. SPIEGELMAN (117) et

SCHERRER et coll. (118) ont montré que les ARN dénaturés par la température pouvaient former des molécules hydrides, soit avec les ADN, soit avec des ARN différents ou des chaines polynucléotidiques. On conçoit aisément les conséquences graves qui pourraient résulter de ces remaniements au cours des extractions, notamment dans les procédés de déprotéinisation par chauffage. Enfin la stabilité thermique est fonction de l'ionisation du milieu et des agents de déprotéinisation présents dans le milieu. C'est ainsi que COX et ARNSTEIN (119) et RICE et DOTY (120) ont montré que la température critique de dénaturation thermique était plus basse en présence de l'urée 8 M, du chlorhydrate de guanidine ou du salicylate de sodium.

Le taux d'hydratation et la concentration en électrolytes ou en composés polaires sont également des facteurs de stabilité très importants. L'hypochromicité en lumière ultra-violette, signe de la destruction de la structure secondaire, se manifeste dans les solutions acides ou basiques, dans les solutions de force ionique très faible ou encore en présence d'urée, de formamide ou de diméthylsulfoxyde. En outre, les cations jouent également un rôle structural important : BOEDTKER (121) et SPIRIN (122) ont étudié l'influence des cations sur la forme des molécules d'ARN ribosomaux. Pour des forces ioniques de 0,1, l'ARN se présente sous forme de pelotes qui se déroulent et conduisent à une molécule monocatainaire par chauffage à des forces ioniques de 10^{-4} à $3 . 10^{-4}$M. Ces structures sont plus stables en présence de Mg^{++} ou de Ca^{++} qu'en présence d'ions monovalents (BOEDTKER (123)). Les cations divalents sont donc des facteurs de stabilité important ; leur addition dans les milieux d'extraction est souhaitable.

Dégradation des ARN.

La labilité des chaînes polynucléotidiques des ARN est très connue et les procédés d'extraction doivent être très rapides ; GIERER et SCHRAMM (124) ont montré que le poids moléculaire de l'ARN du virus de la mosaïque du tabac décroit de moitié après 24 heures à 0° en solution dans l'eau pure et du 1/6 après 24 heures à 0°C dans le

tampon phosphate 0,1 M. Ce poids moléculaire chute de moitié après seulement 5 heures de contact avec le phénol.

A ces phénomènes d'autolyse s'ajoutent les hydrolyses partielles en milieu faiblement alcalins et les dégradations partielles des nucléotides puriques en milieu acide (voir page 35). En outre, nous avons précisé précédemment la nécessité d'inhiber les nucléases au moment de l'extraction.

La revue très rapide de ces différentes conditions techniques va nous permettre d'envisager maintenant une classification des différentes méthodes d'extraction en précisant leurs qualités techniques.

B - MÉTHODES D'EXTRACTION

ALTMANN, en 1889 (125), effectua la première tentative d'isolement d'ARN à partir de la levure de boulangerie, par solubilisation en milieu alcalin, suivie d'une précipitation éthanolique des ARN. Cinq années plus tard, HAMMARSTEN (126) isola du pancréas de chat une fraction protéique riche en ARN qu'il appela β - nucléoprotéine. L'extraction consistait en une homogénéisation du tissu dans des conditions de pH fortement acide ; le précipité formé était redissous dans une solution diluée de soude et précipité par l'acide acétique. Simultanément OSBORNE et HARRIS (127) ont décrit en détail une méthode de préparation des ARN à partir de la graine de blé ; les étapes étaient les suivantes : précipitation par des solutions salines ($ClNa$, CH_3COONa...), digestions enzymatiques répétées par la pepsine et reprécipitation en milieu acide. Les auteurs obtenaient ainsi un mélange de nucléoprotéines et d'ARN libre. Ces trois méthodes faisaient appel à l'acide chlorhydrique comme agent de précipitation ; l'acidité trop élevée du milieu provoquait une dégradation des ARN (voir page 70). Diverses modifications ont été proposées à partir de ces trois techniques ; les tentatives, le plus souvent malheureuses, ont néanmoins permis de préciser les différents impératifs

techniques que nous avons résumés précédemment. C'est ainsi que SLADE (128) a préconisé l'utilisation du sulfate de magnésium comme agent de précipitation des ARN sous forme de nucléates de Magnésium ; JONES et ROWNTREE (129) ont utilisé l'acide acétique, associé à un temps de chauffage, qui provoque une hydrolyse profonde par les nucléases ; STEUDEL et BRIGL (130), puis LEVENE et LAFORGE (131) ont appliqué la méthode d'OSBORNE et HARRIS par digestion pepsique. Enfin, en 1917, CLARKE et SHRYVER (132) ont décrit les premiers un procédé d'isolement des ARN par des solutions de chlorure de sodium à 10 %, portées à 60 - 80°C. BAUMANN (133) a effectué l'année suivante une étude comparée des méthodes décrites depuis les premiers travaux de ALTMANN. A la fin de cette période préliminaire, il devenait possible, en 1920, de considérer les bases expérimentales suivantes :

1 - les ribonucléoprotéides précipitent quantitativement en milieu acide fort.

2 - les solutions alcalines diluées libèrent les ARN à partir des ribonucléoprotéides.

3 - les ribonucléoprotéides sont dissociées par les solutions salines concentrées.

4 - les enzymes protéolytiques conduisent à une déprotéinisation très partielle.

Les recherches entreprises sur le problème de l'extraction des ARN se sont fondées sur ces points essentiels.

Nous avons effectué une classification des techniques d'extraction, en distinguant les méthodes indirectes qui consistent à précipiter les nucléoprotéides, dont on extrait dans un second temps la fraction ribonucléique, et les méthodes directes qui conduisent à des ARN libres directement à partir de l'homogénat brut.

1 - Les méthodes indirectes (*)

Parmi les méthodes indirectes d'extraction, nous distinguerons deux groupes de procédés :

(*) Revues générales : MAGASANIK (134), JORDAN (135), ALLEN (136).

- les procédés d'isolement des ARN par déprotéinisation des ribonucléoprotéides.

- les procédés sans isolement des ARN, par hydrolyse sélective à partir du précipité macromoléculaire global.

a - Procédés d'isolement des ARN par dissociation des ribonucléoprotéides

Les ribonucléoprotéides, contrairement aux désoxyribonucléoprotéides, sont solubles dans le chlorure de sodium 0,14 M ; cette propriété a été mise à profit, en 1946, par MIRSKY et POLLISTER (137) pour la préparation des ribonucléoprotéides. Cette méthode d'extraction des ribonucléoprotéides a été appliquée par de nombreux auteurs ; les différentes méthodes d'isolement des ARN à partir de ces ribonucléoprotéides diffèrent, essentiellement, par l'agent de déprotéinisation choisi.

1949: -Procédé de KERR et SERAIDARIAN (138)

Les ribonucléoprotéides sont dissociées par le chlorure de sodium à demi saturation, pendant 36 heures. Les protéines libérées sont précipitées par l'acide chlorhydrique à pH 4,2 et l'ARN est isolé du filtrat par précipitation éthanolique. Cette méthode a été appliquée à l'ARN du pancréas par les auteurs et aux ARN de foie et d'utérus de rate par GOLD et STURGIS (139).

1950: -Procédé de CHARGAFF et coll. (140)

Les ribonucléoprotéides de la levure sont isolés par le chlorure de sodium 0,14 M ; leur dissociation est obtenue par un chauffage de 30 minutes à 90°, dans une solution de ClNa à 10 %. Ce procédé est fondé sur les résultats de CLARKE et SHRYVER (141).

1951: -Procédé de VOLKIN et CARTER (142)

Les ribonucléoprotéides, en solution dans le chlorure de sodium 0,15 M à pH = 6,8, sont dissociés par addition de chlorhydrate de guanidine à la concentration finale 2 M. On porte à 38°C pendant

30 minutes, puis à 0°C pendant une heure. Les protéines restent en solution et les ARN forment un gel, recueilli par centrifugation, qui est lavé dans la même solution puis débarassé des restes protéiques par le procédé de SEVAG (143) au chloroforme. On effectue enfin plusieurs reprécipitations par l'éthanol. GRINNAN et MOSHER (144) ont modifié le procédé en portant à 4 M la concentration en chlorhydrate de guanidine.

1952: -Procédé de DAVIDSON et SMELLIE (145)

L'extraction des ARN est effectuée par le chlorure de sodium à 10 % et à chaud, dans les conditions de CHARGAFF (146), directement à partir du précipité macromoléculaire, obtenu par l'acide trichloracétique à 10 % et suivi d'une délipidation. Les ARN sont purifiés par reprécipitation éthanolique. Cette technique a été appliquée également, avec certaines modifications, par DAVIDSON et WAY MOUTH (147), TSUBOI et STOWELL (148), CROSBIE et coll. (149).

1953: -Procédé de KAY et DOUNCE (150)

Les auteurs ont utilisé les détergents anioniques comme agent de dissociation des nucléoprotéides. La solution de ribonucléoprotéides dans le chlorure de sodium 0,14 M est additionnée d'un égal volume d'une solution de dodécylsulfate de sodium (SDA) à 5 g. pour 100 ml d'éthanol à 45 %. On agite et on ajoute une solution de soude à 10 % jusqu'à pH = 7. Après trois heures d'agitation, les protéines dénaturées sont précipitées par addition de chlorure de sodium solide (jusqu'à une concentration finale 1 M) et les ARN sont isolés du surnageant par précipitation éthanolique.

Par rapport aux différents impératifs techniques que nous avons posés précédemment, ces méthodes présentent de nombreuses imperfections. La première provient de l'extraction des ribonucléoprotéides par le chlorure de sodium 0,14 M, qui reste toujours incomplète et n'évite pas les dégradations enzymatiques dont nous avons parlé page-34- . La dissociation des nucléoprotéides par le chlorure de sodium provoque, en outre, une autolyse importante des ARN (voir page 35), que ce soit à chaud par les solutions à 10 % (procédés de CHARGAFF ou de DAVIDSON et SMELLIE) ou à demi saturation (procédé de KERR et SERAIDARIAN). Dans les conditions de KAY et DOUNCE, le dodécylsulfate de sodium à 2,5 % ne conduit pas à une déprotéinisation totale et fournit un rendement en ARN pur qui reste faible.

Enfin les concentrations en chlorhydrate de guanidine sont trop faibles pour permettre une déprotéinisation satisfaisante dans les conditions de VOLKIN et CARTER, et les nombreuses purifications sont très préjudiciables au rendement et à l'intégrité des ARN obtenus.

Ces différentes méthodes sont maintenant pratiquement totalement abandonnées ; pour les études de composition des ARN, les procédés sans isolement préalable se révèlent très supérieurs.

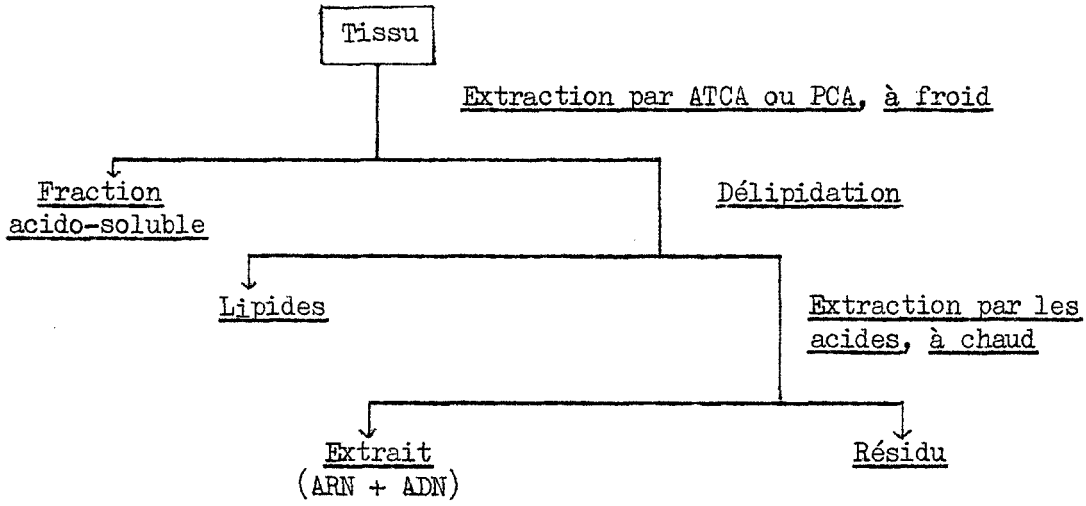
b - Procédés de préparation des tissus pour l'étude des ARN sans isolement préalable

Le principe général de ces procédés peut se résumer de la façon suivante : les tissus sont homogénéisés dans des solutions des acides trichloracétique (ATCA) ou perchlorique (PCA) qui précipitent la fraction macromoléculaire totale ; cette dernière est délipidée ; la fraction résiduelle est ensuite extraite soit par un traitement à chaud avec ces mêmes acides (qui fournit les produits de dégradation des ARN et ADN), soit par une hydrolyse alcaline sélective qui fournit quantitativement les ribonucléotides. Selon l'acide choisi, et les conditions de traitement , il est possible de distinguer trois méthodes générales :

-le procédé de SCHNEIDER (151)
-le procédé de OGUR et ROSEN (152)
-le procédé de SCHMIDT et THANNHAUSER (153).

Procédé de SCHNEIDER (151) et (154)

Le schéma général en est le suivant :



Dans le procédé original de SCHNEIDER (151), l'extrait tissulaire délipidé était traité par une solution d'ATCA à 5 %, pendant 15 minutes à 90°C ; le résidu était ensuite lavé, une fois à froid, par la même solution d'ATCA à 5 %. Ces conditions ont été largement modifiées par la suite : la concentration en ATCA a été réduite à 3 % ou amenée à 5,9 - 6 % et même 7,5 p 100. La température et la durée de l'extraction ont été également modifiées : le traitement a été effectué à 100° C pour des temps de 10 minutes, 20 minutes et 30 minutes. Plusieurs auteurs ont, en outre, préconisé l'application de plusieurs traitements successifs à chaud.

SCHNEIDER, HOGEBOOM et ROSS (154) ont substitué, en 1950 l'acide perchlorique (PCA) à l'acide trichloracétique. L'extraction était effectuée par une solution 1 N (6 %) de PCA, pendant 15 minutes à 90° C. Ces conditions ont été également modifiées par la suite :solutions à 3 %, 5 %, 9 % et 10 %, à des températures de 70° C , ou 80° C ; le temps de traitement a été prolongé à 20 minutes, puis 30 minutes et 50 minutes. Plusieurs traitement successifs ont également été appliqués dans ce cas. (sur ce sujet voir la revue générale de HUTCHISON et MUNRO (155).

L'étude critique de HUTCHISON et coll. (156) et celle, plus récente, de WEBB et LINDSTROM (157) ont montré, en déterminant les rendements par absorption en lumière ultraviolette, que l'extraction des fractions ARN + ADN était quantitative avec l'ATCA à 5 % ou le PCA à 2 %, pour 30 minutes à 90°. Ces résultats confirment ceux, plus anciens, de SCHRAMM et DANNENBERG (158) qui démontrèrent que l'ARN du virus de la mosaïque du tabac était quantitativement libéré par l'ATCA à chaud.

Enfin d'autres acides ont été utilisés pour scinder les nucléoprotéines : l'acide chlorhydrique (DAVIDSON et WAY MOUTH (159), SEVAG et coll. (160)), l'acide malonique (CASPERSSON et HAMMARSTEN (161)). Ces deux acides ne sont cependant pas aussi efficaces que l'ATCA.

Procédé de OGUR et ROSEN (152)

Cette méthode fut proposée en 1949. Elle est fondée sur une solubilisation sélective des ARN par l'acide perchlorique à froid.

Le tissu est délipidé et le fraction macromoléculaire est précipitée par un bref traitement avec l'acide perchlorique à 1 % (0,2 N) à froid. Le résidu est traité ensuite pendant 18 heures à 4°C par l'acide perchlorique à 6 % (1N) ; l'ARN est obtenu dans le surnageant. Le schéma opératoire est résumé dans la figure 9.

Les applications ultérieures de ce procédé, aux tissus végétaux et animaux et aux microorganismes, permettent de faire ressortir trois difficultés majeures :

1 - La solubilisation des ARN dans l'acide perchlorique froid est très variable d'un tissu à l'autre, dans les mêmes conditions. Selon MARTIN et MORTON (163) une classe d'ARN particulière reste insoluble dans l'acide perchlorique. STANLEY et CHU (164) ont démontré, en 1960, que la fraction d'ARN qui résiste à l'extraction possède une vitesse de marquage au ^{32}P nettement supérieure. HEYES (165) a simultanément montré que la composition nucléotidique des deux fractions (extractible

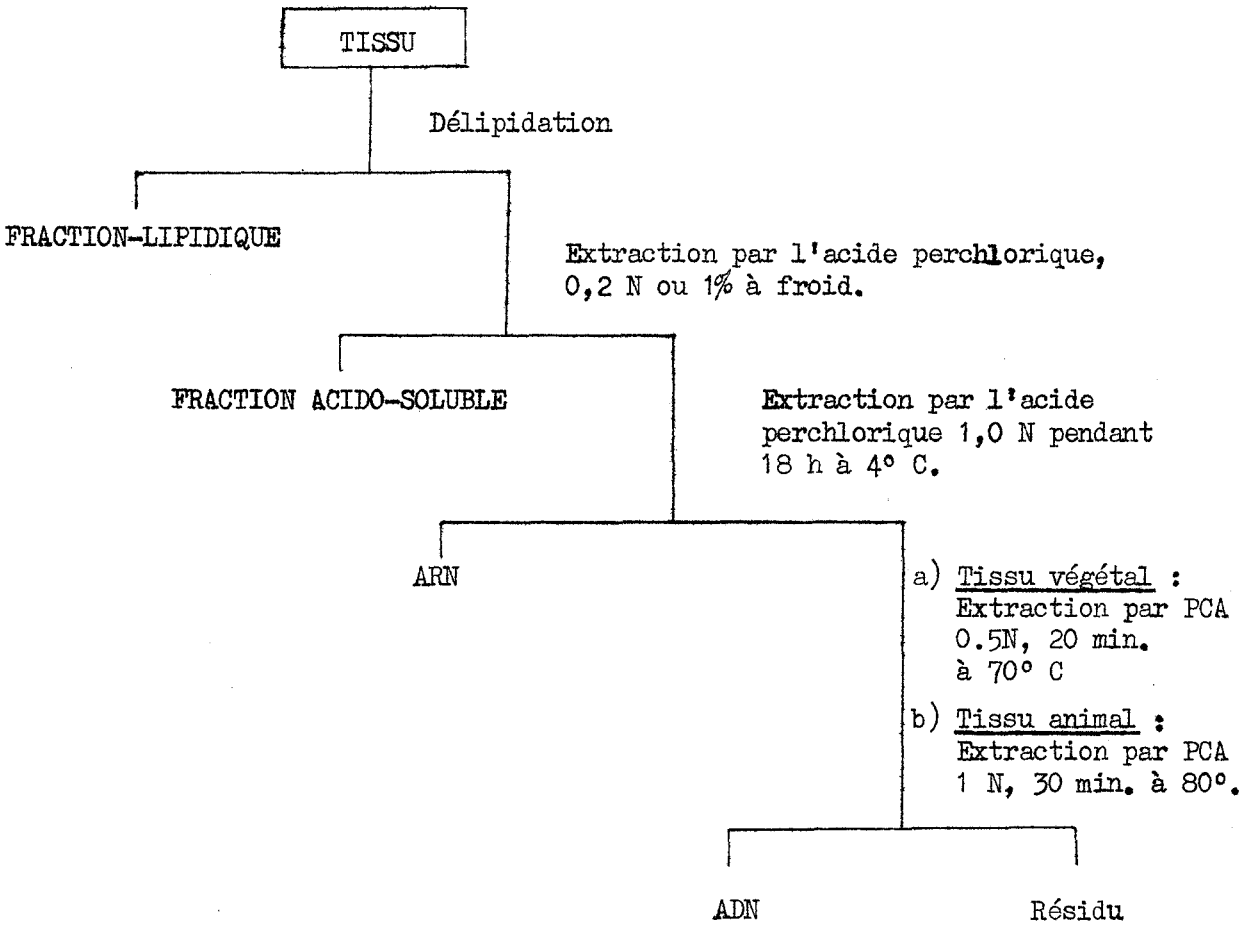


Figure 9 - Schéma opératoire du procédé d'extraction de OGUR et ROSEN.(152).

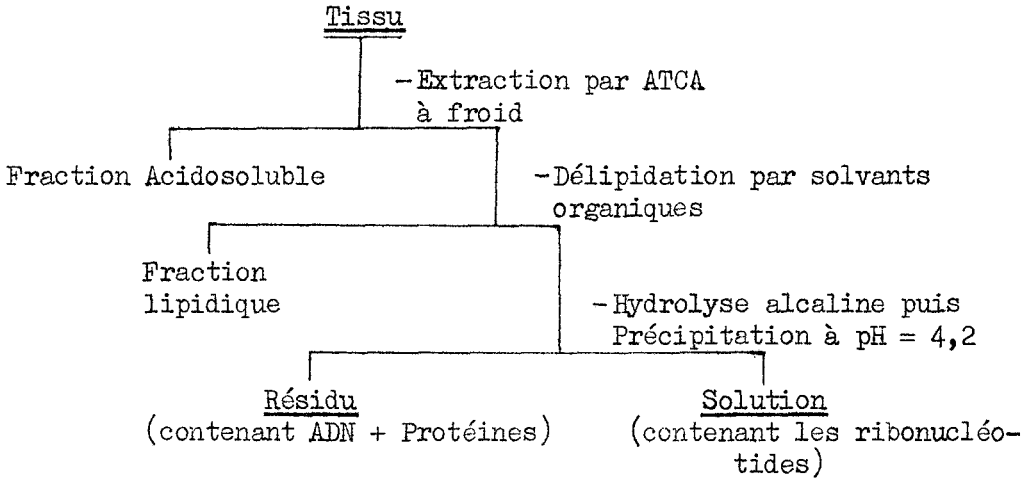
et résistante) était différente. Enfin FINAMORE et VOLKIN (166) ont obtenu une extraction fractionnée des ARN avec des concentrations croissantes d'acide perchlorique.

2 - De nombreux auteurs ont caractérisé la présence d'ADN dans les extraits perchloriques.

3 - Les conditions de OGUR et ROSEN (167) ne sont pas satisfaisantes pour l'extraction sélective des ADN, comme l'ont démontré récemment WEBB et LINDSTROM (168).

Procédé de SCHMIDT et THANNHAUSER (169)

Le schéma opératoire de cette technique est le suivant :



Le mode opératoire est identique à celui du procédé de SCHNEIDER, en ce qui concerne l'extraction acide et la délipidation. L'originalité de cette technique réside dans l'hydrolyse alcaline sélective des ARN à partir du précipité macromoléculaire ; on recueille, par acidification, les ribonucléotides provenant des ARN. Les protéines sont dénaturées et partiellement hydrolysées par les alcalis, tandis que les ADN restent intacts. Ce procédé parait très satisfaisant car il permet d'envisager son application à la détermination de la composition

nucléotidique des ARN totaux. C'est dans ce but que les différentes étapes de cette technique ont subi de nombreuses modifications. Nous allons les envisager de façon détaillée, car elles constituent un des fondements essentiels de nos travaux personnels.

1e étape : Extraction acide et élimination de la fraction acido-soluble.

La précipitation des tissus, à froid, par les acides s'accompagne généralement de l'élimination, dans le surnageant, des composés suivants :

a - phosphates minéraux et composés phosphorylés de faible poids moléculaire.

b - composés glucidiques acido-solubles.

c - nucléotides du métabolisme intermédiaire.

Une séparation incomplète de ces différents composés entrainerait une erreur par excès dans la composition nucléotidique des ARN, tant par la méthode au phosphore que par les dosages spectrophotométriques dans l'ultraviolet. Pour préciser les conditions optimales de cette première étape , il convient donc de tenir compte de deux impératifs complémentaires : 1) précipiter quantitativement les macromolécules, sans dégrader les ARN au cours de l'isolement et 2) éviter l'entrainement des fractions acidosolubles dans le précipité macromoléculaire. Un grand nombre de travaux ont été entrepris pour préciser le choix de l'acide, les concentrations à utiliser et le nombre de lavages requis. Nous distinguerons le cas de l'acide trichloracétique de celui de l'acide perchlorique.

- Utilisation de l'acide trichloracétique

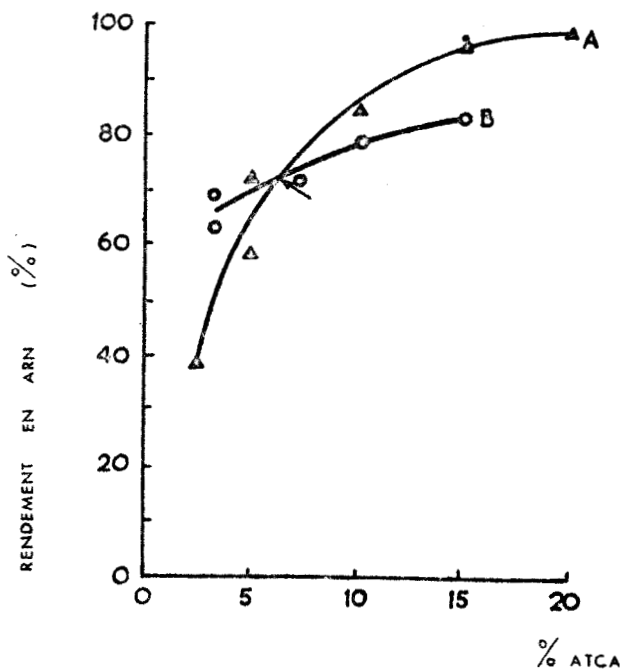
Dans leur article original, SCHMIDT et THANNHAUSER (170) réalisent la précipitation dans 20 volumes d'acide trichloracétique à 7 %. Après filtration, le précipité est lavé avec une solution

d'acide trichloracétique à I % jusqu'à ce que le filtrat ne contienne plus de phosphate minéral. Le précipité est ensuite repris par l'alcool, après plusieurs lavages à l'eau. SCHNEIDER (171) effectue la précipitation dans l'ATCA à 10 %, suivie de deux lavages avec la même solution à 10 %. Les études critiques ultérieures se sont toujours limitées au contrôle des rendements en phosphore. En 1948, MAC CARTER et STELYES (172) ont suivi l'élimination du phosphore acidosoluble en fonction du nombre de lavages dans l'ATCA à 10 % : les fractions acidosolubles contenaient successivement 91, 4, 3 et 2 % du phosphore libre. GRAHAM (173) par extraction et lavage avec l'ATCA à 5 %, a trouvé successivement 91, 7 et 2 % du phosphore acidosoluble ; MOULE (174) a précisé qu'une quatrième extraction de l'homogénat par l'ATCA à 10 %, selon SCHNEIDER, en élimine encore 1 %. Mais DAVIDSON, FRAZER et HUTCHISON (175) ont vérifié, en effectuant des lavages répétés par l'acide trichloracétique à 10 %, qu'il se produit une libération continue d'acide phosphorique par suite d'une lente hydrolyse des liaisons ester-phosphorique . En outre, les lavages répétés par l'acide trichloracétique ne permettent pas d'éliminer les contaminations résiduelles de phosphore libre, qui demeurent inférieures à 0,5 %. Enfin, LUNDIN (176) a signalé une chute appréciable du rendement en ARN et ADN, à partir du cinquième lavage par l'ATCA à 7 %. DAOUST et HOPPER (177) ont, pour cette raison, conseillé de ne jamais dépasser quatre lavages par l'ATCA, pour éviter l'autolyse des substances macromoléculaires.

STETTEN, KATZEN et STETTEN (178) ont attiré l'attention sur le cas particulier du glycogène, dans le cas du foie et du muscle. Sa présence peut être une source d'erreur importante dans le cas où on effectue les dosages du pentose nucléotidique. Le glycogène est précipité par l'ATCA et ne peut être éliminé qu'au stade de l'hydrolyse alcaline.

HUTCHISON et MUNRO (179) et HALLMAN, FLECK et MUNRO (180) ont recherché la concentration optimale d'ATCA. La figure

ci-dessous rend compte des rendements obtenus pour des solutions d'ATCA de concentration croissante. Les rendements sont déterminés par la méthode des doubles longueurs d'onde en ultraviolet (dont nous discuterons la valeur dans nos travaux personnels (voir page 104)) ; les courbes A et B, effectuées dans les mêmes conditions, permettent de constater



la dispersion des résultats, qui provient essentiellement d'une contamination variable en protéines.

Nous avons repris cette étude critique dont nous préciserons les résultats dans nos travaux personnels (voir page 108).

- Utilisation de l'acide perchlorique

L'utilisation de l'acide perchlorique pour la préparation des ARN est due à OGUR et ROSEN (181) (voir page 49). SCHNEIDER, HOGEBOOM et ROSS (182) l'ont adapté à la technique originale de SCHNEIDER (183), à la place de l'acide trichloracétique. Le tissu était extrait une fois par l'acide perchlorique 2 N (à 12 %) et lavé deux fois par une solution à 6 % du même acide. Plusieurs auteurs ont vérifié que l'extraction des ARN était complète après trois à six heures de contact avec l'acide perchlorique à 6 % (1 N). Cependant, HUTCHISON, DOWNIE et MUNRO (184) ont infirmé ces résultats et ils ont démontré, en 1962, que l'acide perchlorique à 4 % provoquait une perte appréciable d'ARN après deux heures de contact. PAUL (185), en 1958, avait déjà signalé une perte d'ARN, dans le cas des tissus embryonnaires, par un traitement d'une heure avec l'acide perchlorique à 1,2 % (0,2 N) ; c'est la raison pour laquelle ils ont préconisé l'emploi de l'acide sulfurique 1 N. Cette suggestion n'a cependant pas été suivie, eu égard à la labilité particulière des nucléotides en présence des acides sulfurique et chlorhydrique (voir page 70). Depuis les travaux de HALLINAN, FLECK et MUNRO (186) en 1963, il est admis maintenant que l'acide perchlorique permet d'obtenir une précipitation quantitative des ARN, à condition toutefois d'éviter un contact prolongé qui provoque une hydrolyse de l'ARN obtenu.

La polémique concernant le choix entre les acides perchlorique et trichloracétique subsiste encore maintenant.

MOULE (187), en 1953, avait précisé que le rendement en ARN était identique, pour quatre extractions avec l'ATCA à 10 % ou le PCA à 5 %. SMILLIE et KROTKOV (188), en 1960, ont obtenu des rendements identiques avec l'ATCA à 15 % ou le PCA à 10 % et 2 %. Enfin MONTREUIL (189) et DEFERT (190) ont étudié l'influence de la concentration en ATCA sur les rendements et la composition nucléotidique des ARN. Nous reviendrons nous-mêmes sur ces conclusions (voir : travaux personnels).

Outre les problèmes concernant la précipitation quantitative des nucléoprotéines par les acides et le respect de l'intégrité moléculaire des ARN, il convient de signaler une cause d'erreur supplémentaire qui intéresse les ADN. BONNAR et DUGGAN (191) et DUTTA (192) ont précisé, en effet, que les ADN pouvaient subir des ruptures de chaine au niveau des résidus puriques par formation d'acide apurinique. Cette réaction apparait à pH = 1,6 et elle est d'autant plus rapide que la température est plus élevée. Elle est totale sur 24 heures à 37°. Ces conditions peuvent être atteintes au cours des opérations de délipidation quand il subsiste des traces d'acide par suite d'un lavage insuffisant du précipité trichoracétique . L'ADN ainsi dégradé devient soluble en milieu alcalin et provoquera ainsi une erreur par excès au cours des dosages spectrophotophotométriques à partir de l'hydrolysat alcalin obtenu par le procédé de SCHMIDT et THANNHAUSER (193).

En conclusion de ces nombreux travaux concernant les conditions optimales de précipitation acide, nous pouvons ressortir les points suivants :

- quatre lavages successifs avec les solutions d'ATCA ou de PCA sont suffisants pour obtenir une précipitation quantitative des nucléoprotéides sans altérer les ARN.

- Les concentrations limites sont de 10 % pour l'ATCA et 6 % pour le PCA.

- Les contacts prolongés avec les acides sont à proscrire, car ils provoquent des dégradations et dénaturations des ARN et des ADN.

- L'ensemble des opérations doit être effectué à 4 ^{o}c.

2e étape : Délipidation

Nous avons relaté (page 36) les travaux nombreux qui ont permis à la fois de poser le problème général des pertes d'ARN dans la phase lipidique et de définir les meilleures conditions d'extraction des lipides. La technique de HUTCHISON et MUNRO (194) parait la plus satisfaisante. Indépendamment du choix des solvants sur lequel nous reviendrons plus loin, nous voudrions, en ce point de notre étude, insister sur le problème particulier de l'élimination des traces d'acide trichoracétique du précipité, avant d'aborder le traitement à reflux, en phase organique. Cette élimination est essentielle pour éviter la dégradation des ARN et des ADN en milieu acide, à chaud. La première phase de la délipidation comportera donc nécessairement un ou plusieurs lavages par l'éthanol, à froid. LUNDIN (195) a conseillé, en 1958, d'ajouter de l'acétate de sodium à l'éthanol pour neutraliser les traces d'acide résiduelles. STEELE, OKAMURA et BUSH (196) ont confirmé, en 1964, l'action bénéfique des acétates, qui conduit à un rendement optimum.

3e étape : Hydrolyse alcaline des ARN

STEUDEL et PEISER (197) ont signalé les premiers, en 1922, que les ARN étaient quantitativement hydrolysés en nucléotides acido-solubles par une solution de soude à 3 %, après 24 heures à la température ordinaire. SCHMIDT et THANNHAUSER (198) ont préféré utiliser la potasse 1 N, pendant 15 heures à 37°. Comme dans le cas de la précipitation acide, le choix des conditions de l'hydrolyse alcaline est fondamental. Nous discuterons de ce problème dans le chapitre consacré aux techniques de détermination de la composition en nucléotides (voir page 70). Le schéma de la figure 10 rassemble les conditions qui tiennent compte des différentes études critiques que nous venons d'envisager.

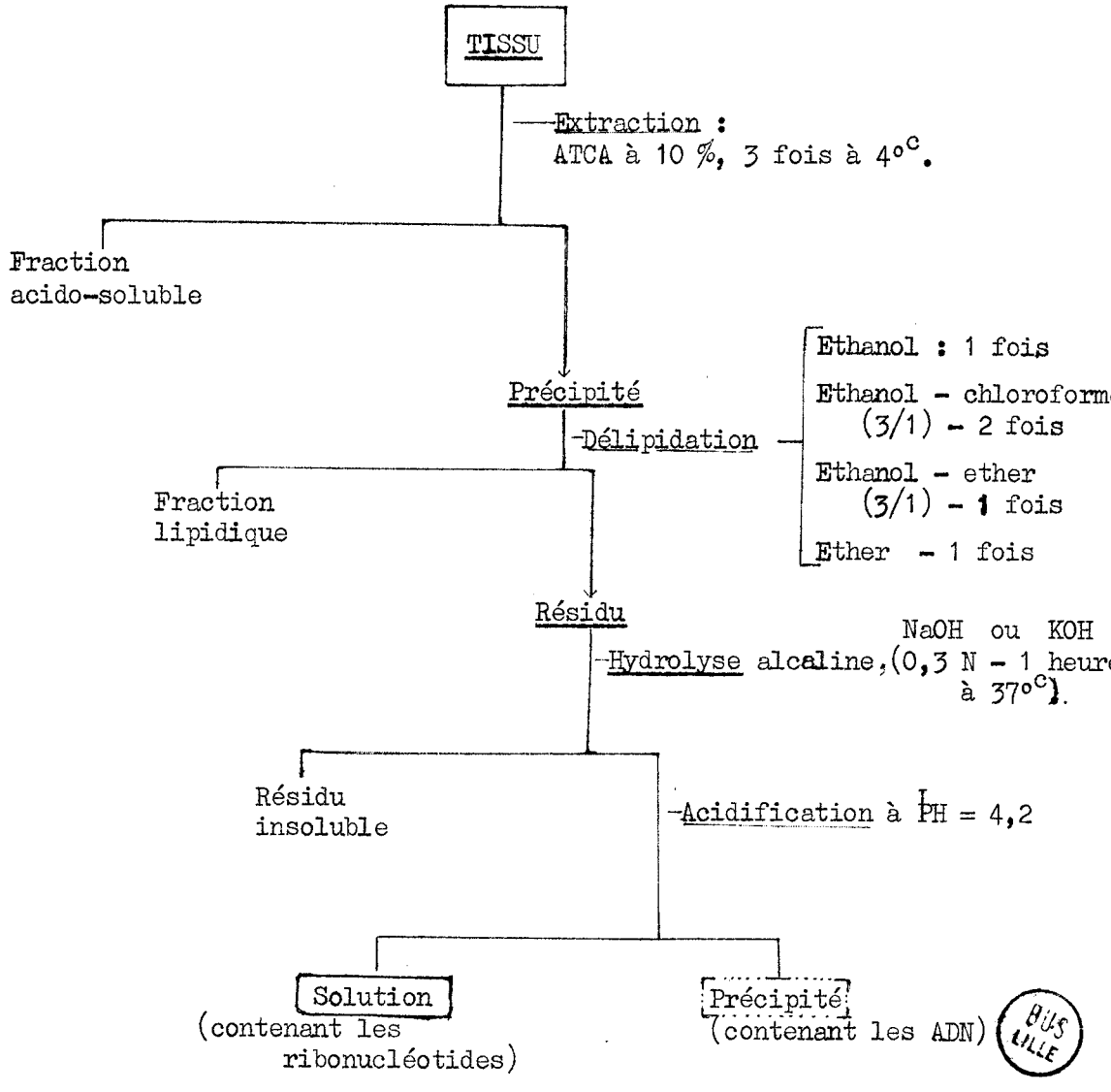


Figure 10 - Procédé de SCHMIDT - THANNHAUSER
modifié par HUTCHISON et MUNRO (199).

Parmi toutes les méthodes indirectes d'extraction des ARN, il apparait que seule la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER (200) a t résisté aux nombreuses études comparatives qui ont été effectuées depuis 1945. Les travaux de WEILL (201), de DERUMEZ (202) et de HUTCHISON et coll. (203) ont démontré que cette technique était la seule applicable pour les études de la composition nucléotidique des ARN tissulaires. Nous discuterons plus loin, dans le chapitre consacré aux méthodes d'étude de la composition des ARN, des problèmes de l'hydrolyse quantitative des ARN et de la détermination des rapports molaires des nucléotides. En ce qui concerne le seul problème de l'extraction des ARN à partir des tissus, seule la technique de SCHMIDT et THANNHAUSER est applicable dans cette orientation. Malheureusement, cette méthode ne permet pas d'obtenir des préparations aptes aux études structurales, car le traitement acide et les délipidations à chaud provoquent une destruction de la structure secondaire et des altérations profondes des structures primaires. Il convenait donc, pour les études de structure, de rechercher des méthodes susceptibles de fournir des ARN dont les intégrités moléculaires soient préservées. Les méthodes directes d'extraction ont tenté de répondre à ces impératifs.

2 - Les méthodes directes

Par rapport aux méthodes indirectes, pour lesquelles les ARN (ou leurs produits d'hydrolyse) sont extraits à partir des nucléoprotéines, préalablement isolées du tissu, ce groupe de techniques est fondé sur l'obtention d'ARN macromoléculaire par déprotéinisation directe des homogénats. Nous nous limiterons à trois groupes de procédés qui diffèrent par l'agent de déprotéinisation choisi : les détergents, le phénol et les sels de guanidine. Ces méthodes ont été travaillées en détail depuis quelques années, car, dans des conditions appropriées, elles fournissent des ARN macromoléculaires intacts, qui ont conservé leurs activités biologiques.

Les préparations doivent présenter les qualités suivantes :

pureté extrême, caractérisée surtout par l'absence de protéines et d'ADN.

intégrité moléculaire très poussée, respectant à la fois la structure secondaire (voir page 34) et la structure primaire (enchainement nucléotidique).

rendement optimum, qui excluera les pertes globales ou sélectives d'ARN.

a - Méthodes d'extraction des ARN par les détergents

BULL et NEURATH (204) ont utilisé les premiers, en 1937, le dodécylsulfate de sodium (SDS) comme agent de dénaturation des protéines. BAWDEN et PIRIE (205) et SREENIVASAYA et PIRIE (206) l'appliquèrent à des préparations virales. Cette technique fut ensuite adaptée aux ribonucléoprotéines tissulaires par KAY et DOUNCE (voir page 46). FRAENKEL - CONRAT et coll. (207) ont préparé de l'ARN infectieux à partir du virus de la mosaïque du tabac par un traitement de 5 minutes à 50°C avec une solution de SDS à 5 %. Cette technique s'est généralisée dans les laboratoires de virologie. CRESTFIELD, SMITH et ALLEN (208) et KEMP et ALLEN (209) ont appliqué ce principe à l'isolement direct

d'ARN tissulaire par le SDS. Dans le cas des tissus de mammifères, il semble que les détergents anioniques seuls ne permettent pas d'isoler quantitativement des ARN non dégradés. L'extraction est effectuée le plus souvent à chaud (80 - 100°) ce qui n'exclut pas les dénaturations thermiques (voir page 41). C'est pourquoi LUST (210) a combiné l'action du SDS et du chloroforme ; ce procédé au SDS - chloroforme fournit, avec un excellent rendement, une préparation très pure qui contient le mélange des ARN nucléaires et cytoplasmiques.

HALL et DOTY (211) ont combiné l'action du SDS à froid à celle du phénol (voir page 45). Parmi les autres types de détergents, les produits cationiques ont été peu appliqués ; GUERRITORE et BELLELLI (212) ont montré que l'extraction directe par le bromure de cétyltriméthyl-ammonium (cétavlon) conduisait à un rendement rarement supérieur à 30 %.

Il apparait actuellement que les procédés par les détergents, qui sont très précieux pour les travaux sur les virus, conduisent rarement à une extraction directe satisfaisante des ARN tissulaires. Ils sont peu appliqués ; les extractions phénoliques paraissent plus énergiques.

b - Méthodes d'extraction par le phénol

Le principe de l'extraction phénolique est simple : en traitant un tissu par une solution aqueuse de phénol, les protéines sont dénaturées et précipitent ; la démixion du mélange permet d'isoler, dans la phase aqueuse, les ARN libérés. PALMER et GERLOUGH (213) et MORGAN et PARTRIDGE (214) avaient les premiers, en 1940, utilisé le phénol aqueux pour isoler les polysaccharides bactériens. WESTPHAL et LUDERITZ (215), en 1952, ont décrit en détail diverses conditions d'extraction phénolique des polysaccharides de différentes bactéries (bacille typhique, Pseudomonas aeruginosa, Proteus vulgaris). Les auteurs ont utilisé des solutions aqueuses de phénol à 80 - 90 %, à différentes

températures (4°C - 68°C - 80°C). L'analyse de la composition chimique des deux phases, séparées par centrifugation, fournissaient les résultats suivants : La phase phénolique renfermait essentiellement des protéines dénaturées et des nucléoprotéines non dissociées et la phase aqueuse contenait, dans des proportions sensiblement égales, les polysaccharides et des acides nucléiques libres. La précipitation par l'éthanol à 50 % a permis de séparer les acides nucléiques (précipité) des polysaccharides (surnageant). Ce travail était orienté vers l'étude des polysaccharides, mais il posait le principe de l'extraction phénolique des acides nucléiques.

KIRBY (216) et GIERER et SCHRAMM (217) appliquèrent simultanément, en 1956, cette technique à l'extraction des ARN. Le procédé opératoire décrit par KIRBY est le suivant : après une homogénéisation du foie de rat dans l'eau, l'homogénat est agité, pendant une heure, avec un égal volume de phénol à 90 % ; après une centrifugation de une heure à 1.750 tours/mn, suivie de trois lavages de la phase phénolique par l'eau, les phases aqueuses rassemblées sont traitées par deux volumes d'éthanol, contenant 2 % d'acétate de sodium. Les polysaccharides sont éliminés du précipité éthanolique par une extraction avec le 2-méthoxy-éthanol. L'ARN obtenu par KIRBY était, selon les termes mêmes de l'auteur, "virtually protein free". Cependant l'hydrolyse totale avec l'HCl - 6N permet de caractériser des traces d'acides aminés. En outre, l'extrait brut contient souvent des nucléotides libres, qui sont éliminés par dialyse. GIERER et SCHRAMM (218) ont isolé l'ARN du virus de la mosaïque du tabac par le phénol à 80 %, en présence de tampon phosphate 0,01 à 0,02 M - pH = 7 ; ce dernier favorise la dissolution des protéines dans le phénol. L'obtention d'un ARN de haut poids moléculaire est conditionnée, selon ces auteurs, par la rapidité de la méthode et, surtout, par un contact le plus court possible avec le phénol (l'extraction s'effectue en une fois - 8 minutes et deux fois - 2 minutes à 4°C et à pH = 7,3 dans le tampon phosphate 0,02 M). La souillure protéique est inférieure à 0,02 % et l'ARN obtenu possède un S_{20} de 14 à 18 (soit un poids moléculaire de 900.000).

De très nombreuses modifications ont été proposées à partir de ces deux techniques; elles ont été essentiellement appliquées dans les recherches concernant les ARN biologiquement actifs des virus et des tissus tumoraux et dans les études de structure des ARN cytoplasmiques. Les modifications essentielles ont porté sur la nature des tampons (phosphate, citrate, Versene, Tris etc...) et sur les conditions de précipitation des ARN (chlorure de sodium, alcool, sulfate d'ammonium etc...).

VON WECKER et SCHAFER (219) ont opéré en présence de ClNa 0,14 M dans du tampon phosphate 0,01 M - pH = 7 : la préparation obtenue possède un rapport $\frac{A\ 260}{A\ 280}$ (*) de 1,90 à 1,97.

COLTER, BIRD et BROWN (220) ont choisi le mélange ClNa 0,14 M - tampon citrate 0,01 M - pH = 7. L'ARN était isolé par précipitation avec le chlorure de sodium 1 M. En 1958, HUPPERT et SANDERS (221) et HUPPERT et al. (222) ont obtenu par extraction de tissus tumoraux en présence du mélange ClNa - 0,14 M - tampon phosphate 0,02 M pH = 7,1, des préparations d'ARN possédant un rapport $\frac{A\ 260}{A\ 280}$ = 2,35. BROWN et STEWART (223) ont utilisé une solution de phénol saturée en tampon phosphate 0,04 M pH = 7,6. LACKS et GROS (224) ont opéré en présence de tampon Tris 0,002 M - pH = 7,2, contenant 0,005 M de Cl_2Mg ; HOLLEY (225) a utilisé une concentration de tampon Tris plus forte (0,1 M - pH = 7,5). Enfin VON WECKER et SHAFER (226) ont décrit, en 1959, une méthode d'extraction par le phénol chaud, à 40°C puis 60°C ; ces auteurs se sont inspirés des travaux de WESTPHAL et LUDERITZ (227). Par rapport aux techniques d'extraction à froid, cette méthode permet d'augmenter le rendement en ARN totaux ; cependant le taux d'ADN augmente et le rapport $\frac{A\ 258}{A\ 280}$ diminue.

(*) $\frac{A\ 260}{A\ 280}$ = rapport des adsorbances à 260 et 280 mμ, rend compte de la proportion relative des ARN (maximum à 260 mμ) et des protéines (maximum à 280 mμ). A pH = 7, la valeur optimale atteinte jusqu'alors avoisine 2,8.

La pratique de ces techniques d'extraction phénolique a fait apparaître, depuis 1960, trois problèmes essentiels concernant essentiellement : 1° - la pureté des extraits, 2° - l'intégrité moléculaire des ARN obtenus et 3° - la quantitativité des extractions.

1° - Pureté des extraits phénoliques

HABERMANN (228) a effectué, en 1959, la première étude chimique poussée de la composition des extraits phénoliques. Cet auteur a signalé la présence de 0,2 à 1,5 p 100 de protéines dont il est impossible de se débarasser par des précipitations répétées ou encore par traitement avec le dodécylsulfate. En outre, la dialyse et les analyses par électrochromatographie ont permis de caractériser la présence de peptides et de nucléotidyl-peptides. Ces résultats ont été confirmés par MONTREUIL et SEGARD (229), qui ont comparé les méthodes de KIRBY, GIERER et SCHRAMM et VON WECKER ; la présence d'ADN fut en outre signalée dans ces préparations. TISSIERES (230) a également obtenu un taux de protéines de 2,5 p 100 dans une préparation d'ARN soluble selon la méthode de KIRBY (231).

Ce problème de la contamination persistante des préparations par les protéines et les ADN a incité certains auteurs à introduire des traitements complémentaires. C'est ainsi que HALL et DOTY (232) ont effectué une déprotéinisation par le laurylsulfonate de sodium (solution à 0,1 p 100) avant de soumettre les préparations à l'extraction phénolique selon GIERER et SCHRAMM (233). Une déprotéinisation préalable par le Duponol C, selon CRESTFIELD et ALLEN (234), a été effectuée par SHORTMAN et FURUHARA (235). LACKS et GROS (236) ont préconisé un tra itement par les DNases avant l'extraction. Enfin MONIER (237) a conseillé une adsorption des extraits sur charbon actif. RALPH et BELLAMY (238) ont purifié les préparations obtenues dans les conditions de KIRBY (239) par une précipitation sélective des ARN sous forme de complexes avec les ions céthyl-triméthyl ammonium. La précipitation par les sels d'ammonium quaternaires a été étudiée systématiquement par AUBEL-SADRON et al. (240). Il semble admis actuellement que la purification

totale des extraits ne peut être atteinte qu'en faisant appel aux techniques d'ultracentrifugation en gradient de densité ou de chromatographie sur colonne.

2° - Intégrité moléculaire des ARN obtenus. (voir page: 41)

LITTAUER et EISENBERG (241) ont effectué une étude critique des conditions d'extraction dans le but de préciser les conditions d'obtention d'ARN de haut poids moléculaire. Les conclusions de ces auteurs furent les suivantes :

1 - La méthode de KIRBY (242) fournit une préparation qui contient des protéines, des polysaccharides et des ADN. Le poids moléculaire de l'ARN obtenu est faible ($S_{20} = 3$)

2 - Le phénol doit être redistillé pour être exempt de produits acides qui provoquent des dégradations profondes ; les solutions phénoliques doivent être fraiches pour écarter la formation de produits d'oxydation.

3 - le pH du milieu doit être voisin de 8.

4 - Le Versène préserve l'intégrité moléculaire des ARN, à une concentration de 10^{-4} M.

5 - Le magnésium exerce la même action pour des concentrations comprises entre 0,1 et 0,5 mM (voir page 8).

6 - La température optimale est de 20°. L'extraction à 68°C, dans les conditions de VON WECKER et SCHAFER (243), fournit 4 à 12 p 100 de l'ARN total, avec un taux très élevé de polysaccharides (40 à 50 p 100 de l'extrait). A 20°C, le taux de protéines est le plus faible et le rendement en ARN le plus élevé.

A la suite de ces travaux, les auteurs conseillèrent l'homogénéisation dans une solution de Versène 10^{-4} M - pH = 8, contenant 0,5 mM de Cl_2Mg. L'extraction est effectuée par une agitation de une heure à 20°C, en présence d'un égal volume d'une solution à 90 p 100 de phénol redistillé. La phase aqueuse est précipitée par le chlorure de sodium 3M : après quelques minutes, les protéines et le glycogène précipitent tandis que l'excès de phénol cristallise.

Un gel d'ARN est obtenu à partir du surnageant, après un à trois jours de repos à 0°C. Repris par le Versène 10^{-4} M et dialysé 18 heures contre deux litres de ClNa - 10^{-3} M, l'ARN de haut poids moléculaire (S_{20} = 26 pour E. COLI) contient encore des traces de protéines.

LACKS et GROS (244) ont obtenu des préparations d'ARN biologiquement actifs, à partir de E. Coli, en opérant avec le tampon Tris 0,002 M - pH = 7,2, contenant 0,005 M de Cl_2Mg. L'importance des ions Mg^{++} dans le respect de l'intégrité moléculaire a été largement confirmée depuis (voir page). SANDERS (245) a suggéré, en 1960, que les ions Ni^{++} stabilisaient les molécules et permettaient de diminuer les dégradations. Enfin l'addition de bentonite au milieu d'extraction a été conseillée par SINGER et FRAENKEL-CONRAT (246). La bentonite présente le double avantage de stabiliser la molécule et d'inactiver les nucléases (voir page 34).Enfin KIRBY (247) a recommandé, en 1960, le naphtalène - 1 - 5 - disulfonate à 0,5 p 100 dans le phosphate 2,5 M - pH = 6,5. La dégradation des ARN est plus faible que par une extraction avec le mélange phénol - eau, et le taux des protéines baisse à moins de 0,5 p 100. Ce même auteur a décrit, en 1965, une méthode d'extraction des ARN ribosomaux par le mélange phénol- m - crésol ; après une purification par l'acétate de sodium 3 M, les ARN 18 et 28 S sont obtenus sans dégradation.

Quelles que soient les modifications envisagées, les techniques d'extraction phénolique ne fournissent donc pas directement des ARN purs (exempts de protéines et d'ADN) ; il est, en outre, très difficile d'éviter les dégradations au cours de l'isolement. Nous avons repris l'étude de ces problèmes en tenant compte des différents travaux que nous venons d'évoquer dans l'espoir de définir des conditions satisfaisantes d'extraction (voir page143). Il convenait également de vérifier si ces méthodes conduisaient à une extraction totale des ARN. Un certain nombre de travaux ont déjà été entrepris dans ce but.

3° - Rendement de l'extraction

SIBATANI et al.(248) et YAMANA et SIBATANI (249) ont, en effet, montré que l'extraction des ARN par le phénol était sélective et conduisait à un fractionnement chimique des ARN par suite d'un partage entre les deux phases. Les déterminations des compositions nucléotidiques et des radioactivités spécifiques des ARN de la phase aqueuse et de la phase phénolique ont conduit les auteurs aux conclusions suivantes : les ARN de la phase aqueuse, qui présentent un taux d'acide guanylique élevé et une radioactivité spécifique faible, correspondent aux ARN cytoplasmiques. Par contre, les ARN de la phase phénolique possèdent un taux d'acide guanylique faible et une radioactivité spécifique très élevée. Ils pourraient bien correspondre aux ARN du noyau, qui passeraient sélectivement dans la phase phénolique au cours des extractions.
A partir de ces travaux, SIBATANI et al.(250) ont décrit, en 1962, une technique de préparation de grandes quantités d'ARN nucléaire du type "ARN messager". KIRBY (251) a caractérisé une fraction d'ARN messager dans l'interphase phénol - eau, par distribution à contre - courant. Enfin KIMURA (252) et GEORGIEV et al. (253) ont confirmé l'origine nucléaire des ARN de la phase phénolique. Nous avons nous mêmes vérifié ces résultats (voir : travaux personnels).

Ces différents travaux, que nous venons de résumer rapidement, permettent donc de conclure que les méthodes d'extraction phénolique ne peuvent être considérées comme des techniques d'isolement quantitatif des ARN. En outre, elles ne fournissent pas des préparations pures d'ARN, dont les intégrités moléculaires soient suffisamment préservées pour envisager des études structurales.

Ces nombreux problèmes techniques nous ont incité à nous tourner vers les méthodes d'extraction par le chlorhydrate de guanidine.

c - Méthodes d'extraction par le chlorhydrate de guanidine

VOLKIN et CARTER (254) (voir page 45) et GRINNAN et MOSHER (255) ont isolé des ARN, à partir des ribonucléoprotéines, en faisant appel au chlorhydrate de guanidine comme agent de déprotéinisation. Dans des conditions de pH et de température déterminées, les ions guanidinium se combinent avec les ARN pour former des complexes insolubles, qui se séparent aisément des protéines restant en solution. Après différents lavages, le complexe est dissocié en milieu acide à pH = 4,2 - 4,5 et l'ARN est isolé par précipitation éthanolique.

Nous avons décrit page46, les conditions de VOLKIN et CARTER (256) et la modification de GRINNAN et MOSHER (257). Plusieurs auteurs ont appliqué ce principe d'extraction, dans le cas de virus ou de certaines fractions cytoplasmiques, en modifiant les conditions de concentration, de température et de pH.

L'isolement de l'ARN infectieux du virus PVX a été effectué, en 1959, par REICHMANN et STACE - SMITH (258), dans les conditions suivantes : chlorhydrate de guanidine 2,5 M dans une solution de Versène 5 mM - pH = 8,4, une heure de contact à 4°C. Le rapport $\frac{A260}{A280}$ était égal à 2,2, mais une analyse poussée de la pureté des extraits n'a pas été effectuée. KAWADE (259) a obtenu des résultats semblables à partir de divers virus végétaux. La seule étude complète des conditions d'extraction est due à COX et ARNSTEIN (260), qui isolèrent des ARN ribosomaux purs à partir des réticulocytes de lapin. L'extraction des ribosomes est effectuée par le chlorhydrate de guanidine 4 M - pH = 4,5 à 0°C pendant 30 minutes. Le précipité est lavé plusieurs fois dans du tampon Versène contenant de la bentonite, pour inhiber totalement la ribonucléase (voir page 34). L'ARN est isolé par passage sur des colonnes de résines à échange de cations. Ce procédé fournit des préparations d'ARN ribosomaux, totalement dépourvus de protéines. Cette méthode a été légèrement modifiée l'année suivante (ARNSTEIN, COX et HUNT (261)) en augmentant la concentration en chlorhydrate de guanidine à 5 M.

Nous discuterons en détail, dans nos travaux personnels les divers résultats techniques de ces auteurs. La qualité des préparations obtenues par le procédé de COX et ARNSTEIN (262) nous a incité à choisir ce principe d'extraction pour tenter de mettre au point une méthode directe de préparation des ARN totaux des tissus. Nous décrirons, dans nos travaux personnels, cette mise au point. Cette technique s'est révélée d'application générale (tissu total et fractions cytoplasmiques); elle fournit des ARN purs, dont l'intégrité moléculaire permet d'envisager en toute rigueur l'étude de leur structure primaire.

Cette étude bibliographique des méthodes de préparation des ARN appelle les conclusions suivantes :

- Parmi les méthodes indirectes d'extraction, les nombreuses études critiques des techniques originales ont démontré que seule la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER (263) fournissait des préparations aptes aux études de composition. Cependant ces préparations ne sont pas pures et les dégradations qui apparaissent au cours de l'extraction interdisent leur emploi pour les études comparatives des structures primaires.

- Parmi les méthodes directes, les méthodes d'extraction par les détergents ne conduisent pas à une déprotéinisation totale. Les techniques d'extraction phénolique permettent difficilement d'obtenir une pureté satisfaisante et le partage sélectif entre les deux phases s'oppose aux études structurales comparatives. Les résultats des extractions par le chlorhydrate de guanidine permettaient d'envisager leur application dans notre orientation de travail.

Avant de rendre compte de nos travaux concernant l'étude critique des différentes méthodes d'extraction des ARN et la mise au point d'une méthode de préparation qui s'applique aux études structurales, nous décrirons, très rapidement, les différentes méthodes d'étude de la composition et de la structure des ARN.

II - LES METHODES DE DETERMINATION DE LA COMPOSITION DES ACIDES RIBONUCLEIQUES

L'étude de la composition des ARN est fondamentale, qu'elle soit qualitative (notamment pour la recherche des composés mineurs) ou quantitative (pour la détermination des rapports molaires des nucléotides). Dans les deux cas, l'opération préalable est celle de l'hydrolyse totale des ARN obtenus par l'un des procédés que nous venons de décrire. Nous distinguerons donc successivement, l'hydrolyse totale des ARN, puis l'analyse des hydrolysats, et enfin le dosage des nucléotides libérés.

A - L'HYDROLYSE TOTALE DES ARN.

L'hydrolyse des chaines polynucléotidiques peut être envisagée par voie enzymatique ou par voie chimique. Les phosphodiestérases et les ribonucléases ne permettent pas une hydrolyse totale directe des ARN, par suite de leurs spécificités d'action. Il est nécessaire, le plus souvent, d'opérer en plusieurs étapes en associant plusieurs enzymes. En outre, les préparations pures sont très coûteuses. Pour ces différentes raisons, les enzymes ont été peu utilisés pour les études de composition des ARN. Leur usage est, par contre, indispensable dans les études de structure et nous préciserons leur domaine d'utilisation dans le chapitre suivant consacré aux hydrolyses partielles. L'hydrolyse totale des ARN est le plus généralement obtenue par voie chimique ; nous distinguerons les hydrolyses acides et les hydrolyses alcalines.

1 - Hydrolyse acide des ARN.

En présence des acides minéraux, les nucléotides pyrimidiques sont beaucoup plus stables que leurs correspondants puriques (voir page 11). Dans des conditions déterminées de concentration et de température, l'hydrolyse totale conduira donc, dans ce cas, au mélange

TABLEAU - E

QUELQUES VARIATIONS DANS LES CONDITIONS D'HYDROLYSE ACIDE DE L'ARN

Acide employé	Conditions	Auteurs et Références	Commentaires
(1) H_2SO_4	9N (= 25 %) 175°C 120 mn	LEVENE et BASS (270)	Désamination de la cytosine en uracile
	1 N 100°C 60 mn	MARKHAM et SMITH (271) MAC DONALD (272)	Libération d'un mélange de bases puriques et de nucléotides pyrimidiques
(2) HCl	0,4 à 0,6 N 120°C 60 mn	HOTCHKISS (273)	Libération des pyrimidines proportionnelle à la concentration en HCl
	2,1 N (= 20 %) 175°C 60 mn	VISCHER et CHARGAFF (274)	Désamination de la cytosine
	1 N 100°C 60 mn	KIRBY (275)	Libération quantitative de bases puriques et de nucléotides pyrimidiques
(3) H COOH	23N (=98 à 100%) 175°C 120 mn	VISCHER et CHARGAFF (275)	Pas de désamination mais CHARGAFF et Coll. (277) signalent une perte d'Uracile
	15 N (= 66 %)	BURTON et PETERSON (278)	Dépurinisation d'ARN
(4) $HCl\ O_4$	12 N (= 71 %) 100°C 60 mn	MARSHAK et VOGEL (279)	Libération quantitative de toutes les bases mais apparemment les pyrimidines sont irrécupérables
		MARSHAK (280), ELVES et coll. (281), SCHNEIDER (282) et CROSBIE et Coll. (283)	ces auteurs notent une hydrolyse satisfaisante par $HClO_4$
		KLEINSCHMIDT et MANTHEY (284) et CROSBIE et Coll. (285)	Pour ces auteurs il existe une libération non quantitative des bases pyrimidiques, spécialement en présence de protéines (SMITH et STUKER (286))
	12 N 100°C 120 mn	MARKHAM (287)	Libération complète de toutes les bases
(5) CF_3COOH	155°C 80 mn	DUTTA, JONES et STACEY (288)	Libération complète de toutes les bases Pas de désamination de la cytidine Pas de destruction du papier

BUS LILLE

des nucléotides pyrimidiques et des bases puriques correspondantes. Avec les acides organiques concentrés, l'hydrolyse libère les bases puriques et pyrimidiques.

De très nombreux travaux ont été entrepris pour préciser les conditions d'hydrolyse quantitative en milieu acide. Nous les avons résumés dans le tableau E. Nous voyons que les conditions d'hydrolyse quantitative par les acides chlorhydrique et sulfurique sont les suivantes : solution 1 N, à 100°C pendant 60 mn. On obtient dans ce cas le mélange des bases puriques et des nucléotides pyrimidiques. Des concentrations en acide supérieures à la normalité provoquent immanquablement une désamination importante de la cytosine (voir la revue générale de LORING (264)) ; l'acide cytidylique se transforme en acide uridylique et provoque ainsi une erreur grave dans les dosages ultérieurs. Dans le cas des acides organiques, les bases sont libérées sur deux heures avec les solutions concentrées des acides formique (à 175°C) et perchlorique (à 100°C). WYATT (265) a montré que ces conditions sont valables dans le cas des ADN. De nombreux auteurs ont, en outre, précisé que l'acide perchlorique 12 N - à 100°C pendant 60 mn, dans les conditions de SCHNEIDER (voir page 48) ne permettait pas une libération rigoureusement quantitative des bases pyrimidiques (KLEINSCHMIDT et MANTHEY (266) ; CROSBIE (267)). Ces techniques ont été largement utilisées dans les études de composition. Elles ont posé le problème de l'analyse des bases et des mélanges bases - nucléotides. En outre, elles ne sont pas sélectives et ne permettent pas l'hydrolyse directe du mélange ADN + ARN. L'hydrolyse alcaline supprime cette difficulté.

2 - Hydrolyse alcaline des ARN

L'hydrolyse alcaline, dans des conditions de pH élevé, avait été travaillée initialement pour tenter d'isoler les nucléosides à partir des ARN : ammoniaque à 16 p 100, 180°C pendant 3 à 4 heures (LEVENNE et JACOBS (268)) ; pyridine à 50 p 100, 110°C pendant 120 heures (BREDERECK et coll. (269)). L'utilisation des phosphatases a permis depuis d'obtenir plus aisément les nucléosides à partir des nucléotides.

Ces travaux historiques sont cependant à l'origine de la mise au point des hydrolyses alcalines d'ARN. Depuis les travaux de STEUDEL et PEISER (289), en 1922, on sait, en effet, que les solutions alcalines diluées libèrent les nucléotides des ARN. Etant donné le mécanisme d'hydrolyse que nous avons indiqué à la page 21 , le grand avantage de s'attaquer sélectivement aux ARN, dont les hydroxydes 2' sont libres ; les ADN restent intacts. Les nucléotides libérés sont des nucléosides - 3' - phosphate. De très nombreux travaux, dont les conclusions ne sont d'ailleurs pas encore définitives, se sont attachés à préciser les conditions d'hydrolyse quantitative. Nous distinguerons successivement le choix de l'alcali et celui des conditions d'hydrolyse, qui doit tenir compte de la stabilité des liaisons esters et de celle des nucléotides.

a - choix de l'alcali

LEVENE (290), en 1918, avait utilisé l'ammoniaque à 25 p 100 pour isoler les nucléotides à partir de l'ARN. De nombreux autres agents alcalins ont été étudiés : carbonates de sodium ou de baryum, hydroxydes de plomb, cadmium, zinc, bismuth ou aluminium. Seuls les hydroxydes de sodium et de potassium ont cependant été retenus pour les études de composition.

b - choix des conditions d'hydrolyse

La détermination des conditions d'hydrolyse (concentration, pH, température, temps) a donné lieu à une somme considérable de travaux, que nous résumerons de la façon la plus brève.

ZITTLE (291) a précisé, en 1945, les conditions de stabilité des liaisons esters en milieu alcalin. A pH = 10,5 (solutions 0,0005 N) et à la température ordinaire, les liaisons phosphodiesters sont stables. L'hydrolyse commence à pH = 11,6 (solutions 0,006 N) au bout de plusieurs jours à 20 - 25°C. BROWN, FRIED et TODD (292) ont confirmé ces résultats.

TABLEAU - F

QUELQUES VARIATIONS DANS LES CONDITIONS D'HYDROLYSE ALCALINE D'EXTRAITS DE TISSUS, AVANT LEUR SEPARATION EN ARN ET ADN

Normalité de l'alcali	Temp. °C	Durée de l'incubation en heures	Tissu examiné	Auteurs et Références
1,5	37	48	Foie	DAOUST et HOOPER (298)
1,0	37	15	Tissus de mammifères	SCHMIDT et THANNHAUSER (299)
	37	4	Tumeur mammaire	DRASHER (300)
	38	2	Tissu hématopoïétique	LOWRANCE et CARTER (301)
	30	18	Oeufs d'Arbacia	MARSHAK et MARSHAK (302)
	labo	18 à 24	Bactéries; tissus végétaux	IVERSON et GIESE (303) ;
				COOPER ET LORING (304)
	labo	1	Foie; rein; rate; épiderme;	SCOTT et coll. (305), BONAR et
			levures; racines végétales	DUGGAN (306), GRIESEMER (307)
				FLECK et MUNRO (308), HEYES (309)
	5	18	Noyaux de cellules de foie	OLMSTED et VILLEE (310)
0,5	38	18	Foie	ANNAU (311)
	37	24	Tissus de mammifères	MONTREUIL et BOULANGER (312)
	37	18	Foie de rat	DERUMEZ (313)
0,4	100	1	Cellules en culture	Mc INTIRE et SPROULL (314)
0,3	37	1	Foie de rat	FLECK et MUNRO (315)
	20	18	Foie de rat	DERUMEZ (316)
	30	18	Fongoïdes	MINAGAWA, WAGNER et STRAUSS (317)
0,25	37	24	Foie	KOSTERLITZ (318)
0,1	37	18	Glandes salivaires	ROBINOWITCH et coll. (319)
			Cellules tumorales	PILERI et LEDOUX (320)
0,05	80	0,5	Noyaux de cellules	NASH (321)
	35	4	Bactéries	BERNLOHR et WEBSTER (322)

BMS LILLE

Le tableau F résume les recherches entreprises pour déterminer les conditions optimales d'hydrolyse quantitative. Deux points essentiels se posent dans ce domaine : 1) l'hydrolyse doit être totale, mais 2) les nucléotides ne doivent subir aucune dégradation.

- Résistance à l'hydrolyse alcaline

L'hydrolyse alcaline se développe par étapes. Très rapide, dans les premiers temps de la réaction, elle provoque un morcellement des chaines nucléotidiques de sorte que l'on obtient rapidement une fraction acido-soluble. FLECK et MUNRO (293) ont montré qu'après une heure de contact à 37°C avec une solution de soude 0,3 N, la fraction ARN devenait acido-soluble. Par contre la libération quantitative des mononucléotides à partir de ces fragments polynucléotidiques est beaucoup plus lente. Plusieurs facteurs interviennent dans ce phénomène de résistance vis à vis des alcalis.

Dans le cas des préparations obtenues par la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER (voir page-51—), il peut se produire une neutralisation partielle des alcalis par les traces d'acide trichloracétique restant adsorbés sur le précipité. En outre, une certaine quantité d'alcali pourra être consommée par des réactions de saponification de la fraction lipidique résiduelle. Enfin, la présence d'un taux élevé de protéines introduit un effet tampon qui modifie de façon importante la cinétique d'hydrolyse. Nous verrons cependant, par ailleurs, (page 79) que cet effet tampon est salutaire vis à vis des désaminations de l'acide cytidilique. Il convient donc de tenir compte de ces différentes actions secondaires dans la détermination des concentrations optimales d'alcali.

Le problème le plus important à envisager reste cependant celui des différences de stabilité des liaisons phosphodiesters. Des études cinétiques de l'hydrolyse alcaline ont été effectuées (CAVALIERI (294), BACHER (295), HAKIM (296), KALTREIDER (297)) ;

les liaisons purine - nucléotide sont, en particulier, plus résistantes que les liaisons pyrimidiques (MAGASANIK et CHARGAFF (323), BOULANGER et al. (324), MONTREUIL (325), LANE et BUTLER (326)). Les liaisons pyrimidiques sont "stabilisées" par la substitution d'un groupement 6 - NH_2 par un groupement 6 - OH (LANE et ALLEN (327)). RICH (328) a confirmé ces résultats par des expérimentations sur des polynucléotides de synthèse. LANE et BUTLER (329) ont caractérisé, enfin, dans la fraction alcali résistante des dinucléotides ApAp en proportion dominante. Nous rassemblons, dans le tableau G, les travaux des principaux auteurs qui se sont attachés à étudier le pourcentage d'oligonucléotides résistants à l'hydrolyse alcaline. Diverses explications ont été envisagées pour justifier cette propriété particulière. BROWN et TODD (330) ont fait intervenir des liaisons "phospho-amide" qui empêcheraient (notamment dans le cas des nucléotides peptides) la formation des triesters cycliques intermédiaires (voir le mécanisme de l'hydrolyse : page 21). L'explication actuellement proposée est la présence d'un substituant occasionnel sur l'hydroxyle 2' du ribose qui s'opposerait également à la formation du dérivé cyclique. En effet, le 2 - méthyl ribose a été identifié dans certaines préparations (SMITH et DUNN (331) BRAWERMAN et CHARGAFF (332)). MORISAWA (333) vient de montrer que les dinucléotides alcali-stables de l'ARN du foie de rat fournissent, après digestion enzymatique, la 2' - O - méthylguanosine et la 2' - O - méthylcytidine en plus des nucléotides habituels. Ces dinucléotides posséderaient la structure schématisée dans la figure 11, où X est le 2-méthylriboside de G ou C, Y étant un riboside normal de U, G, C ou A. Selon MORISAWA, ces dinucléotides constitueraient, avec le guanosine - diphosphate (voir page 19) provenant de l'extrémité de la chaîne (MARKHAM, MATTHEWS, SMITH (334), les 3,6 p100 du phosphore ARN total du foie de rat. Des 2'-O-méthylribonucléotides ont été caractérisés aussi par HALL (335) dans l'ARN de levure.

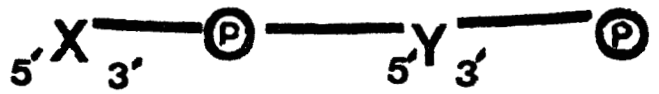
Quelles que soient les conditions d'hydrolyse retenues, il semble donc, d'après ces travaux, qu'il demeure impossible d'éviter cette limite particulière, qui est fonction du taux de nucléotides

TABLEAU - G

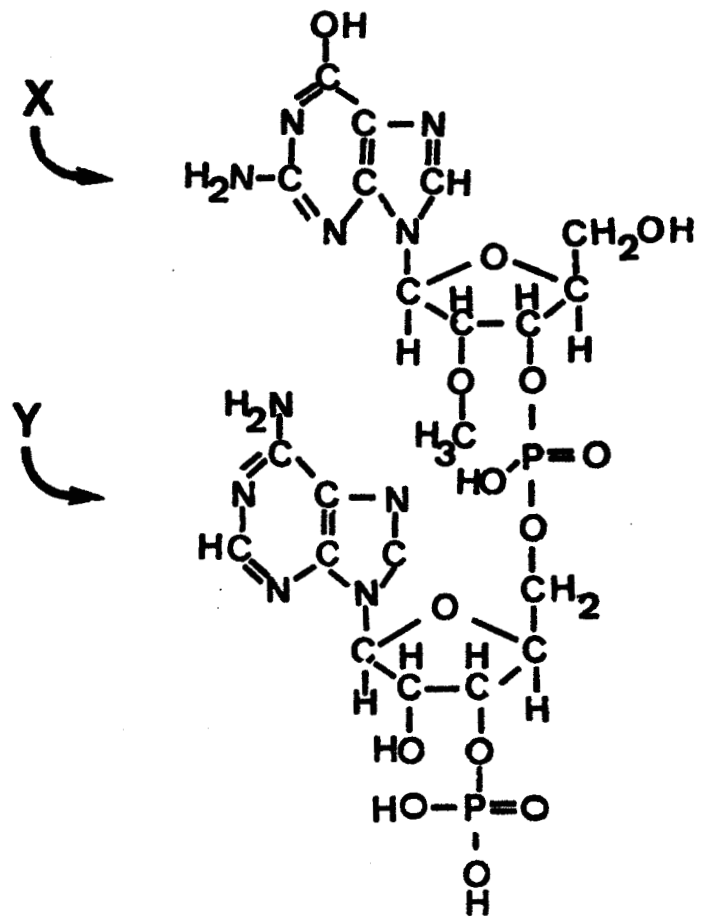
OBSERVATION PAR DIFFERENTS AUTEURS D'UNE FRACTION D'ARN RESISTANT A L'ACTION DE L'HYDROLYSE ALCALINE

Conditions d'hydrolyse	Origine de l'ARN	Commentaires	Auteurs
1 N Alcali, 37°C	levure	3 % de la fraction d'ARN reste non dégradée après hydrolyse.	CRESTFIELD et coll. (336)
1 N NaOH, 22°C, 24 h	levure	On observe la présence d'oligoribonucléotides après la fin de l'hydrolyse.	SMITH et ALLEN (337)
1 N NaOH, 22°C, 24 h	pancréas	- idem -	KEMP et ALLEN (338)
1 N NaOH, 37°C, 20 h	levure pancréas et foie	5,4 % (levure), 37,7 % (pancréas) et 17,9 % (foie) d'ARN alcali-résistant à la fin de l'hydrolyse.	POTTER et DOUNCE (339)
1 N KOH, 20°C, 24 h	-	Il persiste un ensemble d'oligonucléotides alcali-résistant, identifié comme étant composé en majeure partie d'acide diadénylique.	LANE et BUTLER (340)
-	Oeufs d'amphibiens	On retrouve respectivement 10 et 20 % d'oligonucléotides alcali-résistants dans l'hydrolyse d'ARN obtenus à partir d'oeufs d'amphibiens de deux espèces différentes.	FINAMORE et VOLKIN (341)
-	Polyribonucléotides synthétiques	On note également la présence d'oligonucléotides après hydrolyse	RICH (342)

(a)



(b)



X : Guanosine ; Y : Adénosine

FIGURE-11

Structure d'un dinucléotide alcali-stable.

substitués en 2'. Ce fait pourrait représenter un problème important dans le cas où ce taux serait très différent pour les ARN de tissus cancéreux. Il apparaitrait immanquablement, dans ce cas, une erreur par défaut dans les études de composition. Néanmoins, ces dérivés particuliers ne semblent exister dans les ARN normaux qu'à l'état de traces. Nous évoquerons ce problème dans nos travaux personnels pour tenter d'expliquer la nature de composés anormaux qui subsistent dans tous les hydrolysats alcalins d'ARN (voir: travaux personnels).

Parallèlement à ce problème de la résistance à l'hydrolyse alcaline, la détermination des conditions d'hydrolyse doit également tenir compte de la stabilité des nucléotides en milieu alcalin.

- Stabilité des nucléotides en milieu alcalin

-- cas des nucléotides puriques

Les nucléotides puriques sont stables dans les solutions 0,3 ou 0,5 N d'alcali à 37°C. Cependant, une étude chimique récente de JONES et al (343) a permis de préciser les trois types de dégradation qui peuvent se produire dans des conditions plus drastiques ; nous les avons indiquées dans la figure 12, pour le cas de l'adénine. Cette dernière est la moins stable par suite de la présence du groupe 6 - NH_2 ; les dérivés de la guanine, de même que ceux de la Xanthine et de l'hypoxanthine, sont très stables dans les mêmes conditions.

-- cas des nucléotides pyrimidiques

Le groupe 6 - NH_2 de l'acide cytidylique provoque une labilité particulière de ce nucléotide en milieu alcalin, qui se transforme aisément en acide uridylique par désamination. LAMIRANDE et al.(344) et MANDEL et al. (345) n'ont pas constaté de désamination de l'acide cytidylique au cours de l'hydrolyse d'un extrait tissulaire par des solutions de soude 0,3 à 1,5 N, à 37°C pendant 15 à 42 heures. Par contre, MARIAN et al. (346) et DAVIDSON et SMELLIE (347) ont noté 10 à 20 p 100 de désamination de l'acide cytidylique pur en présence

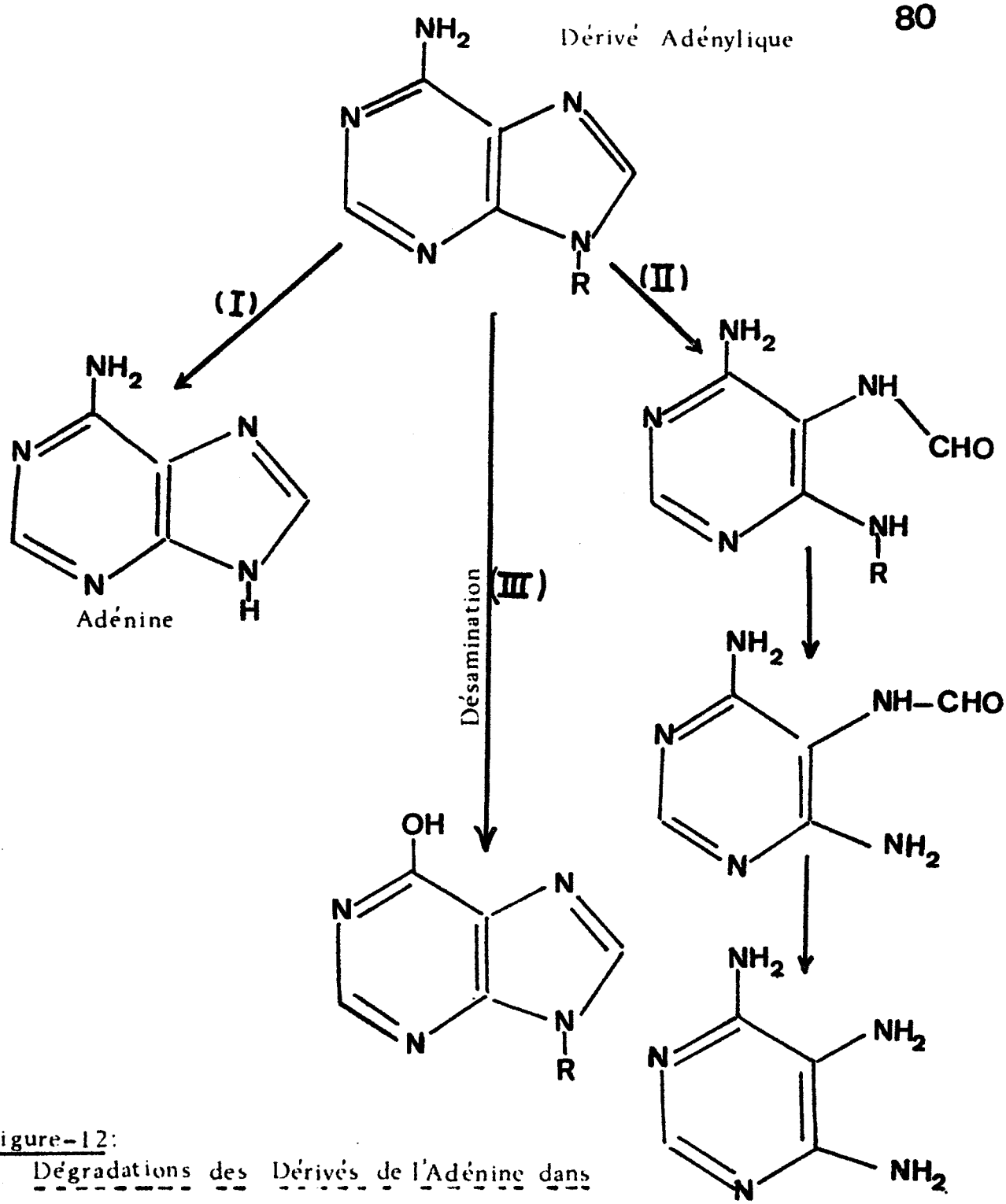


Figure-12:
Dégradations des Dérivés de l'Adénine dans des Solutions Alcalines 0,3N à 100°C Pendant 1 heure.

BUS LILLE

de solutions d'alcali 0,3 à 1 N pendant 12 à 18 heures, à 20 et 37°C. En présence de potasse 0,3 N, à 37°C pendant 18 heures, une désamination de 2 à 3 p 100 a été caractérisée par plusieurs auteurs (LORING et al. (348) ; HALL et ALLEN (349) ; KLEINSCHMIDT et MANTHEY (350)). FLECK et MUNRO (351) ont démontré, en outre, que la désamination de l'acide cytidylique apparait au cours de l'hydrolyse de préparations purifiées d'ARN par la potasse 1 N, à 37°C pendant 24 heures ; dans les mêmes conditions avec la potasse 0,3 N, l'acide cytidylique est stable. DERUMEZ (352) a présenté recemment une étude critique de ce phénomène ; ses conclusions sont les suivantes :

1 - la potasse est plus aggressive que la soude

2 - les protéines exercent un effet protecteur sur les produits d'hydrolyse. En l'absence de protéines, l'hydrolyse doit être effectuée par la soude 0,3 N à 20°C pendant 24 heures pour éviter toute désamination.

3 - l'hydrolyse des extraits obtenus par la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER est quantitative avec la soude 0,5 N, — 37°C pendant 18 heures (la désamination de l'acide cytidylique reste inférieure à 2 p 100).

En fonction des différents travaux que nous venons de résumer, nous pouvons donc considérer que les conditions optimales de l'hydrolyse quantitative des ARN par les alcalis sont les suivantes : solutions de soude 0,3 N, à 20°C pendant 24 heures, dans le cas de préparations pures d'ARN ; solutions de soude 0,5 N, à 37°C pendant 18 heures, pour les extraits tissulaires (trichloracétique ou perchlorique). L'existence de liaisons nucléotidiques alcali-résistantes laisse cependant subsister des traces d'oligonucléotides. Enfin, dans le cas de la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER, les alcalis dégradent simultanément les macromolécules qui accompagnent les ARN dans le précipité trichloracétique.

- Action des alcalis sur les macromolécules accompagnant les ARN

Au cours de l'hydrolyse alcaline, il se produit des dégradations plus ou moins profondes des ADN, des protéines et des complexes d'origine lipidique qui accompagnent les ARN dans les extraits trichloracétiques.

HUTCHISON et al(353) ont montré que les ADN se dégradaient dans les solutions alcalines 1 N, à 37° - 40°C. Cependant, dans les solutions 0,3 et 0,5 N, l'ADN est stable et ne subit pas de dégradation importante.

La fraction protéique se dénature et s'hydrolyse plus ou moins profondément dans les conditions standard de l'hydrolyse des ARN. Une fraction acidosoluble (oligopeptides et acides aminés) se libère au cours de l'hydrolyse et vient souiller la solution finale. Cependant, selon FLECK et MUNRO (354), les solutions de potasse 0,3 N à 37°C ou de soude 1 N à 20°C, pendant une heure, ne libèrent pas de fraction protéique acidosoluble ; seule la fraction ARN, partiellement dégradée, est soluble à pH = 4 - 4,2. Il est donc possible, selon ces auteurs, d'appliquer ces conditions pour doser sélectivement les ARN par spectrophotométrie en lumière ultraviolette.

Nous avons vu à la page 57 que la délipidation ne permettait pas d'éliminer une fraction phospholipidique qui constitue selon HAWTHORNE (355) des complexes lipoprotéiques. Les alcalis hydrolysent ces composés et libèrent des composés phosphorylés non-nucléotidiques d'origine lipidique (acides inositol phosphorique, acide glycérophosphorique, phosphosérine) (voir page-137-). Nous avons nous mêmes caractérisé d'autres dérivés phosphorylés tels que la phosphothréonine et la phosphocolamine (voir travaux personnels).

Ces différents produits de dégradation des protéines et des lipoprotéides viennent souiller les hydrolysats alcalins. Il est nécessaire d'en éliminer la majeure partie pour éviter les interférences dans les dosages de phosphore ou les mesures d'absorption en lumière ultraviolette. Il convient donc, après l'hydrolyse alcaline, de purifier les hydrolysats avant de séparer les nucléotides.

3 - Purification des hydrolysats

L'hydrolysat alcalin contient :

- une fraction macromoléculaire résiduelle constituée des protéines dénaturées et des ADN.
- une fraction micromoléculaire qui contient outre les ribonucléotides, des ions minéraux, des peptites, des acides aminés et des composés phosphores, non-nucléotidiques. Les ions minéraux sont génants pour les séparations chromatographiques et les micromolécules organiques interfèrent dans les dosages.

la fraction macromoléculaire est précipitée par l'acidification de l'hydrolysat. De nombreux auteurs ajustent la solution à pH = 1 ; le précipité est lavé plusieurs fois par les acides dilués. MONTREUIL (356) a montré que l'acidification à pH = 4,2 par l'acide formique précipitait quantitativement le résidu macromoléculaire. L'ADN, dans ce cas, n'est pas dégradé et peut être extrait du précipité par l'ammoniaque à 5 p 100. DAOUST et HOPPER (357) ont précisé, en outre, que deux lavages du précipité par les acides dilués étaient suffisants pour extraire toutes les micromolécules phophorylées ; des lavages répétés augmentent la contamination protéique de la fraction acidosoluble. SCHMIDT, HECHT et THANNHAUSER (358) ont recommandé l'addition de sérum albumine pour faciliter la précipitation de l'ADN, quand ce dernier n'est présent qu'à l'état de traces. MARKHAM (359) et SMELLIE et KROTKOV (360) ont ajouté des ions Mg^{++} pour la même raison. Enfin Mc INTIRE et SPROULL (361) ont recommandé les protamines pour améliorer la précipitation de l'ADN.

la fraction micromoléculaire peut être purifiée par différentes méthodes. Dans le cas des hydrolyses par la potasse, l'acidification est effectuée par l'acide perchlorique qui permet d'éliminer les ions K^{+} sous forme de perchlorate (DAVIDSON et SMELLIE (362) ; SCARANO et KALCKAR (363) et SCHMIDT (364)). Ce procédé provoque cependant un entrainement irréversible de 3 à 5 p 100 des nucléotides de l'hydrolysat (voir, en particulier, COCITO et LADURON (365)). MANDEL, WEILL et LEDIG (366) précipitent

sélectivement les ribonucléotides sous forme de sels de plomb. De nombreux auteurs ont préféré les résines à échange de cations : Dowex 50 x 2 - H^+ ou Dowex 50 x 4 - H^+ (MARIAN et al. (367) ; KERR et al. (368) ; VOLKIN et ASTRACHAN (369) ; DEKEN et DEKEN (370) ; MONTREUIL et al. (371)). Il est possible dans ce cas d'éliminer à la fois les cations et la majeure partie des peptides et amino acides. Enfin des techniques plus récentes ont été proposées pour ces purifications : électrophorèse sur papier (JAENICKE et al. (372) ; DEIMEL (373)), chromatographie sur papier (PLESNER (374)), chromatographie sur des résines à échange d'ions (REICHART et al. (375) ; KHYM et COHN (376); COHN et BOLLUM (377)), chromatographie en couche mince (RANDERATH (378)).

B - SEPARATION DES PRODUITS D'HYDROLYSE

Selon le type d'hydrolyse envisagé, nous distinguerons 1) les méthodes de séparation des bases, 2) les procédés d'analyse du mélange des bases puriques et des nucléotides pyrimidiques et 3) les techniques de séparation des nucléotides.

1°) Séparation des bases (*)

COHN (379) a introduit la chromatographie des bases sur des colonnes d'échangeurs d'ions ; cette dernière peut être réalisée avec succès sur des résines à échange de cations ou d'anions. La chromatographie de partage sur amidon a été mise au point par EDMAN (380) ; DALY et MIRSKY (381) ont adapté ce procédé à la détermination automatique des rapports molaires des bases. Plus récemment, STAMBAUGH et WILSON (382) ont mis au point une méthode de chromatographie sur charbon activé (Darco).

(*) pour les détails voir BOULANGER et MONTREUIL (383).

HOHN et POLLMANN (384) ont mis au point la séparation des bases par chromatographie sur des colonnes de séphadex G 25 (elution en tampon carbonate d'ammonium 0,01 M). Néanmoins, la chromatographie sur papier a été la plus appliquée ; les systèmes solvants les plus satisfaisants sont les suivants :

MARKHAM et SMITH (385):

n - butanol - eau (86/14)

n - butanol - éthanol - eau (50/15/35)

n - butanol - acide formique - eau (77/10/13).

WYATT (386) :

Isopropanol - HCl - eau (170/41/39)

Isopropanol - eau (65/35).

La chromatographie bi-dimensionnelle a été appliquée avec succès (en particulier par WYATT (387)) pour la séparation de mélanges complexes de bases et nucléosides. La séparation de plus de 20 dérivés de substitution de la purine a été effectuée avec succès par ALBERT et BROWN (388) dans le système solvant n-butanol - acide acétique 5 N (2/1). L'électrophorèse sur papier permet de séparer les bases de façon satisfaisante (voir en particulier DIMROTH et al (389), WERKHEISER et WINZLER (390), BURMA (391), FOSTER et al. (392), MUKHERJEE (393), KARINOYE et INOUE (394)). Enfin Mc GEE (395) a obtenu très récemment une séparation satisfaisante des bases par chromatographie en phase gazeuse, sous forme de dérivés méthylés par l'hydroxyde de tétraméhtylammonium.

2°) Séparation du mélange des bases puriques et nucléotides pyrimidiques

Le système solvant de SMITH et MARKHAM (396) réalise la séparation du mélange des bases puriques et des nucléotides pyrimidiques obtenu par l'hydrolyse des ARN par les acides chlorhydrique ou sulfurique 1 N, à 100°C (voir page 70) ; il s'agit du mélange butanol tertiaire - acide chlorhydrique - eau (700 - 132 - 168).

3°) Séparation des nucléotides

Les ribonucléotides ont été analysés essentiellement par chromatographie sur des colonnes de résines à échange d'ions ou par chromatographie et électrophorèse sur papier. Diverses autres techniques ont été, en outre, expérimentées.

a - chromatographie sur résine

La chromatographie des nucléotides sur colonne de résine à échange d'ions met à profit le caractère acide de ces composés. La présence d'un radical phosphoryle dans leur molécule confère aux nucléotides des propriétés d'acide fort. Cependant, la charge totale d'un nucléotide est la somme des charges provenant de l'ionisation du radical phosphoryle et des fonctions des bases puriques et pyrimidiques et elle varie avec le pH.

Les nucléotides présentent aux pH élevés une grande affinité pour les échangeurs d'anions. Inversement, pour les valeurs basses de pH, ils sont fixés par les échangeurs de cations. Dans les deux cas, l'élution peut être effectuée, soit par une augmentation de la concentration d'un ion compétitif, soit en modifiant le pH, de façon à abaisser ou à inverser la charge totale des nucléotides.

La séparation des mononucléotides sur résine à échange d'ions a été mise au point par COHN (397) et par CARTER et coll. (398). Elle a conduit à la mise en évidence des isomères a (2'-phosphate) et b (3'-phosphate) dont la découverte a apporté des renseignements précieux sur la structure des ARN (COHN (399)),et sur le mécanisme de l'hydrolyse alcaline des ARN (voir page 20).

Les échangeur de cations, généralement utilisé, est le Dowex 50, résine polystyrène sulfoné, sous la forme acide et l'élution des nucléotides introduits en solution dans l'acide acétique 0,1 M est réalisée par le passage d'une solution d'acide acétique 0,1 M (COHN (400)). MONTREUIL (401) et, à sa suite, DERUMEZ (402) ont montré que les ribonucléotides introduits à pH 4 sur une colonne de Dowex 50 (H^+),

de Permutite - 50 ou d'Amberlite -IB - 120 (mesh 25-50) pouvaient être déplacés par l'eau distillée dans l'ordre suivant : acide uridylique, acide guanylique et ensemble les acides cytidylique et adénylique (voir travaux personnels). Plus récemment, KATZ et COMB (403) ont montré que les ribonucléotides en solution dans l'acide chlorhydrique 0,05 N pouvaient être séparés sur une toute petite colonne (0,9 x 5,0 cm) de Dowex - 50 x 4 (mesh 200-400) (H^+) par le passage successif d'acide chlorhydrique 0,05 N pour l'acide uridylique et par l'eau distillée pour les autres nucléotides, l'acide guanylique précédant les acides adénylique et cytidylique élués ensembles (KATZ et COMB (404)).

Dans nos recherches personnelles, nous avons utilisé le Dowex - 50 uniquement pour purifier les hydrolysats alcalins des ARN, les nucléotides élués ensembles étant ensuite séparés par chromatographie, par électrophorèse ou par électro-chromatographie sur papier.

Les échangeurs d'anions, employés le plus couramment, sont le Dowex - 1 et le Dowex - 2 sous la forme chlorure (COHN (405)), l'élution des nucléotides étant réalisée par le passage de l'acide chlorhydrique dilué. Cette technique de séparation des ribomononucléotides a été utilisée par VOLKIN et CARTER (406), pour étudier la composition des ARN des tissus sains et néoplasiques de différents mammifères et pour mesurer les activités spécifiques des nucléotides provenant d'ARN marqués. Elle a aussi été appliquée par OLMSTED et VILLEE (407) et DE LAMIRANDE, ALLARD et CANTERO (408). La méthode a été améliorée en 1958 par PONTIS et BLUMSON (409) qui ont utilisé, pour effectuer l'élution, un gradient concave d'acide chlorhydrique et chlorure de calcium, le pH décroissant de 4 à 2 et la concentration en chlorure de calcium croissant jusqu'à 0,14 M. L'élimination du chlorure de calcium se fait par un mélange d'alcool et d'éther qui le dissout complètement alors que les nucléotides restés en suspension peuvent être récupérés par centrifugation.

Les résines à échange d'ions ont encore été employées sous la forme formiate, l'élution des nucléotides étant réalisée par un gradient discontinu (COHN et CARTER (410)) ou continu d'acide formique

(HURLBERT et coll. (411)). L'élution peut se faire aussi successivement, avec de l'acide formique dilué qui déplace des acides cytidylique et adénylique, puis avec des solutions tamponnées (mélange d'acide formique et de formiate de sodium) qui déplacent les acides formique et guanylique (COHN et VOLKIN (412)). Cette technique a été utilisée par MORTREUIL et KHOUVINE (413) pour la détermination des radioactivités spécifiques des différents nucléotides.

En 1960, COHN (414) préconisa d'utiliser un gradient d'acide formique et formiate d'ammonium et, un peu plus tard, il conseilla (COHN et BOLLUM (415)) l'emploi des bicarbonates qui se décomposent rapidement au cours du passage sur la résine avec perte de CO_2 et élévation du pH. Ces éluants sont préférables aux solutions salines et aux solutions habituellement utilisées, car ils évitent l'hydrolyse des nucléotides au cours de la chromatographie.

Les procédés d'élution des nucléotides ont subi de nombreuses modifications. WADE (416), par exemple, a étudié l'influence de la concentration saline et du changement de pH de l'éluant sur la résolution des nucléotides, et ANDERSON et coll. (417) ont décrit une méthode permettant de séparer sur la même colonne de Dowex 1 x 8 (0,9 x 150 cms ; mesh 400) les bases, les nucléosides et les nucléotides. HORI et KONISHI (418) ont récemment adapté cette technique en analyse automatique avec un gradient de concentration d'acétate pH = 4,4, obtenu à l'autograd de 0,1 à 2,5 M. Les séparations sont effectuées à l'autoanalyseur.

Malgré les perfectionnements apportés à la méthode, la chromatographie des nucléotides sur résine à échange d'anions, appliquée à des hydrolysats d'ARN, demeure une technique longue et délicate. Il est vrai que les collecteurs de fractions et les appareils d'enregistrement automatique des densités optiques ont facilité beaucoup la tache des chercheurs. Cependant bien souvent, ceux-ci doivent vérifier la pureté des composés élués, par chromatographie sur papier ou par électrophorèse, car les souillures sont nombreuses. Par exemple, YAMANA et SIBATANI (419) ont montré que l'acide uridylique était élué en même temps que de nombreuses substances de même densité optique qui introduisent une cause d'erreur

dans les dosages. De même HOSODA et coll. (420) ont décelé la présence de contaminants dans les fractions d'acides uridylique et guanylique, élués ensembles d'une résine de Dowex 1 x 8 (forme formiate). Souvent, les nucléotides sont souillés de phosphate minéral, ce qui a amené MITSUI, ISHAMA et OSAWA (421) à modifier la méthode décrite par OSAWA et coll. (422) : après leur séparation sur Dowex 1, les solutions de mononucléotides sont agitées avec un égal volume d'un mélange de benzène et d'isobutanol (1 : 1) en présence de molybdate d'ammonium 0,0016 M et d'acide sulfurique 0,1 M, pour éliminer les contaminants.

La chromatographie des nucléotides sur échangeurs d'anions connait cependant encore de nombreux adeptes (voir par exemple : NOMURA et coll. (423), ISHIHAMA et coll. (424), SIBATANI et coll. (425), SRINIVASAN (426), ALLFREY et MIRSKY (427), HIATT (428), OTAKA et coll. (429), CANTONI et coll. (430), KITAZUME et YCAS (431), ANDOH et coll. (432), BRACHET et coll. (433), DECROLY et coll. (434) et HAYASHI et SPIEGELMAN (435). Il est vrai que lorsque les ARN ont été préalablement isolés par extraction phénolique suivie d'un fractionnement par chromatographie ou centrifugation différencielle comme ils le sont généralement dans les études actuelles des ARN messagers, solubles et ribosomaux, les hydrolysats contiennent moins de contaminants susceptibles de perturber la résolution des nucléotides sur résine. Toutefois, il semble préférable, avant de procéder à l'adsorption des nucléotides sur Dowex-1, de purifier comme le font BRACHET et coll. (436), DECROLY et coll. (437), l'hydrolysat d'ARN par une chromatographie sur charbon qui ne retient pas les impuretés mais fixe les nucléotides que l'on élue ensuite par le passage d'un mélange de pyridine et d'alcool (MANDEL et REVEL (438)).

b - chromatographie sur papier

La chromatographie sur papier reste la méthode la plus utilisée, car elle est plus simple, plus rapide et plus exacte. MARKHAM (439) et de nombreux systèmes solvants ont été décrits :

Celui de CHARGAFF et coll. (440), VISCHER et coll. (441), MAGASANIK et coll. (442), ELSON et CHARGAFF (443), BRAWERMAN et CHARGAFF (444) (acide isobutyrique tamponnée) ne permet pas la séparation des acides uridylique et guanylique qui doivent être dosés ensemble ; la méthode chromatographique bidimensionnelle publiée en 1960 par LIPSHITZ et CHARGAFF (445) ne se prête pas à des dosages en série, pas plus que celle de CRESTFIELD et ALLEN (446).

BOULANGER et MONTREUIL (447) ont mis au point une série de solvants phénoliques dont l'utilisation permet la séparation des 4 ribomononucléotides ; le dosage spectrophotométrique rendu impossible par la présence du phénol, est remplacé par un dosage colorimétrique du phosphore selon la méthode d'ALLEN (448) modifiée.

D'autres systèmes solvants ont été proposés, en particulier par :

CARTER (449) : solution aqueuse à 5 p 100 (p :v) de phosphate disodique saturée d'alcool isoamylique.

MARKHAM et SMITH (450) : solution aqueuse saturée de sulfate d'ammonium/tampon, acétate de sodium 0,1M pH 6/isopropanol, (79 : 19 : 2) ; ce système solvant ne sépare pas les acides cytidylique et uridylique.

CARPENTIER (451) : alcool isoamylique/tétrahydrofurfural/citrate de potassium 0,08M pH 3,02, (1 : 1 : 1).

KIRBY (452) : 1) méthanol/acide chlorhydrique concentré/eau, (70 : 20 : 10) ; 2) méthanol/éthanol/acide chlorhydrique concentré/eau, (50 : 25 : 6 : 19) ; 3) méthyl-éthyl-cétone/butanol tertiaire/acide acétique/acide chlorhydrique/eau, (22,5 : 22,5 : 35 : 19 : 1).

MANDEL, WEILL et LEDIG (453) ont publié une méthode chromatographique en deux temps. Une première chromatographie de 48 heures dans le système solvant : propanol/ammoniaque/eau, (60 : 30 : 10) permet d'isoler l'acide guanylique des trois autres nucléotides qui sont séparés dans un système solvant à base d'isobutyrate d'ammonium (acide isobutyrique/ammoniaque 0,5N), (50 : 30) pH 7 : cette deuxième chromatographie se fait dans le même sens que la première après séchage du papier, découpage de la partie supérieure où se trouve l'acide guanylique et remplacement de celle-ci par un morceau de papier de mêmes dimensions.

LANE (454) obtient de bonnes séparations des nucléotides par chromatographie sur papier imprégné de sulfate d'ammoniaque, avec un système solvant qui est un mélange d'éthanol à 95 p 100 et d'eau (80 : 20). Une chromatographie de 15 à 24 heures à 22°C sépare les nucléotides dans l'ordre suivant : acides cytidylique, guanylique, adénylique, uridylique.

GERLACH et coll. (455) viennent de donner la composition de différents systèmes solvants qui permettent de séparer, selon les auteurs, les bases les nucléosides et les nucléotides.

BRADBEER et JARVIS (456) ont décrit récemment un procédé de chromatographie bi-dimensionnelle qui sépare le mélange des bases, nucléosides et nucléotides. Les systèmes solvants sont les suivants : 1-n-propanol ammoniaque-eau (3-1-1) et 2 - alcool amylique tertiaire - acide formique à 90 p 100 - eau (3-1-3).

Certains auteurs ont préconisé l'emploi des papiers échangeurs d'ions pour séparer les ribomononucléotides :

- papier cellulosique contenant 46,6 p 100 en poids d'Amberlite, résine fortement basique (forme formiate). On fait migrer pendant 2 heures, et de bas en haut, de l'acide formique 3,8 M, puis le papier est séché à l'air et coupé à 10,4 cm de l'origine. Le développement du chromatogramme pendant 6 heures avec du formiate d'ammonium 0,5 M de pH 5 achève la séparation des nucléotides récupérés par élution des bandes de 0,8 cm et repérés par leur densité optique à 260 mu (SMILLIE (457).

- papier Whatman n°1 imprégné de polyéthylène-imine : la chromatographie est réalisée avec des solutions d'électrolytes neutres (RANDERATH (458), VERACHTERT et coll. (459)).

- papier de diéthylaminoéthyl-cellulose (DEAE) sous la forme formiate ; migration pendant 2 à 3 heures d'acide formique 0,05 M ; U et G migrent ensemble et sont séparés par passage, en sens inverse, dans cette zone, d'acide formique 4 M, 45 mn (JACOBSON (460)).

- papier Whatman DE - 20, pour séparer les nucléotides sous forme de complexes boratés. Le système solvant utilisé est le mélange : carbonate d'ammonium 0,2M - tétraborate de sodium 0,005 M (6 heures de migration) (JACOBSON (461)).

c - procédés divers

chromatographie de Gel-filtration

GELOTTE (462) a appliqué la filtration sur gel de séphadex G-25 pour séparer les nucléotides. L'élution était réalisée par une solution ClNa 0,2 M. HONN et POLLMANN (463) ont obtenu des séparations de nucléotides sur le Séphadex G-25, par élution avec un tampon carbonate d'ammonium 0,01M à pH = 7,6. STICKLAND (464) a séparé les nucléotides par chromatographie bi-dimensionnelle en couche mince de Séphadex.

chromatographie sur les celluloses modifiées

Les nucléotides peuvent également être séparés par chromatographie sur DEAE-cellulose (Diéthyl-aminoéthyl-cellulose) (élution avec un gradient de carbonate d'ammonium à pH 8,7) (SINGER et CANTONI (465)). MORISAWA et CHARGAFF (466) utilisent la DEAE -cellulose avec un gradient de concentration en chlorure de lithium (0,01M à 1,0M) dans un tampon acétate de lithium 0,01 M à pH 5.

chromatographie en couche mince

La chromatographie en couche mince est applicable à la séparation des mononucléotides et des mélanges complexes de nucléotides : a) couche mince de cellulose : le développement est réalisé avec le système solvant : eau distillée ou solutions de chlorure de sodium diluées par RANDERATH et STRUCK (467) et RANDERATH (468) ; solution de sulfate d'ammoniaque, saturée/acétate de sodium 1M/isopropanol, (80 : 18 : 2) pendant 90 mn par RANDERATH (469) ; isopropanol/ammoniaque/eau, (60 : 35 : 5) pendant 30 mn ou avec le système ; solution saturée

de sulfate d'ammonium/isopropanol/acétate de sodium 0,5M (80 : 20 : 18) pendant 20 mn par JOSEFSSON (470).

b) couche mince de cellulose microcristalline : développement effectué avec le système solvant : isopropanol / acide chlorhydrique / eau, (65 : 16,7 : 18,3) par GRIPPO et coll. (471).

c) couche mince de cellulose modifiée : sur DEAE-cellulose (diéthyl - aminoethyl-cellulose) et sur ECTE LA-cellulose (cellulose liée à la **bi**ethanolamine par l'épichlorhydrine), développement avec l'acide chlorhydrique 0,06 N pendant 60 mn (RANDERATH (472)) ; sur couche mince de DEAE-cellulose, développement effectué avec le double système solvant : propanol - 1 - ol/ammoniaque/eau, (60 : 30 : 10) pendant 45 mn, puis après séchage, avec le système : acide acétique 0,24 M pendant 15 mn (DYER (473)) ; sur couche mince de polyéthylène -imine - cellulose, les nucléotides sont séparés (RANDERATH et RANDERATH (474)) par le passage successif de chlorure de sodium 0,6 M pendant 5 mn, puis de chlorure de sodium 0,8 M pendant 30 mn, avec un séchage intermédiaire.

d) chromatographie bi-dimensionnelle en couche mince :

STICKLAND (475) a récemment obtenu de bonnes séparations des différents isomères des nucléotides, par une chromatographie bi-dimensionnelle en couche mince sur DEAE-cellulose dans les conditions suivantes : 1 - bicarbonate d'ammonium à pH = 7,8, en gradient de concentration de 0,15M à 1 M - Migration pendant 75 mn.

2 - formiate d'ammonium 2 M en gradient de pH de 2,8 à 4,2.

BIELESKI (476) enfin a étudié les séparations par électro-chromatographie en couche mince de silicagel G, de cellulose MN-300 et de poudre Whatman CC.41.

Il semble cependant que, si ces procédés peuvent rendre de grands services pour des études qualitatives, ils ne peuvent avoir la précision d'une technique plus longue mais qui fait intervenir des quantités plus importantes de substances dont le dosage est plus exact.

chromatographie en phase gazeuse

MILES et FALES (477), puis HANCOCK et COLEMAN (478) ont décrit des conditions de séparation, par chromatographie en phase gazeuse, des dérivés tri-méthylsilylés des ribosides et désoxyribosides. Ces études récentes n'ont pas encore donné lieu à des applications quantitatives.

Electrophorèse

La séparation des ribomononucléotides peut aussi être réalisée par électrophorèse sur papier (voir la revue générale de SMITH (479) et de BENDETSKII et SHADMANOV (480).

- DAVIDSON et SMELLIE (481), SMELLIE et coll. (482), McINDOE (483) et CROSBIE et coll. (484) utilisent un tampon citrate de sodium 0,02 M de pH 3,5 et leur technique est appliquée par de nombreux auteurs et par nous-mêmes.
- Le tampon acétate (pH 3,7, force ionique 0,03), préconisé par WERKHEISER et WINZLER (485) permet lui aussi, une bonne résolution d'un mélange de mononucléotides.
- D'autres systèmes-tampons ont encore été décrits :
- tampon acétate d'ammonium 0,05 M pH 3,2, électrophorèse sous 1000 Volts dans le tétrachlorure de carbone (MARKHAM et SMITH (486)).
- tampon formiate de pH 3,5 et de force ionique 0,1 (30 V/cm) ou tétraborate de sodium 0,1 M de pH 9,2 (CRESTFIELD et ALLEN (487)).
- solutions aqueuses d'acide butyrique (9,2 p 100) et de soude (0,1 p 100) électrophorèse de 4 à 5 heures sous 400 volts sur papier Whatman n°3 lavé avec de l'acide formique 1 N (WADE et MORGAN (488)).
- tampon formiate 0,4 M de pH 3,3, électrophorèse de 5 heures sous 950 volts sur papier Whatman n°1 (SMITH, REBHUM et KAPLAN (489)).
- tampon acétate de lithium 0,1 M de pH 3,5 (70 V/cm) (BADER-HIRSCH et coll. (490)).
- tampon pyridine/acétate pH 3,5, électrophorèse de 70 mn sous 3000 volts (SEBRING et SALZMAN (491)).

Signalons aussi la méthode de KINNORY et coll. (492) mise au point pour la séparation des bases puriques et des nucléotides pyrimidiques libérés par hydrolyse chlorhydrique des ARN (tampon acide monochloracétique de pH 3,1 et de force ionique 0,05 ; électrophorèse de 6 heures sous 9 V/cm sur papier Schleicher et Schüll 589, entre deux glaces paraffinées) et la méthode de microélectrophorèse sur fibre de cellulose d'ÖSTROM (493).

FRONTALI (494) a décrit une technique d'électrophorèse sur colonne de poudre de cellulose (2 x 70) en tampon formiate d'ammonium 0,05 M de pH 3,5 (750 Volts, 22 mA). Après 22 heures d'électrophorèse, l'élution de la colonne donne des nucléotides dans l'ordre suivant : U, G, A, C. L'opération est très longue et dure 88 heures.

GEBICKI et FREED (495) ont obtenu une séparation complète des ribonucléotides par électrophorèse sur des membranes de cellulose Schleicher et Schüll, avec un tampon formiate d'ammonium - acide formique (0,01 M pH 2,& à 3,1), pendant 15 mn (60 volts/cm).

Signalons enfin les techniques récentes d'électrophorèse sur couche mince et sur membrane d'acétate de cellulose :
- DE FILIPPES (496) : électrophorèse sur couche mince de cellulose dans un tampon formiate de pH 3,4, force ionique 0,1 pendant 75 mn.
- COCITO et LADURON (497) : électrophorèse sur membrane d'acétate de cellulose Schleicher et Schüll, 3 à 4 heures sous 300 volts en tampon acide citrique/citrate de sodium 0,01 M de pH 3,15.

Autophorèse

NAUGHTON et DINTZIS (498) ont décrit une technique automatique d'analyse des nucléotides par une électrophorèse à haut voltage dans un gradient de saccharose. L'ensemble des opérations est réalisée dans un appareil entièrement automatique maintenant commercialisé.

Les techniques de séparation des produits d'hydrolyse des ARN sont donc très nombreuses. Elles ont été diversement appliquées et ne se prêtent pas toutes avec la même rigueur aux déterminations quantitatives. La chromatographie et l'électrophorèse sur papier sont, dans ce domaine, les procédés les plus aguerris.

C - METHODES DE DOSAGE DES NUCLEOTIDES

Les principales méthodes de dosage qui ont été appliquées pour la détermination des rapports molaires des nucléotides dans les ARN se fondent sur l'un des principes suivants :

- détermination du phosphore nucléotidique
- spectrophotométrie en lumière ultraviolette
- dosage colorimétrique du ribose
- détermination de la radioactivité des nucléotides marqués par le radiophosphore.

1 - Détermination du phosphore nucléotidique (*)

Le phosphore, après minéralisation, est dosé par photocolorimétrie avec le réactif phosphomolybdique. La minéralisation des nucléotides est effectuée par l'acide sulfurique (FISKE et SUBBARROW (499)) par l'acide perchlorique (KING (500), ALLEN (501)), par le mélange acide sulfurique - sulfate de cuivre - sulfate acide de potassium - oxyde de sélénium (MA et ZUAZAGA (502)) ou par le mélange des acides perchlorique et sulfurique (3/1) (MONTREUIL (503)). Les bleus de molybdène sont formés à partir du phosphomolybdate par action de l'hydroquinone (BRIGGS (504)), de l'acide 1-amino-2-naphtol-4sulfonique (FISKE et SUBBARROW (505), BERENBLUM et CHAIN (506), GRISEWOLD et al. (507)), du chlorure stameux (MARTIN et DOTY (507B), ERNSTER et al. (508))

(*) Voir en particulier les revues générales de LINDBERG et ERNSTER (509) et de LELOIR et CARDINI (510).

ou encore de l'amidol (chlorhydrate de 2-4 diaminophénol) (ALLEN (511), MÜLLER (512), MONTREUIL (513)). Les études critiques ont montré que la réaction était quantitative avec l'amidol. Le dosage est sensible au microgramme.

2 - Spectrophotométrie dans l'ultraviolet

Comme nous l'avons indiqué précédemment (page 82), les bases et les nucléotides absorbent la lumière ultraviolette, avec un maximum d'absorption voisin de 260 mμ. Les dosages spectrophotométriques sont sensibles, mais ils sont souvent entachés d'erreurs à cause de la présence de substances interférentes. Ils doivent donc s'adresser à des préparations pures. Pour éviter ces causes d'erreur, différentes méthodes ont été proposées.

CHARGAFF et ZAMENHOF (514) établirent la relation entre l'absorbance en lumière ultraviolette et la concentration en phosphore. Ils définirent ainsi l'absorption molaire $\epsilon (p) = A/C \cdot d$, avec A = densité optique, C = concentration molaire (en atomegramme de P/litre) et d = longueur de la cuve en centimètres. La détermination des $\epsilon(P)$ est très précieuse pour controler la pureté des produits dosés, qu'il s'agisse des nucléotides séparés à partir des hydrolysats alcalins, ou des préparations d'ARN totaux obtenus par les méthodes directes d'extraction. La valeur de l' $\epsilon(P)$ permet, dans ce dernier cas, d'évaluer la contamination protéique des extraits ; cette valeur augmentera, en effet, proportionnellement au taux des protéines présentes. Cette technique n'est cependant pas rigoureuse, car elle ne tient pas compte de la présence éventuelle de composés phosphorylés non-nucléotidiques (phosphoprotéides, dérivés phosphorés d'origine lipidique etc...). Elle demeure cependant un critère de pureté qu'il ne faut pas négliger et auquel nous avons fait appel nous mêmes (page 64).

TSANEV et MARKOV (515) se sont fondés sur les différences entre le maximum d'absorption des dérivés nucléiques (257 à 260 mμ) et celui des dérivés protéiques (275 à 278 mμ). Ils décrivirent une

méthode spectrophotométrique à double longueur d'onde, qui permet, selon ces auteurs, d'éliminer l'interférence protéique. La quantité de nucléotides est calculée à partir de la différence des densités optiques à 260 et 286 mμ. FLECK et BERG (516) ont introduit, en outre, la détermination à partir de la différence des densités optiques à 232 et 260 mμ. Cette technique séduisante est précieuse pour les études de rendement des extractions ; elle n'est cependant pas applicable à la détermination des rapports molaires des nucléotides. Nous en discuterons les limites expérimentales dans nos travaux personnels.

Les techniques de spectrophotométrie dans l'ultraviolet sont appliquées à la fois pour l'étude de la pureté et du rendement des préparations d'ARN et pour la détermination de la composition nucléotidique des ARN. Dans ce dernier cas, la méthode n'est applicable que si les nucléotides séparés à partir des hydrolysats sont purs.

3 - Dosage colorimétrique du ribose

Pour vérifier les résultats obtenus par le dosage de phosphore ou la spectrophotométrie, certains auteurs déterminent la teneur en ribose nucléotidique. La méthode consiste à transformer, par l'acide chlorhydrique, le ribose en furfural et à doser les produits de condensation de ce dernier avec l'orcinol (MEJBAUM (517)), le phloroglucinol (EULER (518)) ou l'acétate d'aniline (REEVES (519)). Dans les conditions réactionnelles, seul le ribose des nucléotides puriques réagit entièrement. En outre, la présence de protéines, de peptides, d'acides aminés ou d'autres composés glucidiques provoque des colorations parasites qui sont extrêmement dangereuses.

4 - Détermination de la radioactivité des nucléotides marqués par le phosphore 32

Les travaux de YCAS et VINCENT (520) ont établi que le marquage des ARN par les radiophosphates s'effectuait uniformément et au hasard, dans des conditions cinétiques appropriées. Ce principe a été

le fondement de nombreuses techniques d'étude de la composition des ARN par la détermination de la radioactivité des nucléotides. Ces méthodes sont applicables à des quantités très faibles de substances mais les conclusions de YCAS et VINCENT ne sont pas uniformément admises. Il convient, en effet, de rappeler que le clivage en milieu alcalin des chaines nucléotides (page -21) libère des nucléosides-3'-phosphate dont les restes phosphoryles correspondent à ceux des nucléotides voisins dans la chaine.

Cette longue énumération des techniques de séparation et de dosage des mononucléotides pourrait laisser croire que le chercheur n'a que l'embarras du choix lorsqu'il désire déterminer les quantités relatives de ces constituants dans les ARN. En fait, la valeur des études de composition est liée à la fois à la qualité des méthodes d'extraction des ARN et à l'efficacité des méthodes de séparation de leurs produits d'hydrolyse. Deux problèmes, étroitement liés, subsistent donc actuellement :

celui de la pureté des préparations d'ARN et nous avons vu les difficultés rencontrées dans ce domaine

celui du choix des techniques d'étude de la composition des ARN, en particulier en ce qui concerne l'hydrolyse totale et la séparation de tous les produits d'hydrolyse(en particulier des nucléotides mineurs et des fractions alcali-résistantes).

BUS LILLE

Cet aspect constitue la première orientation de notre travail ; il convenait, en effet, de préciser les conditions les plus rigoureuses qui permettent d'envisager la caractérisation de nucléotides anormaux dans les ARN cancéreux.

T R A V A U X P E R S O N N E L S

RECHERCHE D'UNE METHODE GENERALE D'EXTRACTION DES ARN, APPLICABLE A L'ETUDE DE LEUR COMPOSITION :

I - Etude critique des méthodes indirectes.

II - Mise au point d'une méthode directe.

III - Applications aux ARN des tissus normaux et cancéreux.

ETUDE COMPARATIVE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES ARN NORMAUX ET CANCEREUX :

I - Choix d'une méthode d'hydrolyse partielle.

II - Mise au point d'un procédé comparatif d'analyse des séquences nucléotidiques.

III - Applications aux ARN normaux et cancéreux.

==========

RECHERCHE D'UNE METHODE GENERALE D'EXTRACTION DES ARN, APPLICABLE A L'ETUDE DE LEUR COMPOSITION.

A la suite de notre étude bibliographique, nous avons abordé le problème de la caractérisation des composés nucléotidiques anormaux par une étude critique des méthodes indirectes les plus couramment utilisées. Nous ne pouvions retenir, en effet, qu'une technique d'extraction qui fournisse quantitativement des préparations pures d'ARN.

Nous décrirons les nombreuses modifications que nous avons introduites pour tenter de satisfaire à ces critères de rendement, de pureté et d'intégrité moléculaire. Devant l'insuccès de nos tentatives, nous nous sommes tournés vers les méthodes directes pour la mise au point d'une technique générale d'extraction des ARN, qui satisfasse à ces trois impératifs techniques.

Ces résultats nous ont permis d'entreprendre une étude comparative de la composition qualitative des ARN du foie de rat normal et de l'hépatome ascitique, pour tenter de mettre en évidence des composés nucléotidiques anormaux caractéristiques de l'état cancéreux.

I - ETUDE CRITIQUE DES METHODES INDIRECTES D'EXTRACTION DES ARN TISSULAIRES.

Avant de présenter nos résultats personnels, nous décrirons les différentes techniques que nous avons appliquées.

A - DESCRIPTION DES TECHNIQUES

Nous distinguerons successivement les procédés d'extraction étudiés, puis les méthodes de détermination des rendements, de la pureté et de l'intégrité des préparations.

1 - Procédés d'extraction

Comme nous l'avons précisé, en détail, à la page-51- , la méthode originale de SCHMIDT et THANNHAUSER (521) a fait l'objet de très nombreuses modifications en ce qui concerne essentiellement, d'une part, la nature de l'acide (trichloracétique ou perchlorique), la concentration et le temps de contact et, d'autre part, les conditions de délipidation. Nous avons, à dessein, comparé, dans un premier temps, la méthode originale de SCHMIDT et THANNHAUSER (522) et la technique la plus récente de HALLINAN, FLECK et MUNRO (523) : les résultats obtenus nous ont ainsi permis de poser les problèmes techniques essentiels. Toutes les extractions ont été effectuées, de façon comparative, à partir du foie de rat normal (souche WISTAR, poids moyen par animal : 500 g ; animaux sacrifiés par décapitation).

a - Procédé de préparation selon SCHMIDT et THANNHAUSER (524), et BOULANGER et MONTREUIL (525).

Les foies sont prélevés rapidement, broyés à l'aide de l'appareil de FISCHER et recueillis dans 10 volumes d'une solution aqueuse d'acide trichloracétique à 10 p 100, maintenue à + 4°C. On homogénéise pendant 2 à 5 mn dans un appareil de POTTER-ELVEHJEM. Après 10 minutes de contact, à + 4°C, la suspension est centrifugée 15 mn à 3000 t/mn et le culot est lavé deux fois dans la même solution d'acide trichloracétique. Le précipité est lavé trois fois par 10 p 100 (p/v) d'éthanol pur redistillé. Le résidu est ensuite soumis à trois délipidations à reflux par le mélange éthanol - éther (1 - 1) (5 p100 - p/v). Le précipité résiduel est repris par environ 5 ml d'une solution de NaOH - 0,5 N, de façon à obtenir une pâte homogène ; on complète ensuite au volume final (60 ml de NaOH - 0,5N pour 10 g de tissu frais). L'hydrolyse alcaline est effectuée à 37°C pendant 18 heures (*). La solution obtenue est

(*) le flacon n'est bouché qu'après 2 à 3 heures, pour permettre l'élimination des traces d'éther.

ensuite ramenée à + 4°C et ajustée à pH = 4,2, sous agitation, par l'acide formique concentré. Après 3 à 4 heures de repos à + 4°C, on élimine le précipité par une centrifugation à 2500 t/mn, pendant 30 mn à 2°C. Le surnageant est filtré sur du papier Whatman n° 1 et complèté à 100 ml pour 5 g de tissu frais. La purification de l'hydrolysat est effectuée par un"passage" sur une colonne de Dowex 50 x 2 (25-50 mesh.) (2 x 20 cm) suivi d'un lavage de la résine par un litre d'eau distillée ; Hydrolysat et eau de lavage sont recueillis ensembles, sur chloroforme, à la vitesse de 0,6 ml/mn.

b - Procédé de FLECK et MUNRO (526)

Les foies de rat sont homogénéisés dans 10 volumes d'une solution d'acide perchlorique 1-N à + 4°C. Le précipité est lavé deux fois, dans les mêmes conditions, par une solution d'acide perchlorique 0,7 N. Le résidu est hydrolysé directement par une solution de KOH - 0,3N (160 ml pour 10 g de tissu frais), à 37°C pendant une heure. La solution refroidie est neutralisée par l'acide perchlorique 10 N et acidifiée par un volume d'acide perchlorique 1 N. Après centrifugation, le précipité est lavé deux fois par l'acide perchlorique 0,5 N. Les solutions sont rassemblées et amenées à une concentration finale en acide perchlorique de 0,1N.

2 - Détermination des rendements

a - Dosage du phosphore total selon ALLEN (527)

La minéralisation est effectuée dans des fioles à destruction de 50 ml. Dans le cas des solutions purifiées, sur colonne, on concentre au préalable par évaporation. La minéralisation est effectuée, à la rampe à destruction, par addition de 2,5 ml du mélange d'acide sulfurique (d = 1,83) et d'acide perchlorique (d = 1,61) dans les proportions 3 - 1. Après refroidissement, on ajoute environ 20 ml d'eau distillée et les fioles sont maintenues à l'étuve à 100°C pendant 2 heures pour hydrolyser

les polyphosphates. Après avoir complété à 50 ml, le dosage est effectué en triple sur 10 ml, dans des tubes gradués de 15 ml. On ajoute successivement : 1 ml de molybdate d'ammonium à 8,3 g p 100 ml d'eau ; 1 ml de solution réductrice, préparée extemporanément en dissolvant 1 g d'AMIDOL (2-4-diaminophénol) p 100 ml d'une solution aqueuse de sulfite de sodium anhydre à 20 g p.100 ml. Les tubes sont complétés à 15 ml et abandonnés à l'obscurité pendant 60 mn. Le dosage est effectué à l'électrophotocolorimètre de MEUNIER (écran rouge - cuve de 1 cm)(*). Le développement de la coloration doit être prolongé pendant 60 mn ; nous avons, en effet, vérifié que la coloration n'est stable qu'entre 60 et 90 mn après l'addition de la solution réductrice.

b - Spectrophotométrie dans l'ultraviolet

Comme nous l'avons précisé à la page -97-, la méthode spectrophotométrique de FLECK et MUNRO (528) dite "à double longueur d'onde" présente le grand avantage d'éliminer l'interférence des contaminations protéiques. La technique est la suivante :

le dosage est effectué sur la solution obtenue en ajustant à 0,1 N en acide perchlorique l'hydrolysat potassique préparé dans les conditions décrites précédemment (page -72-) (KOH - 0,3 - N - 37°C - 1 h). On détermine les absorptions à 260 et 275 mμ (en cuve de 1 cm). La concentration en μg de phosphore ribonucléique est donnée par la formule :

$$ARN - P = (11,87 \times A_{260\ m\mu}) - (10,40 \times A_{275 m\mu})$$

Les auteurs ont précisé l'importance du temps d'hydrolyse (1 heure, à 37°C dans la potasse 0,3 N) qui solubilise quantitativement les ARN et fournit le minimum de contaminations protéiques acidosolubles. Un temps d'hydrolyse alcaline supérieur augmente considérablement cette contamination.

(*) l'étalonnage de l'appareil est réalisé à l' aide d'une gamme de phosphate monopotassique.

Nous avons étudié les conditions d'application de cette technique au cas des préparations d'ARN ayant subi une hydrolyse alcaline totale (NaOH - 0,5N - 18 h - à 37°C). Nous nous sommes fondés sur les considérations suivantes :

- cette méthode spectrophotométrique doit pouvoir être applicable pour déterminer le rendement en ARN des hydrolysats totaux utilisés pour les études de la composition nucléotidique.

- l'hydrolyse par la potasse suivie d'une acidification par l'acide perchlorique provoque une perte de 3 à 5 p 100 des nucléotides, qui sont entrainés irréversiblement sur le précipité de perchlorate de potassium, quelque soit le nombre des lavages. Il était donc important d'envisager l'application de cette technique dans le cas des hydrolysats sodiques.

- pour l'étude des compositions nucléotidiques, la délipidation est indispensable pour écarter les contaminations de composés phosphorylés d'origine lipidique (voir page -57-), qui altèrent les migrations électro-chromatographiques des nucléotides.

- nous montrerons plus loin l'action néfaste de l'acide perchlorique sur les rendements et la stabilité des préparations.

En conséquence, nous avons appliqué la technique de dosage de FLECK et MUNRO:

- sur un mélange des 4 nucléotides purs, pour vérifier la quantitativité de la méthode sur des nucléotides libres, en l'absence de contaminants et en tenant compte de l'effet hyperchromatique

- sur une préparation d'ARN exempte de protéines, pour étudier l'action du pH sur la valeur de l'ARN - P obtenue.

- sur des préparations obtenues selon les techniques de SCHMIDT et THANNHAUSER et de FLECK et MUNRO que nous venons de décrire.

Les résultats sont les suivants :

1 - Une solution à 0,5 p 100 des quatre ribonucléotides purs est préparée dans l'acide perchlorique 0,1N (pH = 1,45). Les adsorbances sont déterminées, dans des cuves de 1 cm, à 260 et 275 mμ et le phosphore nucléotidique est déterminé par l'équation de FLECK. On détermine ensuite le phosphore nucléotidique par la méthode de ALLEN précédemment décrite.

Les résultats comparatifs sont les suivants :

Dosage de phosphore : 1,662 mg ;
Dosage spectrophotométrique : 1,67 mg.

En conséquence, la méthode de FLECK et MUNRO est applicable à pH = 1,45, dans le cas des mélanges de nucléotides purs. Les valeurs fournies par la méthode à double longueur d'onde sont de 0,3 à 0,5 p 100 supérieures à celles obtenues par le dosage du phosphore.

2 - Une préparation pure d'ARN, obtenue par notre méthode d'extraction par le chlorhydrate de guanidine (voir page 149) a été traitée dans les conditions de FLECK et MUNRO (hydrolyse par une solution de KOH - 0,3 N - 37°C - 1 heure et neutralisation par l'acide perchlorique 1 N). Une gamme de pH est préparée, à partir de cette solution neutre, dans les conditions suivantes :

(1) ajustement à pH = 1,45 par l'acide perchlorique 0,1 N
(2) " pH = 2,35 par l'acide chlorhydrique 0,01 N
(3) " pH = 4,15 par un tampon formiate 0,1 M
(4) " pH = 7,20 par un tampon Tris - Acétate 0,1 M
(5) " pH = 12,80 par une solution NaOH - 0,1 N.

Le tableau, ci-après, fournit les valeurs d'ARN - P déterminée par la formule de FLECK et MUNRO, pour ces différents pH. On constate une augmentation des valeurs d'ARN - P proportionnellement au pH (66,6 p 100 à pH neutre). En conséquence, la formule de FLECK et MUNRO doit être calculée pour des déterminations effectuées obligatoirement à pH = 1,45, après ajustement par l'acide perchlorique 0,1 N.

pH		ARN - P (*)	Augmentation de l'ARN-P en fonction du pH
(1)	1,45	60,0	0
(2)	2,35	65,7	11,7 p 100
(3)	4,15	74,9	27,3 p 100
(4)	7,20	98,0	66,6 p 100
(5)	12,80	82,5	40,3 p 100

(*) taux de phosphore total = 62,7 mg.

3 - Des préparations obtenues par le procédé d'extraction de SCHMIDT et THANNHAUSER, modifié dans les conditions définies plus loin (hydrolyse par la soude 0,5 N - 37°C - 18 h et ajustement à pH = 1,45 par l'acide perchlorique 0,1 N) et par le procédé de FLECK et MUNRO (hydrolyse par la potasse 0,3 N - 37°C - 1 h et ajustement à pH = 1,45) ont été dosées dans les mêmes conditions :

(1) par la méthode de détermination du phosphore total

(2) par la méthode de la double longueur d'onde

(3) par la même méthode, après purification sur Dowex 50 x 2, dans les conditions précisées précédemment, et réajustement à pH = 1,45 par l'acide perchlorique 0,1 N.

	Préparation selon FLECK et MUNRO	Préparation selon la modification personnelle de SCHMIDT et THANNHAUSER
(1)	62,7	80,1
(2)	60,0	105,6
(3)	59,4	76,7

* Valeurs en mg de Phosphore pour 100 g. de tissu frais.

Il apparait donc que, dans le cas des hydrolyses sodiques totales, la méthode de détermination de l'ARN - P n'est applicable qu'après la purification sur Dowex qui élimine la contamination des protéines et des ions Na^+.

La présence de proportions variables de composés phosphorylés non nucléotidiques (voir page 137-) fournit des valeurs du phosphore, dosé par la méthode d'ALLEN, de 4 à 5 p 100 supérieures à celles de l'ARN - P déterminé par spectrophotométrie.

En conclusion, la méthode de dosage spectrophotométrique dite "à double longueur d'onde" est applicable pour les déterminations du rendement des extractions, dans les conditions suivantes :

- les hydrolysats sodiques doivent être, au préalable, purifiés sur Dowex 50 x 2.

- le dosage doit être effectué après ajustement à pH = 1,45, en présence d'acide perchlorique 0,1 N.

- l'ARN - P est déterminé par la formule de FLECK et MUNRO :

$$(ARN\text{-}P)_{\mu g \text{ de } P} = (11,87 \cdot A_{260}) - (10,40 \cdot A_{275}).$$

La méthode de la double longueur d'onde, modifiée dans les conditions ci-dessus, permet ainsi de déterminer directement et très aisément le rendement de l'extraction à partir des produits d'hydrolyse en mélange. Il est cependant évident que cette méthode néglige l'interférence de composés non nucléotidiques qui présentent une absorption à 260 mμ. La détermination de l'ARN - P ne fournit donc pas, dans le cas de préparations impures, une valeur absolue du rendement en ARN des préparations. Il était donc nécessaire de rechercher une méthode de détermination du rendement à partir des ribonucléotides purs, préalablement séparés des impuretés non nucléotidiques qui peuvent être présentes dans les préparations.

- Détermination du "rendement absolu" des extractions.

Etant donné leur sensibilité, nous avons retenu les méthodes de dosage spectrophotométrique en lumière ultraviolette. Les hydrolysats, purifiés sur colonne de Dowex, dans les conditions de BOULANGER et MONTREUIL précédemment décrites (page 83), sont séparés par électrophorèse et les 4 nucléotides sont dosés, après élution, à 260 mμ, dans des cuves de 1 cm (pour les détails opératoires, voir à la page 112). Le rendement absolu est ensuite calculé, en mg de phosphore pour 100 g de tissu frais, en effectuant la somme des absorbances des 4 nucléotides, qui est affectée d'un coefficient de correction K, que nous allons préciser. Nous définissons ainsi le rendement absolu en phosphore ribonucléique par la formule suivante :

$$\Sigma(P) = (A)_{4N} \times K$$

ce calcul dérive de la formule générale :

$$P = \frac{A \times 30,98}{\varepsilon \cdot d} \times 10^{-3}$$

dans laquelle :

P = poids de phosphore en mg ,

A = absorbance d'un nucléotide,

30,98 = poids atomique du phosphore,

ε = absorb_ance molaire d'un nucléotide,

d = épaisseur de cuve en cm.

Pour chaque nucléotide, le poids de phosphore nucléotidique, en mg, calculé à partir de l'absorb_ance, A à 260 mμ est donc :

$$P = A \times \frac{30,98.10^{-3}}{\varepsilon \cdot d} = A_N \times k_N$$

La distribution des quatre nucléotides dans les ARN totaux du foie de rat étant inégale, il convenait de tenir compte de la composition centésimale des nucléotides, dans la détermination du $\Sigma(P)$.

C_N représentant la composition centésimale de chaque nucléotide, le $\Sigma(P)$ sera donc, pour d = 1 cm ;

$$\Sigma(P) = \Sigma(A)_{4N} \times \frac{(k_N \times C_N)}{100}$$

$$\text{avec } K = \frac{\Sigma(k_N \times C_N)}{100}$$

Les valeurs respectives des ε, selon BEAVEN et al (529), et des compositions centésimales C_N, selon MONTREUIL et al (530), sont, pour les ARN totaux du foie de rat :

Nucléotides	$\varepsilon_{260m\mu}$	Composition centésimale CN
Acide adénylique	14,2	18,0
- guanylique	11,8	32,8
- cytidylique	6,8	29,2
- uridylique	10,0	20,0

(*) les valeurs des ε sont données à pH = 2 pour C, A et U et à pH = 1 pour G.

Le produit $k_N C_N$ pour les 4 nucléotides est donc :

$$k_A C_A = \frac{30\,980.10^{-6}}{14,2} \times 18 = 39\,270 \cdot 10^{-6}$$

$$k_G C_G = \frac{30\,980.10^{-6}}{11,8} \times 32,8 = 86\,113 \cdot 10^{-6}$$

$$k_C C_C = \frac{30\,980.10^{-6}}{6,8} \times 29,2 = 133\,032 \cdot 10^{-6}$$

$$k_U C_U = \frac{30\,980.10^{-6}}{10} \times 20 = 61\,960 \cdot 10^{-6}$$

donc $\Sigma (k_N C_N) = 320\,375 \times 10^{-6}$

et $K = \frac{320\,375 \cdot 10^{-6}}{100} = 3204 \cdot 10^{-6}$

La détermination expérimentale du $\Sigma(P)$ consiste donc à déterminer l'absorbance des nucléotides séparés par électrophorèse et élués par 5 ml d'une solution d'H Cl - 0,01N pour C, A et U et 0,1 N pour G. On effectue ensuite le calcul selon la formule générale :

$$\Sigma (P) = \Sigma (A)_{4N} \times 3.204 \cdot 10^{-6}$$

Le rendement absolu de l'extraction, exprimé en mg de phosphore, correspond ainsi à la somme de l'absorbance des quatre nucléotides purs, corrigée en fonction de leur répartition centésimale. On exprime ensuite le Σ (P) pour 100 g de tissu frais.

Les trois procédés de détermination du rendement que nous avons retenu sont donc les suivants :

- Dosage du phosphore total, qui n'exclut pas l'interférence des dérivés phosphorylés non-nucléotidiques.

- Détermination de l'ARN - P, par spectrophotométrie en double longueur d'onde, selon FLECK et MUNRO modifié, qui n'élimine pas l'interférence des dérivés non-nucléotidiques absorbant la lumière ultra-violette à 260 mu.

- Détermination du Σ(P) selon un procédé original, qui exprime le rendement absolu en phosphore ARN, par spectrophotométrie des quatre nucléotides purs, obtenus par séparation électrophorétique des hydrolysats totaux. La comparaison systématique de ces trois valeurs sera, en outre, très utile pour contrôler la pureté des préparations.

3 - Méthodes d'étude de la composition des préparations

Outre l'interprétation des valeurs obtenues pour l'ARN - P et la détermination des Σ(P) des préparations, la pureté des extraits a été étudiée par l'électrophorèse, la chromatographie et l'électrochromatographie des hydrolysats alcalins.

a - Analyse électrophorétique des hydrolysats

Les solutions d'élution, obtenues par passage des hydrolysats alcalins sur des colonnes de Dowex - 50 x 2 (voir à la page -83-), sont lyophilisées. Les résidus secs sont repris par une solution d'acide chlorhydrique 0,1 N et portés à 37°C pendant 10 mn ; ces conditions permettent, à la fois, la solubilisation totale de l'acide guanylique, sans risques de dégradation des autres nucléotides, et l'élimination d'un résidu protéique, insoluble dans ces conditions de pH.

L'électrophorèse est effectuée dans une cuve "en toit", sur du papier d'Arches 304. On effectue des dépots correspondant à 15 à 20 unités d'absorbance à 260 mu, sur un trait de départ tracé à 14 cm du bord de la feuille ; les dépots sont écartés d'une distance minimale de 4 cm ; ils peuvent être ponctuels ou en traits de 3,5 cm. L'électrophorèse

est effectuée avec le tampon citrate 0,02 M - pH=3,5 de DAVIDSON et SMELLIE (531). La migration est prolongée, vers l'anode, pendant 6 heures, pour une tension de 11 V/cm (850 à 900 volts). On sèche les électrophorégrammes à l'air libre et on repère les nucléotides à 260 mμ avec une lampe type MINERALIGHT. Dans le cas des préparations radioactives, on effectue des autoradiographies (voir pages 116 et 202).

Le dosage spectrophotométrique des nucléotides est réalisé sur les solutions d'élution de carrés de papier dont la surface est à peine supérieure aux surfaces délimitées par le trait de crayon. Ces carrés sont découpés et introduits en petits morceaux dans des flacons contenant un volume connu d'acide chlorhydrique 0,01 N (0,1 N pour l'acide guanylique). On utilise en général 5 ml. pour éluer une quantité de nucléotide voisine de 100 μg. L'élution des nucléotides est totale après 18 heures à la température du laboratoire. Des carrés de papier de mêmes dimensions sont découpés à côté des nucléotides et élués de la même manière : ils servent de témoins et permettent d'éliminer l'absorption propre du papier et du solvant. Les densités optiques des solutions sont mesurées à 250, 260, 280 et 290 mμ. Les quantités de nucléotides sont déduites des densités optiques à 260 mμ et des coefficients d'extinction ε donnés par BEAVEN et coll. (532), en appliquant la formule suivante :

$$P = \frac{A_{260\ m\mu} \times M}{\varepsilon \cdot d} \times 100$$

avec M = masse moléculaire du nucléotide ;

d = largeur de la cuve en cm.

Les résultats sont ensuite exprimés pour 100 résidus de nucléotides. Tous les dosages sont faits en quatre exemplaires en présence de quatre témoins papier. La détermination du rendement absolu des préparations Σ (P) s'effectue à ce stade, à partir des valeurs d'absorbance à 260 mμ. La pureté des nucléotides est contrôlée en déterminant les rapports caractéristiques A_{250}/A_{260} , A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{290}, et en précisant les longueurs d'onde minimales et maximales à pH = 2 pour C, A et U et à pH = 1 pour G.

La radio activité spécifique des nucléotides est déterminée sur chaque nucléotide par le comptage de la radioactivité de pastilles, de surface constante, découpées à l'emporte pièce à l'emplacement correspondant à chacun d'eux. Ces pastilles sont ensuite éluées, à 20°C pendant 18 heures, par 5 ml d'une solution d'acide chlorhydrique 0,01 N (pour C, A et U) et 0,1 N (pour G). On détermine ensuite l'absorbance à 260 mμ. La radioactivité spécifique est déterminée, en coups/mn/mg de phosphore, à partir de la formule suivante :

$$\frac{(C.P.M. - \text{témoin fond})}{A_{260\,m\mu}} \times K$$

Le facteur K est calculé, à partir des absorptions molaires ε de chaque nucléotide :

$$K_A = 458,50 \; ; \; K_C = 219,79 \; ; \; K_G = 380,90 \text{ et } K_U = 322,89.$$

On ramène ensuite au jour de l'injection, pour 1 mC de radiophosphate injecté.

b - Analyse chromatographique des extraits

La chromatographie se fait sur papier Whatman n°1 dans le solvant suivant (BOULANGER et MONTREUIL (533)) :
Acide formique/isopropanol/phénol/eau (10 : 5 : 85 : 100).

Le phénol utilisé est du phénol aqueux préparé par l'addition de 100 ml. d'eau distillée à 950 g de phénol pur fondu. La phase phénolique du système solvant constitue la phase mobile. La phase aqueuse, additionnée d'une pincée de cyanure de potassium constitue la phase de saturation de la cuve.

Nos cuves à chromatographie sont de dimensions réduites pour permettre une bonne saturation et placées dans une pièce climatisée dont la température est réglée à 20°C.

Les dépôts sont faits sous forme de traînées de 2,5 cm de longueur et de largeur minimum (ou de 3 spots distants de 1 cm), à 10 cm

du bord supérieur du papier. Sur chaque chromatogramme est déposé un témoin constitué par un mélange des 4 nucléotides purs (50 µg de chaque ribonucléotide : mélange des nucléosides 2' et 3' phosphate).

Après passage du solvant, les feuilles de papier sont séchées à l'étuve à 80°C et les composés phosphorés sont révélés par pulvérisation du réactif de HANES et ISHERWOOD (534) :

Molybdate d'ammonium à 8 p 100	:	125 ml.
Acide perchlorique pur	:	50 ml.
Acide chlorhydrique 1 N	:	100 ml.
Eau distillée qsp	:	1000 ml.

Après exposition des chromatogrammes à la lumière solaire (MONTREUIL (535) ou devant une lampe germicide (BANDURSKI et coll. (536), (GUERIN (537)), l'emplacement des nucléotides est marqué par l'apparition de taches bleues sur un fond blanc. Dans le cas de préparations marquées par le phosphore ^{32} on révèle la radioactivité par autoradiographie (voir pages: 116 et 203).

c - Séparation électrochromatographique ou "Finger-Printing"

L'électrochromatographie permet l'analyse totale de la composition des hydrolysats ; les séparations, effectuées dans des conditions rigoureusement standardisées sont, en outre, applicables à l'étude comparative des variations qualitative et quantitative des nucléotides mineurs et à la recherche de composés anormaux. L'utilisation de l'autoradiographie permet enfin d'accroître fortement la sensibilité de la technique. Les conditions opératoires suivantes ont été appliquées :

- On dépose, sous forme d'une bande d'environ 15 mm, une solution correspondant à 100 unités d'absorbance à 260 mµ, sur une feuille de papier d'Arches n° 304, en un point situé en un coin de la feuille, à respectivement 7 et 12 cm des deux bords du papier. Des volumes de solution allant jusqu'à 300 µl peuvent être déposés sans inconvénient.

- L'électrophorèse est effectuée dans la première direction, à 1000 volts (50 à 60 mA) pendant 6 à 7 heures *, dans le tampon formiate

* la migration est suivie par le déplacement d'un spot témoin d'acide picrique déposé en marge de la feuille de papier.

d'ammonium 0,06 M - pH = 2,7 (25 ml d'acide formique concentré - 8.330 ml d'eau - 3,9 ml d'ammoniaque concentré). Le papier est séché pendant 15 h, sous un courant d'air à 20°C, et le séchage est achevé dans une étuve à 37°C pendant 4 à 6 heures.

- une chromatographie descendante est ensuite réalisée dans la deuxième direction, avec le système-solvant de MARKHAM et SMITH (538) : Isopropanol * - eau (70 - 30), en atmosphère d'ammoniac (0,35 ml d'ammoniaque concentré par litre de solvant est ajouté au fond de la cuve à chromatographie). Le papier est mis à saturer pendant 15 heures, dans la cuve à chromatographie, avant d'ajouter le solvant. La migration est prolongée de 4 à 7 jours. Cependant le temps de migration peut être ramené à 2 à 3 jours en agrafant à la partie inférieure du chromatogramme plusieurs épaisseurs depapier Whatman 3 MM. Le chromatogramme est ensuite séché à l'air et peut être révélé soit par observation à 260 mμ avec la lampe "Mineralight" soit par le réactif spécifique des phosphates de HANES et ISHERWOOD (539), soit encore, dans le cas de préparations marquées par le phosphore radioactif, par autoradiographie.

- L'autoradiographie est effectuée à partir de préparations obtenues après un marquage in vivo par les radiophosphates (1 mC/Kg d'animal). Bien que la méthode soit longue (2 à 4 semaines elle présente les avantages suivants :

1 - il s'agit de la méthode de révélation des composés phosphorylés la plus sensible. Il est possible de caractériser des traces de composés qui ne se révèlent pas à la lumière ultraviolette.

2 - La révélation des composés phosphorylés non-nucléotidiques est obtenue aisément.

3 - La méthode est applicable quels que soient les papiers et les conditions de séparation.

4 - L'évaluation de l'intensité des taches permet une application semi-quantitative très aisée.

5 - Les autoradiogrammes, une fois révélés, se conservent indéfiniment.

---

* il est indispensable d'utiliser de l'isopropanol pur, exempt de contaminations absorbeant la lumière ultra violette.

On procède, en pratique, de la façon suivante :
l'acide uridylique est localisé sur les électrophorégrammes par observation à 260 mμ, et sa radioactivité est mesurée directement avec une sonde de Geiger classique. Les papiers sont ensuite placés entre deux films KODAK (KODIREX, sans écran, 45 x 45cm) et l'ensemble est introduit dans une boîte opaque. Quand la radioactivité moyenne de l'acide uridylique est de 1000 CPM, les deux films sont successivement révélés après 2 à 4 semaines d'exposition.

Ces différentes techniques de détermination des rendements en ARN et d'analyse, qualitative et quantitative, des préparations ont été appliquées à l'étude critique des différentes étapes de la méthode d'extraction de SCHMIDT et THANNHAUSER, par rapport à la technique récente d'extraction de FLECK et MUNRO. Il convenait, dans notre orientation de travail, d'étudier l'influence des différentes conditions d'extraction sur le rendement, la pureté et l'intégrité des préparations obtenues.

B - RESULTATS DE L'ETUDE CRITIQUE DES CONDITIONS D'EXTRACTION DES ARN PAR LES METHODES INDIRECTES

Nous avons, dans une première série de travaux, recherché les conditions d'extraction conduisant au rendement optimum.

1 - Comparaison des méthodes de SCHMIDT et THANNHAUSER (540) et de FLECK et MUNRO (541) : modification des opérations de délipidation.

Un homogénat obtenu à partir de dix foies de rat dans un volume minimum de tampon (tris pH = 6,8) (voir à la page 101) a été divisé en deux lots qui furent traités, de façon comparative, l'un par la méthode originale de SCHMIDT et THANNHAUSER et l'autre par le procédé de FLECK et MUNRO. Le phosphore total et l'ARN - P ont été déterminés pour les différentes étapes de l'extraction de SCHMIDT et THANNHAUSER : extrait éthanolique, extrait par le mélange éthanol-éther et surnageant à

pH = 4,2 (fraction ARN). Ces valeurs ont été comparées à celles obtenues à partir de la solution perchlorique pH = 1,45 de FLECK et MUNRO (page:104).

Les résultats appellent les commentaires suivants : (voir tableau H).

- la méthode SCHMIDT et THANNHAUSER fournit, dans les deux cas, des valeurs de rendement total supérieures à la préparation obtenue selon le procédé de FLECK et MUNRO.

- les opérations de délipidation provoquent une perte importante de dérivés phosphorylés, spécialement au cours des lavages du précipité trichloracétique par l'éthanol. Outre les phospholipides normalement entrainés, la solution éthanolique contient 43 p 100 des dérivés qui absorbent la lumière ultraviolette à 260 mμ. Par contre la solution dans le mélange éthanol- éther n'en contient plus qu'environ 5 p 100. Ces résultats sont en accord avec les travaux de VENKATARAMAN (542) (voir à la page: 57).

- enfin la fraction ARN obtenue directement sans délipidation par la méthode de FLECK et MUNRO présente une contamination importante en dérivés phosphorylés ; par contre la fraction ARN obtenue par le procédé de SCHMIDT et THANNHAUSER montre une correspondance parfaite entre les valeurs du phosphore total et de l'ARN - P.

Il convenait donc de modifier les conditions de délipidation de façon à améliorer le rendement de la fraction ARN, en réduisant à l'extrême les pertes de composés nucléiques au cours de la délipidation. Nous avons substitué l'éther pur à l'éthanol pour effectuer les lavages à froid du précipité trichloracétique. Les résultats montrent que l'éther n'entraîne plus que 18 p 100 de composés absorbant la lumière ultra - violette à 260 mμ et que le rendement de la fraction ARN augmente considérablement (de 47 mg avec l'éthanol à 72,5 mg avec l'éther). Le lavage par l'éther, suivi d'une délipidation classique par le mélange éthanol - éther, fournit donc une fraction ARN avec un rendement voisin de celui de la méthode de FLECK et MUNRO. En outre, le contenu en phosphore total correspond à la valeur de l'ARN - P, ce qui permet de supposer dès maintenant que la fraction ARN obtenue selon cette modification

TABLEAU - H

COMPARAISON DU RENDEMENT EN ARN * POUR LES PROCEDES DE FLECK ET MUNRO ET DE SCHMIDT ET THANNHAUSER.

Méthode de dosage	FLECK ET MUNRO	SCHMIDT et THANNHAUSER				SCHMIDT et THANNHAUSER MODIFIEE			
		Ethanol **	Ethanol + Ether (1:1)	Surnageant pH = 4,2	Total	Ether **	Ethanol + Ether (1:1)	Surnageant pH = 4,2	Total
Phosphore total	142	123	3,5	47	173,5	50,5	50	71,5	172
ARN - P	78,5	39	4	47	90	8	4	72,5	84,5

BUS LILLE

* Valeurs exprimées en mg de phosphore pour 100 g de tissu frais (moyenne de 4 expériences).

** Dans le cas des extraits obtenus par l'éthanol, l'éther et l'éthanol - éther, l'hydrolyse alcaline est réalisée avec une solution de soude 1 N, à 37°C pendant 18 heures, par suite de la saponification simultanée des lipides présents.

est plus pure que la fraction correspondante de FLECK et MUNRO.

Nous avons donc entrepris, à partir de ces résultats préliminaires, une étude systématique de toutes les étapes de la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER de façon à déterminer les conditions optimales de rendement et de pureté.

2 - Etude critique des différentes étapes de l'extraction selon le procédé de SCHMIDT et THANNHAUSER.

Nous avons successivement envisagé l'influence du temps de contact et de la concentration en acide trichloracétique sur les rendements. Puis nous avons comparé l'extraction avec les acides trichloracétique et perchlorique à différentes concentrations. Ces différents facteurs ont été étudiés séparément en adoptant définitivement le lavage du précipité par l'éther, suivi d'une délipidation par le mélange éthanol-éther. Nous avons également comparé dans ce dernier cas, nos résultats avec la très récente modification proposée par STEEL et al. (543) (voir à la page 128), qui consiste à laver le précipité trichloracétique par l'éthanol en présence d'acétate de sodium.

a - Influence du temps de contact avec l'acide trichloracétique à 10 p 100.

Un homogénat obtenu dans les conditions précisées à la page 102 à partir de dix foies de rat est divisé en trois lots qui sont traités séparément par dix volumes d'une solution d'acide trichloracétique à 10 p 100. On abandonne à 0 - 4°C respectivement pendant 10 mn, 30 mn et 60 mn avant de centrifuger. Les culots de centrifugation sont ensuite remis en suspension deux fois dans la même solution et abandonnés à nouveau pendant 10 mn, 30 mn et 60 mn.

Les précipités sont ensuite traités par l'éther puis l'alcool - éther et, après une hydrolyse par la soude 1 N ou 0,5 N, à 37°C pendant 18 heures, on détermine le phosphore total et l'ARN - P sur les différentes fractions : extrait éther, extrait éthanol - éther et surnageant pH = 4,2.

TABLEAU - J

VARIATION DU RENDEMENT EN ARN * EN FONCTION DU TEMPS DE CONTACT AVEC L'ACIDE TRICHLORACETIQUE A 10 %

Méthode de dosage	Temps en mn	Ether **	Ethanol + ether (1:1) **	Surnageant à pH=4,2	Total
Phosphore total	10	45	45	74	164
	30	57,4	31	64,5	153
	60	54	34,5	67	156
ARN - P	10	10,2	1,8	64	76
	30	11,5	2,0	63	76,5
	60	12,0	2,4	60	74,4

BUS LILLE

* valeurs exprimées en mg de phosphore pour 100 g de tissu frais (moyenne de 4 expériences).

** dans le cas des extraits obtenus par l'éther et l'éthanol-éther, l'hydrolyse alcaline est réalisée avec une solution de soude 1N, à 37°C pendant 18 heures par suite de la saponification simultanée des lipides présents.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau J. On ne constate pas de variations significatives des rendements, pour les différentes fractions étudiées, qu'il s'agisse du phosphore total ou de l'ARN - P. Le rendement dans le surnageant à pH = 4,2 est toujours optimum pour 10 mn de contact et nous avons retenu définitivement cette condition. En outre, pour un contact supérieur à 10 mn, le précipité trichloracétique devient gommeux ; les lavages et la délipidation sont rendus plus difficiles et le résidu se solubilise mal dans la soude. Ces difficultés sont en partie responsables de la dispersion des résultats.

b - Influence de la concentration en acide trichloracétique.

Un homogénat préparé dans des conditions identiques (voir page 102) est réparti en 5 lots qui sont traités respectivement pendant trois fois 10 minutes, avec des solutions d'acide trichloracétique à 10, 15, 20, 30 et 40 p 100. Les rendements sont déterminés par le dosage du phosphore total et le calcul de l'ARN - P modifié ; le Σ(P) a été, en outre, déterminé après séparation électrophorétique de la solution surnageante à pH = 4,2. (Dans le cas des phases éther et éthanol-éther, l'impossibilité d'obtenir la séparation satisfaisante d'éventuels dérivés nucléotidiques interdit toute détermination du Σ(P)).

Les résultats du tableau K et les courbes de la figure 13 appellent les commentaires suivants :

- La quantité de phosphore total entrainé dans la phase organique (Ether + éthanol-éther) varie en raison inverse de la concentration en acide trichloracétique ; cette variation s'accompagne d'une augmentation du phosphore total dans la fraction ARN (surnageant pH = 4,2). Il est possible d'interpréter ces variations en considérant que la délipidation n'est que partielle pour des concentrations élevées en acide trichloracétique et le résidu phospholipidique se retrouve dans la fraction acido-soluble de l'hydrolysat alcalin. Le rendement total en phosphore ne présente donc pas de variation significative.

- Cette interprétation est confirmée par les variations des valeurs d'ARN (P) pour ces différentes fractions. En effet l'ARN (P) décroit

TABLEAU - K

VARIATION DU RENDEMENT EN ARN * EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN ACIDE TRICHLORACETIQUE

Méthode de dosage	Conc. en ATCA %	Ether **	Ethanol ** + ether (1:1)	Surnageant pH = 4,2	Total
Phosphore total	10	45	45	74	164
	15	44	46	72	162
	20	53	38	70	163
	30	31	57	88	166
	40	20	53	95	167
ARN - P	10	10,2	1,8	64	76
	15	8,2	1,7	65	74
	20	6,6	1,4	58	66
	30	6,4	0,6	59	62
	40	7,6	0,6	56	63,2
$\leq$(P)	10	—	—	49	—
	15			44	
	20			40	
	30			33	
	40			30	

BUS LILLE

* et ** : voir tableau - J (page 121).

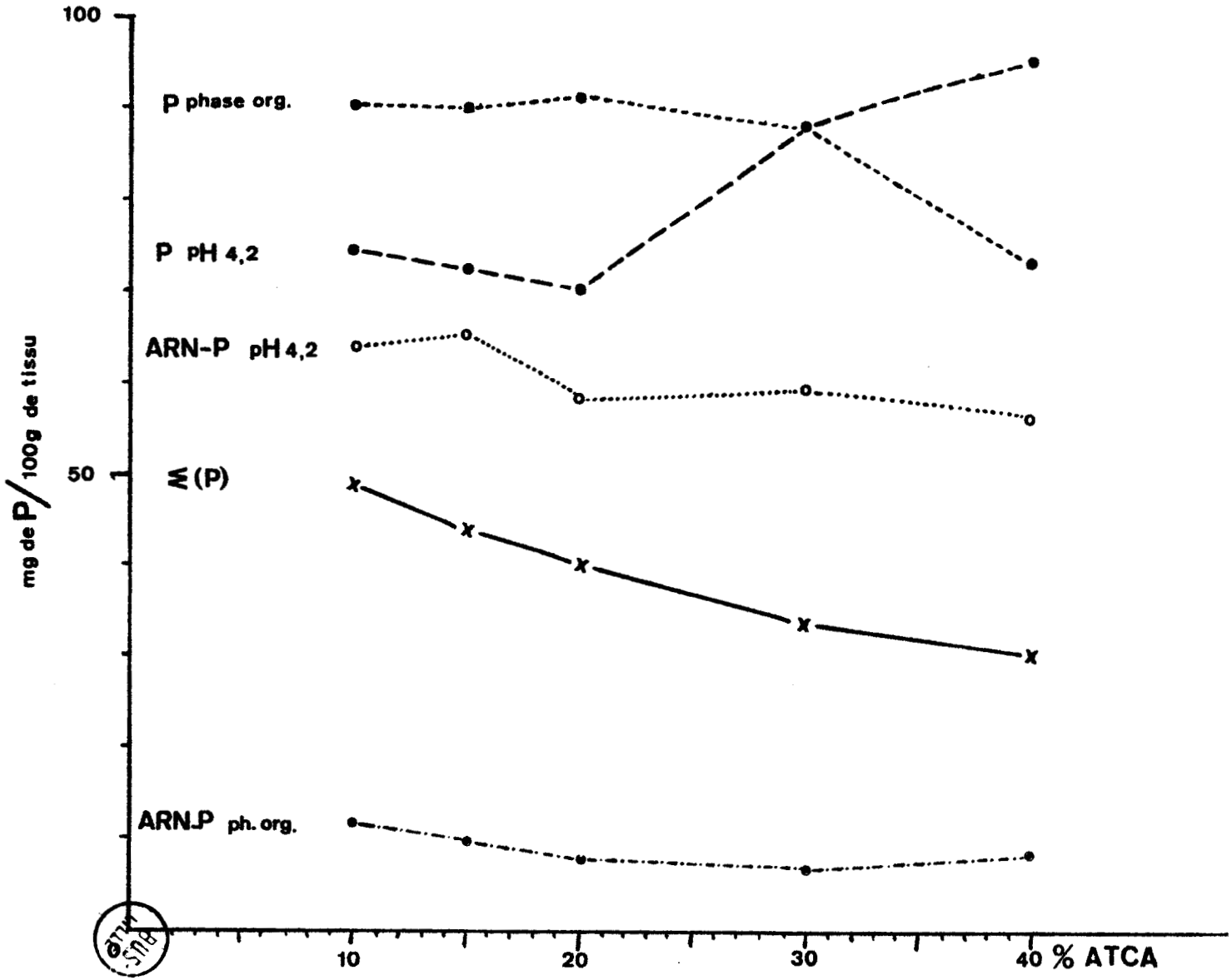


Figure-13 : VARIATION DU RENDEMENT D'ARN EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN ACIDE TRICHLORACETIQUE.

(P et ARN-P en Phase organique: somme des valeurs correspondant à l'ether et ethanol-ether.)

légèrement dans la phase organosoluble. Cependant l'ARN (P) décroit également dans le surnageant à pH = 4,2 ce qui tend à démontrer une perte de composés possédant un max. à 260 mμ. Ainsi les valeurs globales des rendements par l'ARN (P) décroissent de façon sensible avec la concentration.

- cette hypothèse se trouve confirmée par les valeurs des Σ (P) qui décroissent fortement en fonction de la concentration. Ces résultats sont en faveur d'une perte en ARN au cours de l'extraction.

L'hypothèse d'une contamination importante de la fraction ARN par des composés phosphorylés non nucléotidiques se trouve renforcée par la détermination de la radioactivité spécifique des nucléotides. On constate en effet une augmentation importante (environ 10 p 100) de la radioactivité spécifique de la tache correspondant à l'acide uridylique, en passant de l'ATCA à 10 p 100 à l'ATCA à 20 p 100. La radioactivité spécifique des autres nucléotides ne varie pas. Nous verrons plus loin (page: 135) que l'acide uridylique, séparé par électrophorèse à pH = 3,5 en tampon citrate, correspond à une zone d'interférence avec des dérivés d'origine phospholipidique (inositol mono - et diphosphates, glycerophosphate) et phosphopeptidique.

	C	A	G	U
ATCA à 10 p 100	108.000	177.000	93.000	193.000
ATCA à 20 p 100	107.000	167.000	92.500	265.000

(*) radioactivité spécifique exprimée en CPM/mg de Phosphore nucléotidique pour 1 mC.

En conclusion, le rendement optimum en ARN (Σ (P) = 49 mg pour 100 g de tissu frais) est obtenu avec les solutions d'acide trichloracétique à 10 p 100. Les contaminations sont, en outre, les plus faibles à cette concentration. Ces résultats sont en désaccord avec les conclusions de HALLIMAN, FLECK et MUNRO (544) (voir à la page 54), selon lesquelles

l'acide trichloracétique à 20 p 100 conduit au rendement optimum.

En fonction des nombreux travaux que nous avons résumés précédemment (voir à la page: 47), il convenait également d'étudier le rendement des techniques utilisant l'acide perchlorique et de comparer ces dernières aux méthodes à l'acide trichloracétique.

c - Comparaison des acides perchlorique et trichloracétique

- Influence des concentrations d'acide perchlorique

Un homogénat préparé dans les conditions précédemment décrites (voir page 102-) est réparti en 4 lots qui sont ajustés, à partir d'une solution d'acide perchlorique 2 N, aux concentrations suivantes : 0,5 - 0,75 - 1 N et 1,5 N. Après un contact de 10 minutes, les précipités sont recueillis et lavés deux fois, dans les mêmes conditions, par des solutions d'acide perchlorique de même normalité. Après délipidation par l'éther et le mélange alcool - éther, le résidu est traité par la soude 0,5 N, à 37°C pendant 18 heures, puis précipité à pH = 4,2 par l'acide formique. Après passage sur Dowex 50 x 2, on détermine systématiquement le phosphore total, l'ARN (P) et le Σ(P). Les résultats sont rassemblés dans le tableau L.

On peut constater que le rendement en phosphore total est légèrement supérieur avec l'acide perchlorique 0,75 N. Mais les valeurs d'ARN - P ne présentent plus de variations significatives. En outre, la séparation électrophorétique effectuée pour la détermination du Σ(P) permet de caractériser une dégradation profonde des nucléotides puriques ; en effet, l'acide adénylique est totalement détruit et le taux d'acide guanylique est diminué d'environ 50 p 100 ; on peut caractériser la présence de nucléosides et de bases libres (voir la composition centésimale à la page -163). Cette dégradation profonde est due à la présence de traces résiduelles d'acide perchlorique qui ne sont pas retenues sur la résine et provoquent une hydrolyse des nucléotides puriques au cours de la concentration des éluats ; les ions perchlorates peuvent être caractérisés dans les éluats des colonnes par précipitation avec la potasse.

TABLEAU - L

VARIATION DU RENDEMENT EN ARN * EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN ACIDE PERCHLORIQUE

Méthode de dosage	Concentration en acide perchlorique			
	0,5 N (3%)	0,75 N (4,5%)	1,0 N (6%)	1,5 N (9%)
Phosphore total	48,5	53,2	48,5	48,0
ARN - P	48,1	52,9	51,0	52,3
Σ(P)	7,9	16,5	9,2	8,6

BU S LILLE

* valeurs exprimées en mg de phosphore pour 100 g de tissu frais (moyenne de 3 expériences).

On peut donc conclure que l'extraction par l'acide perchlorique suivie d'une hydrolyse sodique, ne fournit pas de préparations satisfaisantes; les traces d'acide perchlorique résiduelles provoquent, en effet, une hydrolyse profonde des nucléotides. Pour éviter cette dégradation nous avons appliqué la modification proposée récemment par STEELE et al. (545), qui consiste à ajouter de l'acétate de sodium (ou de potassium) à l'éthanol de façon à neutraliser l'excès d'acide entrainé sur le précipité (voir à la page 42).

- Etude critique de la modification de STEELE et al (546)

STEELE et al (547) ont proposé de laver les précipités trichloracétiques par l'éthanol contenant 10 p 100 d'acétate de potassium et les précipités perchloriques par l'éthanol à 2 p 100 d'acétate de sodium. L'addition d'acétate permet de neutraliser les traces d'acide adsorbés sur le précipité, ce qui améliore le rendement en diminuant les pertes au cours des opérations de délipidation (voir page 57).
Nous avons appliqué ces conditions et nous avons comparé les rendements pour les différentes méthodes suivantes :

- Extraction par l'acide trichloracétique et délipidation par l'éthanol et l'éthanol-éther

- Extraction par l'acide trichloracétique et délipidation par l'éther, puis l'éthanol-éther

- Extraction par l'acide perchlorique 0,75 N, telle que nous venons de la décrire.

Le tableau M rassemble ces résultats comparatifs.

- Dans le cas de l'extraction par l'acide trichloracétique, on peut constater que l'addition d'acétate à l'éthanol provoque une augmentation importante du rendement, par rapport à la technique classique de SCHMIDT - THANNHAUSER. Le rendement absolu Σ (P) reste cependant inférieur à celui obtenu avec notre modification personnelle (substitution de l'éther à l'éthanol).

TABLEAU - M

MODIFICATION DU RENDEMENT EN ARN * EN PRESENCE DU MELANGE ETHANOL - ACETATE

METHODE DE DOSAGE	ACIDE TRICHLORACETIQUE			ACIDE PERCHLORIQUE	
	Ethanol +	Ethanol - CH_3COOK, 10 % x	Ether **	Ethanol - CH_3COONa, 2 % x	Ether **
Phosphore total	51,2	70	78	74	74
ARN - P	50	70	74	74,4	74
$\leq$(P)	32	46	51,3	41	22

* Valeurs exprimées en mg de phosphore pour 100 g de tissu frais (moyenne de 4 expériences).

+ Procédé de SCHMIDT et THANNHAUSER classique

x Modification proposée par STEELE et al.

** Modification personnelle.

Dans le cas de l'extraction perchlorique, l'utilisation de l'éthanol à 2 p 100 d'acétate de sodium permet d'éviter, en partie, les dégradations constatées par lavage avec l'éther pur ; le Σ (P) reste cependant très inférieur à celui obtenu avec la méthode à l'acide trichloracétique - éther - éthanol-éther.

En conclusion de ces différentes études, seule notre modification personnelle de la méthode de SCHMIDT - THANNHAUSER fournit le rendement optimum en ARN : selon les lots d'animaux, le Σ (P) varie de 45 à 52 mg de phosphore ribonucléique pour 100 g de tissu frais. Les étapes essentielles de cette technique se résument de la façon suivante :

- précipitation, pendant 10 mn à 4°C, par 10 volumes d'une solution d'acide trichloracétique à 10 p 100.
- 2 lavages de 10 mn du précipité par la même solution.
- 3 lavages à 4°C par l'éther pur.
- 3 délipidations successives à reflux par le mélange éthanol - éther (1/1)
- hydrolyse par la soude 0,5 N à 37°C pendant 18 heures.
- précipitation à pH = 4,2 par l'acide formique
- purification du surnageant sur Dowex 50 x 2.

Ces conditions opératoires fournissent une préparation avec le maximum de rendement. Il convenait cependant, dans notre orientation de travail, de vérifier encore la pureté des extraits obtenus par cette méthode modifiée.

3 - Etude de la pureté des extraits obtenus par la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER modifiée.

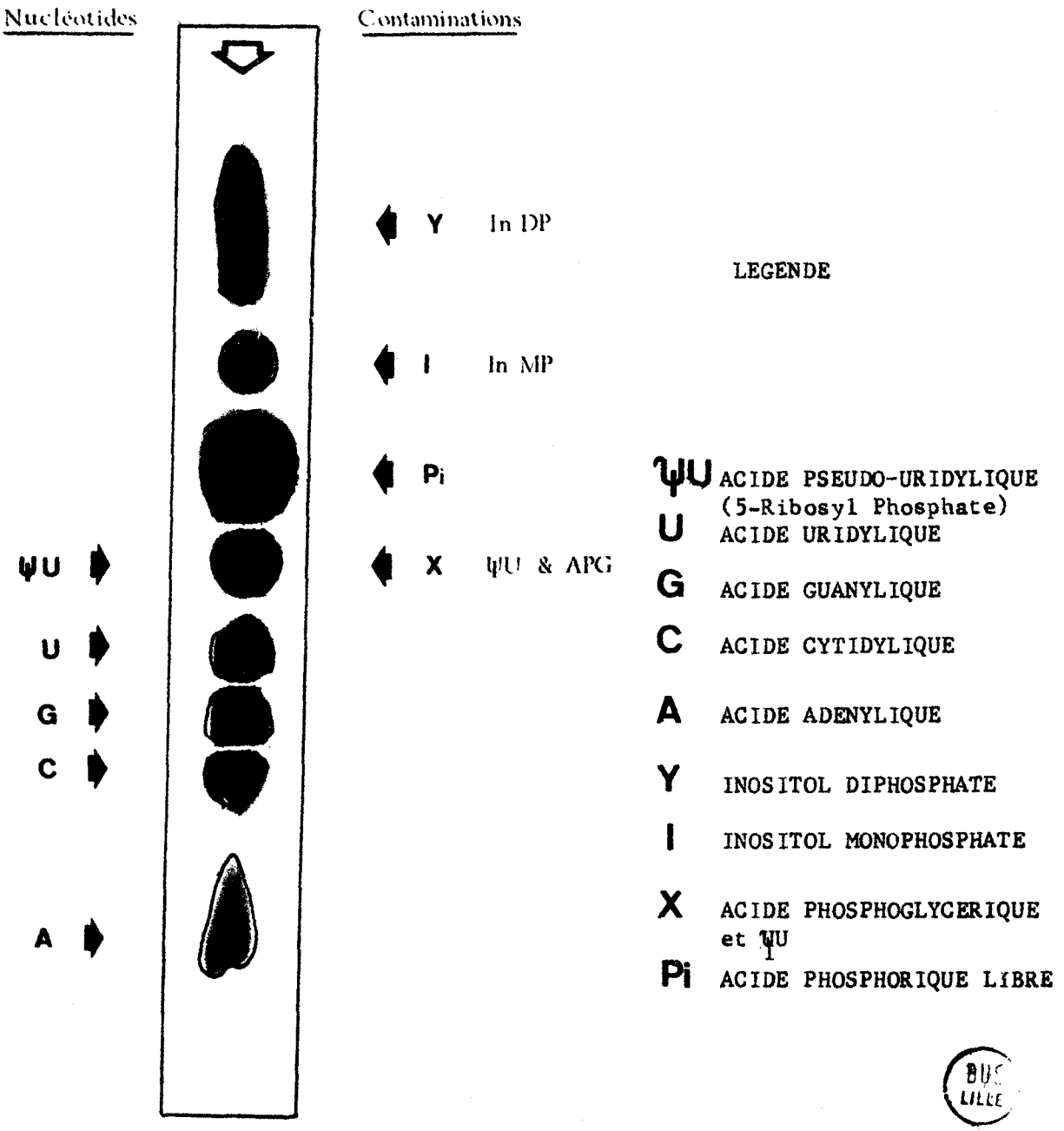
Nous avons controlé la pureté des extraits obtenus par la méthode modifiée dont nous venons de préciser les étapes, en reprenant l'analyse chromatographique sur papier dans les conditions de BOULANGER et MONTREUIL (548). La mise en évidence de nombreux composés non nucléotidiques

nous a conduit à rechercher un procédé de séparation totale des différents constituants, de façon à préciser les conditions analytiques applicables à l'étude comparative d'extraits normaux et cancéreux et à la recherche de nucléotides anormaux. Après avoir étudié le comportement des différents constituants en électrophorèse classique sur papier, dans le tampon citrate 0,02 M à pH = 3,5, l'existence de nombreuses zones d'interférence nous a conduit à retenir une technique d'électrochromatographie bidimensionnelle.

a - Analyse des extraits trichloracétiques par chromatographie sur papier dans le système solvant de BOULANGER et MONTREUIL (549)

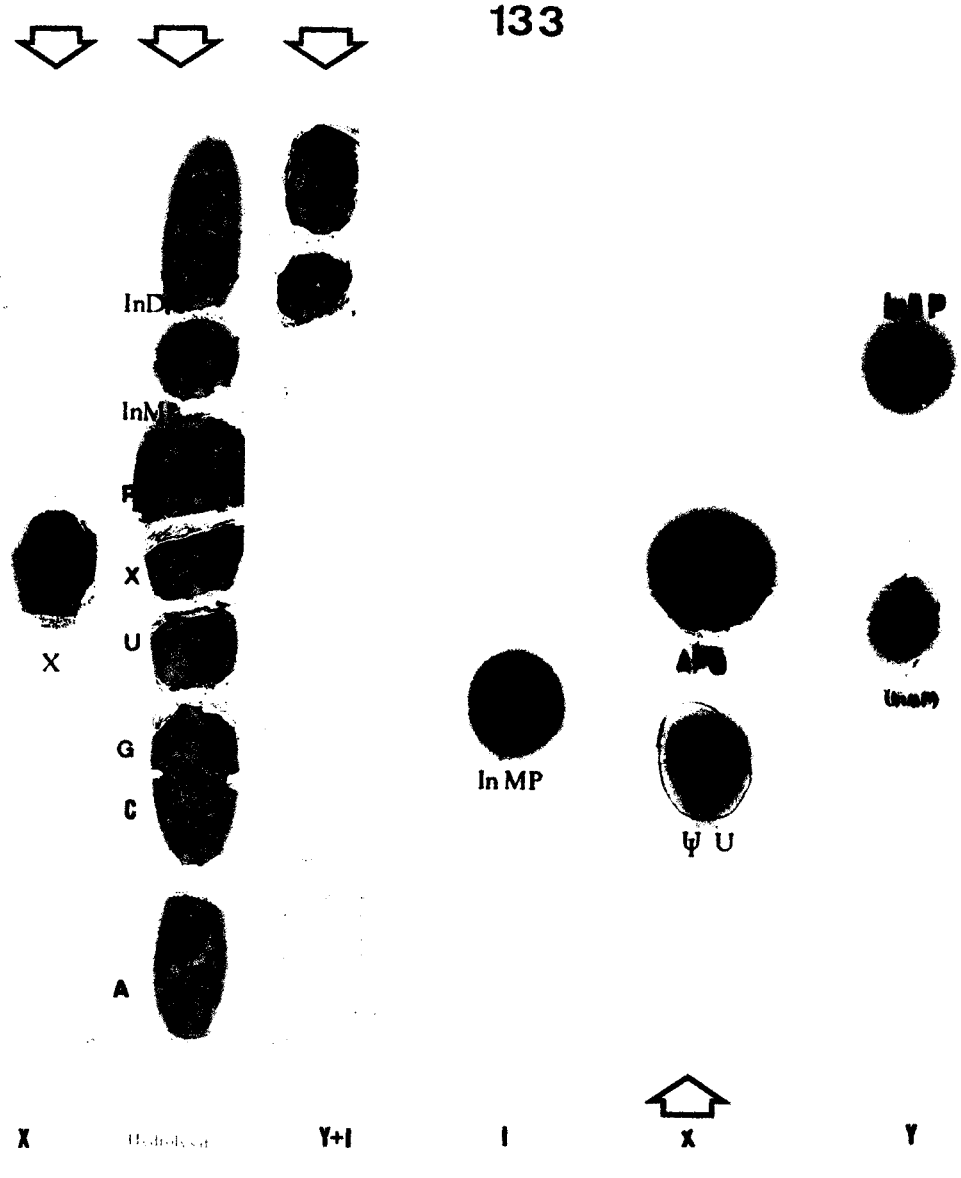
Les travaux de MONTREUIL (550), BOULANGER et MONTREUIL (551) et DERUMEZ (552) ont montré que l'extraction des ARN du foie de rat par la méthode classique de SCHMIDT et THANNHAUSER (précipitation trichloracétique, délipidation par l'éthanol puis le mélange éthanol - éther, suivie d'une hydrolyse par la soude et d'une purification sur Dowex 50 x 2) fournissait des préparations contenant de l'acide glycérophosphorique. La révélation du chromatogramme par le réactif de HANES et ISHERWOOD (voir page -114-) faisait apparaître une tâche (spot X de MONTREUIL - R_F = 0,43) se localisant entre l'acide phosphorique libre (R_F = 0,36) et l'acide uridylique (R_F = 0,50). DERUMEZ (553) a précisé que le spot X était un mélange d'acide glycérophosphorique (AGP) et d'acide pseudo-uridylique (Ψ-U).

Nous avons soumis les extraits obtenus par le procédé de SCHMIDT et THANNHAUSER modifié, à l'analyse chromatographique, dans les mêmes conditions. Les préparations, obtenues après un marquage in vivo de 24 heures par l'acide phosphorique radioactif, ont été séparées par chromatographie sur papier ; les chromatogrammes ont été révélés, de façon comparative, par l'autoradiographie et par le réactif de HANES et ISHERWOOD (554). La figure 14 montre les résultats obtenus dans ces conditions. Outre les quatre nucléotides et l'acide phosphorique libre (Pi), on caractérise également dans ces préparations le spot X de MONTREUIL et deux fractions I et Y, très apparentes en autoradiographie mais qui



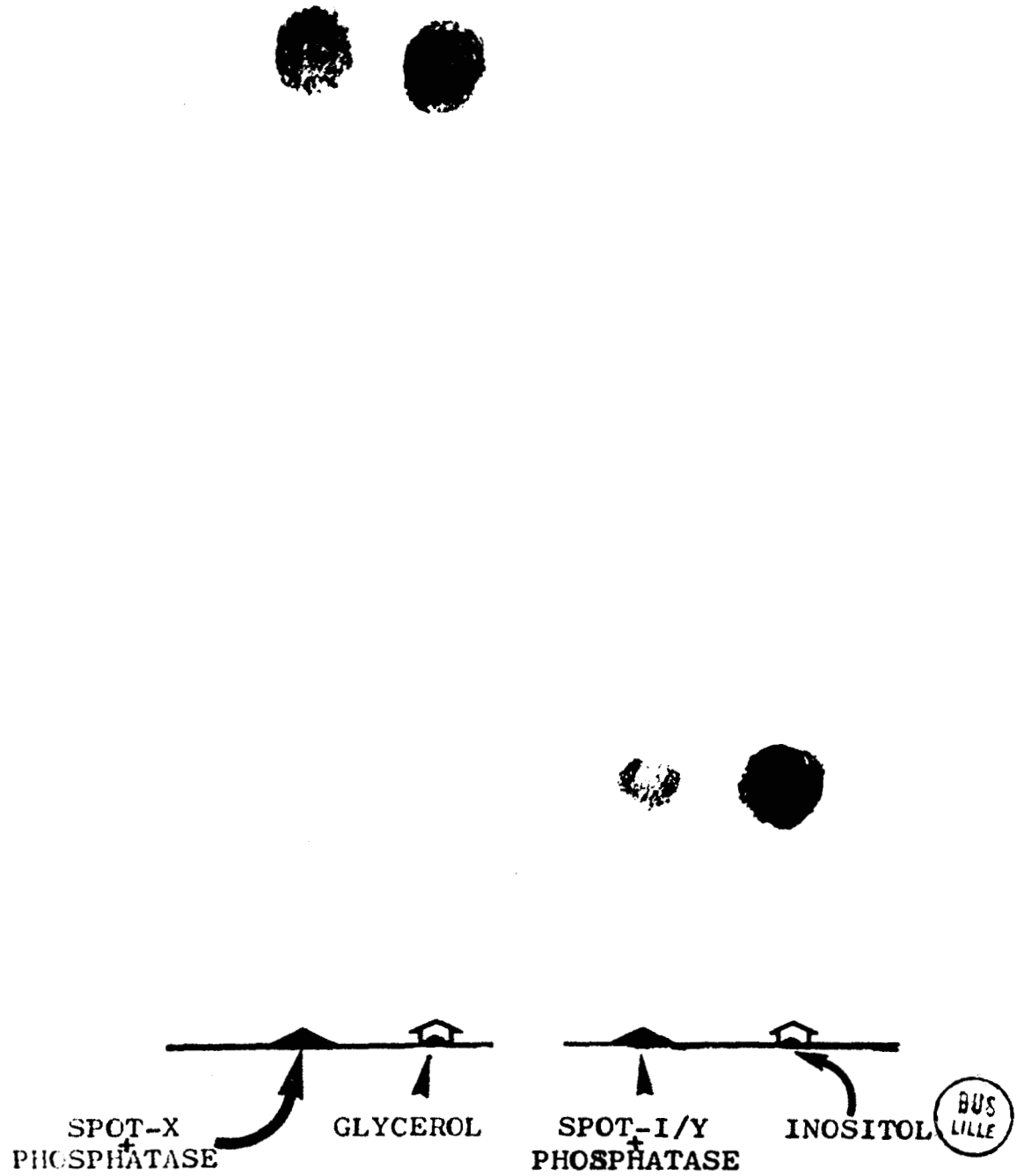
BU LILLE

Figure 14 - Séparation par chromatographie de 48 h sur papier Whatman n° 1 phénol-isopropanol-acide formique/eau (85:5:10/100) de l'hydrolysat alcalin d'un extrait de foie obtenue par la méthode SCHMIDT et THANNHAUSER modifiée.



BUS LILLE

fig. 15 : IDENTIFICATION DES SPOTS X . Y . I .



BUS LILLE

FIGURE-16: CHROMATOGRAPHIE DESCENDANTE EN SYSTEME SOLVANT DE PARTRIDGE: n-BUTANOL:ACIDE ACETIQUE:EAU (4:1:5) SUR PAPIER WHATMAN NUMERO 3 PENDANT 48 HEURES; REVELATION PAR LE NITRATE D'ARGENT AMMONIACAL.

n'apparaissent que tardivement (48 heures) avec le révélateur de HANES et ISHERWOOD. Après autoradiographie, les fractions X, I et Y, sont éluées et soumises à une électrophorèse en tampon citrate 0,02 M à pH = 3,5. Conformément aux conclusions de DERUMEZ (555), le spot X correspond bien au mélange d'acide glycérophosphorique et d'acide pseudouridylique ; l'hydrolyse par la phosphatase alcaline (en tampon Tris-acétate - 0,05 M - pH = 8,6 pendant 1 heure à 37°C) libère 1) le glycérol qui est caractérisé par une chromatographie sur papier dans le système solvant de PARTRIDGE (556) (Butanol - acide acétique - eau ; 4 - 1 - 5) (figure 16) et 2) la pseudouridine, repérable par observation en lumière ultraviolette. Les spots I et Y correspondent aux inositol mono - et diphosphates (figure 15) dont l'hydrolyse phosphatasique libère l'inositol (figure 16).

L'extraction par l'acide trichloracétique, suivie d'une délipidation par l'éther et le mélange éthanol - éther, fournit donc le même type de contamination non-nucléotidique que la méthode classique. En outre, le système solvant phénolique de BOULANGER et MONTREUIL (557), qui ne permet pas les observations en lumière ultraviolette, ne sépare pas tous les composés nucléotidiques (interférence entre AGP et U-U). La séparation par électrophorèse à pH = 3,5 permet, en outre, de caractériser d'autres contaminants phosphorylés.

b - Analyse des extraits par électrophorèse en tampon citrate 0,02 M à pH = 3,5

Les mêmes extraits radioactifs, obtenus après un marquage in vivo, sont soumis à une séparation électrophorétique à pH =3,5 sur du papier d'Arches 304. On révèle ensuite, de façon comparative, par l'autoradiographie, le réactif de HANES et ISHERWOOD, l'observation en lumière ultraviolette, le nitrate d'argent ammoniacal et la ninhydrine à0,1 p 100 dans l'acétone.

La figure 17 montre que, outre les quatre nucléotides et l'acide pseudouridylique (qui possède la même mobilité que l'acide uridylique) les extraits contiennent :

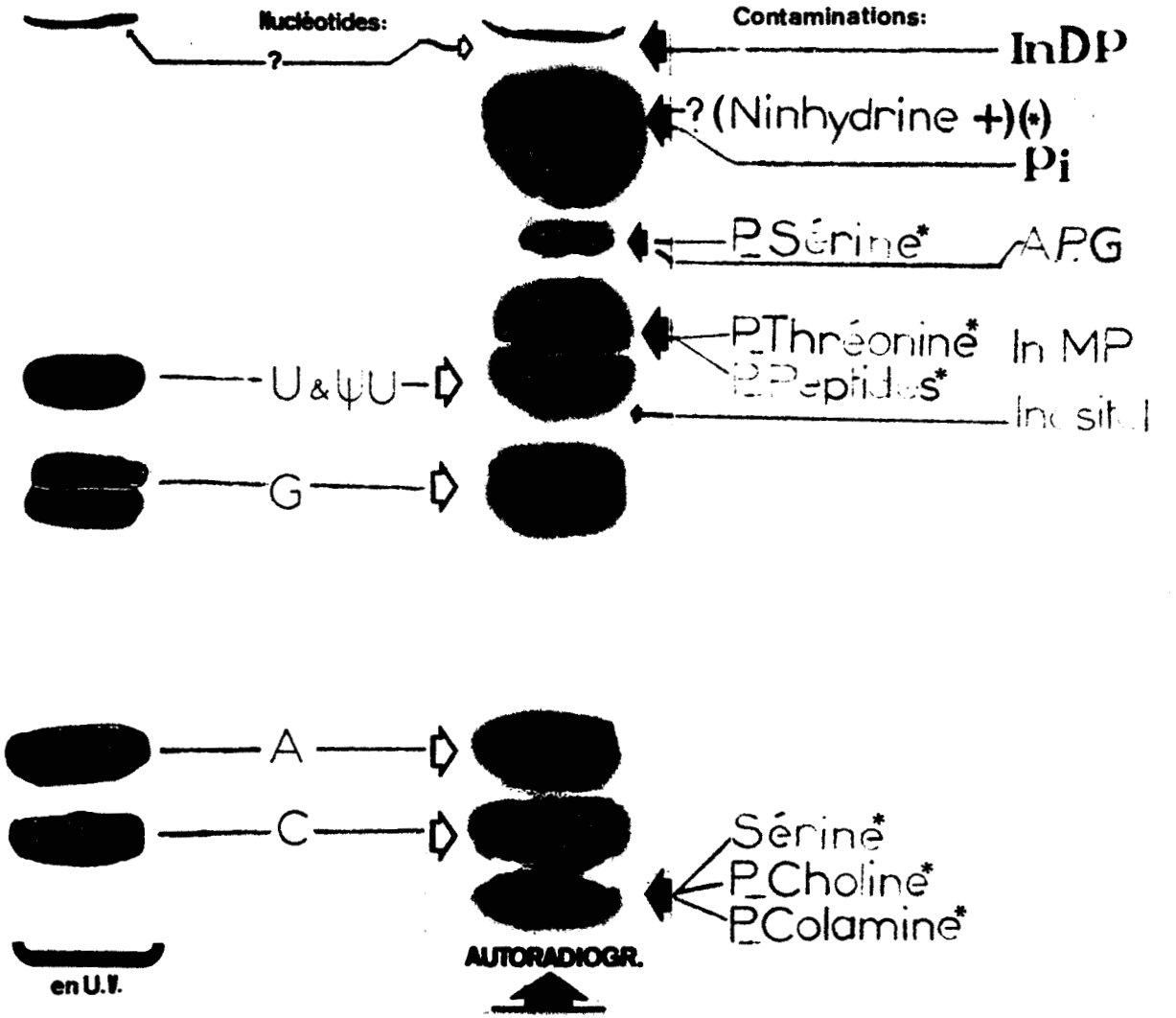


fig:17— Séparation par électrophorèse en tampon citrate 0,02 M à pH 3,5 de l'hydrolysat alcalin d'un extrait de foie obtenu par la méthode de Schmidt & Thannhauser modifiée.

BUS SNB

- de l'inositol libre et les inositol mono et diphosphates.

- de l'acide glycérophosphorique et des dérivés d'origine phosphatidique (phosphocholine, phosphocolamine, phosphosérine).

- des dérivés protidiques (sérine, phosphothréonine et phosphopeptides).

- une fraction d'oligonucléotides qui migre avec l'acide phosphorique et dont nous reparlerons plus loin.

Ces différents composés ont été caractérisés par des analyses chromatographiques complémentaires dans les systèmes solvants classiques des acides aminés et des peptides (chromatographie bidimensionnelle en (1) butanol acide acétique - eau et (2) phénol - ammoniaque - eau, dans les conditions décrites par BISERTE et al. (558).

La présence de ces différents composés non nucléotidiques a été caractérisée par de nombreux auteurs et notamment par HUTCHISON et al. (559) et LEDIG et al. (560).

Nos résultats confirment ceux de HUTCHISON et al. (561) en ce qui concerne la position des inositol mono et diphosphates. Nous nous trouvons cependant en désaccord avec ces auteurs quant à la localisation de la phosphosérine. En outre, la fraction peptidique signalée par ces derniers en avant de l'acide cytidylique correspond au mélange de la sérine, de la phosphocholine et de la phosphocolamine.

La révélation par la ninhydrine à 1 p 100 fait apparaître des trainées, dont certaines interférent avec les nucléotides. Cette contamination protéique introduit une cause d'erreur dans les dosages spectrophotométriques ; nous avons, en particulier, vérifié que les nucléotides présentent un déplacement de leur maximum d'absorption (voir tableau R à la page : 154). Enfin la fraction, absorbant la lumière ultraviolette, qui migre avec l'acide phosphorique libre pourrait correspondre à des oligonucléotides alcali - résistants, présentant les caractéristiques structurales que nous avons présentées précédemment (voir pages: 75 à 79).

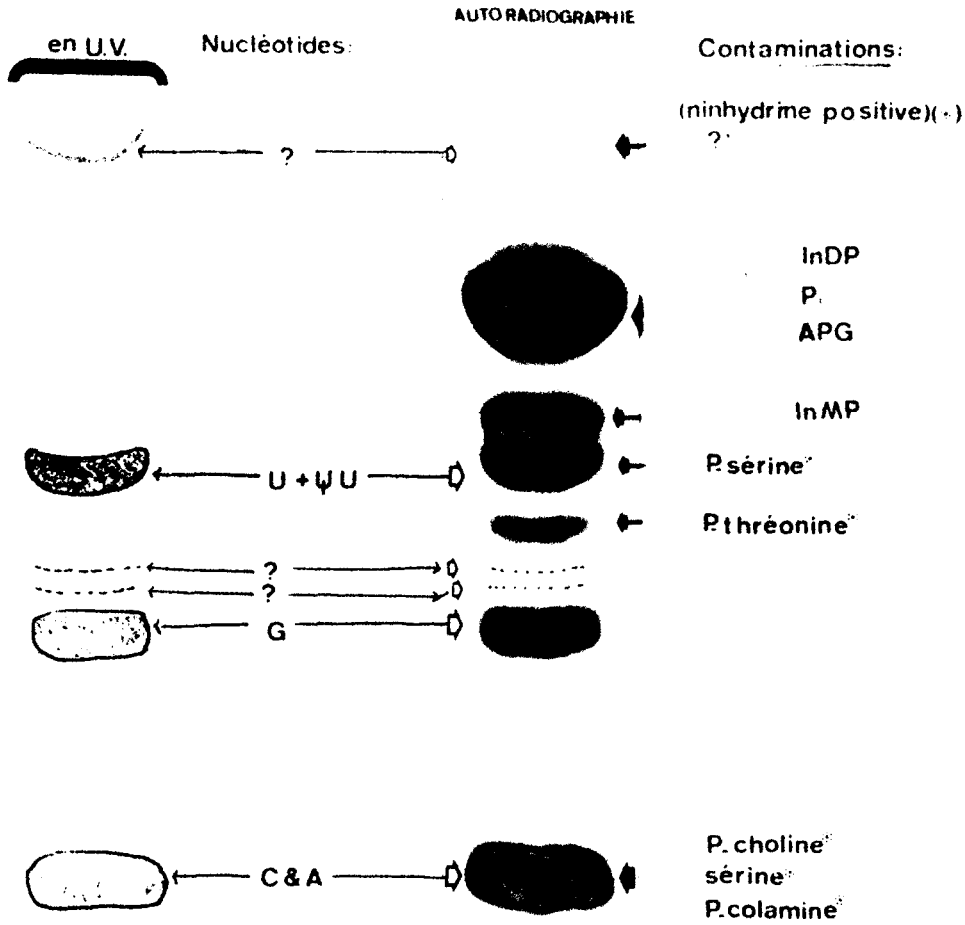


Figure 18 :Séparation par électrophorèse.

en tampon formiate 0.06 M à pH 2.7.

de l'hydrolysat alcalin d'un extrait de foie suivant la méthode de Schmidt & Thannhauser modifiée.

BUS LILLE

Il était donc important de choisir des conditions opératoires qui permettent de séparer tous les constituants que nous venons de caractériser.

c - Analyse électrochromatographique des hydrolysats totaux

Pour obtenir une bonne résolution des nucléotides libres d'une part, (et notamment des nucléotides mineurs), et de fractions alcali - résistantes d'autre part, nous avons associé l'électrophorèse à pH = 2,7 et la chromatographie selon MARKHAM et SMITH (562).

SMITH et DUNN (563) avaient obtenu, en 1959, une séparation intéressante de mono - et dinucléotides par l'électrophorèse sur papier, en tampon phosphate 0,05 M à pH = 2,1 et en tampon formiate 0,05 M à pH = 3,5. Après différents essais de concentration et de pH, nous avons retenu l'électrophorèse en tampon formiate 0,06 M à pH = 2,7. La figure 18 montre la séparation obtenue à partir de l'extrait tissulaire. L'association de l'électrophorèse, dans ces conditions, avec la chromatographie dans le système solvant de MARKHAM et SMITH (564) a fait apparaitre l'extrême hétérogénéité des extraits (figure 19). Les révélations comparées par absorption en lumière ultraviolette, par autoradiographie et par la ninhydrine font en effet apparaître 28 à 30 spots. Outre, les constituants déjà caractérisés par l'analyse monodimensionnelle, l'électrochromatographie permet de localiser 6 à 8 contaminants de nature protéique, trois fractions d'oligonucléotides et 6 à 8 fractions phosphorylé absorbant la lumière ultraviolette, que nous n'avons pu identifier ; ces dernières sont présentes à l'état de traces et interfèrent après la séparation électrophorétique avec les acides guanylique et uridylique.

Cette première série de travaux démontre que les méthodes indirectes d'extraction des ARN par les acides perchlorique et trichloracétique ne fournissent pas quantitativement des préparations pures, applicables aux études de structure.

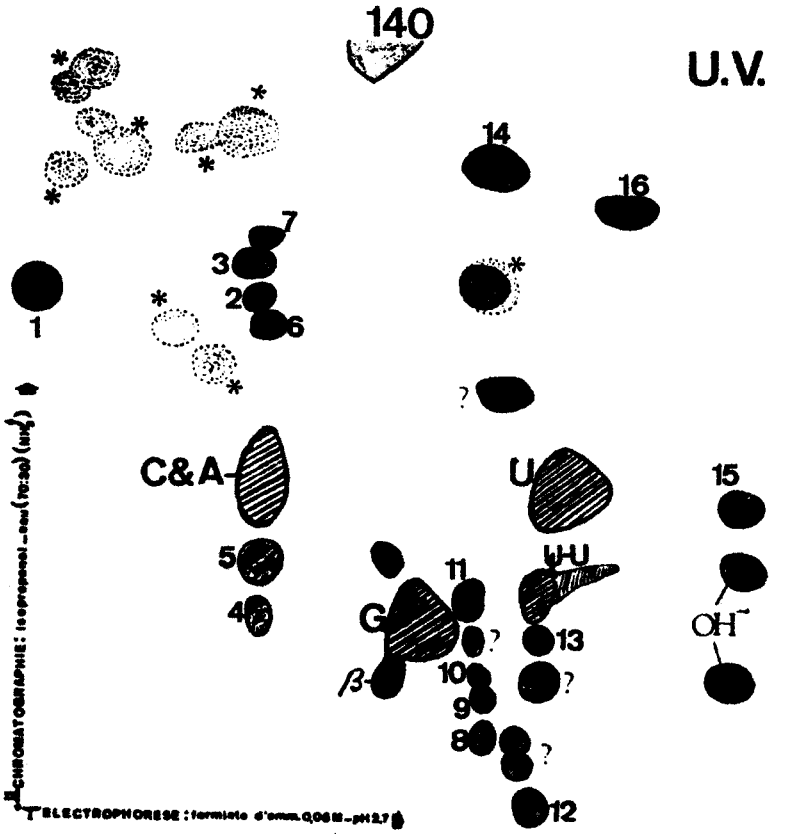
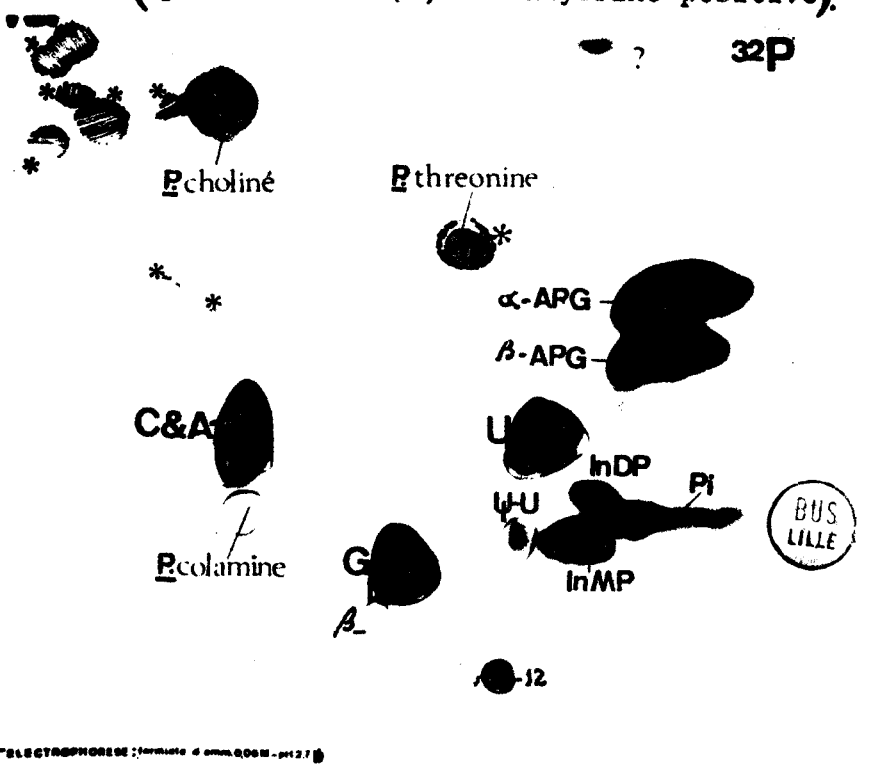


Figure 19: Hydrolysat total d'un extrait de foie de rat normal, obtenu par la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER modifiée.
(spots hachurés(*) = ninhydrine positive).



Les techniques à l'acide perchlorique fournissent des rendements trop faibles. Plusieurs auteurs ont démontré que l'hydrolyse par la potasse suivie d'une précipitation par l'acide perchlorique provoquait une perte de 3 à 5 p 100 des nucléotides qui sont adsorbés sur le précipité de perchlorate de potassium (voir page-79-). Nous avons nous mêmes vérifié que l'hydrolyse sodique du précipité perchlorique, délipidé par l'éther et le mélange éthanol éther, suivi d'une purification sur des colonnes de Dowex 50, provoque une dégradation profonde des nucléotides puriques par suite de la présence d'un résidu d'acide perchlorique persistant après la purification sur résine. Par contre, le lavage du précipité perchlorique par l'éthanol contenant 2 p 100 d'acétate de sodium, dans les conditions proposées par STEELE et al. (565) permet d'éviter cette dégradation profonde mais laisse subsister une perte importante au cours de l'extraction, la concentration optimale d'acide perchlorique étant de 0,75 N.

Parmi les méthodes à l'acide trichloracétique, les conditions classiques de précipitation par l'acide trichloracétique à 10 p 100, suivie d'une délipidation par l'éthanol et l'éthanol - éther, font apparaître une perte très importante au cours des lavages par l'éthanol. Ces pertes sont dues à la fois à une autolyse au cours de la délipidation, provoquée par les traces d'acide trichloracétique restant adsorbées sur le précipité et à l'entrainement d'une fraction d'ARN, soluble dans la phase organique. En effet, l'extraction par la méthode à la guanidine (voir à la page -149-) des phases éther et éthanol-éther rassemblées permet de caractériser, après hydrolyse sodique et chromatographie (figure 19 bis), une fraction d'ARN dont la radioactivité spécifique est double de celle des ARN obtenus, de façon classique, dans la phase aqueuse : 970.000 c/mn/mg de P pour les ARN de la phase organique, pour 500.000 c/mn/mg de P pour les ARN de la phase aqueuse (après 2 heures d'incorporation in vivo). Ces résultats sont en accord avec l'hypothèse, formulée par plusieurs auteurs (voir à la page 57,137) selon laquelle il existerait des complexes ARN - lipides, possédant une activité métabolique très élevée. L'introduction de 10 p 100 d'acétate de potassium dans l'éthanol permet de contrecarrer partiellement cette autolyse, mais n'évite pas l'entrainement de la fraction nucléique soluble en phase

Chromatographie de 72 heures dans le système solvant:
Isopropanol - eau (70:30),(NH_3).

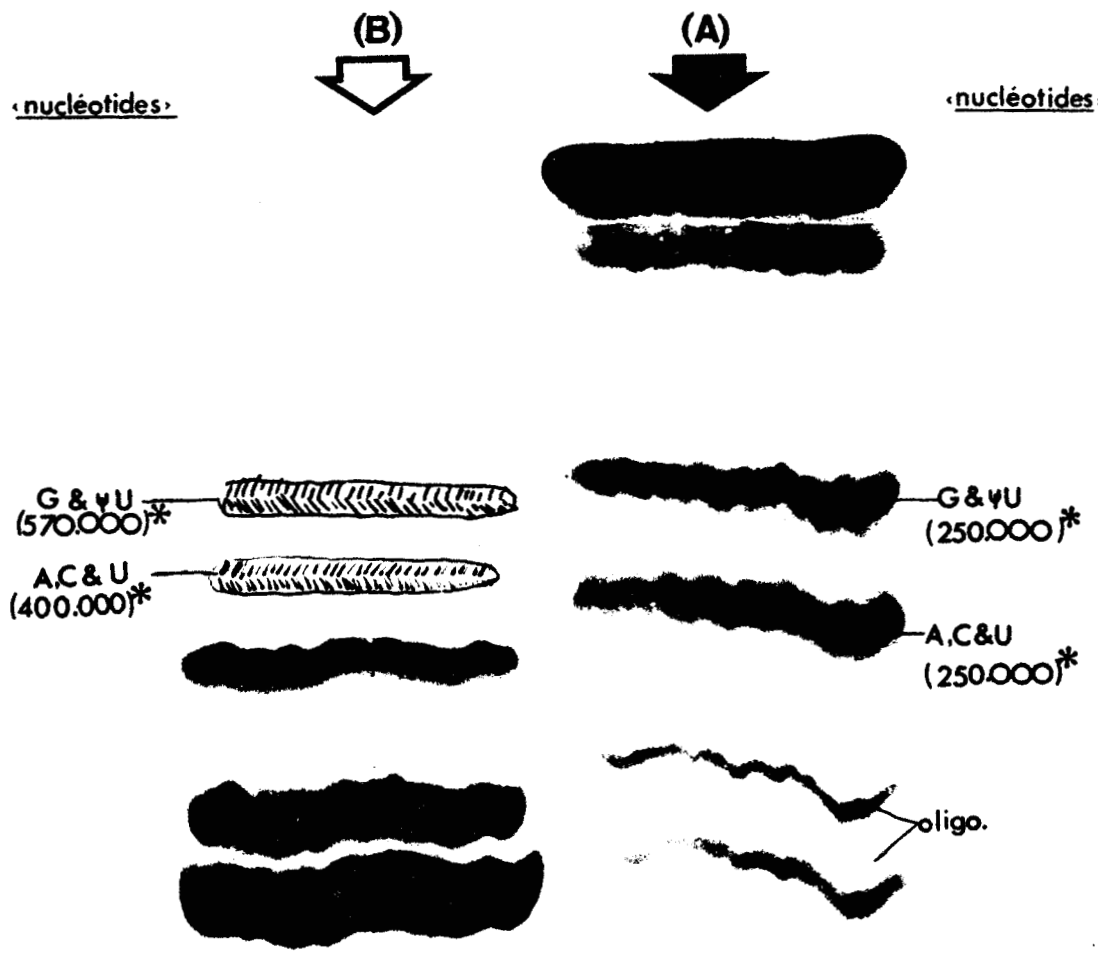


FIGURE 19-Bis: Chromatographie des hydrolysats alcalins d'un extrait de foie de rat normal, obtenu par la méthode de **SCHMIDT** et THANNHAUSER modifiée.

A-surnageant pH=4,2 ;
B-fraction organo-soluble (extrait par la guanidine);
*-radioactivités spécifiques (C.P.M.).

organique. Le rendement optimum en ARN est obtenu en effectuant la délipidation par l'éther et le mélange éthanol - éther. Cependant, la pureté des préparations n'est pas améliorée et l'analyse électrochromatographique permet de caractériser plus de 20 fractions qui viennent souiller les préparations. Ces résultats nous ont conduits à rechercher un procédé direct d'extraction qui permette d'améliorer à la fois le rendement, en supprimant les pertes dues à la délipidation et la pureté des préparations, en éliminant les composés non nucléotidiques dont la présence peut être considérée comme une caractéristique des méthodes d'extraction par l'acide trichloracétique.

II - RECHERCHE D'UNE METHODE DIRECTE D'EXTRACTION DES ARN

Parmi les méthodes directes, nous avons, dans une première série de travaux, repris les techniques d'extraction phénolique de façon à rechercher des conditions d'extraction quantitative des ARN du foie total. Devant l'insuccès de nos tentatives, nous nous sommes tournés vers la méthode d'extraction par le chlorhydrate de guanidine décrite par COX et al. (566). Ces travaux nous ont conduits à adapter cette technique au tissu total et à décrire une méthode générale d'extraction des ARN, applicable aux tissus et aux fractions cytoplasmiques ; cette technique fournit quantitativement des préparations pures d'ARN.

A - TRAVAUX CONCERNANT LA PREPARATION DES ARN TOTAUX DU FOIE DE RAT PAR LES METHODES D'EXTRACTION PHENOLIQUE.

Nous avons abordé cette série de recherches, en tenant compte des travaux de LITTAUER et EISENBERG (567) (voir à la page -45-) et des résultats de SIBATANI et al. (568). Il convenait en effet, dans notre orientation de travail,

1 - de déterminer le rendement de l'extraction par le phénol des ARN totaux du foie de rat

2 - de vérifier, à la lumière des travaux de SIBATANI (569), l'existence d'un partage des ARN entre les phases aqueuses et phénoliques.

1 - Etude du rendement et de la pureté des préparations d'ARN totaux du foie de rat

L'étude critique effectuée par MONTREUIL et SEGARD (570) a démontré que la méthode originale de KIRBY (571) fournissait, par rapport aux méthodes de GIERER et SCHRAMM (572), de HAREL et al. (573) et de HALL et DOTY (574), l'ARN le plus pur, avec un rendement de l'ordre de 30 à 35 mg de Phosphore ARN pour 100 g de tissu frais. L'ε (P) des préparations variait de 7.500 à 8.000 et le rapport A_{260}/A_{280} était égal à 1,8. En collaboration avec G. SAGNIEZ, nous avons modifié la technique d'extraction, en tenant compte des conclusions de LITTAUER et EISENBERG (575).

Le tissu est homogénéisé, à + 4°C, dans du tampon Tris-acétate, 0,02 M - pH = 7,3, 10^{-4} M en Cl_2 Mg (10 ml par g de tissu frais) ; on ajoute ensuite un égal volume d'une solution aqueuse*, à 90 p 100 de phénol redistillé. On agite pendant 60 mn à + 4°C. La solution est centrifugée à 1.800 t/mn pendant 1 heure à 4°C. La phase aqueuse est recueillie à la pipette et conservée à - 20°C. La phase inférieure phénolique et l'interphase sont à nouveau extraites, dans les mêmes conditions, deux fois par 1/10 du volume de tampon tris - acétate. Les phases aqueuses rassemblées sont recentrifugées 30 mn à 20.000 t/mn. La phase aqueuse limpide est extraite 5 fois par de l'éther sans peroxyde, puis précipitée par 2 vol. d'éthanol, en présence de 2 p 100 d'acétate de potassium. Le précipité, recueilli par centrifugation, est redissous dans le tampon Tris - acétate. On ajoute un volume de PO_4HK_2 - 2,5 M et on ajuste à pH = 7,8 par addition d'acide phosphorique à 33,3 p 100. On agite 15 mn avec 1 volume de 2 - méthoxyethanol et on centrifuge 5 mn à + 4°C. La phase aqueuse supérieure est recueillie et la phase inférieure est lavée deux fois par le même tampon :

* le phénol est redistillé au préalable et conservé à + 4°C.

Tris - acétate 0,02 M - pH = 7,3/PO_4HK_2 - 2,5 M (1-1) ajusté à pH = 7,8 par PO_4H_3. Les phases aqueuses rassemblées sont à nouveau centrifugées 30 mn à 20.000 t/mn, puis dialysées 48 heures à + 4°C contre une solution 10^{-4}M de Versène. La fraction adialysable est enfin reprécipitée trois fois par l'éthanol en présence de 2 p 100 d'acétate de sodium.

L'étude du rendement et de la pureté des préparations a fourni les résultats suivants :

- Rendement des préparations

Nous avons déterminé les rendements en phosphore total et en ARN - P, dans les conditions décrites précédemment à la page- 103 . Les résultats sont les suivants :

Phosphore total = 40 à 42 mg/100 g de tissu frais
ARN - P = 53 à 56 mg/100 g de tissu frais

Contrairement aux méthodes de préparation par l'acide trichloracétique (voir à la page- 123), les valeurs du phosphore total sont plus faibles que celles de l'ARN-P. Les extraits ne contiennent plus, en effet, de contaminations phosphorylées non nucléotidiques. En outre, le pourcentage de phosphore dans les ARN macromoléculaires varie de 6,7 à 7,5 p 100 (6,75 p 100 selon KIRBY (576) pour les foies de rat WISTAR) ; ce taux justifie les valeurs excédentaires de l'ARN-P déterminé par absorption à 260 mμ. Cependant, les rendements en ARN sont très inférieurs à ceux fournis par la méthode à l'acide trichloracétique et ne représentent que 70 p 100 du rendement global obtenu par cette dernière méthode. Ce fait s'explique à la lumière des travaux de KIDSON et KIRBY (577) et de SIBATANI et al. (578) concernant le phénomène de partage sélectif des ARN entre la phase aqueuse, la phase phénolique et l'interphase. Nous avons néanmoins étudié la pureté des préparations.

- Pureté des extraits phénoliques

Les préparations possèdent des valeurs d'ε (P) de 10.500 et le rapport A_{260}/A_{280} est de 2,3 à 2,5 selon les préparations. Ces résultats sont le signe d'une pureté élevée des préparations.

La séparation électrophorétique à pH = 3,5 d'un hydrolysat alcalin montre l'absence de composés phosphorylés non nucléotidiques, mais la révélation par la ninhydrine à 1 p 100 fait apparaître une contamination protéique persistante. L'hydrolyse totale par l'acide chlorhydrique 5,6 N suivie d'une chromatographie bidimensionnelle dans les systèmes solvants : (1) butanol - acide acétique - eau et (2) phénol -ammoniaque - eau (BISERTE et al. (579)) permet de caractériser une quinzaine d'acides aminés. Enfin l'hydrolyse formique totale, dans les conditions de WYATT (580), suivie d'une chromatographie dans le système solvant : Isopropanol - acide chlorhydrique - eau (170-44-36) révèle la présence de thymine, signe d'une contamination par les ADN. Les préparations contiennent de 1,5 à 3 p 100 d'ADN, dosé par la méthode à la diphénylamine de DISCHE (581).

Les préparations, conformément aux conclusions de HABERMAN (582) et de MONTREUIL et SEGARD (583) ne sont donc pas rigoureusement pures. Il subsiste des traces d'ADN et de protéines, qui risquaient de provoquer à nouveau des interférences dans les études électrochromatographiques. Cependant l'existence d'un partage des ARN entre les deux phases représentait pour nous un problème majeur. L'expérimentation que nous allons décrire maintenant confirme l'existence de ce partage qui avait été mis en évidence par SIBATANI et al. (584) et démontre, en outre, le caractère sélectif de cette répartition.

2 - Etude du partage des ARN entre la phase aqueuse et la phase phénolique

Les phases phénoliques, rassemblées au cours de l'extraction que nous venons de décrire, sont traitées selon un protocole expérimental inspiré de celui de YAMANA et SIBATANI (585). On reprend la phase phénolique et l'interphase par 4 volumes d'éthanol à froid, puis le précipité est traité par le mélange éthanol - éther (4-1) et enfin par l'éther ; on lave à nouveau par l'alcool absolu et le résidu est repris à froid par 2 volumes d'acide trichloracétique à 10 p 100. On traite ensuite le précipité trichloracétique par l'éther à froid puis à reflux par le mélange éthanol - éther (1-1). Le résidu est ensuite hydrolysé par la soude 0,5 N à 37°C,

pendant 18 heures, et l'hydrolysat est purifié sur des colonnes de Dowex 50 x 2, dans les conditions qui ont été décrites précédemment (voir page 83). L'ARN P de la préparation fournit, selon les cas, une valeur de 12 à 14 mg pour 100 g de tissu frais. Les études comparatives de répartition des ARN entre les deux phases démontrent que 20 à 22 p 100 des ARN totaux du tissu sont présents dans la phase phénolique.

L'étude comparée de la composition nucléotidique des ARN de la phase aqueuse et de la phase phénolique montre qu'il s'agit de deux classes chimiques distinctes, dont les compositions centésimales sont différentes de celle des ARN totaux (voir tableau T, page -163). Les ARN de la phase aqueuse présentent un taux élevé d'acide guanylique (35 p 100) et un taux d'acide uridylique (17,7 p 100) inférieur à celui des ARN totaux. Ces résultats se rapprochent de ceux de YAMANA et SIBATANI (586).

En outre, nous avons comparé les radioactivités spécifiques des ARN de la phase aqueuse et des ARN cytoplasmiques, d'une part, des ARN de la phase phénolique et des ARN nucléaires, d'autre part. Les résultats sont rassemblés dans le tableau P. On voit que les radioactivités spécifiques des nucléotides des ARN de la phase aqueuse et cytoplasmique sont identiques et que celles des nucléotides des ARN de la phase phénolique et nucléaire sont, toutes deux, beaucoup plus élevées que les premières. Ces résultats obtenus après 1 heure d'incorporation in vivo, sont donc un argument en faveur d'une extraction sélective des ARN nucléaires dans la phase phénolique et de la présence des ARN à marquage rapide dans l'interphase, conformément aux travaux de KIDSON et KIRBY (587).

L'extraction phénolique des ARN totaux du tissu s'accompagne d'un fractionnement chimique de ces composés, par suite de leur partage entre les différentes phases. La dispersion des résultats obtenus au cours de plusieurs extractions comparatives montre, en outre, que ce fractionnement n'est pas reproductible et correspond, en fait, à un simple partage entre la phase aqueuse et le phénol.

TABLEAU - P

RADIOACTIVITES SPECIFIQUES * DES NUCLEOTIDES CONSTITUANT LES ARN DU CYTOPLASME ET DE LA PHASE AQUEUSE DES EXTRAITS PHENOLIQUES, D'UNE PART, ET LES ARN DU NOYAU ET DE LA PHASE PHENOLIQUE D'AUTRE PART.

Nucléotides	Phase aqueuse	ARN cytoplasmique	Phase phénolique	ARN nucléaires
C	5.500	6.000	90.000	210.000
A	8.500	8.000	150.000	370.000
G	6.500	6.000	100.000	250.000
U	-	-	170.000	300.000
(globale)	20.500	20.000	510.000	1130.000

BBS LILLE

* exprimées en c/mn/mg. P-nucléotidique / mC de ^{32}P.

L'application de cette technique devait être exclue, dans notre orientation de travail. Nous nous sommes donc tournés vers les techniques d'extraction par le chlorhydrate de guanidine.

B - MISE AU POINT D'UNE METHODE GENERALE D'EXTRACTION DES ARN TISSULAIRES, PAR LE CHLORHYDRATE DE GUANIDINE

1 - Mode opératoire

En s'inspirant du protocole décrit par COX et ARNSTEIN (588), l'extraction est conduite de la façon suivante :

a - Extraction de l'ARN

5 g de tissu sont broyés dans 3 ml du mélange : Tris - 0,05 M - KCl - 0,025 M, $MgCl_2$ 0,005 M ajusté à pH = 6,8 avec de l'acide acétique. Le broyat est recueilli dans un bécher refroidi dans un bain de glace - acétone. On ajoute ensuite 5 volumes d'une solution de chlorhydrate de guanidine 5 M, contenant 0,033 M d'EDTA (disodique) et ajustée à pH = 4,5 par de l'acide chlorhydrique. On homogénéise et on laisse en contact à 0°C pendant 30 mn. Dans le cas où l'on opère sur des fractions cytoplasmiques contenant une quantité très faible d'ARN (noyaux, ribosomes nucléaires), on ajoute, après l'homogénéisation, 0,5 volume d'éthanol absolu que l'on mélange par une simple agitation manuelle avec une tige de verre ; on abandonne, dans ce cas, 60 mn à - 5°C. Le précipité formé est ensuite recueilli par une centrifugation à 0°C, de 60 mn à 10.000 g (dans le cas des substrats pauvres en ARN, on centrifuge à 40.000 g pendant 60 mn). Le surnageant est décanté et le culot de centrifugation est réhomogénéisé dans une solution de chlorhydrate de guanidine 6 M, ajusté à pH = 7,2, à raison de 1 ml pour 1 g du tissu de départ. Après un repos de 10 mn, on centrifuge 30 mn à 9.000 - 9.500 g. Puis on lave à nouveau le précipité, dans les

mêmes conditions, avec le tampon : EDTA (disodique) 0,2 M, Tris - 0,01 M, ajusté à pH = 7 avec de la soude ; et enfin avec de l'éthanol absolu amené à - 20°C.

L'ARN est ensuite extrait de ce complexe ARN - guanidine insoluble par 5 traitements avec le mélange Tris - 0,01 M, EDTA - 0,002 M ajusté à pH = 7,2, à raison de 1,5 à 2 ml par gramme du tissu de départ. Après chaque extraction, (la première de 60 mn et les suivantes de 30 mn), on centrifuge pendant 20 mn à + 2°C, à 9.000 g. On recueille les 5 surnageants qui sont conservés à - 20°C, avant d'être rassemblé. La solution finale renferme les ARN libérés.

b - Purification des extraits

Cette solution finale est additionnée de 2 p 100 d'acétate de potassium (à partir d'une solution d'acétate de potassium à 100 p 100 p/v). La précipitation est effectuée alors par addition de 2 volumes d'éthanol absolu à - 20° C et le mélange est abandonné 15 heures à cette température. Le précipité blanc floconneux est lavé deux fois par l'éthanol à 75 p 100 contenant 2 p 100 d'acétate de potassium et une fois par l'éthanol à 75 p 100 (*). Toutes les centrifugations sont effectuées à - 20° C, pendant 30 mn à 9.000 g.

c - Hydrolyse alcaline des préparations

Le précipité ainsi obtenu est constitué d'ARN macromoléculaire, libre de protéines. L'hydrolyse alcaline des préparations, nécessaire pour les études de rendement et de pureté, doit être conduite, dans ce cas, de façon particulière.

(*) La précipitation éthanolique des ARN sous forme libre, telle qu'elle est effectuée ici, ne provoque pas de solubilisation partielle des ARN dans l'éthanol, comme c'est le cas à partir des ribonucléoprotéines obtenues par la précipitation trichloracétique. La solubilisation d'une fraction d'ARN dans l'éthanol, dont nous avons parlé à la page : 141, peut être due à la fois à l'entrainement de complexes ARN-lipide et à une affinité particulière pour l'éthanol des ribonucléoprotéines.

L'étude critique des conditions d'hydrolyse alcaline, effectuée par MONTREUIL et al. (589) et par DERUMEZ (590), a en effet démontré que l'hydrolyse d'un ARN exempt de protéines par la soude 0,5 N à 37°C, pendant 18 heures, provoquait une désamination importante de l'acide cytidylique (voir à la page -79-). Les auteurs conseillent, dans ce cas, une hydrolyse par la soude 0,3 N - à 20°C pendant 24 heures. Pour préserver la valeur comparative de nos résultats, nous avons maintenu l'hydrolyse par la soude 0,5 N - à 37°C pendant 18 heures, en ajoutant 1 g de sérum albumine bovine cristallisée pour 100 g du tissu frais du départ ; ces conditions ne provoquent pas de désamination de l'acide cytidylique (DERUMEZ (591)).

Dans le cas où le procédé d'extraction est appliqué pour déterminer la composition nucléotidique des ARN, l'hydrolyse alcaline peut être effectuée directement sur la solution finale d'extraction obtenue dans les conditions du paragraphe a. Il n'est pas nécessaire, dans ce cas, d'ajouter de la sérum albumine, car la contamination protéique est suffisante, à ce stade, pour éviter les désaminations. On ajuste, dans ce cas, la concentration finale en soude à 0,5 N, à partir d'une solution de soude 10 N.

L'hydrolysat alcalin est ensuite précipité par l'acide formique et purifié sur des colonnes de Dowex 50 x 2, dans les conditions décrites précédemment (voir page : 83).

d - Etude du rendement et de la pureté des préparations

Les techniques d'étude sont identiques à celles qui ont été détaillées à la page 103.

2 - Etude du rendement en ARN des extraits obtenus par la méthode à la guanidine

Le procédé de SCHMIDT et THANNHAUSER modifié, tel que nous l'avons précédemment décrit, fournissait un rendement optimum Σ (P) variant de 45 à 50 mg de phosphore pour 100 g de tissu. Il convenait donc

TABLEAU - Q

COMPARAISON DU RENDEMENT EN ARN POUR LE PROCEDE A LA GUANIDINE

ET LA METHODE DE SCHMIDT ET THANNHAUSER MODIFIEE

Procédé de dosage *	Méthode de Schmidt-Thannhauser modifiée	Méthode à la Guanidine
Phosphore total	80,1	75,7
ARN - P	76,7	74,5
ε(P)	47,8	68,4

BIUS LILLE

* valeurs exprimées en mg de phosphore pour 100 g de tissu frais (moyenne de 4 expériences).

de comparer, sur un même lot de tissu, les rendements fournis par cette technique avec ceux obtenus par la méthode à la guanidine.

Le broyat obtenu à partir d'un lot de foies de rat est congelé instantanément à - 70°C dans la carboglace. La masse solide est découpée et pulvérisée au mortier ; 10 lots correspondant chacun à 10 g de tissu sont préparés à partir de ce broyat. Cinq lots sont alors traités par la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER modifié et les cinq autres sont traités par la méthode à la guanidine. Dans tous les cas, les rendements sont calculés en déterminant le Phosphore total, l'ARN-P et le Σ (P). Les moyennes des résultats sont rassemblées dans le tableau Q. Comme nous pouvons le constater, les valeurs du phosphore total et de l'ARN-P, dans le cas des préparations par la guanidine, sont inférieures à celles des préparations obtenues par la précipitation trichloracétique. Par contre, le Σ (P) de l'extrait à la guanidine est nettement supérieur à celui de l'extrait trichloracétique (68 mg contre 48 mg soit 20 p 100). En outre, le Σ (P) est, dans ce cas, très voisin des valeurs d'ARN-P et du phosphore total. Ces résultats sont en faveur d'une pureté supérieure de ces extraits, notamment en ce qui concerne les composés phosphorylés non-nucléotidiques (augmentation du phosphore total) et les dérivés non-nucléotidiques absorbant la lumière ultraviolette (majoration de l'ARN-P). Cette interprétation s'est trouvée confirmée par les méthodes d'étude directe de la pureté.

3 - Etude de la pureté des préparations obtenues par la méthode à la guanidine

Nous avons successivement étudié les propriétés optiques des nucléotides, séparés à partir de l'hydrolysat alcalin, et la composition qualitative des hydrolysats totaux par électrochromatographie.

a - Propriétés optiques des nucléotides constituant les ARN

Les hydrolysats alcalins des ARN extraits par la méthode à la guanidine sont séparés, après la purification sur Dowex 50 x 2, par

TABLEAU - R

CARACTERISTIQUES SPECTROPHOTOPHOTOMETRIQUES DES NUCLEOTIDES OBTENUS

A PARTIR DES ARN EXTRAITS PAR LES DIFFERENTES METHODES ETUDIEES

Nucléotides	Absorbeance en mμ	METHODE D'EXTRACTION						Constantes des Nucléotides purs
		Acide perchlorique		Acide trichloracétique			Guanidine	
		Ether	Ethanol + acétate	Ethanol	Ethanol + acétate	Ether		
C (pH2)	λmin	240,5	241	241,5	241	240,5	240	240
	λmax	278	278	278	278	278	278	278
	250/260	0,48	0,48	0,45	0,48	0,47	0,47	0,465
	280/260	1,76	1,72	1,92	1,70	1,90	1,92	1,90
	290/260	1,25	1,21	1,23	1,21	1,29	1,31	1,325
A (pH2)	λmin	–	231	231,5	231	231	231	231
	λmax	–	256,5	256,5	256,5	256,5	256,5	256,5
	250/260	–	0,88	0,82	0,88	0,86	0,86	0,85
	280/260	–	0,24	0,25	0,21	0,21	0,22	0,225
	290/260	–	0,035	0,04	0,035	0,034	0,036	0,038
G (pH1)	λmin	229,5	229,5	229,5	229,5	229,5	229,5	229,5
	λmax	256	256	256	256	256	256	256
	250/260	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,93	0,915
	280/260	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,685
	290/260	0,42	0,44	0,40	0,43	0,44	0,45	0,485
U (+ψU) (pH2)	λmin	230	230,5	231	230,5	230	229	229
	λmax	260,5	261	261,5	261	260,5	260	260
	250/260	0,78	0,79	0,76	0,79	0,79	0,78	0,78
	280/260	0,31	0,31	0,32	0,31	0,31	0,29	0,30
	290/260	0,04	0,05	0,05	0,05	0,04	0,03	0,03

électrophorèse, en tampon citrate 0,02 M à pH = 3,5. Les quatre nucléotides parfaitement séparés (figure 20 b) sont respectivement élués par des solutions d'HCl 0,01N pour C, A et U, et d'HCl 0,1 N pour G. Les spectres d'absorption en lumière ultraviolette sont tracés et on détermine d'une part les longueurs d'onde du minimum et du maximum d'absorption (λ_{min} et λ_{max}) et d'autre part, les rapports d'absorbance A_{250}/A_{260}, A_{280}/A_{260} et A_{290}/A_{260}. Le tableau R rassemble ces différentes valeurs, que l'on peut comparer à celles des préparations obtenues par les différentes méthodes indirectes d'extraction, que nous avons étudiées précédemment. Comme on peut le constater ces valeurs sont identiques à celles des constantes caractéristiques des témoins purs de référence (*). En outre, les valeurs obtenues par les méthodes à l'acide perchlorique et à l'acide trichloracétique présentent de notables variations. Les valeurs les plus satisfaisantes sont obtenues par la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER modifiée (lavages du précipité trichloracétique par l'éther au lieu de l'éthanol voir pages - 130 -). Une légère différence subsiste encore cependant pour les acides uridylique et cytidylique, par suite des contaminations, non-nucléotidiques que nous avons caractérisées à pH = 3,5 (page-135-).

Les nucléotides obtenus à partir des préparations par la guanidine sont donc optiquement purs.

b - Recherche de contaminants phosphorylés non-nucléotidiques dans les préparations

Le contrôle de la contamination des dérivés phosphorylés non nucléotidiques a été effectué à partir de préparations marquées par les radiophosphates.

La figure 20 montre les autoradiogrammes obtenus après la séparation des hydrolysats par chromatographie dans le système solvant

(*) Les constantes classiques de la littérature (BEAVEN et al. (592) ont été vérifiées à partir de nucléotides commerciaux (Sigma - ref : Kit n°8) purifiés par électrophorèse préparative et cristallisation.

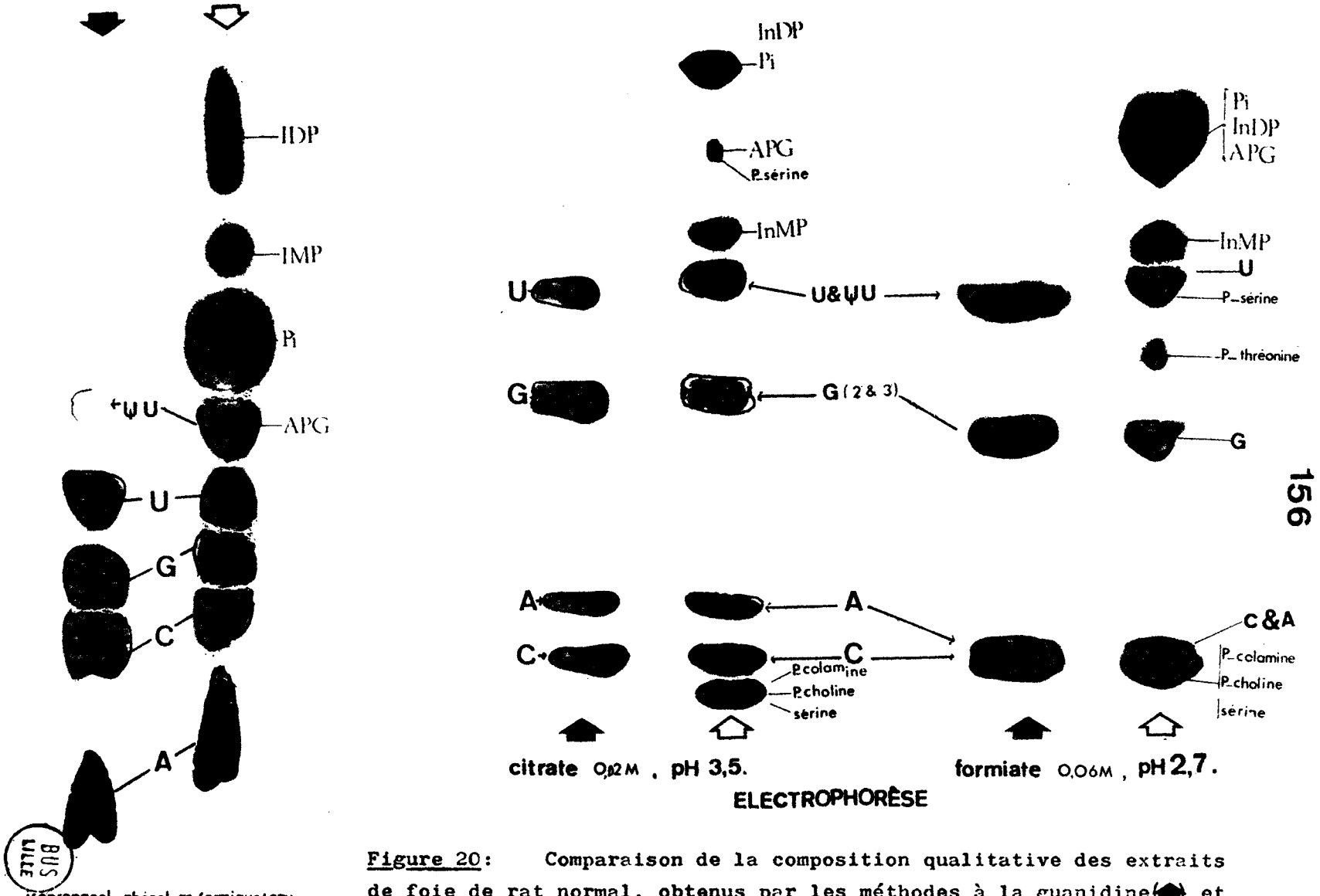


Figure 20: Comparaison de la composition qualitative des extraits de foie de rat normal, obtenus par les méthodes à la guanidine (◓) et à l'acide trichloracétique (⌂).

phénolique de BOULANGER et MONTREUIL (593) et par l'électrophorèse à pH = 3,5 et à pH = 2,7. Par rapport aux extraits obtenus par la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER modifiée, nous pouvons constater l'absence totale de dérivés phosphorylés non nucléotidiques, qui se localisaient préférentiellement dans les zones de migration des acides uridylique et cytidylique.

L'importance de ces résultats est fondamentale, car il devient possible par cette technique d'extraction d'éliminer totalement les causes d'erreur dans la détermination des radioactivités spécifiques des nucléotides, qui se manifestaient dans le cas des extraits obtenus par l'acide trichloracétique. La détermination des radioactivités spécifiques des nucléotides obtenus par les deux méthodes (guanidine et acide trichloracétique) après successivement 1 heure et 24 heures de marquage in vivo fait apparaître l'importance de ces erreurs (tableau S). En tenant compte de la cinétique de marquage, on constate, en effet, que les radioactivités spécifiques des acides guanylique et adénylique restent égales pour les deux méthodes. Les erreurs apparaissent pour les acides cytidylique et uridylique, par suite de l'interférence des composés phosphorylés non-nucléotidiques, dont les vitesses d'incorporation sont très élevées. Dans le cas de l'acide cytidylique, la différence est négligeable après une heure de marquage, mais la radioactivité spécifique augmente de 12 p 100 après 24 heures. L'erreur par excès, pour l'acide uridylique, se manifeste dès la première heure de marquage (23 p 100) ; elle ne cesse de croître pour atteindre 35 p 100 après 24 heures.

Ainsi seules les radioactivités spécifiques déterminées à partir des préparations obtenues par la méthode à la guanidine représentent les valeurs exactes de l'incorporation du ^{32}P dans les nucléotides.

c - Etude électrochromatographique de la composition qualitative des extraits fournis par la méthode à la guanidine

Les électrochromatographies ont été effectuées dans les conditions standardisées décrites à la page **139** . Les révélations par l'autoradiographie, l'absorption en lumière ultraviolette, le réactif de

TABLEAU - S

CAUSES D'ERREUR DANS LA DETERMINATION DES RADIOACTIVITES SPECIFIQUES

DES NUCLEOTIDES DANS LE CAS DES ARN OBTENUS PAR LA METHODE A L'ACIDE TRICHLORACETIQUE

Nucléotides	Incorporation : 1 heure		Incorporation : 24 heures	
	Schmidt et Thannhauser modifiée	Guanidine	Schmidt et Thannhauser modifiée	Guanidine
C	240.000	235.000	400.000	357.000
A	371.000	361.000	442.000	432.000
G	198.000	192.000	381.000	370.000
U + ΨU	441.000	360.000	540.000	400.000
Radioactivité totale	125.10^4	115.10^4	176.10^4	156.10^4

HANES et ISHERWOOD (594) et la ninhydrine à 1 p 100 dans l'acétone ont été systématiquement appliquées.

La figure 21 permet de comparer la composition des extraits obtenus par la méthode à la guanidine (b) à celle des extraits trichloracétiques (a). On peut constater la disparition des différents composés phosphorylés non nucléotidiques (acide glycérophosphorique, inositol - phosphate , phosphosérine, phospho-thréonine, phosphocolamine) ainsi que celle de l'acide phosphorique libre. Un examen plus détaillé des chromatogrammes, pour un temps d'exposition plus long appelle les commentaires suivants (figure 22) :

- les quatre nucléotides majeurs et l'acide pseudouridylique se localisent aisément, étant donné leurs concentrations et leurs radioactivités élevées.

- 16 autres composés peuvent être caractérisés, à la fois en ultraviolet et par l'autoradiographie ; nous les numérotons conventionnellement de bas en haut et de gauche à droite.

——— le spot 1, qui n'apparait qu'irrégulièrement, n'est visible qu'en ultra-violet. Son comportement et sa fluorescence bleue caractéristique pourraient correspondre à ceux de la guanosine.

——— les spots 2, 3, 6, 7, 8 et 14 sont faiblement radioactifs et se révèlent surtout en ultraviolet.

——— le spot 15 présente une migration identique à celle de l'acide phosphorique libre, dont il subsiste parfois des traces dans les préparations.

——— tous les autres spots se révèlent aisément à la fois en ultra violet et par l'autoradiographie.

En outre, nous retrouvons le composé qui se révélait à la ninhydrine et présentait une fluorescence bleue en électrophorèse monodimensionnelle (voir page 135) ; ce dernier possède la même migration électrophorétique que l'acide guanylique et migre très loin en chromatographie. Ce dérivé ne se révèle pas en autoradiographie et pourrait correspondre à une fraction peptidique riche en acides aminés aromatiques.

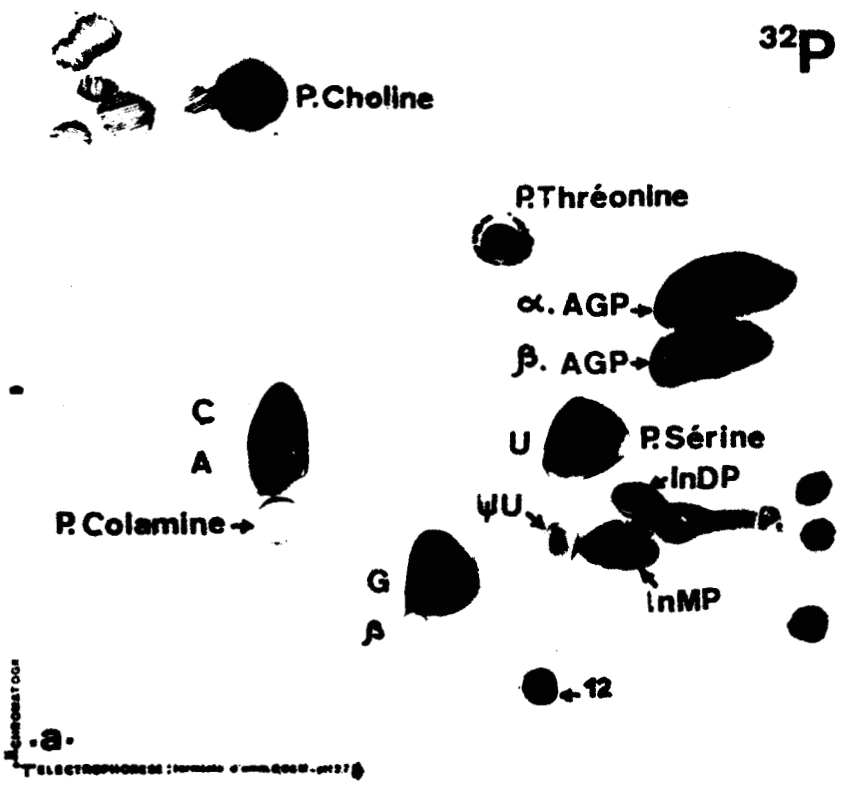
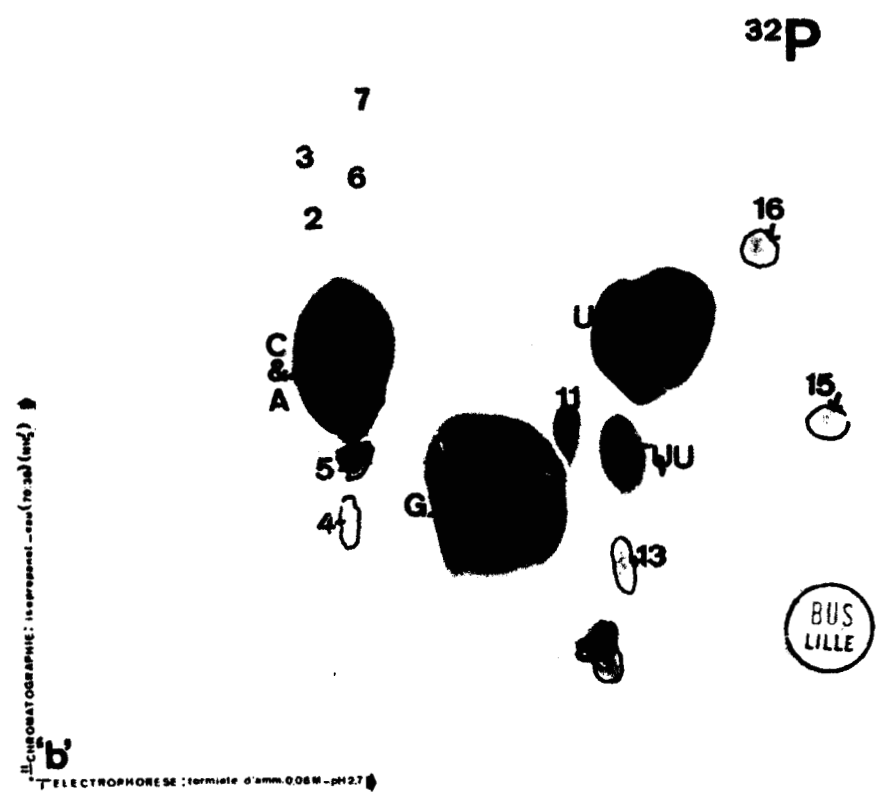


Figure 21: Composition comparée des extraits obtenus par la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER modifiée(a) et par la méthode à la guanidine(b).



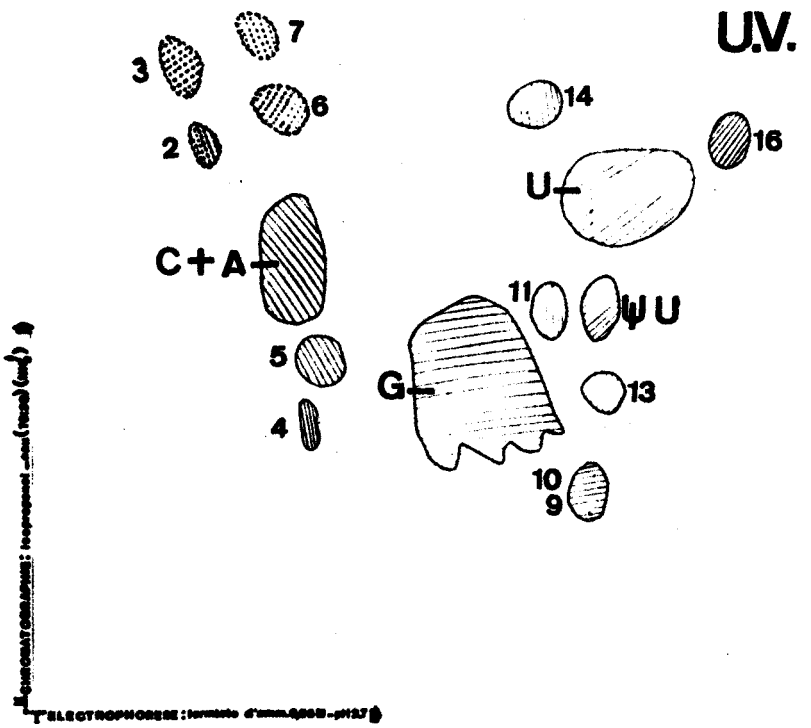
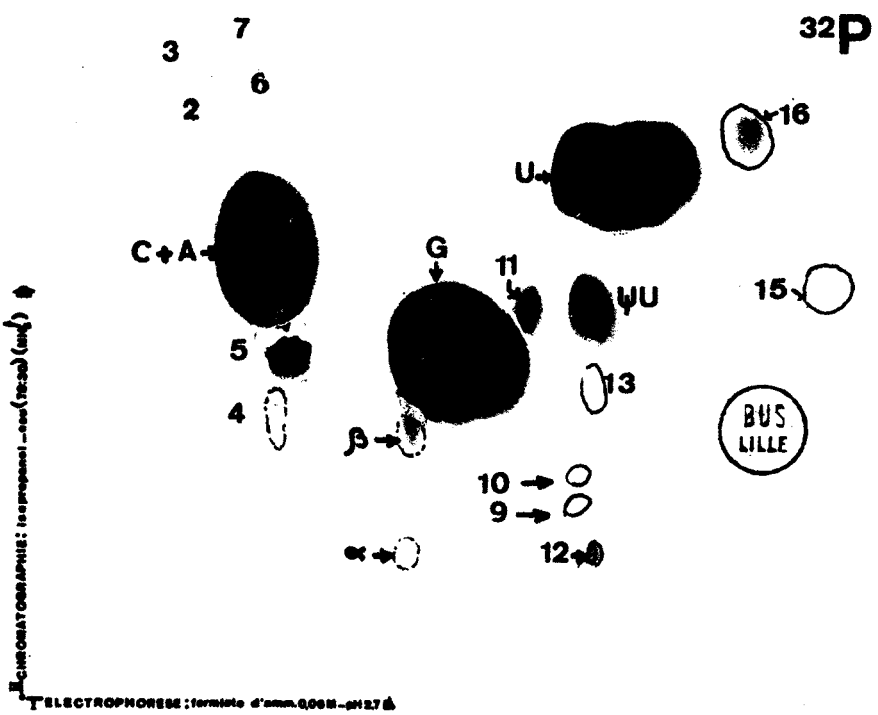


Figure 22: Hydrolysat total d'un extrait de foie de rat normal obtenu par la méthode à la guanidine.



Sous réserve d'effectuer l'identification de ces dérivés, dont l'isolement demande une longue expérimentation, il nous semble valable de les considérer pour la suite de notre expérimentation, comme des fractions nucléotidiques mineures, dont nous suivrons les variations en estimation semi-quantitative.

En conclusion, il apparait donc que l'extraction par la guanidine fournit des préparations d'ARN, exemptes de composés phosphorylés non nucléotidiques, dont l'hydrolyse alcaline totale permet de caractériser 15 dérivés nucléotidiques mineurs non identifiés, qui accompagnent les quatre nucléotides majeurs et l'acide pseudouridylique.

Il restait encore à vérifier l'absence de pertes sélectives de nucléotides qui seraient le signe d'une dégradation des ARN au cours de l'isolement.

4 - Contrôle de l'intégrité moléculaire des préparations obtenues par la méthode à la guanidine

La composition nucléotidique des ARN a été déterminée, de façon comparative, pour l'ensemble des méthodes que nous avons étudiées. Les dosages sont effectués après élution des nucléotides séparés par électrophorèse à pH = 3,5 (voir page -112). Les compositions centésimales des ARN obtenus par les différentes méthodes sont rassemblées dans le tableau T. Les ARN extraits par la guanidine présentent la même composition que les préparations obtenues par la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER originale (595) et modifiée. Comme nous l'avons vu à la page -126 parmi les méthodes à l'acide perchlorique, l'extraction suivie des lavages par l'éther, de la délipidation par le mélange éthanol-éther, et de l'hydrolyse sodique provoque une dégradation profonde des nucléotides puriques. Cette dernière apparait nettement dans le tableau U qui exprime les rapports molaires des nucléotides comparés à ceux de la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER modifiée. Enfin l'extraction phénolique provoque un fractionnement des ARN tissulaires. Ces cas particuliers mis à part, les ARN totaux du foie de rat présentent la même composition nucléotidique,

Tableau - T

COMPOSITION CENTESIMALE EN NUCLEOTIDES DES ARN OBTENUS PAR LES DIFFERENTES METHODES ETUDIEES

Nucléotides	PROCEDES INDIRECTS				PROCEDES DIRECTS		
	ACIDE TRICHLORACETIQUE			Ac.Perchlorique	Par Phénol		
	Ethanol	Ethanol/ acétate	Ether	Ethanol / acétate	Phase aqueuse	Phase phénolique	Guanidine
C	30,0±0,2	31,1 ± 0,8	30,2 ± 0,7	31,2 ± 0,8	30,0	30,10	30,1 ± 0,2
A	18,5±0,3	18,1 ± 0,4	18,3 ±0,3	18,1 ± 0,4	16,4	17,95	18,3 ± 0,5
G	32,0±0,5	31,4 ± 0,6	32,0 ± 0,4	31,3 ± 0,6	35,8	29,20	32,3 ± 0,5
U (+ Ψ-U)	19,5±0,3	19,5 ± 0,3	19,5 ± 0,1	19,4 ± 0,4	17,7	22,75	19,3 ± 0,2

TABLEAU - U

COMPARAISON DE LA COMPOSITION MOLAIRE EN NUCLEOTIDES DES ARN OBTENUS PAR LES METHODES A L'ACIDE PERCHLORIQUE ET A L'ACIDE TRICHLORACETIQUE

Nucléotides	$0,75_N$ APC	10 % ATCA
	Ether	Ether
C	15,43	15,50
A	0	9,39
G	6,21	16,41
U + ψU	10,00	10,00

BU LILLE

qu'ils soient extraits par l'acide trichloracétique, l'acide perchlorique avec la modification de STEELE et al. (596) ou la guanidine.

La guanidine fournit donc bien une extraction totale des ARN tissulaires, sans altérer la structure primaire des molécules.

Pour conclure ce chapitre de mise au point, nous voudrions discuter nos résultats à la lumière des travaux de COX et ARNSTEIN (597).

5 - Discussion des résultats

COX et ARNSTEIN (598) ont extrait les ARN par la guanidine à partir de ribonucléoprotéines ribosomales pures. Il convient de noter les modifications que nous avons introduites pour généraliser cette technique et la rendre applicable aux tissus totaux et à n'importe quel type de fractions subcellulaires.

a - Précipitation des ARN

Les solutions utilisées pour les précipitations et les lavages sont identiques à celles qui ont été préconisées par COX et ARNSTEIN. Cependant le tissu est homogénéisé dans le tampon Tris/$MgCl_2$, exempt de saccharose. Une homogénéisation énergique avec la solution de guanidine 5 M est nécessaire à cause de la présence du tissu conjonctif et des ADN. Nous opérons, en outre, à des températures comprises entre 0°C et - 5°C. Il nous a paru également important, pour parvenir à un rendement optimum, d'effectuer les centrifugations à des vitesses supérieures pendant des temps plus longs : 30 et 60 mn, pour des accélérations de 9.000 à 10.000 g. Dans le cas des fractions dont la proportion d'ARN par rapport aux protéines est faible (spécialement dans le cas des noyaux) la précipitation n'apparait qu'en ajoutant 1/2 volume d'éthanol absolu (à - 20°C) ; il est important dans ce cas, de ne pas réhomogénéiser en présence de l'alcool, car on provoque une perte d'ARN par solubilisation partielle ; une simple agitation avec une baguette de verre suffit à déclencher la précipitation.

Conformément aux remarques de COX et ARNSTEIN, la concentration d'ARN par ml de solution est un facteur déterminant pour la précipitation : à une dilution supérieure à 0,1 mg d'ARN par ml, il n'y a plus de précipitation, même à basse température. Il faut opérer à des concentrations de 0,5 à 0,1 mg d'ARN/ml. A partir du foie total, les conditions optimales sont les suivantes : 10 g de foie sont homogénéisés et complétés à 20 ml de tampon tris/Mg^{++}. On ajoute ensuite 100 ml de solution de chlorhydrate de guanidine 5 M.

Enfin le temps de contact à - 5°C ne doit pas dépasser 60 mn, car il se produit ensuite des pertes par solubilisation des ARN. Les conditions optimales sont de 30 mn à - 5°C.

b - <u>Dissolution des ARN à partir du précipité</u>

COX et ARNSTEIN ont préconisé d'extraire le précipité par l'eau, contenant 1 mg/ml de bentonite pour inhiber les ribonucléases (voir à la page -34). Les auteurs montrent que dans le cas du foie de rat, l'extraction n'est pas totale même après 5 traitements. Pour extraire quantitativement les ARN, sans risquer de solubiliser les protéines et les débris cellulaires présents dans le précipité, nous avons vérifié qu'il faut se placer à un pH légèrement alcalin, en présence d'EDTA pour stabiliser les molécules d'ARN. Le pH optimum est de 7,2, à la température de 0°C à 2°C ; l'extraction est quantitative, pour une dilution de 2 ml par g de tissu frais, après 5 extractions successives (la première de 60 mn et les suivantes de 30 mn). Ces conditions sont très importantes à respecter pour préserver le rendement de la méthode.

COX et ARNSTEIN ont conseillé l'addition de bentonite, pour inhiber les ribonucléases. HITCHBORN et DUNN (599) avaient signalé que la présence de bentonite dans les extraits d'ARN provoquait, au cours de l'hydrolyse alcaline, une dégradation des nucléotides qui altérait les rapports molaires. Nous avons constaté combien il est difficile d'éliminer les traces de bentonite, dans les étapes ultérieures de l'extraction.

Une ultracentrifugation est souvent nécessaire pour sédimenter ces traces persistantes et il se produit un entrainement d'ARN au cours de la sédimentation. Nous avons préféré éviter l'autolyse par les traces de ribonucléase en maintenant les opérations à basse température.

c - Isolement des ARN sous forme de leurs sels de potassium

COX et ARNSTEIN ont utilisé des résines cationiques, sous forme K^+ (Amberlite IR 120 ou Amberlite IRC 50). Nous avons préfére éviter les risques éventuels de dépolymérisation ou d'adsorption irréversible des ARN au contact des résines. Nous appliquons la méthode classique de précipitation éthanolique, en présence de 2 p 100 d'acétate de potassium. En utilisant l'éthanol à - 20°C, on obtient une précipitation quantitative des ARN et les lavages par l'éthanol à 75 p 100 permettent d'éliminer les dernières traces d'impuretés.

En conclusion de ces travaux, il apparait donc que la méthode d'extraction par la guanidine fournit des préparations pures d'ARN, avec un rendement optimum. Les modifications que nous avons introduites à la méthode de COX et ARNSTEIN en font une technique générale d'extraction des ARN, applicable à la fois aux tissus totaux et aux fractions cytoplasmiques. La pureté des préparations permet d'envisager des études comparatives orientées vers la caractérisation et l'étude des variations quantitatives des nucléotides mineurs dans les ARN de différentes origines.

Les méthodes d'extraction par l'acide trichloracétique ne conviennent donc pas pour les expérimentations consacrées à la caractérisation des fractions nucléotidiques mineures. La présence de nombreux dérivés phosphorylés non-nucléotidiques d'origine lipidique provoque des interférences, dans les autoradiogrammes, qui s'opposent à la caractérisation de l'acide pseudouridylique (interférence avec les inositol-phosphates) et des fractions 15 et 16 (interférence avec l'acide phosphorique libre et l'acide glycérophosphorique). Pour les comparaisons entre les cellules normales et cancéreuses, il conviendra donc d'appliquer la méthode à la guanidine, qui fournit des préparations pures. Néanmoins, dans certains cas particuliers, il a paru intéressant de retenir la méthode à l'acide trichloracétique, pour suivre la pureté en ARN de certaines fractions cytoplasmiques ou pour dépister, de manière semi-quantitative, une différence d'activité métabolique des fractions d'origine lipidique. Avant de décrire une étude comparative de la composition qualitative des extraits à la guanidine du foie total et de l'hépatome ascitique, nous décrirons un exemple d'étude comparative de différentes fractions d'ARN d'origine nucléaire, extrait par l'acide trichloracétique.

III - APPLICATION A L'ETUDE COMPARATIVE DE LA COMPOSITION QUALITATIVE DES ARN NORMAUX ET CANCEREUX

1 - ETUDE DE DIFFERENTES FRACTIONS D'ARN D'ORIGINE NUCLEAIRE

Les travaux de MONTREUIL et al. (600) et ceux de DEFERT-KOBUS, SEGARD et MONTREUIL (601,602) ont montré récemment que l'incubation de noyaux de foies de rat dans des solutions de saccharose phosphatées permettait d'obtenir une fraction très enrichie en ARN de type messager et une classe particulière de "ribosomes nucléaires" contenant des ARN à marquage rapide. Nous avons entrepris, en collaboration avec Mme DEFERT (*), d'étudier, par la technique électrochromatographique, la composition qualitative des différentes fractions d'ARN obtenues lors de l'incubation de noyaux isolés après 1 heure de marquage in vivo par l'acide radio - phosphorique.

Les noyaux des hépatocytes, isolés par la méthode de CHAUVEAU et al. (603), sont maintenus à 4° C, pendant 4 heures, sous agitation douce, dans une solution de saccharose 0,35 M tamponnée à pH = 7,4 avec du phosphate bipotassique (0,02 M). La suspension est ensuite centrifugée à 20.000 g. pendant 15 mn. On obtient ainsi les "noyaux résiduels" et une fraction diffusible. Cette fraction diffusible est soumise à une ultra-centrifugation de 60 mn à 50.000 g. qui fournit une fraction soluble (contenant des ARN de type messager) et un sédiment, qui possède au microscope électronique une morphologie de ribosomes et dont les ARN sont de type ribosomal, en possédant toutefois une vitesse de renouvellement 20 fois supérieure à celle des ARN ribosomaux du cytoplasme (fraction "ribosomes nucléaires").

Les ARN de ces différentes fractions ont été extraits par la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER modifiée (voir page -130-) et les hydrolysats alcalins ont été soumis à l'analyse électrochromatographique,

(*) Assistante à l'Institut de Recherches sur le Cancer de LILLE.

dans les conditions standardisées précédemment décrites (voir page -115-). Ces différentes fractions ont été, en outre, comparées aux extraits correspondant des ribosomes et du précipité pH = 5.

Les résultats sont rassemblés dans les figures 23, 24 et 25 ; ils appellent un certain nombre de remarques importantes.

Par rapport à l'extrait des ARN du noyau total, celui des ARN résiduels du noyau, après diffusion, a perdu la plupart des contaminants non phosphorylés absorbant l'ultraviolet ; ces dérivés se localisent dans la zone des spots 8 à 13. En outre, les fractions très radioactives qui possèdent le comportement d'oligonucléotides alcali-résistant, ont également disparu après la diffusion. Cette fraction se retrouve d'ailleurs dans les "ribosomes nucléaires" (figure 24 a) et se trouve également présente dans la fraction microsomale cytoplasmique et dans le précipité pH = 5. Ces fractions pourraient provenir de certaines classes particulières d'ARN possédant des nucléotides substitués en 2' (figure 11 - page -78 -) ou des séquences dominantes Ap Ap ou Gp Ap permettant la formation de liaisons phospho-amides qui s'opposeraient à la formation des nucléotides cycliques au cours de l'hydrolyse alcaline. Ces résultats nous ont amené à poser l'hypothèse de l'existence préférentielle de ces séquences alcali-résistantes dans les ARN macromoléculaires à "destinée cytoplasmique". Nos travaux s'orientent actuellement vers la vérification de cette hypothèse. Au niveau de ces fractions, possédant un comportement très anodique, le spot qui ne migre pratiquement pas en chromatographie correspondrait, selon INGRAM et PIERCE (604), à la guanosine diphosphate (pGp).

Enfin, l'extrait des ARN résiduels du noyau pose une énigme en ce qui concerne d'une part la disparition quasi-totale du spot 12 (qui est très radioactif dans toutes les autres fractions) et, d'autre part, une diminution très nette de la radioactivité des composés phosphorylés non nucléotidiques (P-choline, P-thréonine, acide glycérophosphorique et inositol - phosphates). Ces différents composés se trouvent répartis dans les deux fractions diffusibles : "ribosomes nucléaires" (figure 24 a) et "ARN type messager" (figure 25 a). Il faudrait envisager la diffusion d'une fraction importante de dérivés phospholipidiques qui accompagnerait

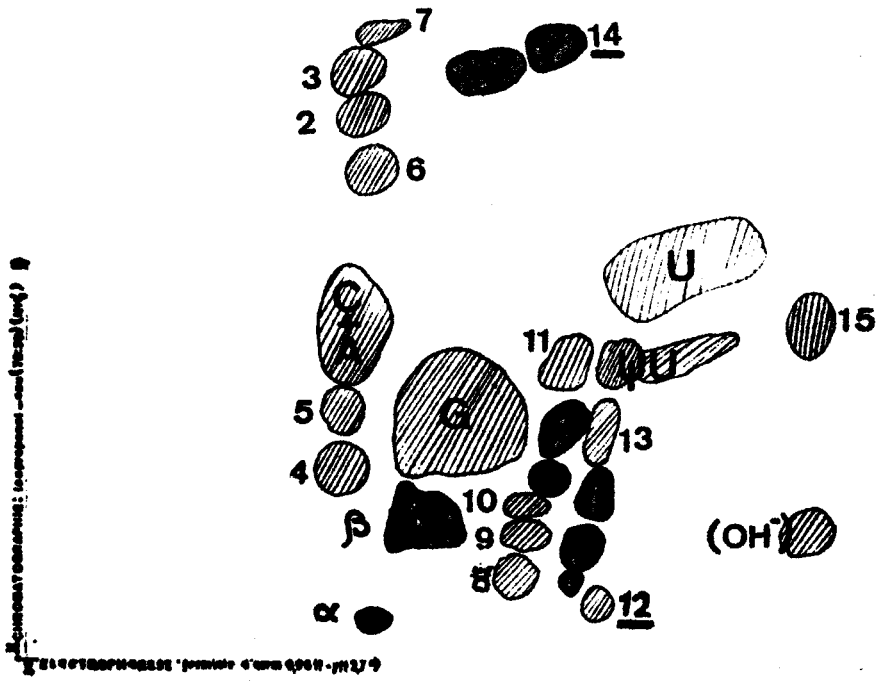
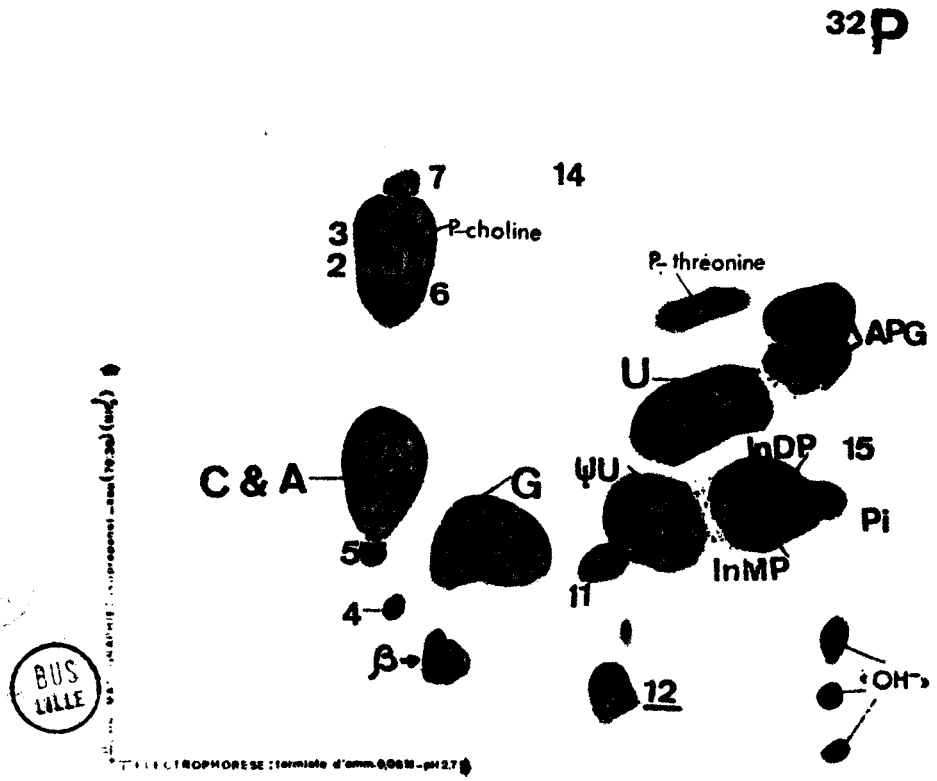


Figure 23: Hydrolysats totaux d'extraits trichloracétiques:
-a- Noyau total.



BUS LILLE

U.V.

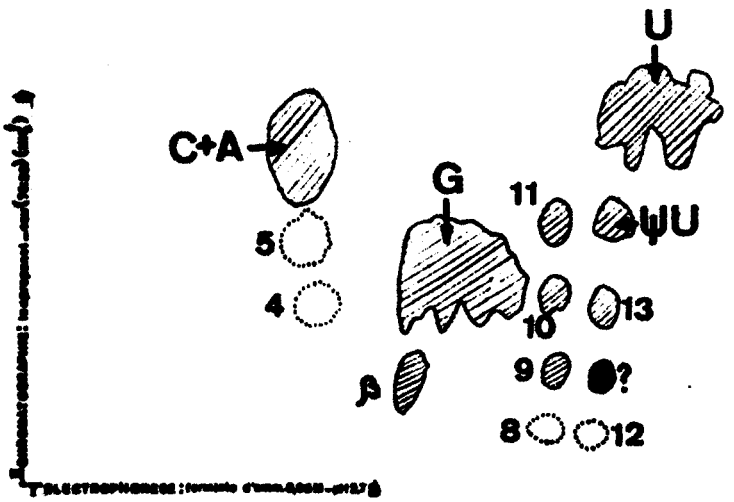
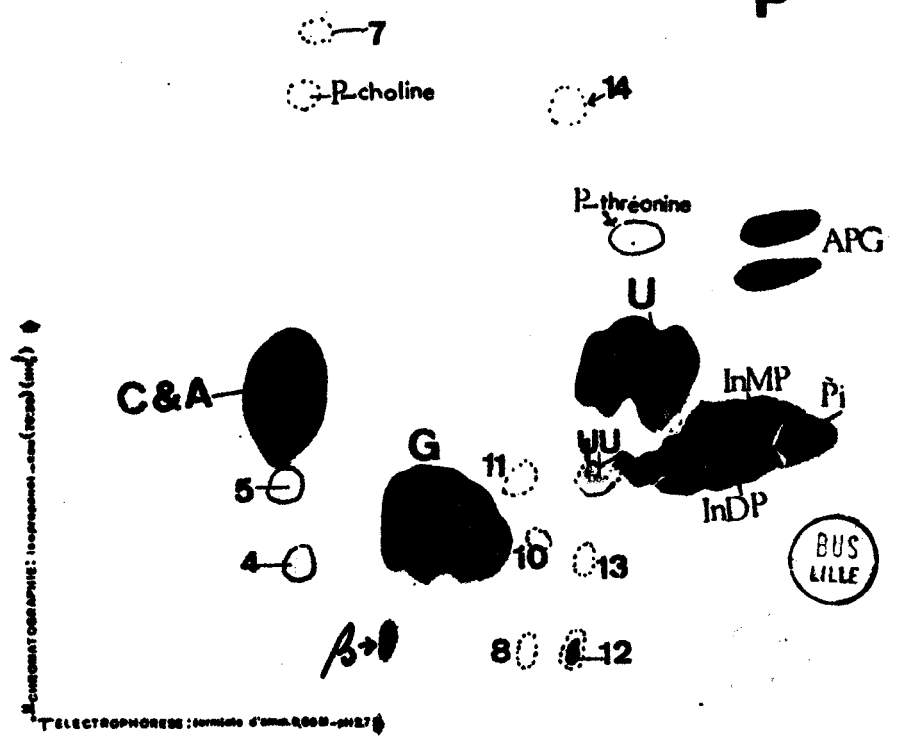


Figure 23: Hydrolysats totaux d'extraits trichloracétiques:
-b- Noyau résiduel après diffusion.

^{32}P



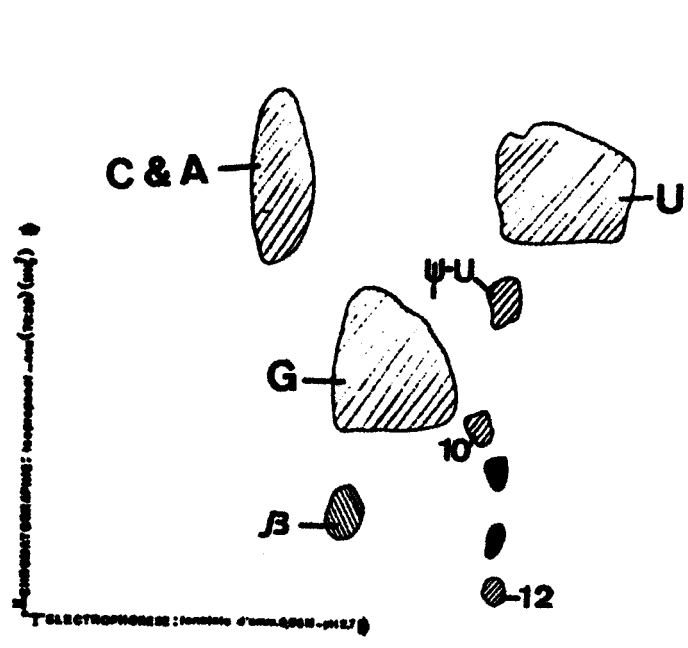
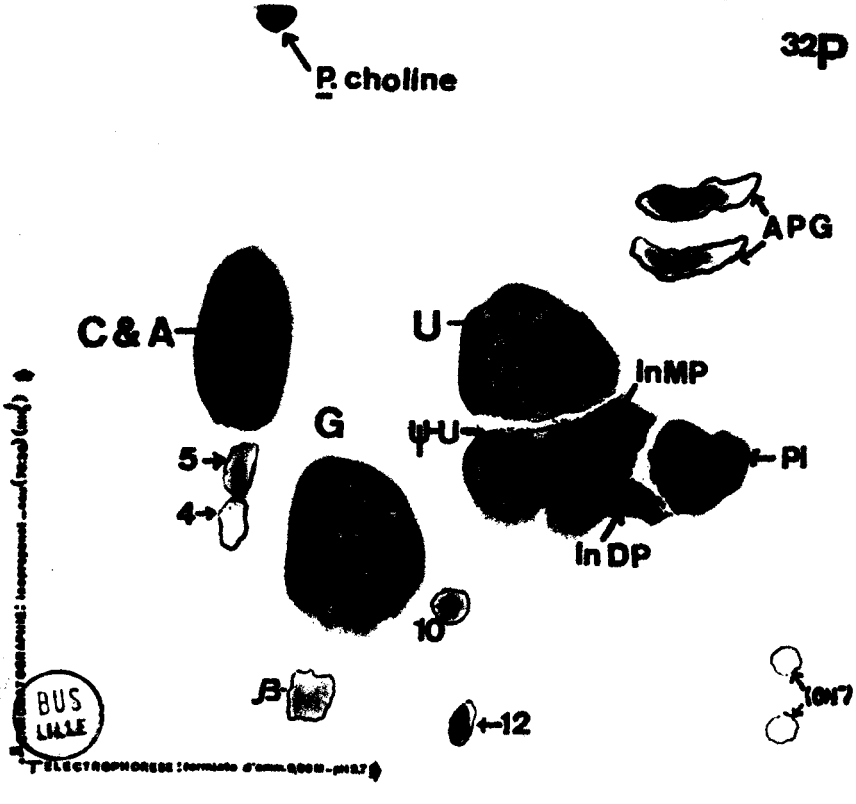


Figure 24: Hydrolysats totaux d'extraits trichloracétiques: -a-fraction "Ribosomes Nucléaires".



U.V.

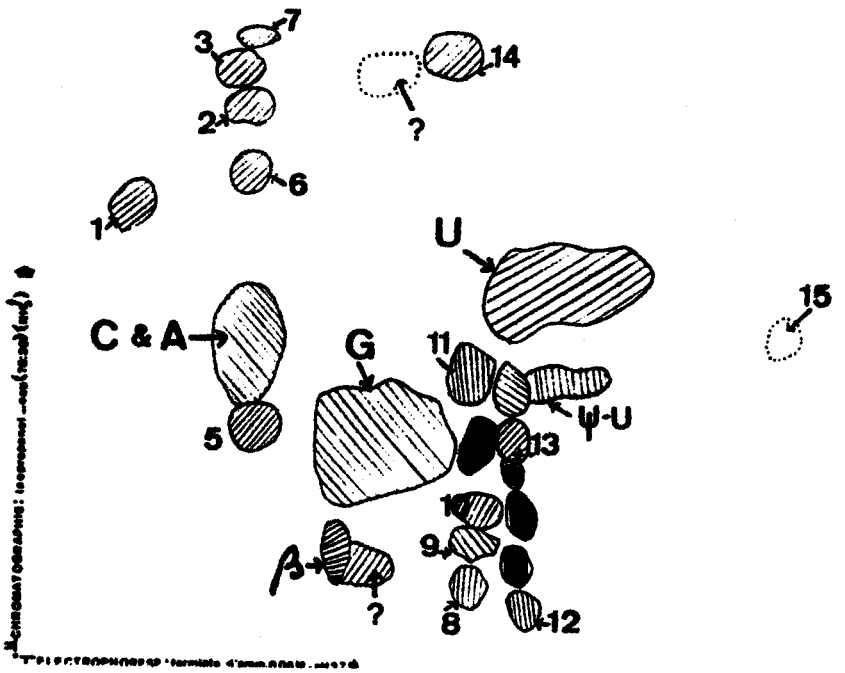
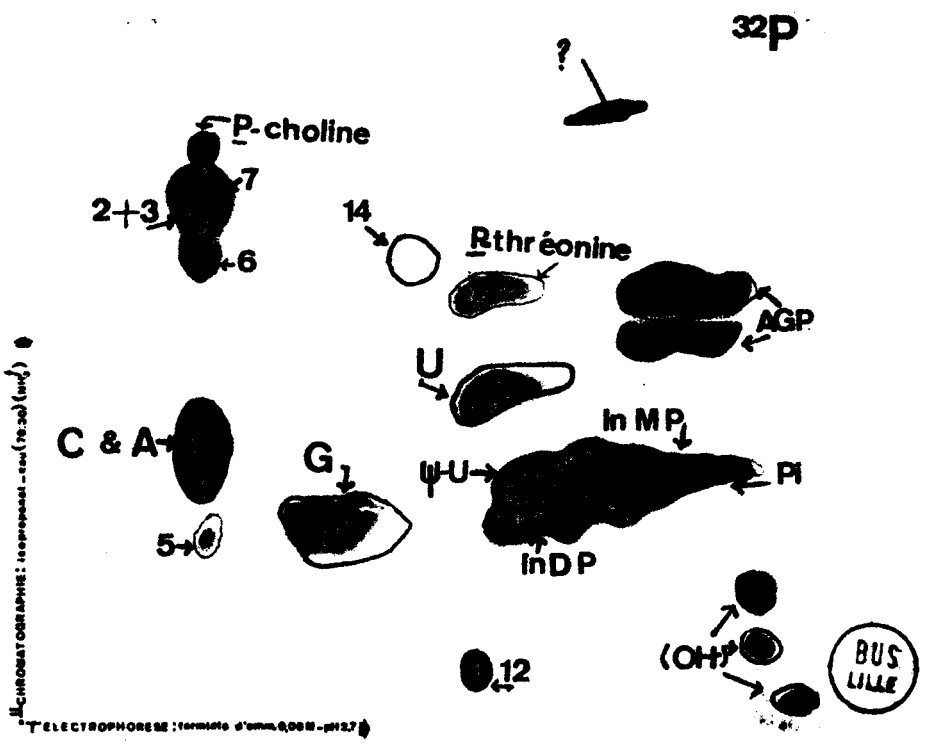


Figure 24: Hydrolysats totaux d'extraits trichloracétiques:
-b-Fraction microsomale.



celle des ARN, par suite d'un éclatement des structures nucléaires ou par un phénomène que nous ignorons encore. Cette analyse permet de confirmer l'existence d'une contamination des préparations de "ribosomes nucléaires" et "d'ARN type messager" par des membranes dont la nature et l'origine restent à étudier.

Les ARN obtenus à partir des "ribosomes nucléaires" sont très différents des ARN totaux de la fraction microsomale. Les spots 10 et 12 subsistent seuls, en proportion appréciable ; les spots 4 et 5 sont présents à l'état de traces et les fractions d'oligonucléotides subsistent. Ces résultats confirment donc l'hypothèse selon laquelle il s'agit là d'une classe particulière de ribosomes, d'origine nucléaire. Néanmoins, la présence des dérivés phosphorylés non nucléotidiques démontre à nouveau une contamination importante par des membranes cytoplasmiques.

La fraction "d'ARN type messager" présente également une composition caractéristique en composés mineurs ; moins complexe que les ARN - pH = 5 et les ARN de la fraction microsomale, la fraction d'ARN type messager est dépourvue de la fraction d'oligonucléotides résistants. Les fractions 4 et 5 sont plus actives et sont présentes en quantité plus importante que dans les ribosomes, "nucléaires" ou cytoplasmiques. Les fractions 8 et 9, peu radioactives sont cependant présentes en proportion nettement supérieure à celle des ribosomes cytoplasmiques ; elles sont totalement absentes dans les ribosomes nucléaires. On peut donc à nouveau confirmer la présence d'une classe particulière d'ARN dans ce cas. Cette préparation n'est cependant pas dépourvue des habituelles contaminations par les dérivés phospholipidiques.

Ces résultats permettent de démontrer l'intérêt présenté par l'application de cette technique d'analyse électrochromatographique comparative. L'utilisation de l'extraction trichloracétique peut être fructueuse, dans certains cas particuliers, cependant l'étude des diagrammes appelle les commentaires suivants :

- Dans tous les cas, les extraits trichloracétiques fournissent plus de fractions mineures que les extraits à la guanidine. On peut caractériser,

U.V.

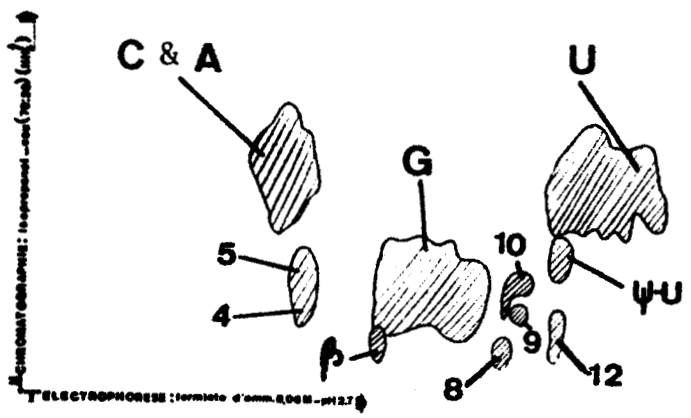
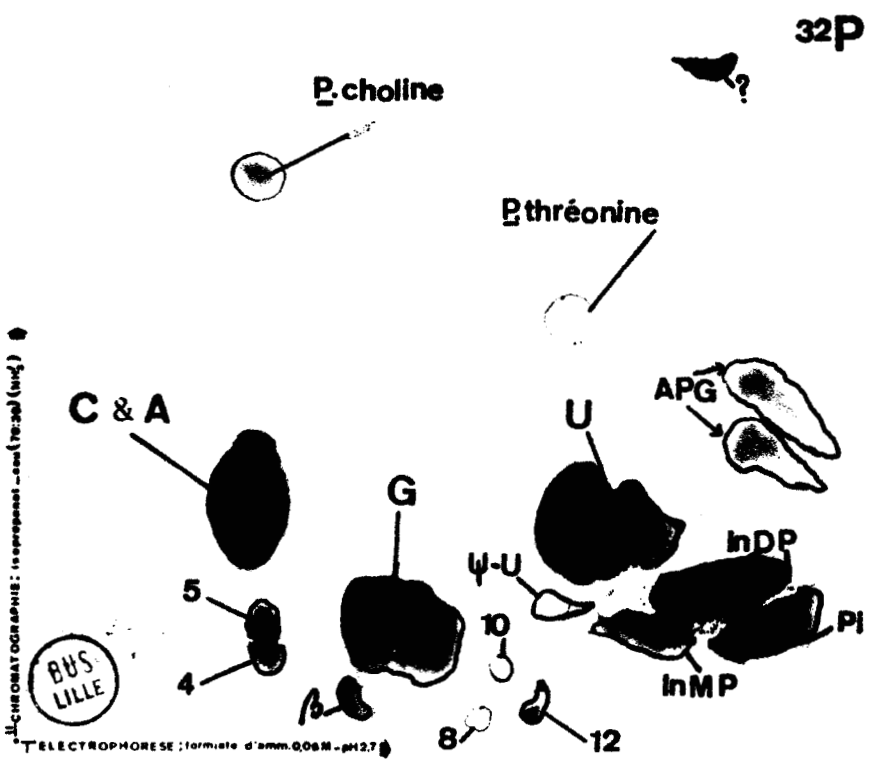


Figure 25: Hydrolysats totaux d'extraits trichloracétiques: -a-fraction d'ARN type messager.



BUS LILLE

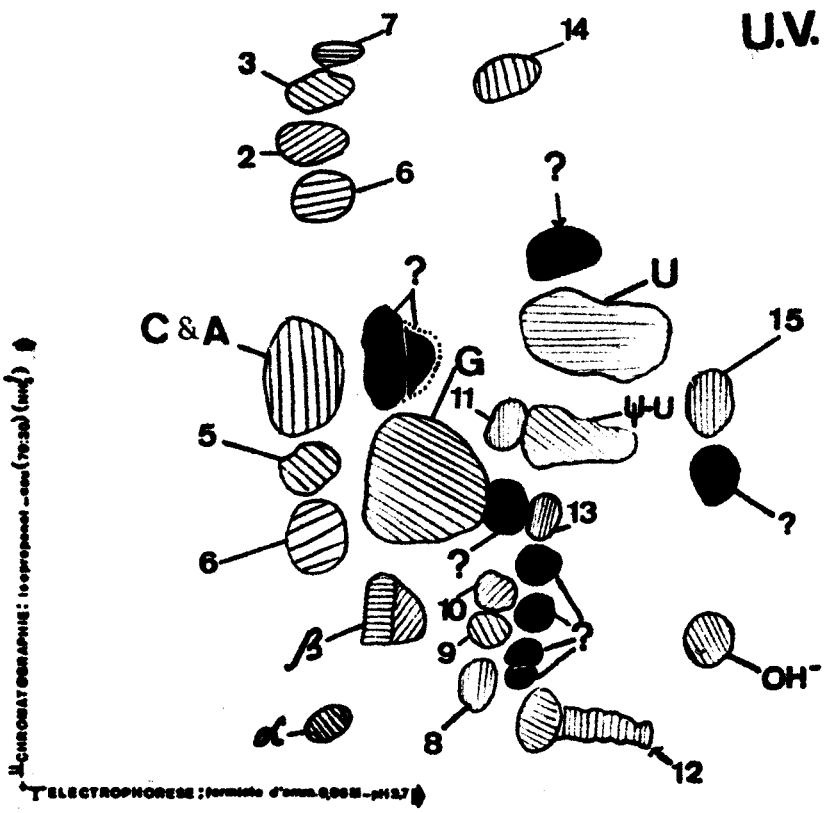
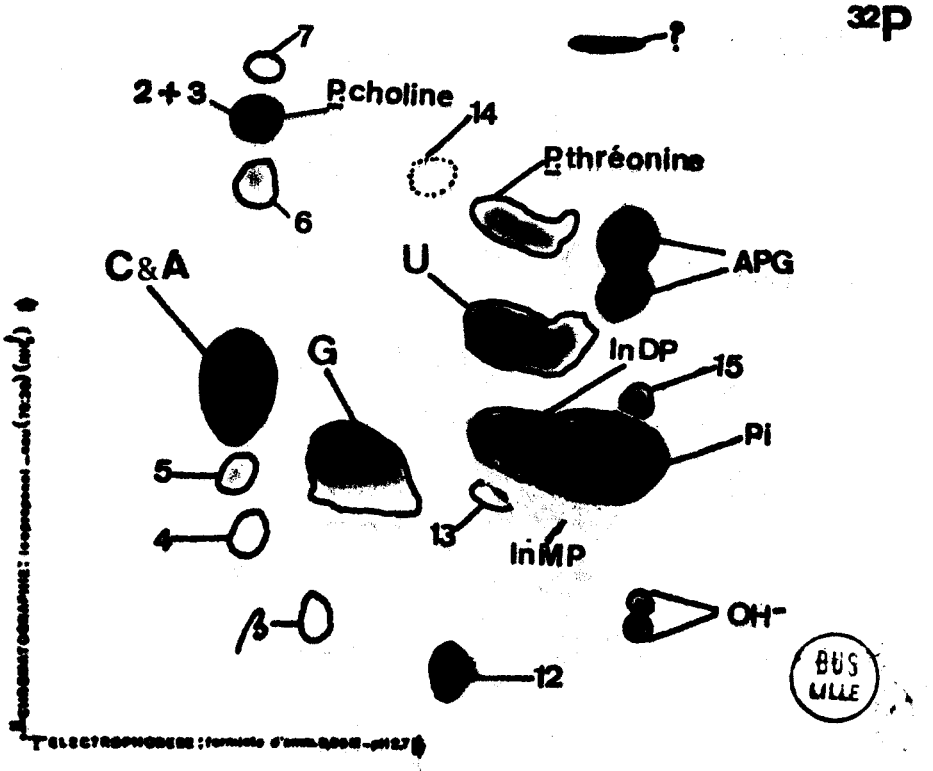


Figure 25: Hydrolysats totaux d'extraits trichloracétiques: -b-précipité pH=5.



en outre, de 5 à 7 contaminants non phosphorylés, absorb_ant la lumière ultraviolette. Enfin, le spot 12 est toujours présent dans les extraits trichloracétiques ; sa radioactivité très élevée pourrait correspondre à une interférence avec une fraction phosphorylée non nucléotidique.

- La caractérisation de l'acide pseudouridylique et des spots 11, 13 et 15 est fortement génée par suite de l'interférence avec les inositol-phosphates et l'acide phosphorique libre.

- Enfin les spots 1, 2, 3, 6, 7 et 10 sont le plus souvent présents à l'état de traces et leur radioactivité est extrêmement faible, ce qui rend difficile et souvent discutable, une interprétation les concernant.

Ces différentes raisons sont venues s'ajouter aux qualités de rendement précédemment décrites, pour nous faire adopter la méthode à la guanidine dans les études comparatives des ARN normaux et cancéreux.

2 - ETUDE COMPARATIVE DE LA COMPOSITION QUALITATIVE DES ARN DU FOIE TOTAL ET DE L'HEPATOME ASCITIQUE

Les hydrolysats alcalins des extraits obtenus par la méthode à la guanidine à partir du foie de rat normal et de l'hépatome ascitique de Zajdela ont été analysés par électrochromatographie. Comme on peut le constater sur la figure 26, ces extraits ne présentaient pas de différences significatives dans leur composition qualitative. Pour des dépots possédant la même absorb_ance à 260 mμ, il est cependant possible de mettre en évidence des variations quantitatives, notamment en ce qui concerne les spots 4, 5, 6 et 14 qui sont présents en quantité plus faible dans l'hépatome ascitique et sont repérables pour des dépots 4 à 5 fois supérieurs. La radioactivité nettement supérieure du spot 15 n'est que fortuite ; elle correspond, dans le diagramme retenu à la figure 16, à une

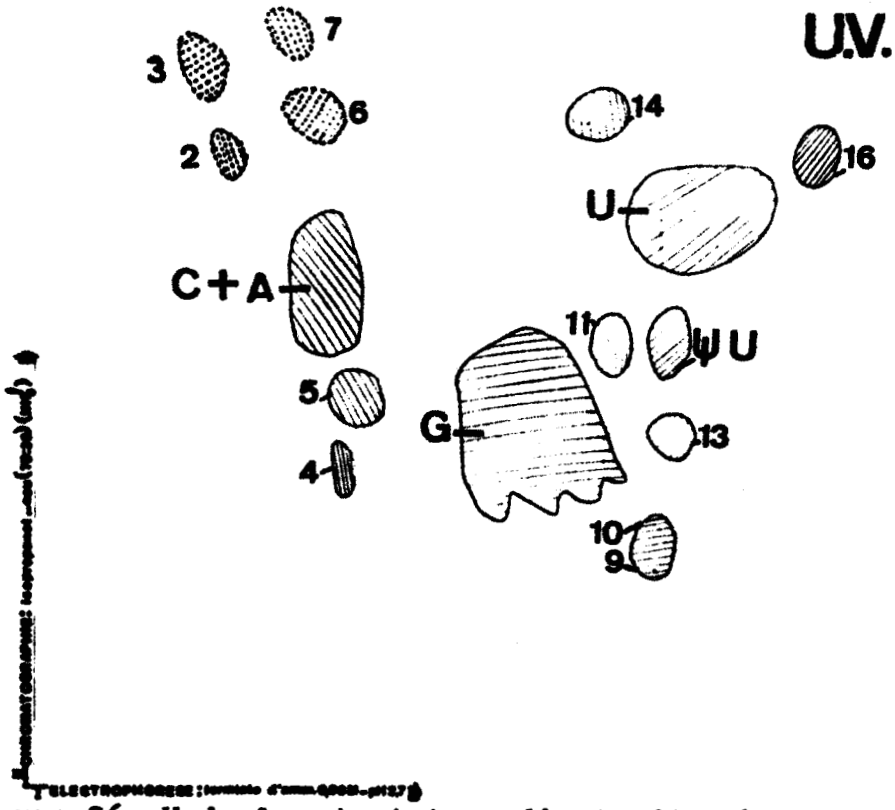
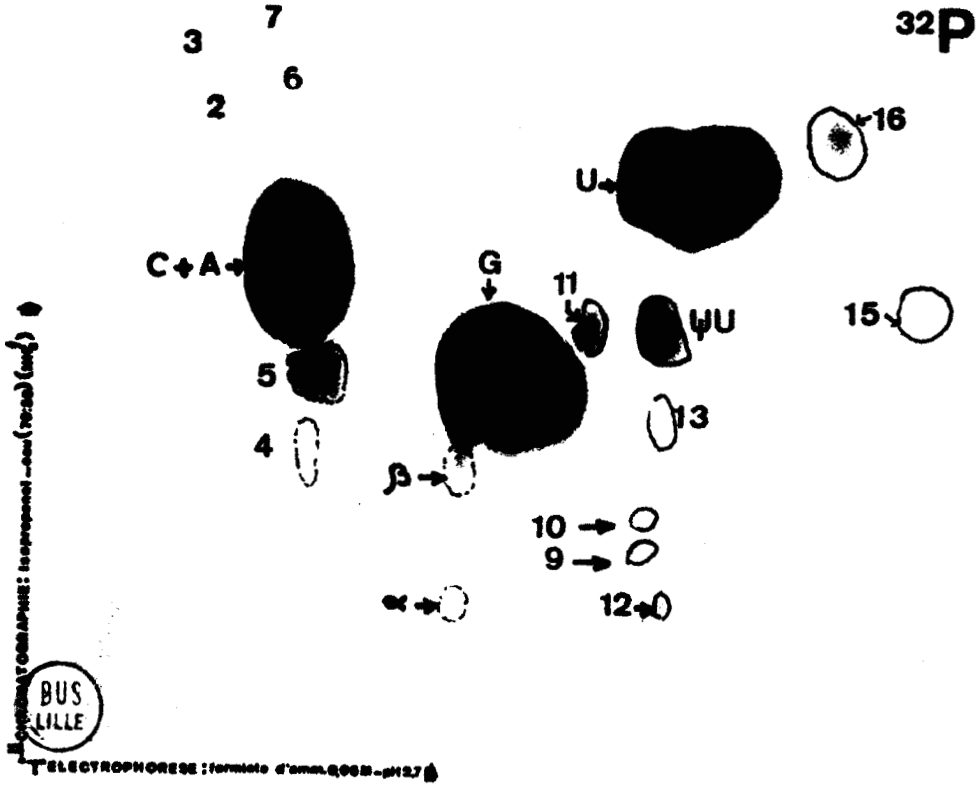


Figure 26: Hydrolysats totaux d'extraits obtenus par la méthode à la guanidine:

-a-foie de rat normal.



BUS LILLE

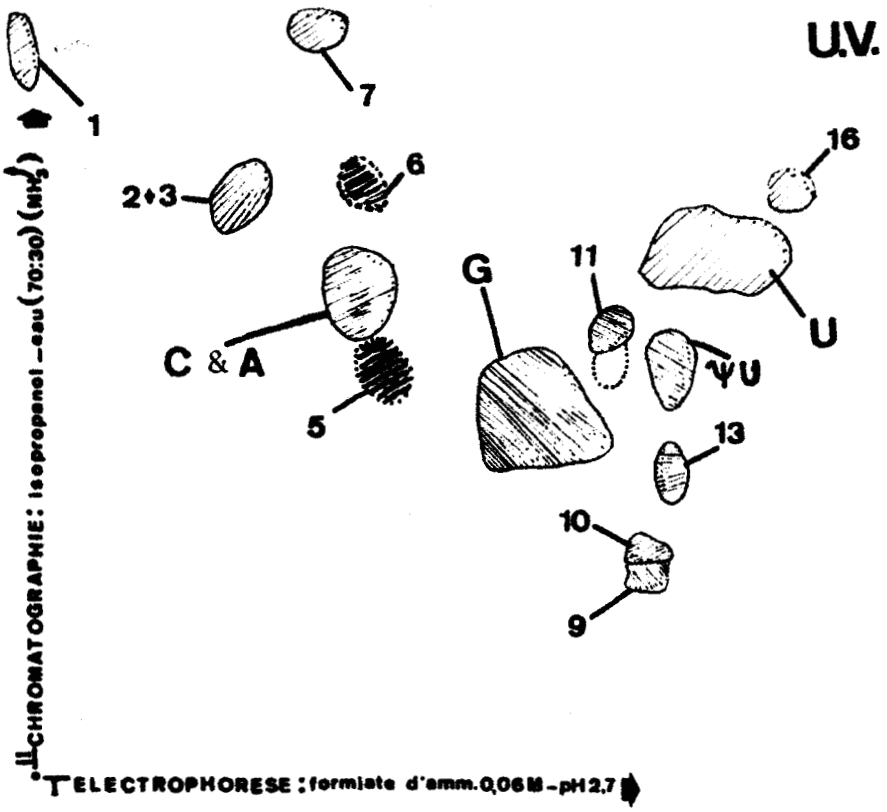
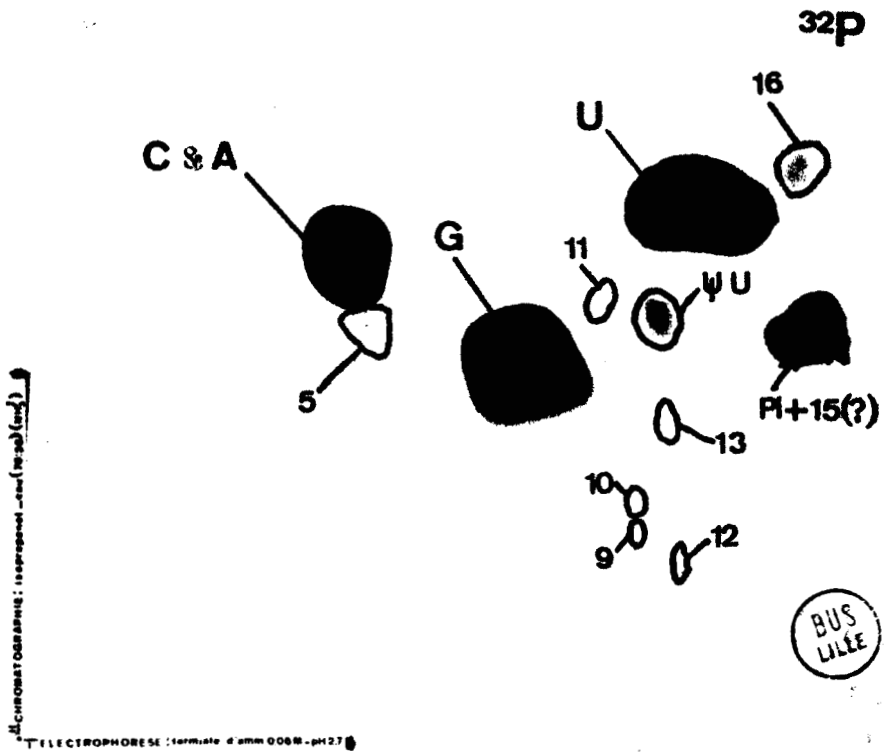


Figure 26: Hydrolysats totaux d'extraits obtenus par la méthode à la guanidine:

-b-Hépatome Ascitique de ZEDJDELA.



BUS LILLE

contamination d'acide phosphorique libre. Le spot 8 qui est présent dans les extraits obtenus par la précipitation trichloracétique, est absent dans les deux cas pour l'extraction à la guanidine. Selon INGRAM et PIERCE (605), le spot 6 correspondrait au méthyl adénine ribotide et le spot 14 à l'acide ribothymidylique.

En conclusion, quelles que soient les conditions de séparation et les quantités de substance analysées, il n'existe pas de différences significatives dans la composition qualitative des ARN normaux et cancéreux. Sans pousser plus loin l'identification de ces composés et l'étude quantitative de leurs variations, il convenait, dans notre ligne de travail, de nous orienter vers la recherche de séquences nucléotidiques anormales. Nous avons ainsi abordé une nouvelle expérimentation, consacrée à l'analyse comparative des produits d'hydrolyse partielle de préparations d'ARN normaux et cancéreux obtenues par la méthode à la guanidine.

ETUDE COMPARATIVE DES SEQUENCES NUCLEOTIDIQUES DES ARN NORMAUX ET CANCEREUX

Pour tenter de caractériser des séquences nucléotidiques anormales dans les ARN d'origine cancéreuse, nous disposions d'un certain nombre de techniques parmi lesquelles nous avons du faire un choix. Nous nous sommes fondés sur quelques principes essentiels axés sur un impératif absolu, qui fut celui de la reproductibilité des résultats :

1 - La méthode d'hydrolyse partielle devait permettre de morceler profondément la molécule, en évitant des réarrangements au cours de l'hydrolyse. En outre, les hydrolysats partiels devaient être analysés directement, sans introduire le risque de pertes au cours d'opérations de purification.

2 - Le procédé d'analyse des hydrolysats devait être rapide, sensible et rigoureusement reproductible.

Nous envisagerons donc successivement le choix de la méthode d'hydrolyse partielle, puis la mise au point de conditions rigoureusement standardisées d'analyse des produits d'hydrolyse. Nous présenterons ensuite les résultats de l'étude comparative des ARN du foie normal et de l'hépatome ascitique.

I - CHOIX DE LA METHODE D'HYDROLYSE PARTIELLE

L'hydrolyse partielle des ARN peut être effectuée par voie chimique ou par voie enzymatique.

A - HYDROLYSES CHIMIQUES

Les solutions acides diluées provoquent une hydrolyse profonde et non sélective des liaisons phosphodiesters. Dans le cas des liaisons - Pu - p - Pyr -, les acides hydrolysent indifféremment la liaison 3' ou la liaison 5'. En outre, comme nous l'avons précisé précédemment (voir à la page -70-), les acides libèrent les bases puriques (Pu) et les nucléotides pyrimidiques (Py).

Les solutions alcalines (NaOH 0,1 à 0,5 N - Ammoniaque) ont été également utilisées pour des cinétiques d'hydrolyse. Dans ce cas, les nucléotides pyrimidiques se libèrent avant les nucléotides puriques.

Ces deux types d'hydrolyse ne fournissent pas de fragments nucléotidiques de façon reproductible et s'accompagnent d'une dégradation des produits d'hydrolyse. Ils ont été, pour ces raisons, totalement abandonnés.

L'acide périodique et diverses amines basiques permettent une hydrolyse récurrente des chaines nucléotidiques. BROWN (606) et WHITFELD (607) ont décrit les conditions d'hydrolyse récurrente par la partie 3' terminale, au moyen de l'acide périodique. De même, la méthyl - amine ($CH_3 - NH_3^+$) en milieu acide induit une hydrolyse de la partie 5' terminale par un mécanisme d'élimination.

Ces procédés chimiques ne provoquent pas un morcellement profond, spécifique et reproductible des chaines nucléotidiques des ARN. Seule l'hydrolyse enzymatique par les nucléases fournira des oligonucléotides de façon reproductible.

B - HYDROLYSE PAR LES NUCLEASES

De nombreux enzymes appartenant au groupe général des hydrolysases attaquent l'édifice nucléique pour aboutir à la formation de fragments plus ou moins nombreux selon leur degré de spécificité. Les enzymes dits "nucléolytiques", peuvent se subdiviser en 4 catégories principales :

1 - Nucléases

Hydrolyse de la liaison phosphodiester sans libération de phosphate minéral.

a) Endonucléases

Hydrolyse simultanée de la chaîne nucléique en des points multiples.

Nucléases aspécifiques quant au pentose - Hydrolyse en des points multiples, déterminée par la séquence des bases, avec production de :

1°) Mono-et oligonucléotides terminés par un 3'-phosphate (ex. nucléase de S. Pyogènes).

2°) Mono-et oligonucléotides terminés par un 5'-phosphate (ex. nucléase d'Azotobacter agilis).

Ribonucléases - Hydrolyse spécifique des molécules d'ARN, en des points multiples, avec production de :

1°) Mono- et oligonucléotides terminés par des groupements 3'-phosphate (ex. ribonucléase pancréatique).

2°) Mono- et oligonucléotides terminés par des groupements 5'-phosphate (ex. ribonucléase du foie de cobaye).

Désoxyribonucléases - Hydrolyse spécifique des molécules du type ADN, en des points multiples, avec production de :

1°) Mono et oligonucléotides terminés par des groupements 3'-phosphate (ex. DNAse du thymus)

2°) Mono- et oligonucléotides terminés par des groupements 5'-phosphate (ex. DNAse pancréatique).

b) Exonucléases

Hydrolyse récurrente, nucléotide par nucléotide, (step-wise degradation), à partir de l'une des extrémités. Pas de distinction sur la nature du pentose.

- Phosphodiestérases, 1re catégorie - Libération de mono-nucléotides terminés par un groupement phosphoryle en position 5' (ex. venin de Crotalus adamanteus).

TABLEAU - V

PROPRIETES ESSENTIELLES DES RIBONUCLEASES D'ORIGINE ANIMALE ET VEGETALE

(D'APRES PRIVAT DE GARILHE (609) et BURTON (610))*

ORIGINE	pH OPTIMUM	REFERENCES	SPECIFICITE	PRODUITS LIBERES
Pancréas de Boeuf (RNase-I)	7,7	(KUNITZ (611) (MARKHAM et SMITH (612)	- Py - p ↕ X -	- Py - p
Rate de Veau	6 à 6,5	KAPLAN et HEPPEL (613)	- id -	- Py - p
Mitochondries de foie de rat	7,8	ROTH (614)	- id -	- Py - p
Lysosomes de foie de rat	5,8	REID et NODES (615), ROTH (616)	- id -	- Py - p et Pu-2',3'-p (cycliques)
Sérum de rat	7,4	RABINOVITCH et DOHI (617)	- id -	- Py - p
Nepenthes - sp	5,0	MATTHEWS (618)	- id -	Py-2', 3'p (cycliques) Pu-2', 3'p (cycliques)
Feuille de pois	5,0	HOLDEN et PIRIE (619)	- id -	- id -
Feuille de tabac	5,1	FRISCH-NIGGEMEYER et REDDI (620)	- id -	Py - p et Pu - p
Bacillus subtilis	-	WITZEL (621)	- Gp ↕ Pu - ⟶ (préférentiellement)	- Gp
Streptomyces Erythreus	-	TANAKA et CANTONI (622)	- Gp ↕ X - ⟶	- Gp
Escherichia Coli	-	LEHMAN (623)	- Ap ↕ X - ⟶ - Up ↕ X - ⟶ (préférentiellement)	- Ap - Up
Taka diastase T_1 ($RNase-T_1$)	7,5	SATA et EGAMI (624) RUSHIZKY et SOBER (625)	- Gp ↕ X - (préférentiellement)	- Gp
Taka diastase T_2 ($RNase-T_2$)	4,5	UCHIDA et EGAMI (626), UCHIDA (626) préparée selon HIRAMARU et al. (626 bis)	Aucune spécificité	Hydrolyse totale des ARN ⟶ Xp

* Voir revues générales récentes sur le mode d'action des différentes endo - et exonucléases : LASKOWSKI (610/1), KHORANA (610/2), LEHMAN (610/3), PRIVAT DE GARILHE (610/4) et BURTON (610).

- Phosphodiestérases, 2e catégorie - Libération de mononucléotides terminés par un groupement phosphoryle en position 3' (ex. la rate de veau).

2 - Nucléophosphatases

Hydrolyse de la liaison phosphomonoester avec libération de phosphate minéral libre.

a) phosphatases non-spécifiques - Hydrolyse de tous les phosphomonoesters (ex. Phosphatase prostatique).

b) 3'-nucléotidases - hydrolyse des 3'-nucléotides avec formation de nucléosides + phosphate (ex. germe de Lolium multiflorum)

c) 5'-nucléotidases - Hydrolyse des 5'-nucléotides avec formation de nucléosides + phosphate (ex. venin de serpent).

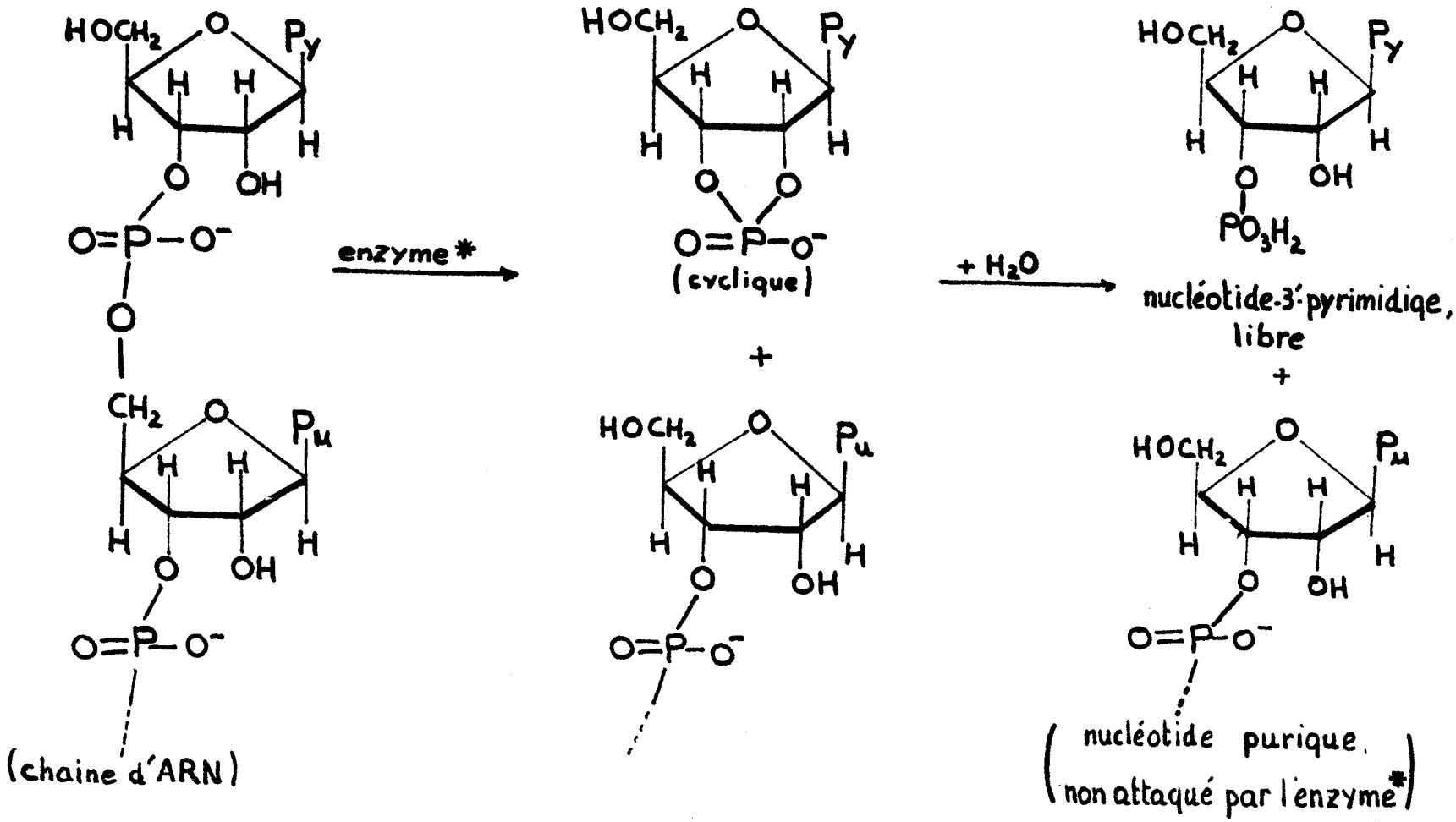
3 - Nucléosidases

Hydrolyse de la liaison base-pentose.

4 - Nucléodesaminases

Hydrolyse des groupements aminés libres des bases avec libération d'ammoniaque.

Le tableau V rassemble les propriétés des ribonucléases actuellement connues. D'une façon générale, ces nucléases libèrent des nucléoside-3'-phosphates et des oligonucléotides possédant un groupe 3' phosphate terminal. La seule exception actuellement connue serait la RNase des noyaux du foie de porc et du foie de cobaye, qui libère des nucléosides-5'-phosphate. Dans le cas des RNases classiques, l'hydrolyse s'effectue par un passage intermédiaire à la forme 2' - 3' phosphate cyclique (BROWN et TODD (608) (Figure 27)). La spécificité d'action de ces enzymes permet ainsi d'obtenir des coupures sélectives des chaines polynucléotidiques, en fonction de leur enchainement nucléotidique ; elle assure, en outre, la reproductibilité des hydrolyses. Parmi ces différents enzymes, nous avons choisi la RNase I du pancréas de boeuf. La spécificité de cet enzyme est suffisamment large pour assurer un morcellement profond



BLUE **Figure 27** : Mécanisme d'action de la ribonucléase I pancréatique (*)

(Py = pyrimidine ; Pu = purine)

des molécules d'ARN ; les préparations sont, en outre, commercialisées et suffisamment bon marché pour permettre de larges expérimentations. Enfin le pH optimum d'activité de 7,7 permet d'éviter des phénomènes d'hydrolyse chimique complémentaire. Les oligonucléotides obtenus possèdent toujours un nucléoside 3' phosphate pyrimidique en position terminale. L'hydrolyse des préparations d'ARN total du tissu par la RNase I laisse subsister une fraction résistante ("core") qui est très riche en nucléotides puriques (MARKHAM et SMITH (627)).

C - DIGESTION ENZYMATIQUE

Mode opératoire

10 ml d'une solution aqueuse à 4 mg/ml d'ARN total, extrait par la méthode à la guanidine, sont placés à 37°C dans un bain marie. Le pH est ajusté à 7,6 par addition d'une solution d'ammoniaque à 1 p 100. On ajoute ensuite, à partir d'une solution aqueuse à 2 mg/ml, 1 mg de ribonucléase pancréatique cristallisée (L. Light and Co Ltd, Colnbrook, England). La digestion est conduite ensuite à 37° C, sous agitation, le pH étant stabilisé à 7,6 avec un pH-stat (Titromatic TTT - 1 - Radiometer Inc - Copenhagen) avec la solution d'ammoniaque à 1 p 100. Après 4 heures d'incubation, on effectue une 2e addition de 1 mg de RNase et la digestion est prolongée 20 heures. On ramène à + 4°C et on ajuste le pH à 3,5 avec de l'acide formique (ou de l'acide acétique). Après une centrifugation destinée à éliminer l'enzyme et le "core", on lyophilise la solution surnageante. Le résidu sec est dissous dans l'acide chlorhydrique 0,1 N à la concentration voulue (voir page 202) et on abandonne une nuit à + 4°C. Cette dernière opération est très importante pour provoquer une ouverture des cycles 2' - 3' phosphate (MIURA (628)).

Nous avons retenu ces conditions d'hydrolyse qui sont très reproductibles. Il convient de rechercher par ailleurs une technique d'analyse très fine et rigoureusement standardisée, qui se prêterait à l'étude comparative de la composition en oligonucléotides des ARN normaux et cancéreux. Notre but se limitait, en effet, à caractériser des fractions particulières d'oligonucléotides, signe de la présence d'ARN cancéreux de structure anormale.

II - RECHERCHE D'UNE METHODE D'ANALYSE DES PRODUITS D'HYDROLYSE PARTIELLE

Les méthodes les plus classiques de séparation des oligonucléotides ont fait essentiellement appel à deux principes : la chromatographie par échange d'ions et la chromatographie bidimensionnelle sur papier.

A - CHROMATOGRAPHIE PAR ECHANGE D'IONS

Les principaux supports utilisés sont les résines du type polystyréne, les celluloses modifiées (sur colonne , en couche mince ou sur papier) et les séphadex modifiés.

1 - Chromatographie sur des colonnes de résines

COHN (629) et VOLKIN et COHN (630) ont décrit, dès 1957, une méthode d'analyse des di- et trinucléotides sur des colonnes de Dowex 1 x 2 ou de Dowex 2. La méthode fut étendue depuis, par de nombreux auteurs, à la séparation d'oligonucléotides supérieurs (voir notamment : RUDNER et CHARGAFF (631), SPENCER et CHARGAFF (632), SCHOLTISSEK (633, 634), Mc CULLY et CANTONI (635), DIMROTH et WITZEL (636), DOSKOCIL et SORM (637)). Les élutions sont effectuées par des gradients de concentration et de pH, à base de formiate d'ammonium ou de chlorure de sodium. Sans entrer dans le détail des résultats, nous nous bornerons à préciser que ces méthodes ne sont applicables de façon satisfaisante que pour l'analyse des di- et trinucléotides ; en outre les séparations sont très longues (6 à 8 jours) et la technique nécessite une quantité importante de substance (environ 50 mg). Ce groupe de méthodes a été supplanté par les techniques de chromatographie sur les celluloses modifiées.

2 - Chromatographie sur des colonnes de cellulose modifiée.

Les ECTEOLA - et DEAE - celluloses fournissent de bonnes séparations des oligonucléotides. TENER, KHORANA, MARKHAM et POL (638)

ont étudié le comportement des oligonucléotides de synthèse et défini leurs conditions d'élution ; STAEHELIN (639) a appliqué cette technique à l'analyse des produits d'hydrolyse ribonucléasique d'ARN de levure. Les séparations, effectuées par des tampons formiate ou bicarbonate, sont excellentes au début de l'élution, mais les oligonucléotides supérieurs, plus acides, sont fixés très fortement sur la colonne et leur élution, plus difficile, altère la qualité des séparations. STAEHELIN (640) améliore les séparations en éliminant le groupe 5' phosphate terminal de chaque oligonucléotide par un traitement préalable de l'hydrolysat avec la phosphomonoestérase. STAEHELIN, PETERSON et SOBER (641) ont isolé de nombreux oligonucléotides, à partir d'hydrolysats ribonucléasiques, en opérant à des pH légèrement alcalins. Ce type de chromatographie a été largement exploité par de nombreux auteurs, d'un point de vue préparatif. Les différents oligonucléotides peuvent être obtenus en quantité suffisante pour déterminer leurs séquences. STAEHELIN (642) a mis en évidence ainsi des séquences trinucléotidiques isomères dont les proportions varient pour les ARN de différents virus ; ARONSON (643) a caractérisé des séquences différentes dans les ARN - 18 et 23 S des ribosomes ; LAGERKVIST et BERG (644) ont étudié les trinucléotides subterminaux (voisins du triplet Cp Cp A terminal) de différents ARN de transfert spécifiques ; STAEHELIN, SCHWEIGNER et ZACHAU (645) ont précisé l'existence de certaines unités de répétition dans différents ARN solubles (par exemple - Pyp - Gp Cp: pour l'ARN - Sérine) RUSHIZKY et SOBER (646) ont effectué, récemment, une étude poussée de la séquence de tri- et tétranucléotides obtenus, par cette technique, après hydrolyse, par la RNase T_1.

Cette méthode est actuellement la plus intéressante, du point de vue préparatif. Les élutions suivent les règles suivantes :

1 - L'élution s'effectue proportionnellement à la longueur de chaine

2 - Les composés dont les pK sont alcalins sont très fortement fixés et leur élution est très difficile (les composés riches en uracide sont élués après ceux qui sont plus riches en cytosine ; de même, les dérivés riches en guanine sont élués après ceux dans lesquels l'adénine prédomine).

3 - Les trinucléotides dont l'acide guanylique est adjacent au nucléotide pyrimidique 3' phosphate terminal sont élués après leurs isomères.

Pour plus de détails concernant ce sujet, nous renvoyons à la revue générale de STAEHELIN (640)

3 - Chromatographie sur papier à échange d'ions

a - TYNDALL et al. (648) ont décrit, pour la première fois, une méthode de chromatographie bidimensionnelle sur papier DEAE, type Whatman DE - 20, qui permet la séparation de 19 oligonucléotides à partir d'ARN de cellules HeLa. La chromatographie est effectuée dans les conditions suivantes : (1) bicarbonate d'ammonium 0,3 M ; (2) acide formique 3 N.

b - SANGER et al. (647) ont décrit, plus récemment, une méthode de séparation bidimensionnelle des produits d'hydrolyse ribonucléasique (RNase I et RNase T_2) obtenus à partir de préparations d'ARN ribosomaux 16 et 23 s. L'électrophorèse à haut voltage est utilisée dans les deux directions : la première sur acétate de cellulose à pH = 3,5 (pyridine à 0,5 p 100 - acide acétique à 5 p 100 - v/v) ; la seconde sur le papier DEAE - cellulose à pH = 1,9 (acide formique à 2,5 p 100 - acide acétique à 8,7 p 100 - v/v). La séparation dans la première direction est suivie d'un transfert direct sur la feuille de DEAE - cellulose. Ce transfert est obtenu, selon ces auteurs, avec une perte de 5 à 10 p 100 des nucléotides. L'électrophorégramme est ensuite révélé par autoradiographie. La bonne séparation des oligonucléotides (tétra- et penta nucléotides) est due, selon ces auteurs, à l'action combinée de la migration électrophorétique et de l'électroendosmose rapide du tampon de la cathode vers l'anode ; des nucléotides sont, en outre, soumis durant la migration à l'échange d'ions avec le support. Cet effet combiné améliore nettement la séparation des oligonucléotides par rapport à la simple chromatographie sur DEAE-cellulose, telle qu'elle est réalisée dans les conditions de TYNDALL et al. (648). L'application de ce procédé a permis aux auteurs de préciser des différences quantitatives entre les oligonucléotides des fractions d'ARN 16 et 23-S et d'ARN soluble d'E. Coli et de levures.

Cette méthode est, cependant, très longue et nécessite un appareillage particulier ; appareil de MICHL (647 bis). En outre, les feuilles de DEAE-cellulose utilisées sont de grande dimension (85 cm x 46 ou 57 x 46 cm), hors commerce. En outre, l'utilisation de la pyridine exclut l'application

quantitative par spectrophotométrie en ultra violet. L'élimination de la pyridine nécessite une manipulation supplémentaire, qui provoque des pertes appréciables. Enfin, le transfert du produit, séparé dans la première direction, sur la DEAE-cellulose introduit une nouvelle perte de substance. Le nombre maximum de spots ne dépasse pas, dans les meilleures conditions, 26 à 30,* qui se rassemblent, pour la plupart, dans la partie supérieure de la feuille. La quantité maximale à déposer ne doit pas excéder 0,1 mg, ce qui complique l'application de cette méthode à l'étude des séquences nucléotidiques après isolement. Enfin, les auteurs ne fournissent pas de précision sur les conditions de reproductibilité de leur méthode, dont l'application en analyse comparative parait délicate.

4 - Chromatographie en couche mince de cellulose modifiée

BERGQUIST et SCOTT (649) ont obtenu, récemment, une séparation satisfaisante d'oligonucléotides (ARN de E. Coli) par électrochromatographie en couche mince de poudre de cellulose MN 300. La solution d'oligonucléotide est déposée sur la plaque et cette dernière est humectée par pulvérisation avec un tampon formiate d'ammonium 0,1 M - pH = 2,45, en présence d'EDTA. Une électrophorèse de 20 à 25 mn, à 5 volts/cm (16 à 20 mA) est suivie, après séchage, d'une chromatographie de 4 heures, dans la deuxième direction, avec le système solvant : butanol tertiaire - acide formique 0,08 M - alcool isoamylique (50 - 50 - 2). Après séchage, une deuxième chromatographie est effectuée, dans la même direction, avec le système solvant : n-butanol-eau (84 - 14), pour éliminer les contaminants fluorescents. Les auteurs ont ainsi caractériser 17 spots présents dans l'hydrolysat partiel.

5 - Chromatographie sur des colonnes de Séphadex

GELOTTE (650) et ZADRAZIL et al. (651) ont obtenu des séparations de mono - et oligonucléotides sur des colonnes de Séphadex G - 50, par élution dans une solution de carbonate d'ammonium à 0,005 p 100 de pH = 7,6. Les fractions riches en acide adénylique sont fortement retenues et leur élution n'est pas quantitative. Cette propriété peut être mise à profit pour éliminer sélectivement les fractions contenant de l'acide adénylique.

---

* dans le cas d'hydrolysat ribonucléase pancréatique.

HOLLEY et al. (652), KEIR (653) et HOHN et POLLMANN (654) ont séparé les oligonucléotides sur des colonnes de DEAE-Séphadex. Cette technique a notamment permis au groupe de HOLLEY de déterminer la séquence complète de la molécule de l'ARN-S spécifique de l'alanine. Cet échangeur d'ion présente une capacité supérieure à la DEAE cellulose (3 meq/g contre 1 meq/g) ; cependant STAEHELIN (655) ne trouve pas avantage à l'adopter car, selon ce dernier, les fractions obtenues ne sont pas pures et la méthode n'est pas reproductible. Cependant, récemment, RUSHIZKY et al. (656) ont précisé des conditions très intéressantes d'élution des oligonucléotides à longue chaine (octamères) sur des colonnes de DEAE - Sephadex A - 25 par le tampon Urée 7 M - Tris - HCl - 0,02 M - pH = 7,6, avec un gradient de concentration en NaCl. Cette technique est actuellement la seule qui permette de séparer, sur colonne, les oligonucléotides supérieurs. Cependant, les tétra- et pentanucléotides sont élués en mélange et doivent être refractionnés à pH = 2,7.

Enfin TOMLINSON et TENER (657) ont proposé de fractionner les oligonucléotides sur des mélanges de Sephadex et de DEAE - cellulose, par élution avec l'urée 7 M.

En conclusion de cette revue très courte des méthodes de séparation sur colonne, nous pouvons préciser que la chromatographie sur DEAE cellulose et sur DEAE Sephadex est intéressante d'un point de vue préparatif. Néanmoins ces techniques sont longues ; en outre, chaque fraction obtenue correspond souvent à un mélange de plusieurs oligonucléotides isomères. Enfin, il est évident, dans notre orientation de travail, que ces méthodes ne se prêtent pas aisément à des études comparatives directes sur des quantités très faibles de substance. Quelques essais personnels nous ont rapidement conduits à éliminer ce groupe de méthodes ; nous nous sommes tournés vers les méthodes de chromatographie de partage sur papier, dont le pouvoir séparateur est nettement supérieur, pour des quantités de substance de l'ordre de 200 µg.

B - CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER

Simultanément aux travaux de COHN (658) (voir page -185), MARKHAM et SMITH (659) ont décrit, en 1952, un système solvant permettant de séparer les produits d'hydrolyse ribonucléasique par une chromatographie monodimensionnelle sur papier (Isopropanol - eau - ammoniac) (voir page -84-). La séparation fournit 6 bandes dont chacune correspond à un mélange des oligonucléotides, par poids moléculaire croissant. Chacune de ces bandes peut être éluée et séparée par électrophorèse.

A partir de ces premiers travaux, plusieurs auteurs ont appliqué soit la chromatographie bidimensionnelle, soit l'électrochromatographie.

1 - Chromatographie bidimensionnelle

HAKIM (660) a obtenu 17 spots à partir de la fraction dialysable d'un hydrolysat ribonucléasique, par une chromatographie bidimensionnelle avec les systèmes solvants : (1) acide isobutyrique - ammoniaque 0,5 N (5 - 3) (solvant de MAGASANIK et al. (661)), (2) alcool isoamylique tertiaire acide formique conc. - eau (3 - 3 - 1). On caractérise les 4 mononucléotides et 9 fractions di- et trinucléotidiques ; 4 spots correspondent à des fractions nucléotidiques plus complexes. En outre une proportion très importante de l'hydrolysat reste au voisinage du dépot.

LIPSHITZ - WIESNER et CHARGAFF (662) ont associé le solvant de MARKHAM et SMITH (isopropanol - eau, en atmosphère d'ammoniac (70 - 30)) et celui de MAGASANIK et al. (663) (acide isobutyrique - ammoniaque 0,5 N (5 - 3) pH = 3,7). Cette méthode permet de caractériser seulement 13 spots, parmi lesquels les 4 nucléotides et l'acide pseudouridylique.

Enfin, très récemment, KRUTILINA, VENKSTERN et BEAV (664)ont amélioré les séparations en utilisant (1) le mélange : acide isobutyrique - ammoniaque 0,5 N (5 - 3) (solvant de MAGASANIK et al. (665)) ; 2 à 3

chromatographies successives sont poursuivies pendant 24 à 30 heures, jusqu'à ce que le solvant atteigne la limite de la feuille ; les chromatographies sont poursuivies jusqu'à ce que les fractions paraissent parfaitement séparées par absorption en ultra violet. (2) la chromatographie, dans la 2e dimension, est effectuée avec le système solvant de RUSHIZKY et KNIGHT (666) (butanol tertiaire - formiate d'ammonium pH = 3,8 (1 - 1)) ; l'optimum de température est, selon ces auteurs, de 12 à 14°C. L'absorption en ultra violet permet de localiser 30 spots. Cependant le comportement chromatographique n'est pas rigoureusement reproductible et ne permet pas de standardiser la méthode pour des études comparatives.

Il apparait donc que la chromatographie bidimensionnelle présente un pouvoir séparateur assez limité et le nombre de fractions caractérisées n'excède pas 30. En outre, la standardisation se trouve limitée par la difficulté de contrôler la migration chromatographique, dans les deux directions. Les méthodes d'électrochromatographie permettent d'éviter certains de ces inconvénients.

2 - Electrochromatographie

La mise au point d'une technique d'électrochromatographie, sur le principe de la méthode de "Finger printing" d'INGRAM (667), a été réalisée par RUSHIZKY et KNIGHT (668, 669, 670). Ces derniers ont analysé les hydrolysats ribonucléasiques d'ARN de levure sur papier Whatman 3 MM. L'électrophorèse est effectuée, dans la première direction, pendant 17 à 20 heures, sous 6 volts/cm (320 volts) et 12 mA, avec le tampon formiate d'ammonium 0,06 M - pH = 2,7 (7,5 ml d'acide formique concentré sont dilués dans 2,5 litres d'eau et ajustés à pH = 2,7 avec l'ammoniaque concentré). Après séchage, la chromatographie est effectuée, dans la direction perpendiculaire, avec le système solvant butanol tertiaire - formiate d'ammonium pH = 3,8 (1 - 1), pendant 48 heures à 20° C.

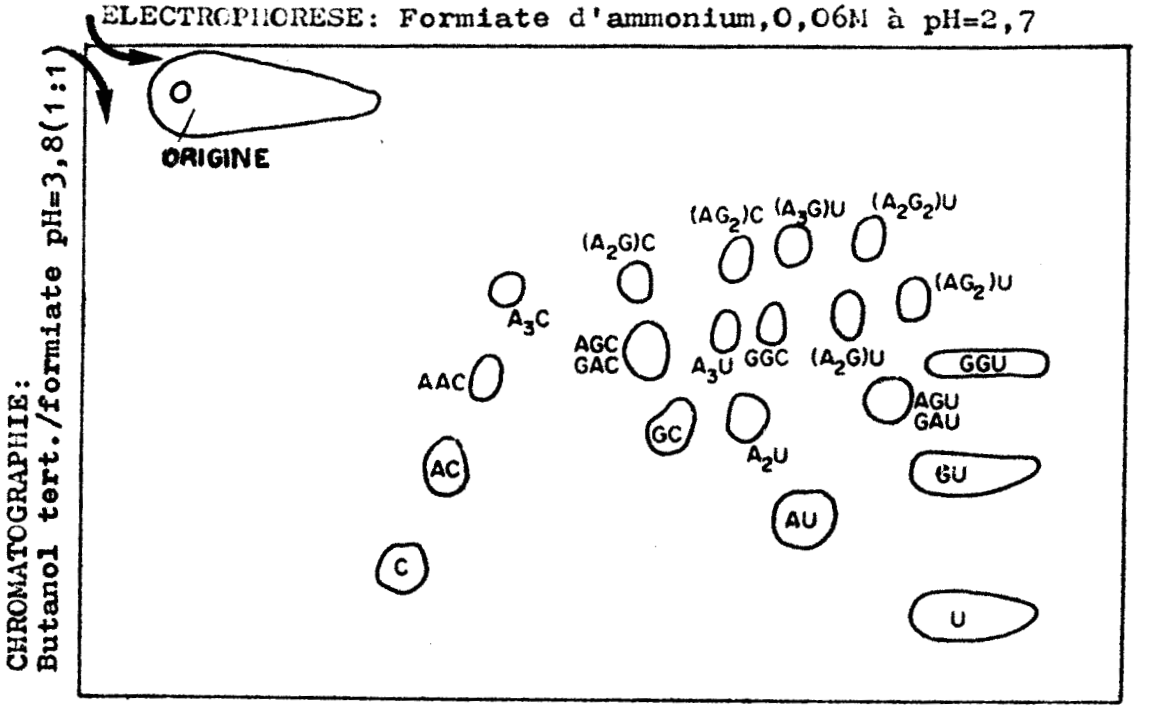


FIGURE 28: Electrochromatographie d'hydrolysat ribonucléasique — selon RUSHIZKY et KNIGHT(679).

L'absorption à 260 mμ permet de localiser 19 à 20 spots, tandis qu'une proportion importante de polynucléotides restent au point de dépot (figure 28). Cette méthode a été largement appliquée : étude des séquences des ARN de levure et du virus de la mosaïque du tabac, par hydrolyse ribonucléasique (RNase pancréatique et RNase T_1) (RUSHIZKY et KNIGHT (671), RUSHIZKY et SOBER (672), RUSHIZKY, SOBER et KNIGHT (673)) ; travaux concernant le mode d'action des nucléases de micrococques (ROBERTS et al. (674)).

DOCTOR et al. (675) ont effectué une étude quantitative de mono- et oligonucléotides obtenus à partir d'hydrolysats ribonucléasiques des ARN - S spécifiques de l'alanine et de la tyrosine. Ces auteurs ont modifié les proportions du solvant chromatographique : butanol tertiaire - formiate d'ammonium 0,02 M pH = 3,7 (au lieu de 3,8) dans les proportions 55 - 45 (au lieu de 50 - 50) ; la chromatographie est, en outre, effectuée à 23°C. Cette technique permit à ces auteurs de caractériser de nombreuses séquences différentes dans les deux ARN - S.

INGRAM et PIERCE (676), utilisant les mêmes solvants que RUSHIZKY et KNIGHT, ont modifié la technique, sur les points suivants : l'électrophorèse est effectuée, selon le procédé de MARKHAM et SMITH (677), la feuille de papier imprégnée du tampon étant placée entre deux plaques de verre ou de polyéthylène ; en outre l'électrophorèse est conduite sous 28 à 35 volts/cm et 20 à 150 mA, avec refroidissement.

La chromatographie est ascendante. Les séparations des oligonucléotides ne sont pas nettes et il se produit de nombreuses trainées et les tâches sont souvent très diffuses. Ces imperfections sont dues, en partie, à l'électrophorèse sous plaques de verre (nous avons constaté le même phénomène dans le cas des nucléotides libres). Selon les auteurs, ces trainées sont provoquées essentiellement par l'interférence de contaminations non-nucléotidiques. Les séparations sont améliorées par une hydrolyse préalable des 5' phosphates terminaux. LEVIN (678) a montré, cependant, un peu plus tard, que cette déphosphorylation ne modifiait pas

la qualité des séparations. ARMSTRONG et al. (680) ont étudié, plus récemment, plusieurs solvants différents, dans le cas d'hydrolysats partiels d'ARN solubles. Les électrophorèses sont effectuées, soit dans les conditions de RUSHIZKY et KNIGHT (formiate d'ammonium pH = 2,7), soit avec l'acide acétique à 10 ou 20 p 100, ajusté à pH = 2,7 ou 3 avec l'ammoniaque. La chromatographie est descendante, dans le système-solvant : n-propanol - ammoniaque eau (55 - 10 - 35) (selon LIPSETT et al. (681)). 18 à 25 spots sont caractérisés par cette technique.

L'électrochromatographie permet donc d'obtenir une meilleure séparation des oligonucléotides (di-, tri- et tétra). Cependant la plupart des travaux effectués jusqu'alors n'ont pas permis de caractériser plus de 30 fractions différentes. Ceci est dû aux conditions de séparation, mais aussi à la sensibilité des méthodes de révélation. En effet, toutes les expérimentations que nous avons décrites utilisent la révélation en ultraviolet. Il est préférable d'utiliser l'autoradiographie, à partir de préparations marquées par le radiophosphate, pour augmenter considérablement la sensibilité de la révélation. TYNDALL et al. (682) et SANGER et al. (647) ont utilisé cette méthode de révélation pour comparer les hydrolysats partiels d'ARN extraits de cellules HeLa, avant et après l'infection virale. TYNDALL a pu, de cette façon, caractériser 5 oligonucléotides caractéristiques de l'infection virale. Outre la sensibilité de la révélation, cette technique permet également de comparer la radioactivité spécifique des oligonucléotides obtenus. C'est la raison pour laquelle nous avons d'emblée choisi la technique autoradiographique pour nos travaux comparatifs. Cette méthode, très sensible, permet de caractériser directement des différences séquentielles d'activité métabolique.

Notre étude bibliographique concernant cette question nous a donc conduit à rechercher une technique électrochromatographique qui fournisse, par autoradiographie, le plus grand nombre de spots, de façon rigoureusement reproductible. Avant de décrire nos résultats comparatifs concernant les ARN normaux et cancéreux, nous décrirons nos recherches concernant la standardisation de l'électrochromatographie.

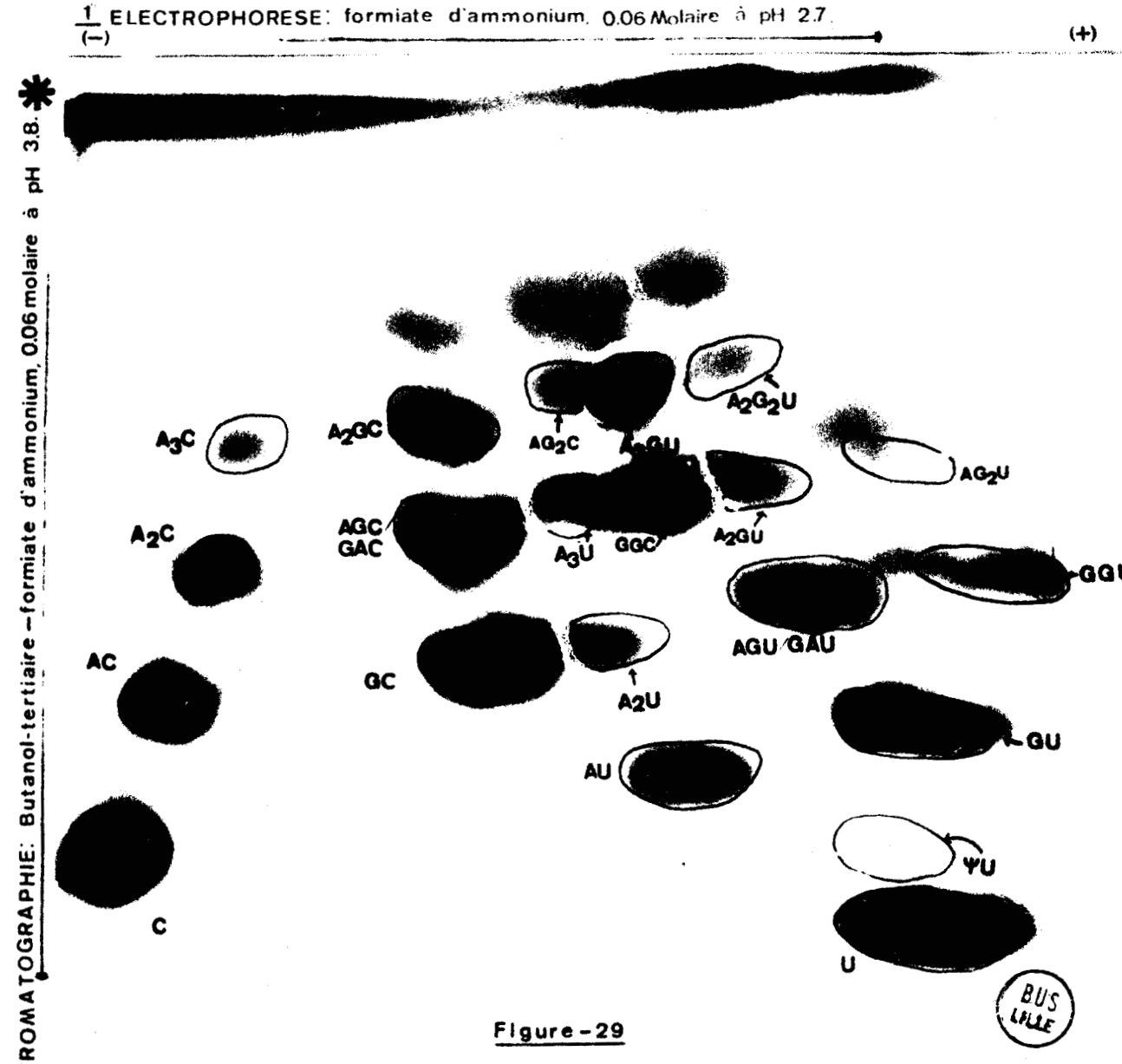


Figure-29

'Finger print' d'hydrolysat ribonucléasique d'ARN de foie de rat effectué par la méthode de RUSHIZKY et KNIGHT(679): éléctrophorèse de 18 heures à 350 volts, et chromatographie descendante dans le système solvant, butanol tertiaire — formiate d'ammonium à pH 3,8 (1:1).

— Les différents spots sont très étalés dans le sens de la migration éléctrophorètique.

C - MISE AU POINT D'UNE METHODE ELECTROCHROMATOGRAPHIQUE STANDARDISEE

Nous avons repris la méthode de RUSHIZKY et KNIGHT (683), en opérant par autoradiographie à partir d'extraits à la guanidine obtenus après un marquage in vivo par le radiophosphate. Les résultats nous ont conduits à modifier les conditions d'électrophorèse et de chromatographie pour définir une technique, totalement reproductible qui fournit de 56 à 60 spots.

La figure 29 fournit les résultats de l'analyse d'un hydrolysat ribonucléasique d'ARN total de foie normal. L'autoradiographie est obtenue après une séparation dans les conditions exactes de RUSHIZKY et KNIGHT : (1) électrophorèse en tampon formiate d'ammonium pH = 2,7 - 350 volts, pendant 18 heures ; (2) chromatographie descendante en butanol tertiaire - formiate d'ammonium pH = 3,8 (1 - 1). L'électrophorèse est effectuée dans une cuve en toit (modèle de MACHEBOEUF (684), qui présente l'avantage d'éviter les diffusions spontanées qui apparaissent au cours de la migration entre deux plaques deverre . Par rapport aux résultats de RUSHIZKY et KNIGHT (685), l'autoradiographie permet de localiser 8 à 10 spots supplémentaires. En outre, ces différentes fractions correspondent à des mélanges d'oligonucléotides. Il était donc important de modifier ces conditions pour améliorer les séparations. Nous avons fait varier systématiquement, les conditions d'électrophorèse, d'une part, et la chromatographie, d'autre part.

1 - MODIFICATION DE L'ELECTROPHORESE

Comme on peut le constater dans la figure 29, les différents spots sont très étalés dans le sens de la migration électrophorétique. Il était donc logique de chercher à réduire le temps de migration et à augmenter la tension. De nombreux essais ont été effectués de 400 à 1.000 volts, pour des temps de migration de 6 heures à 18 heures. La figure 30

Figure - 30

'Finger print' d'hydrolysat ribonucléasique de foie de rat normal effectué par la méthode de RUSHIZKY-KNIGHT modifiée: éléctrophorèse de 7 h 30 à 800 volts.

(la chromatographie n'étant pas modifiée)

——Noter que la séparation des 42 spots est nette; chaque fraction est bien localisée.

BUS LILLE

montre les résultats obtenus pour une électrophorèse de 7 h 30 à 800 volts, la chromatographie n'étant pas modifiée. L'observation à 260 mμ permet de localiser 30 fractions et l'autoradiographie fournit 39 à 42 spots nettement distincts ; en outre, chaque fraction est bien condensée et les spots sont circulaires. La séparation est optimale pour une électrophorèse de 6 à 7 heures à 1000 volts. Dans la figure 31, on peut localiser 50 à 55 fractions bien séparées. Par rapport à l'électrophorèse précédente (figure 30) il apparait notamment, en avant de la ligne des oligonucléotides $(A)_nC$, 4 spots supplémentaires. Etant donné la qualité des séparations, nous avons adopté définitivement ces conditions d'électrophorèse.

2 - ETUDE DE LA MIGRATION CHROMATOGRAPHIQUE

En nous fondant sur les résultats de BERGQUIST et SCOTT (686) obtenus en couche mince de cellulose (voir à la page-187B), nous avons introduit leur modification du solvant, qui consiste à ajouter l'alcool isoamylique au solvant de RUSHIZKY et KNIGHT : butanol tertiaire - formiate d'ammonium, 0,06 M à pH = 3,8 - alcool isoamylique (50 - 50 - 2). L'électrophorèse est conduite à 1000 volts pendant 6 à 7 heures, avec le tampon formiate d'ammonium 0,06 M - pH = 2,7. Comme on peut le constater dans la figure 32, l'addition d'alcool isoamylique provoque des traînées de toutes les fractions, bien que la séparation soit nettement améliorée. Ce solvant est très intéressant dans le cas d'ARN de faible poids moléculaire (ARN - S par exemple) dont l'hydrolyse ribonucléasique fournit un nombre restreint d'oligonucléotides.

Comme le montre la figure 31, le solvant de RUSHIZKY et KNIGHT Butanol tertiaire - formiate d'ammonium, en proportions égales, laisse subsister, dans la partie supérieure du chromatogramme (au voisinage du trait de départ) une zone diffuse, dans laquelle les fractions s'individualisent très mal. Nous avons, pour cette raison, étudié le comportement avec le système solvant, modifié par les auteurs eux-mêmes, qui contient

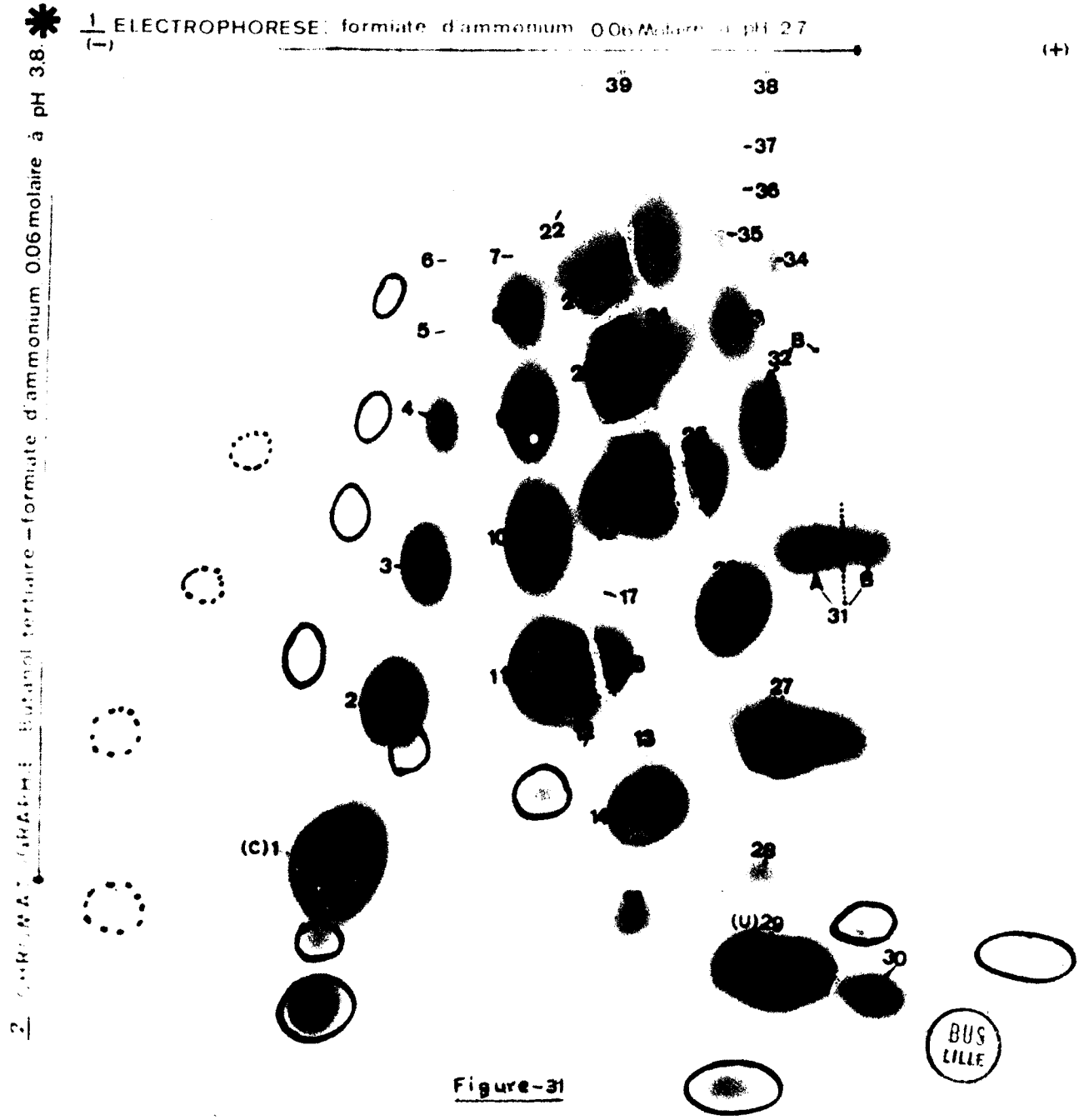


Figure-31

'Finger print' d'hydrolysat ribonucléasique de foie de rat normal effectué par la méthode de RUSHIZKY-KNIGHT modifiée: éléctrophorèse de 6-7 heures à 1000 volts (la chromatographie n'étant pas modifiée).

——Les 49 spots sont bien séparés. Localisation de 4 spots supplémentaires dans le compartiment cathodique. Les spots cerclés représentent la répartition des différents spots supplémentaires variables dans les fractions cytoplasmiques.
(voir figures 35 à 38)

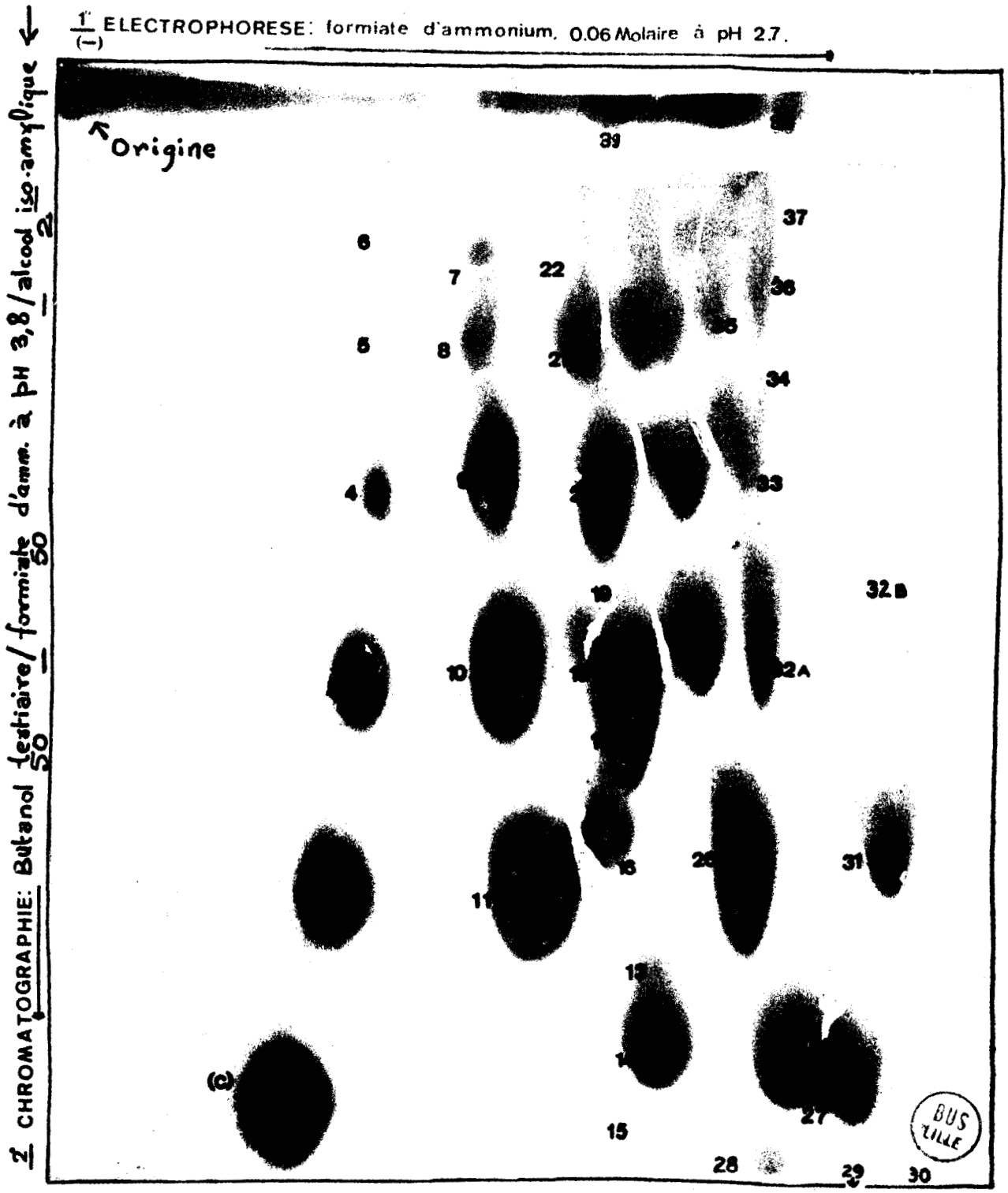


Figure 32 'Finger print' d'hydrolysat ribonucléasique de foie de rat normal: éléctrophorèse—6-7 heures à 1000 volts; chromatographie en système solvant-butanol tertiaire/ formiate d'ammonium, 0,06M à pH=3,8/alcool isoamylique (50-50-2).

——L'addition d'alcool isoamylique provoque des traînées de toutes les fractions.

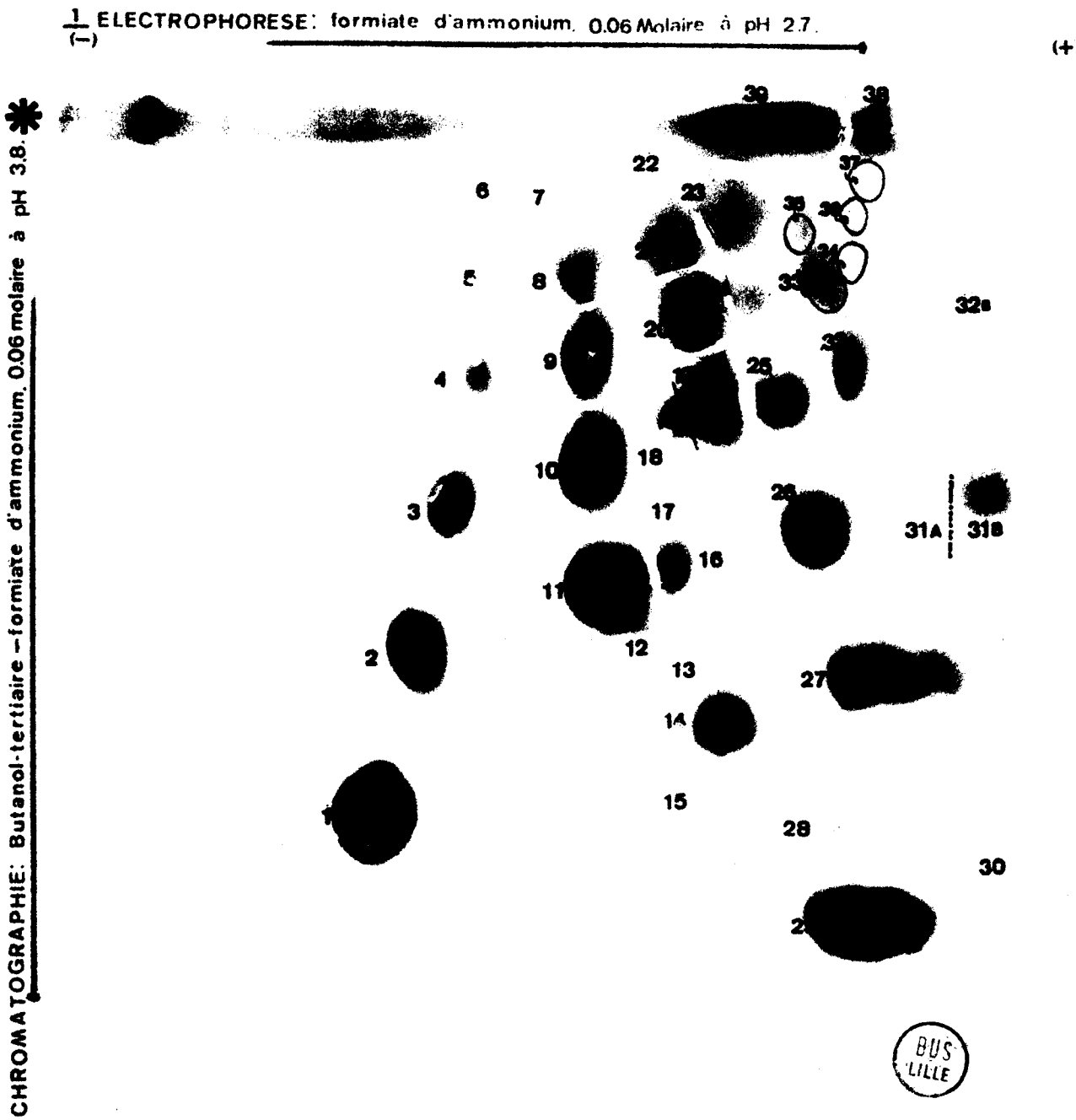


Figure-33: 'Finger print' d'hydrolysat ribonucléasique de foie de rat normal. Eléctrophorèse: 6-7 heures à 1000 volts. Chromatographie: butanol tertiaire — formiate d'ammonium (87 - 63).

——La proportion plus importante de phase organique permet d'obtenir dans la zone des tri- et tetranucléotides des spots plus condensés.

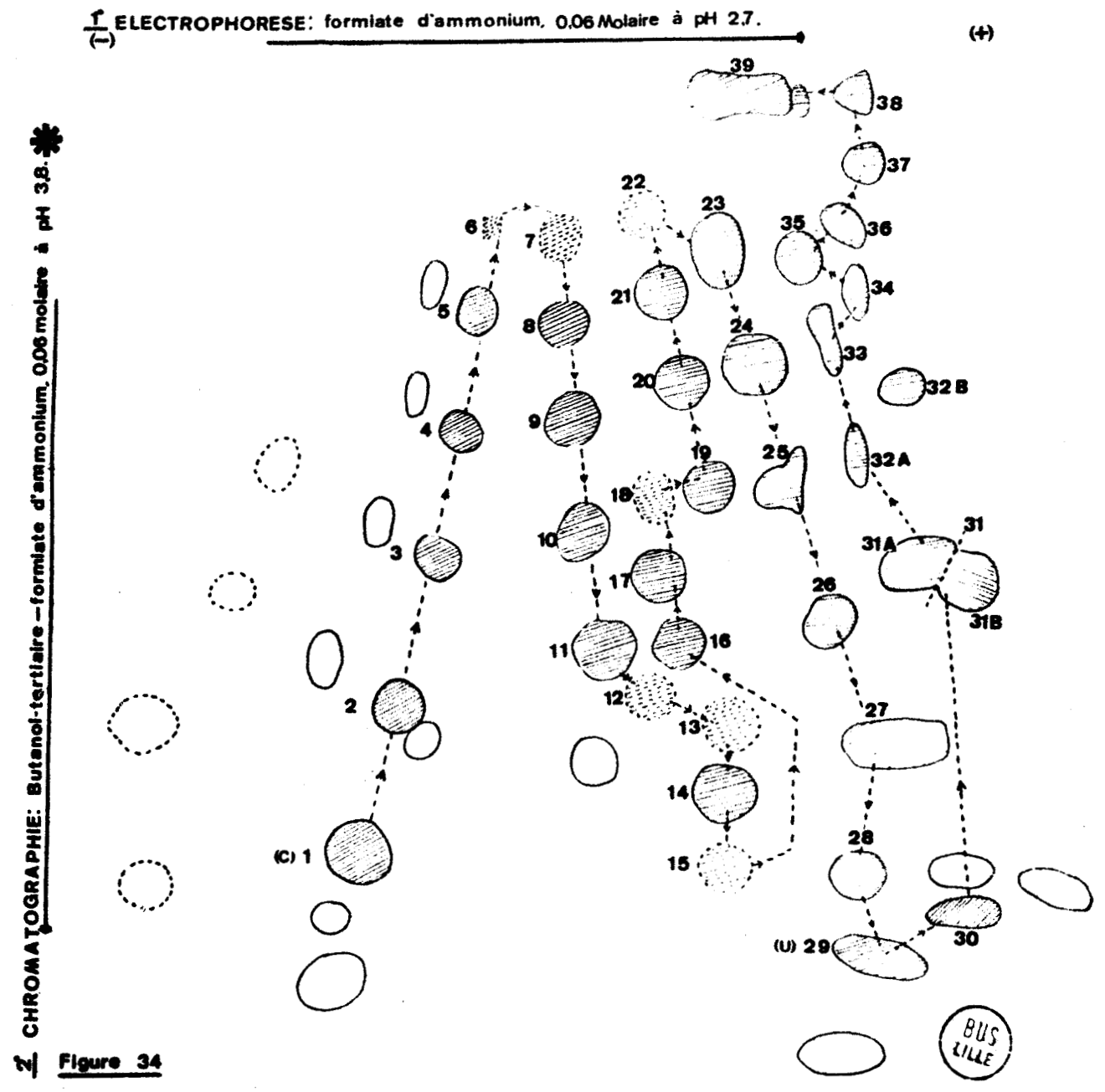


Figure 34

Figure-34: Diagramme de référence d'un 'finger print' d'hydrolysat ribonucléasique de foie de rat normal effectué dans les conditions standard: Eléctrophorèse- 6-7 heures à 1000 volts; Chromatographie descendante- butanol tertiaire / formiate d'ammonium 0,06M à pH=3,8 (1:1, 63h ou 87:63, 83h).

—— Présence de 39 fractions nucléotidiques majeures. Le spot 1 correspond à l'acide cytidylique (3'-), et le spot 29 à l'acide uridylique(3'-).

une proportion supérieure de butanol tertiaire. La proportion plus importante de phase organique permet d'obtenir, dans la zone des tri- et tétra nucléotides, des spots plus condensés. Le solvant est le suivant : butanol tertiaire - formiate d'ammonium 0,06 M, pH 3,8 (87 - 63). L'autoradiogramme obtenu, dans ces conditions, est montré à la figure 33. Il correspond à un dépot dont la radioactivité totale déposée est plus faible qu'à la figure 31. Cela nous permet de définir un diagramme standard faisant ressortir 39 fractions majeures. Nous avons schématisé, dans la figure 34, ce diagramme de référence que nous utiliserons par la suite dans nos études comparatives. Le spot 1 correspond à l'acide cytidylique et le spot 29 à l'acide uridylique. Des fractions mineures apparaissent dans certains cas ; nous ne les avons pas répertoriées, pour faciliter l'interprétation, et nous nous bornerons à les signaler au passage. La reproductibilité des séparations a été vérifiée sur un grand nombre de séparations, correspondant à plus de 10 hydrolysats ribonucléasiques de préparations différentes d'ARN de foie normal. Les diagrammes sont rigoureusement superposables.

Avant de décrire les résultats de nos études comparatives, il nous parait important de rassembler, sous forme schématique, le mode opératoire qui conditionne cette reproductibilité.

Schéma opératoire général

Le résidu sec provenant de la lyophilisation de l'hydrolysat ribonucléasique obtenu dans les conditions opératoires décrites à la page -184- est traité selon le mode opératoire décrit ci-dessous.

1 - Le résidu est repris par 200 µl HCl - 0,1 N. 10 µl sont complétés à 25 ml et on détermine la radioactivité et la concentration à 260 mµ.

les 190 µl résiduels sont complétés à x µl, pour obtenir une radioactivité de 1.000 c/mn/µl.

2 - On dépose 25 µl (25.000 c/mn - 250 µg), sur une feuille de papier d'Arches n° 304 ; le point de dépot est situé en un coin de la feuille,

respectivement à 6 et 10 cm des deux bords (la marge de 6 cm est réservée pour l'électrophorèse et celle de 10 cm pour la chromatographie).

3 - L'électrophorèse est effectuée dans une cuve en toit (modèle de MACHEBOEUF (687)), une goutte d'une solution saturée d'acide picrique étant déposée sur le bord de la feuille opposé au point de dépot. La migration est poursuivie, à 1 000 volts (20 volts/cm) jusqu'à ce que le repère d'acide picrique atteigne le tampon du compartiment anodique (de 6 à 7 heures). On sèche à l'air, puis pendant 6 heures à 37°C.

4 - La feuille est ensuite disposée dans une cuve de chromatographie descendante à 2 godets (64 x 56 x 24 cms). Il est indispensable de réserver 1 godet par feuille et de disposer le chromatogramme du côté de la paroi de la cuve.

Une nuit de saturation est, en outre, indispensable avant le début de la migration. La température doit être stabilisée à 19 - 20°C.

Avec le solvant butanol tertiaire - formiate d'ammonium 0,06 M pH = 3,8 (1 - 1), la migration est de 63 heures exactement. Pour le même solvant, dans les proportions 87 - 63, la migration est de 83 heures.

Les chromatogrammes sont ensuite séchés à l'air pendant 18 à 24 heures.

5 - On localise l'acide cytidylique à 260 mμ et on détermine sa radioactivité avec une sonde de Geiger. Pour x coups/mn de l'acide cytidylique, le temps d'exposition pour l'autoradiographie est déterminé par la formule empirique suivante :

$$t_{\text{jours}} = \frac{21.000}{x}$$

L'électrochromatogramme est ensuite disposé entre deux films KODAK (KODIREX monocouche - 45 x 45 cm) et abandonné à l'obscurité. Le premier film est révélé après t jours et le deuxième film après t + 7 jours.

III - APPLICATION A L'ETUDE COMPARATIVE DES PRODUITS D'HYDROLYSE PARTIELLE DES ARN NORMAUX ET CANCEREUX

Nous avons appliqué la technique d'analyse que nous venons de décrire 1) à l'étude des ARN de différentes fractions cytoplasmiques et 2) à la comparaison des ARN totaux du foie de rat normal et de l'hépatome ascitique. En fonction des résultats obtenus avec les différents solvants chromatographiques étudiés, nous avons vu (figures 31 et 33) que le solvant : butanol tertiaire - formiate d'ammonium (1 - 1) permettait d'obtenir plus de tâches que le même mélange, dans les proportions 87 - 63. Néanmoins, dans ce dernier cas, les spots, moins nombreux, étaient plus compacts et se prêtaient mieux à la détermination des radioactivités spécifiques.

Nous nous sommes limités à une étude purement qualitative, dans le cas des ARN des fractions cytoplasmiques ; nous avons donc choisi le mélange chromatographique dans les proportions 1 - 1. Par contre, nous avons tenté de caractériser des différences de radioactivité spécifique entre les ARN normaux et cancéreux ; c'est la raison pour laquelle nous avons utilisé, dans ce cas, le solvant dans les proportions 87 - 63.

A - ETUDE DES PRODUITS D'HYDROLYSE PARTIELLE DES ARN DES FRACTIONS CYTOPLASMIQUES

Parallèlement aux travaux concernant les variations de composition qualitative des ARN d'origine nucléaire (voir à la page -169-) nous avons étudié les produits de l'hydrolyse ribonucléasique des différentes fractions d'ARN obtenues à partir des noyaux (voir mode opératoire à la page-184-). Les produits d'hydrolyse partielle des ARN, extraits par la guanidine, à partir des noyaux totaux, des noyaux résiduels, de la fraction "ribosomes nucléaires" et de la fraction ARN - type messager ont été comparés entre eux et avec les ARN des autres fractions cytoplasmiques.

Un homogénat de foies de rat est soumis à un fractionnement complet, selon la méthode de SCHNEIDER et HOGEBOOM (688). Les fractions noyaux, mitochondries, microsomes et précipité pH = 5 sont extraits par la guanidine et les préparations sont hydrolysées par la ribonucléase pancréatique dans les conditions précédemment décrites (page -184-). Les figures 35 à 38 rassemblent les résultats fournis par les extraits des quatre fractions totales : Noyaux, mitochondries, "microsome" et précipité pH = 5.

Par rapport au diagramme obtenu à partir du tissu total (figure 31), la répartition des différents spots supplémentaires (cerclés sur la figure 31) apparait nettement. L'extrait mitochondrial ne présente pas de spots caractéristiques, hormis un faible spot dont la migration chromatographique est supérieure à celle de l'acide cytidylique. La fraction microsome est également très "classique" ; elle possède seulement deux spots supplémentaires en dessous de C (1) et de U (29). Du point de vue de la composition en oligonucléotides, les fractions mitochondriale et microsomale sont apparemment identiques.

En outre des caractéristiques importantes apparaissent dans le cas des fractions pH = 5 et noyau total. La fraction pH = 5 (figure 38) possède tous les spots supplémentaires caractérisés dans le tissu total. Cependant, les spots 17 et 28 ne sont pas décelables dans les noyaux totaux (figure 35). Ces fractions particulières pourraient donc correspondre à une classe d'ARN qui se trouve présente à la fois dans le noyau et dans la fraction soluble.

Cette hypothèse s'est trouvée renforcée par les résultats obtenus à partir des fractions diffusibles du noyau total, en relation avec les travaux de DEFERT et al. (689). La figure 39 correspond à la fraction diffusible (*), après une heure de marquage in vivo, et la figure 40 aux noyaux résiduels. Dans la figure 37, qui concerne les ribosomes

(*) Dans le cas de la fraction diffusible du noyau, l'extraction par la guanidine est effectuée après dialyse et lyophilisation ; ces opérations sont nécessaires pour éliminer le saccharose avant l'extraction.

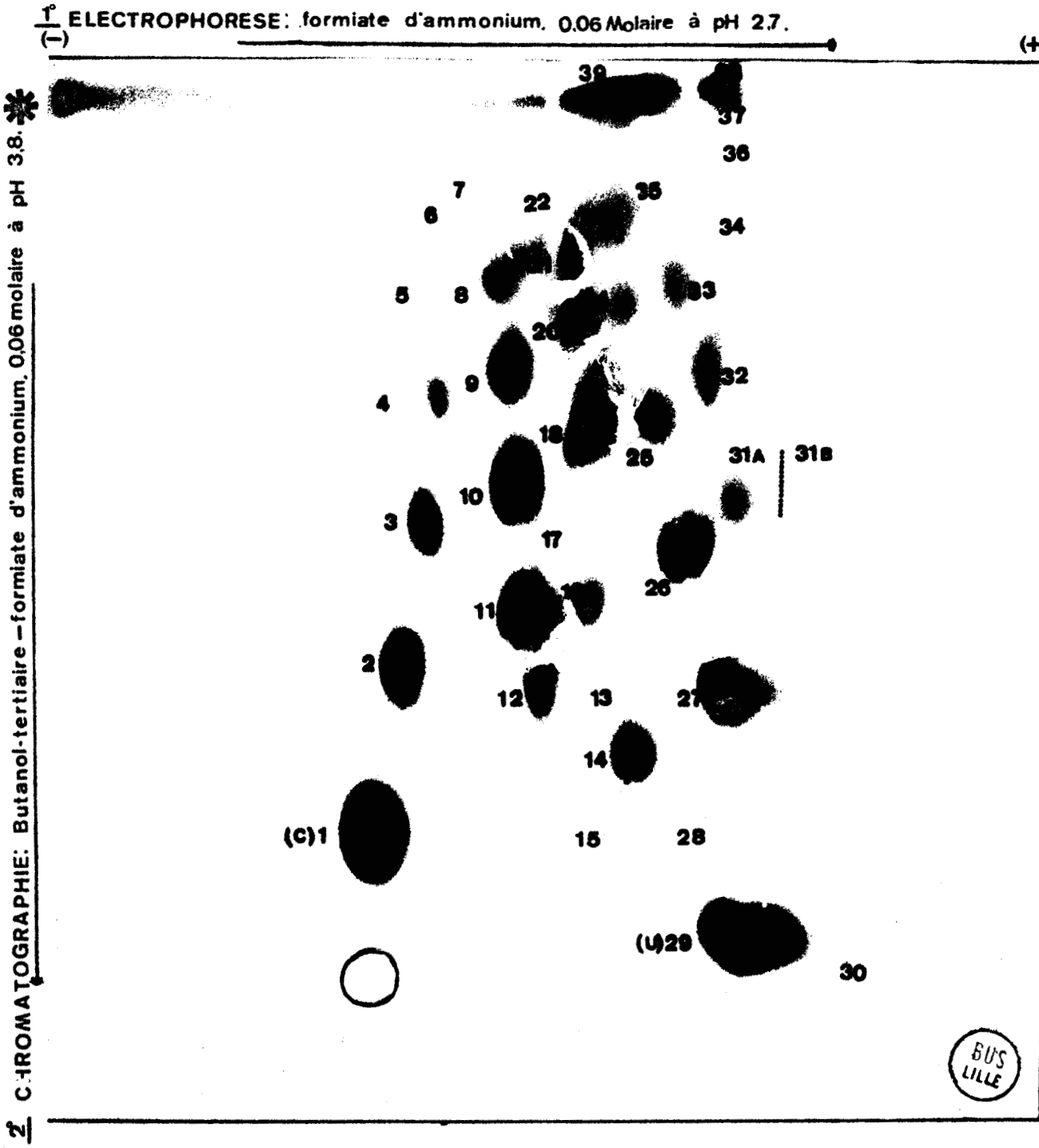


Figure-36: 'Finger print' d'hydrolysat ribonucléasique: -fraction mitochondriale.

———Une tache supplémentaire au dessous de l'acide cytidylique.

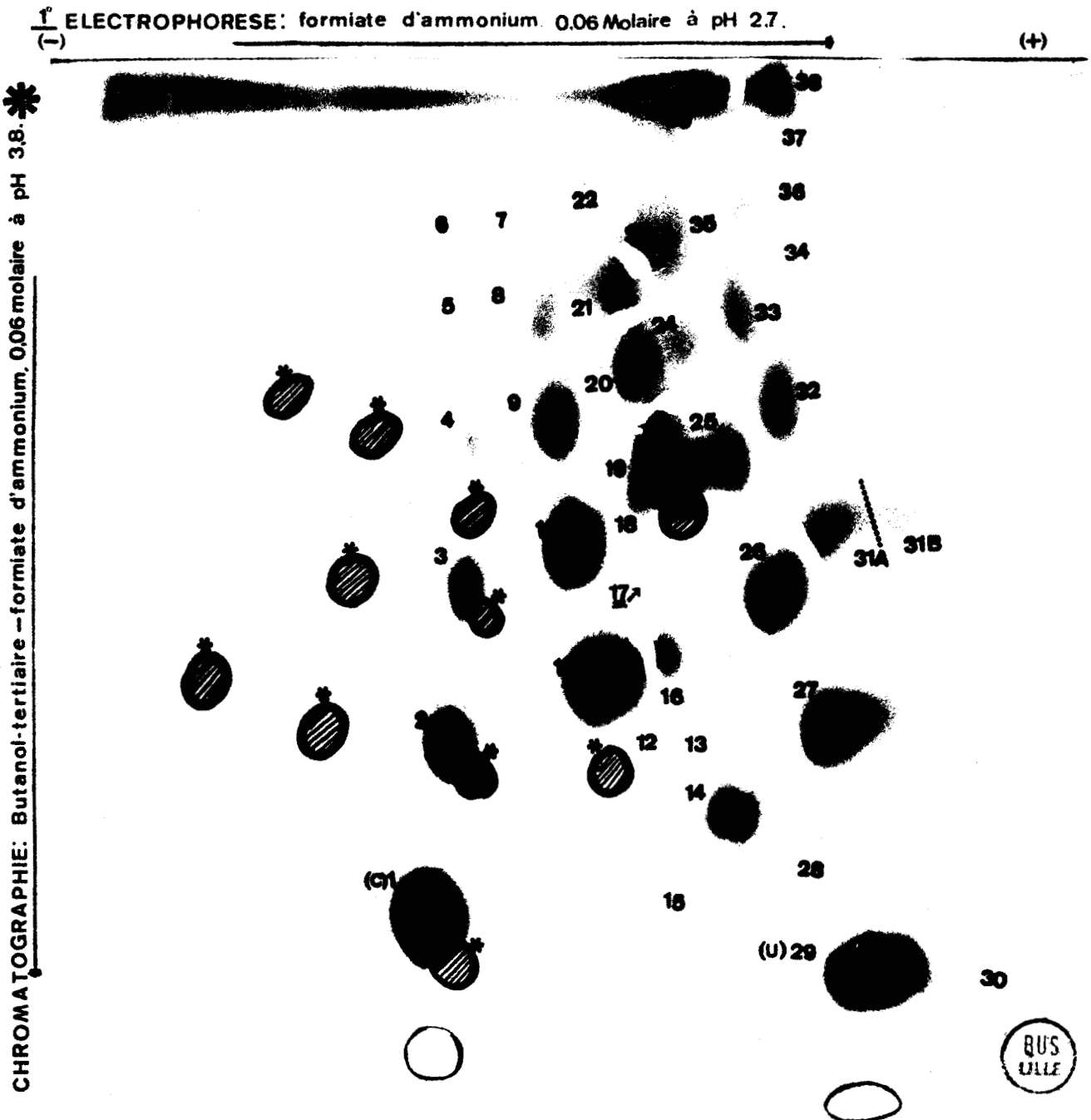


Figure-37: 'Finger print' d'hydrolysat ribonucléasique: -fraction ribosomale cytoplasmique.

—— Deux taches supplémentaires au dessous des acides cytidylique et uridylique.

Spots supplémentaires (hachurés)* appartenant à la fraction des "ribosomes nucléares".

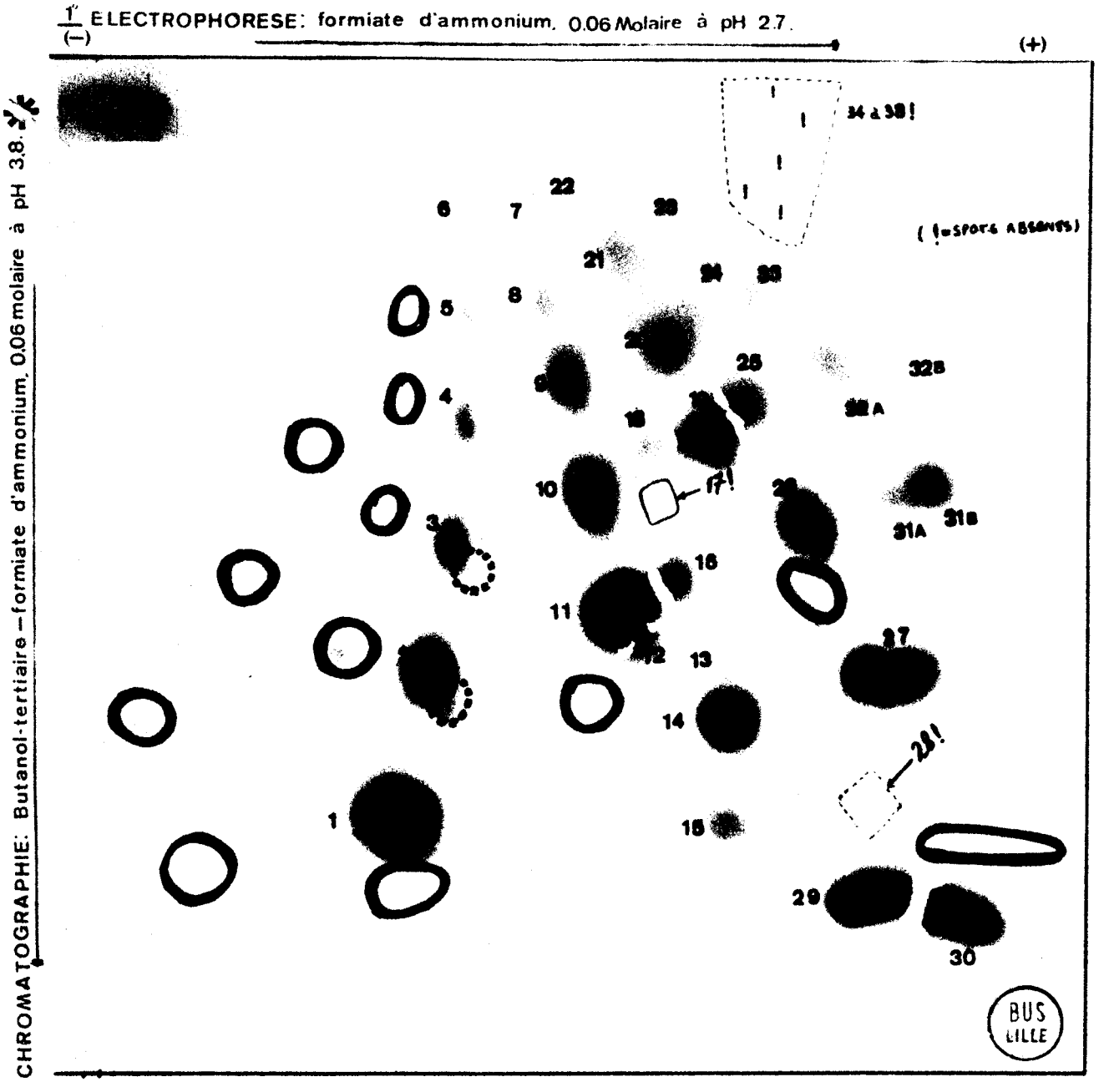


Figure-35 : 'Finger print' d'hydrolysat ribonucléasique: -fraction noyau total.

—— Spots 17 et 28 non décelables.

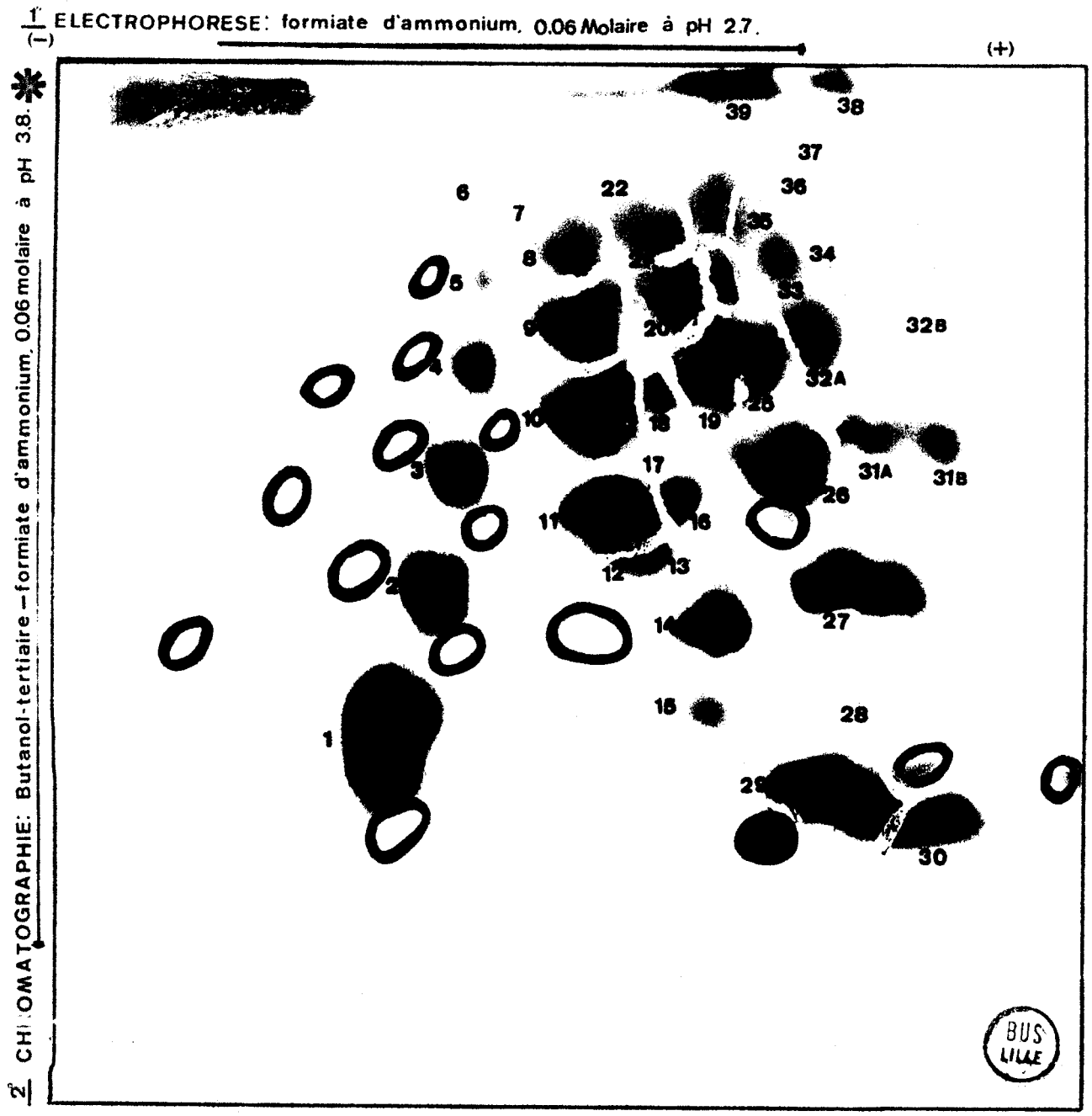


Figure-38: 'Finger print' d'hydrolysat ribonucléasique: -précipité pH=5.

——— Présence de tous les spots supplémentaires -caractéristiques de l'acide ribonucléique du tissu total (voir figure-31, p.198).

cytoplasmiques, nous avons indiqué les spots supplémentaires (hachurés) obtenus dans le cas de la fraction "ribosomes nucléaires".

La fraction "ARN type messager" (figure 39) contient les différents spots supplémentaires qui sont présents à la fois dans le noyau total et la fraction pH = 5. En outre, cette fraction se caractérise par l'absence totale des oligonucléotides supérieurs correspondant aux spots 21 à 25 et 27 à 39. Cette fraction d'ARN micromoléculaire ne libère donc pas de polynucléotides supérieurs par hydrolyse ribonucléasique ; l'hydrolysat est composé d'un "core" résistant et d'oligonucléotides de faible poids moléculaire. Il s'agit là d'une caractéristique particulière à cette famille d'ARN. La fraction "ribosomes nucléaires" présente la composition "classique" de la fraction microsome, en possédant, en outre, un certain nombre des fractions supplémentaires existant également dans la fraction "ARN type messager". Le noyau résiduel (figure 40) a perdu, après 4 heures de diffusion, d'une part les spots supplémentaires caractéristiques des "ARN type messager" (dont il ne subsiste plus que des traces) et, d'autre part, les oligonucléotides supérieurs (spots 5 à 9, 20 à 25 et 32 à 39) qui sont caractéristiques des ARN de type ribosomal.

Ces résultats ne permettent cependant pas d'admettre, de façon définitive, que tous les spots supplémentaires caractéristiques des noyaux correspondent aux ARN de type messager qui se retrouvent à l'état libre dans la fraction cytoplasmique soluble. En effet, les travaux de DEFERT et al. (690) ont montré que ces fractions diffusibles ne sont pas pures. Il n'est pas possible d'expliquer actuellement l'origine des spots supplémentaires caractérisés dans la fraction "ribosomes nucléaires" : proviennent-ils d'une différence moléculaire entre les ARN des ribosomes nucléaires et ceux des ribosomes cytoplasmiques, ou de la présence d'ARN type messager accompagnant les ribosomes nucléaires ?. On ne peut, en outre, exclure a priori l'existence de particules du type "informosome" qui résulteraient d'une association d'ARN macromoléculaire de type ribosomal avec des ARN de type messager, porteurs d'informations génétiques.

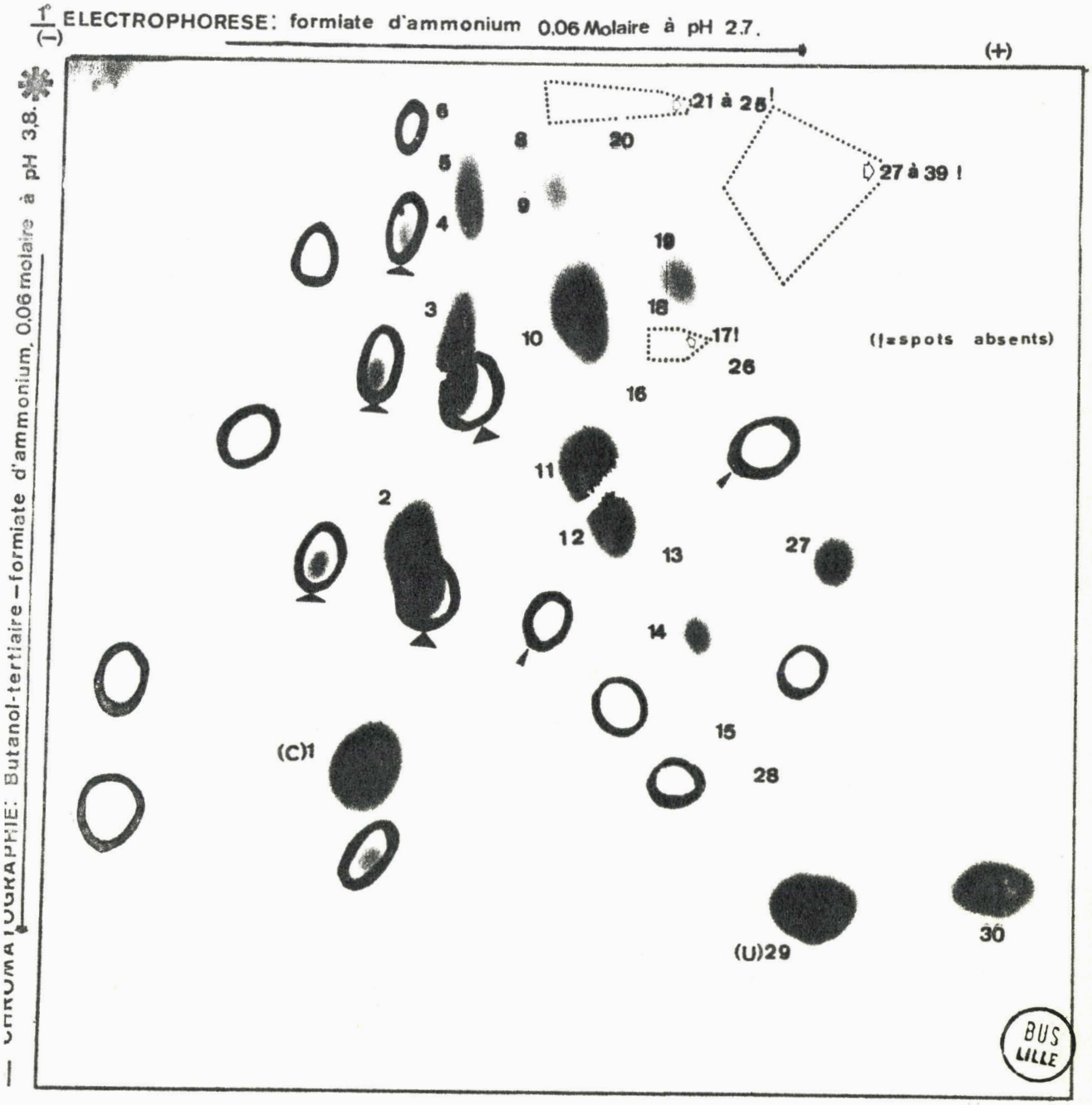


Figure-39: 'Finger print' d'hydrolysat ribonucléasique: -fraction d'ARN type messager.

-----Incorporation de ^{32}P de 1 heure. Présence importante de spots supplémentaires. Absence des oligonucléotides majeurs.

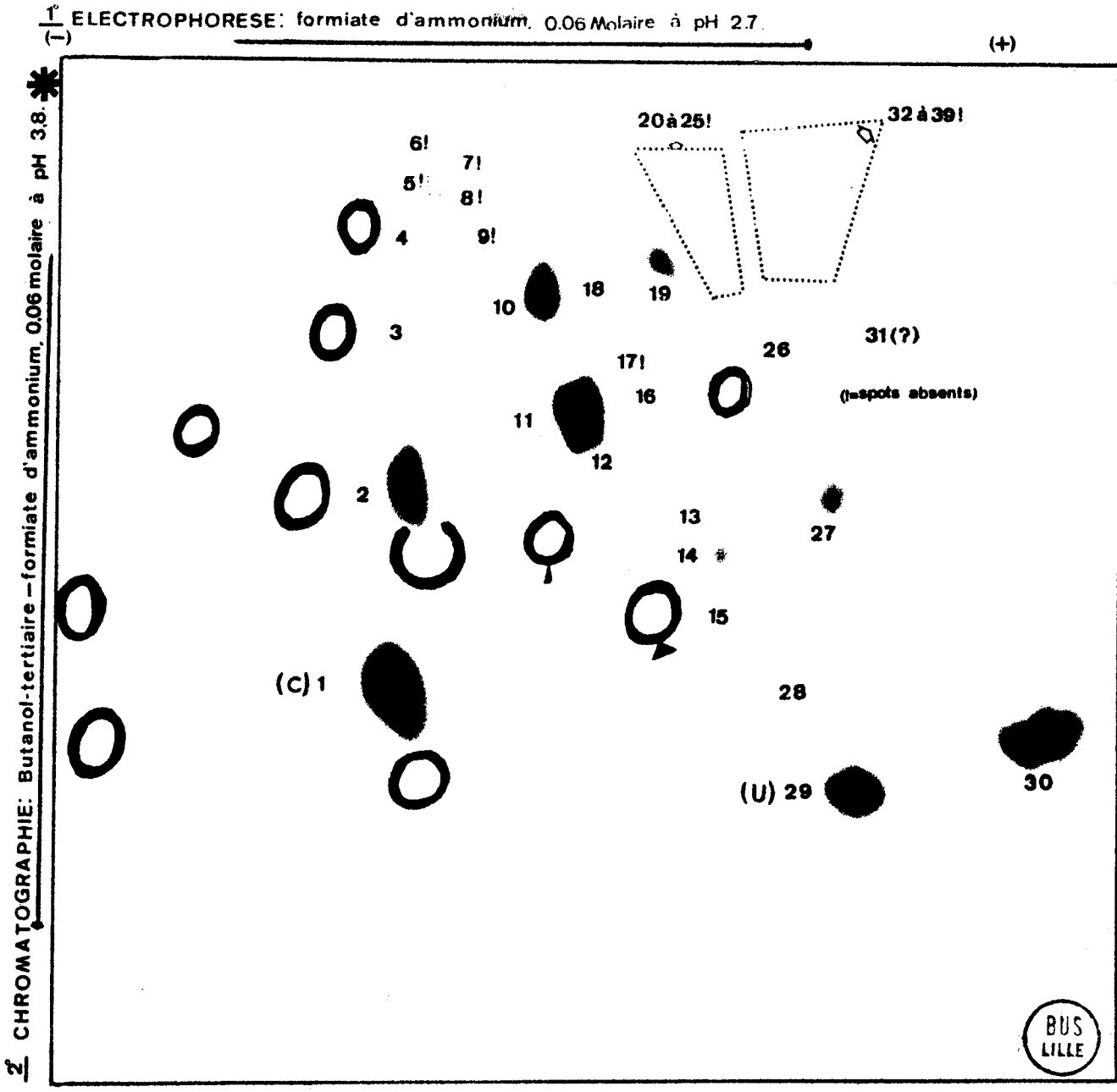


Figure-40: 'Finger print' d'hydrolysat ribonucléasique: -fraction noyau résiduel après diffusion.

---Diminution importante de l'intensité des spots supplémentaires. Disparition complète des oligonucléotides majeurs.

Ces résultats préliminaires obtenus en collaboration étroite avec DEFERT et al. (691), constitue un exemple d'application des techniques que nous avons mises au point. Nous souhaitons que leur exploitation systématique conduise à des résultats fructueux, sur ce programme de recherche qui est actuellement en cours au laboratoire ; il fait l'objet du travail de thèse de Madame DEFERT.

Parallèlement à ce travail d'équipe, nous avons effectué, dans la ligne de recherche que nous nous étions fixés, une étude comparative des hydrolysats d'ARN du foie normal et de l'hépatome ascitique.

B - COMPARAISON DES PRODUITS D'HYDROLYSE PARTIELLE D'ARN NORMAUX ET CANCEREUX

Les préparations d'ARN obtenues par la méthode à la guanidine, à partir du foie de rat normal et de l'hépatome ascitique de Zedjdela ont été hydrolysées par la ribonucléase dans les conditions standard précédemment décrites. Les hydrolysats partiels ont été analysés, selon le schéma opératoire décrit à la page-202 . Après une série d'études comparatives avec les solvants chromatographiques de RUSHIZKY et KNIGHT : butanol tertiaire formiate d'ammonium, dans les proportions 1 - 1 (solvant n° 1) et 87 - 63 (solvant n° 2), nous avons finalement opté pour le solvant n° 2. Dans le cas de préparations d'ARN totaux, ce système solvant fournit des spots plus condensés qui se prêtent mieux aux études quantitatives.

1 - Comparaison qualitative

Les figures 41 et 42 fournissent les séparations obtenues respectivement à partir des ARN du foie normal et de l'hépatome ascitique. La figure 43 correspond au mélange des deux préparations. Comme on peut

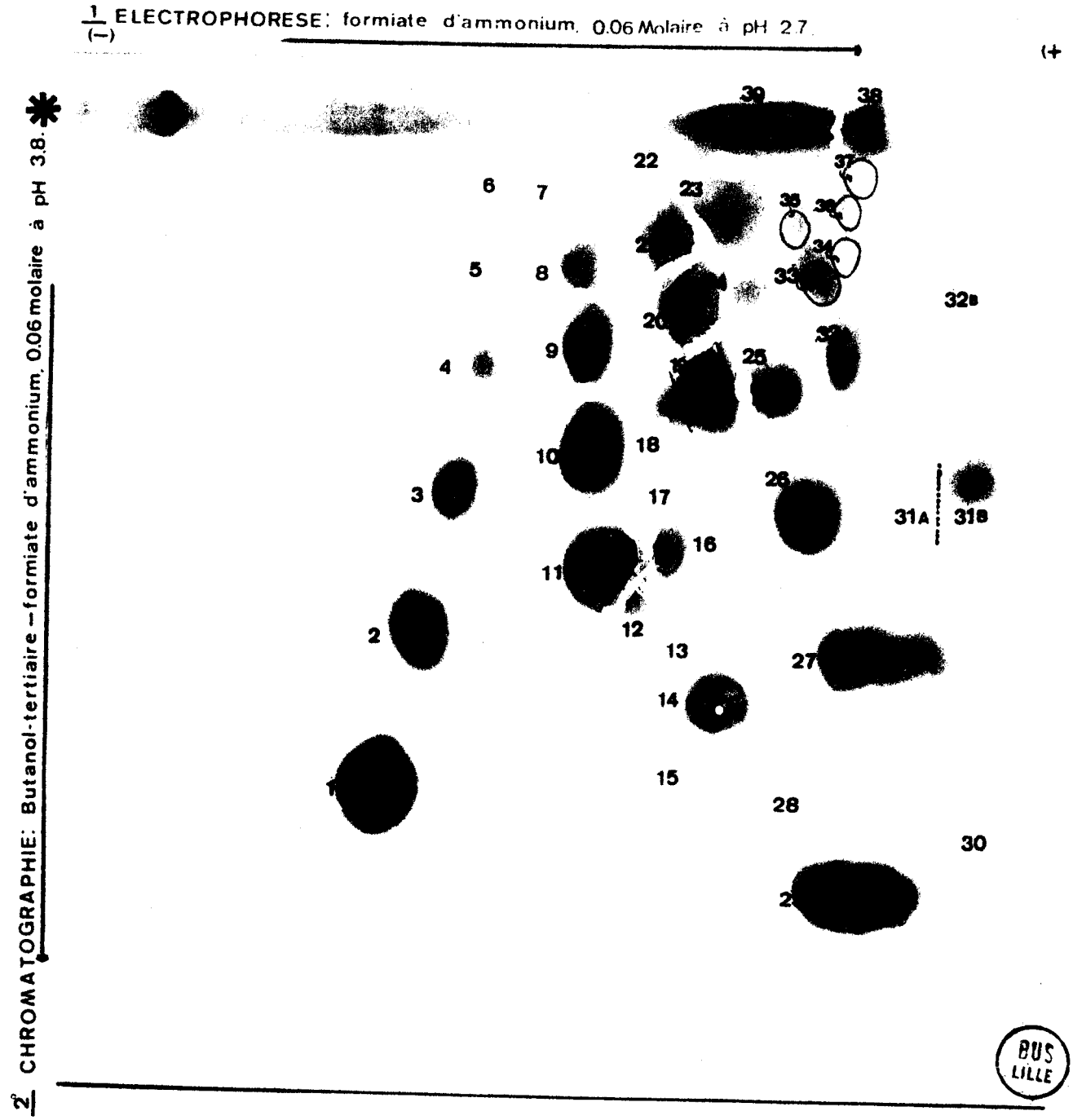


Figure-41: 'Finger print' d'hydrolysat ribonucléasique:
-<u>foie de rat normal</u>.

---Dépôt de ^{32}P -nucléotique identique à celui du 'finger print' des cellules ascitiques (figure-42).

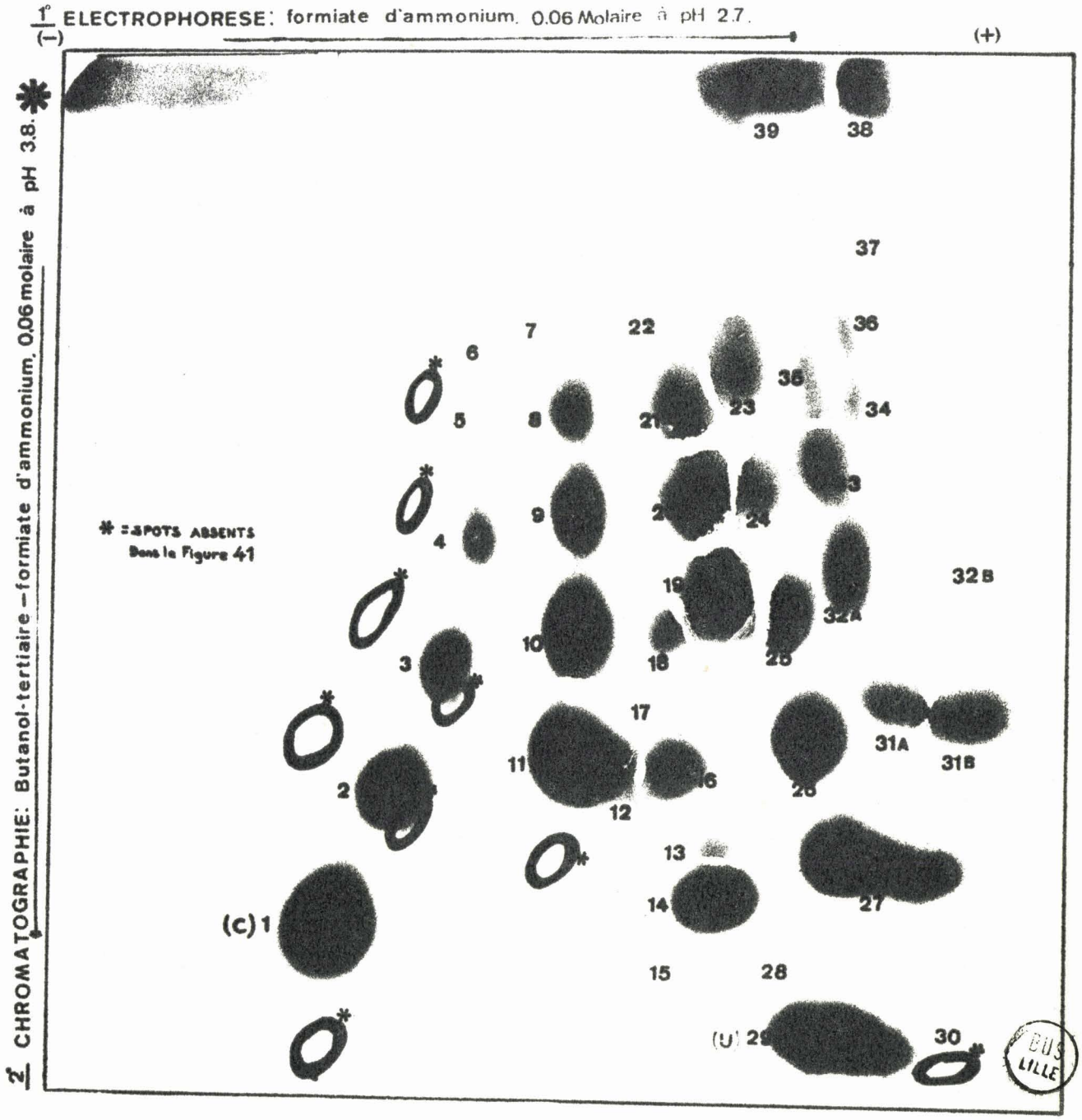


Figure-42: 'Finger print' d'hydrolysat ribonucléasique:
-Hépatome ascitique de Zedjdela.

---Présence importante de spots supplémentaires sans disparition des oligonucléotides majeurs .

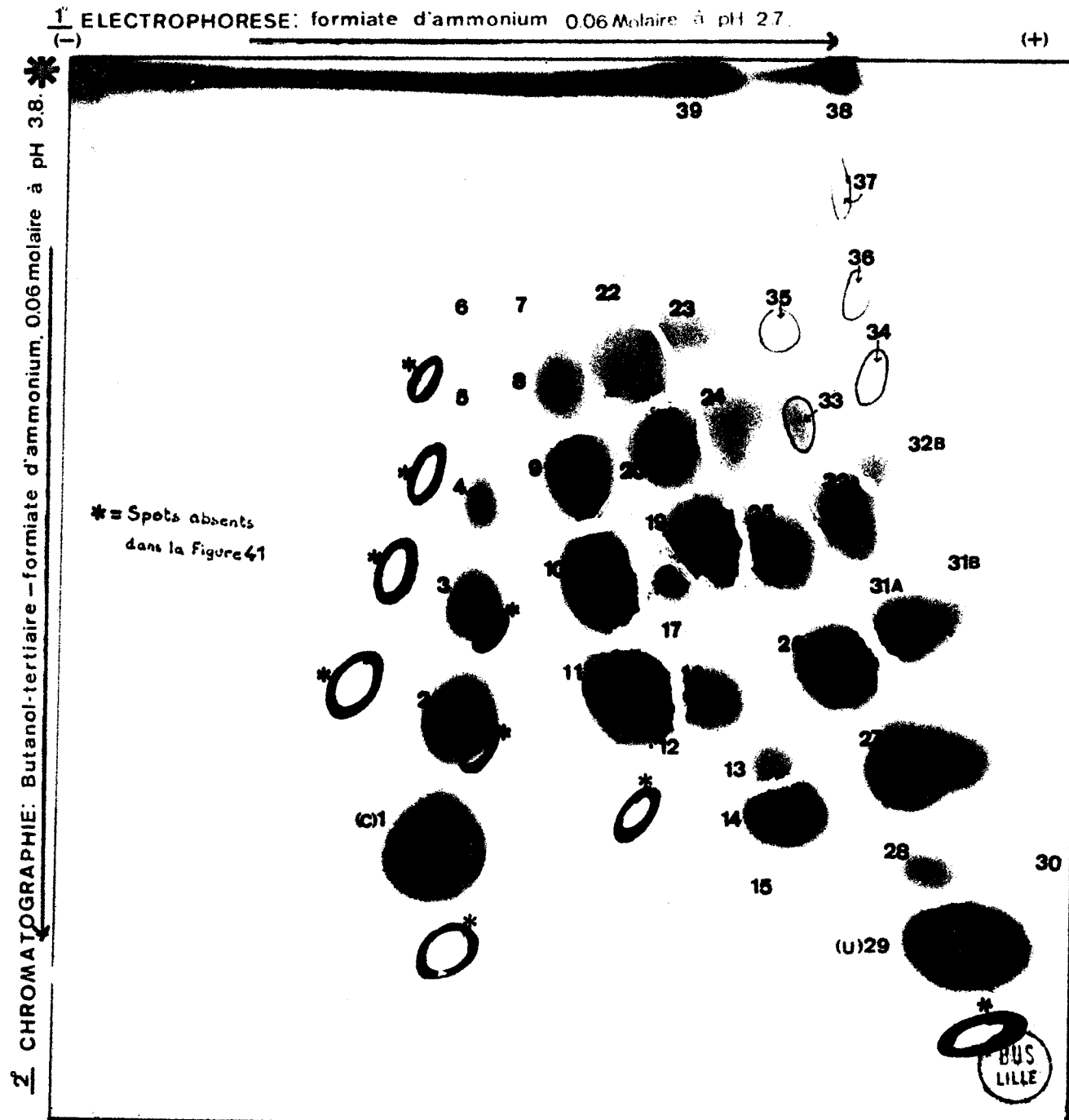


Figure-43: 'Finger print' d'hydrolysat ribonucléasique: mélange d'ARN-foie de rat + cellules ascitiques.

TABLEAU - Y

COMPARAISON DES RADIOACTIVITES SPECIFIQUES (*) DES OLIGONUCLEOTIDES PROVENANT DES ARN DU FOIE NORMAL ET DES CELLULES ASCITIQUES

Fractions (Fig. 34)	Radioactivité spécifique- N Foie Normal	Radioactivité spécifique- A Cellules ascitiques	Δ_{p100} (xx)
3	2.160	1.870	+ 13
5	4.840	2.840	+ 41
8	2.230	1.810	+ 19
9	2.150	1.710	+ 20
10	2.060	1.760	+ 15
12	2.620	2.320	+ 11
14	2.190	2.850	- 30
15	1.510	1.190	+ 21
16	2.150	2.420	- 21
17	2.820	1.040	+ 63
19	1.760	1.400	+ 19
20	2.200	1.870	+ 15
21	2.270	1.530	+ 33
22	1.770	2.530	- 42
23	2.110	1.820	+ 14
24	2.490	2.040	+ 18
25	2.120	1.520	+ 39
27	1.810	1.540	+ 15
28	1.240	1.510	- 22
31/A	1.720	1.930	- 12
31/B	1.670	1.940	- 16
32	1.930	1.720	- 11
33	2.230	1.910	+ 14
34	2.880	1.950	+ 32
35	2.690	1.800	+ 33
36	2.690	2.100	+ 22
37	3.320	2.090	+ 37
38	2.360	1.550	+ 34
39	1.860	1.450	+ 22

(*) Les radioactivités spécifiques sont exprimées en coup/mn/unité d'absorbance à 260 mμ

(xx) $\Delta_{p\cdot 100} = \frac{(N-A) \times 100}{N}$ exprime le pourcentage de variation de la radioactivité spécifique du foie normal par rapport aux cellules ascitiques.

le constater il n'existe pas de différences qualitatives importantes dans la composition en oligonucléotides des ARN normaux et cancéreux. Cependant, comme le montre la figure 42, pour des doses de radioactivité globale identiques, les oligonucléotides supplémentaires de comportement cathodique, caractéristiques de la fraction nucléaire et de la fraction pH = 5 (voir figures 35 et 38) présentent un marquage supérieur dans le cas des ARN cancéreux. Ces différences peuvent s'expliquer par la différence d'activité métabolique bien connue qui existe entre les ARN normaux et cancéreux. Cependant, en nous inspirant des travaux de TYNDALL et al. (692), nous avons comparé les radioactivités spécifiques des différents oligonucléotides fournis par les ARN normaux et cancéreux.

2 - Comparaison quantitative

Plusieurs électrochromatogrammes, effectués dans les conditions standard, sont révélés par observation à 260 mu. Les spots majeurs, numérotés de 1 à 39, sont découpés et la radioactivité est déterminée pour chacun d'eux. On élue ensuite par 5 ml d'HCl 0,1 N, à 20°C pendant 24 heures, et on détermine l'absorbeance à 260 mu. La radioactivité spécifique est exprimée en coups/mn/unité d'absorbance à 260 mu.

Le tableau Y rassemble les valeurs concernant les fractions dont les radioactivités sont différentes de l'état normal à l'état cancéreux. Comme on peut le constater 29 fractions sur 39 présentent des différences significatives ; 22 fractions possèdent une radioactivité supérieure, dans le cas du foie normal, et 7 fractions sont plus fortement marquées dans les cellules ascitiques. Ces résultats peuvent être le signe d'une différence de distribution des segments nucléotidiques, en tenant compte du fait qu'après 24 heures de marquage in vivo la distribution du phosphore dans les ARN est devenue uniforme, selon la théorie de YCAS et VINCENT (693). Il est cependant très important de considérer que le marquage s'effectue in vivo, d'une part dans le foie organisé et, d'autre part, dans les cellules ascitiques en suspension ; les conditions biologiques du marquage sont donc très différentes et l'incorporation du phosphore, dans le tissu

et dans les cellules libres, peut expliquer ces variations des radioactivités spécifiques. Ces dernières peuvent également provenir de la différence d'activité métabolique bien connue qui existe entre les ARN normaux et cancéreux. Nous n'accorderons donc pas à ces résultats une valeur définitive et nous entreprenons, actuellement, une étude quantitative plus poussée de ces préparations, par élution des tâches, dosage en ultra-violet et détermination des séquences de chaque fragment nucléotidique. Ces travaux permettront de déterminer, de façon précise la distribution quantitative des différents segments nucléotidiques, par rapport aux mononucléotides libérés. Les travaux de MIURA (694) ont, en outre, permis d'établir, récemment, une technique rigoureuse d'étude de la distribution des mononucléotides dans les oligonucléotides libérés. Cette détermination permet de mettre en évidence des variations significatives entre les ARN de diverses origines. Ce nouveau programme de travail, actuellement en cours, nous permettra peut-être de caractériser des différences structurales fondamentales entre les ARN de ces deux origines.

Nous pouvons donc conclure, à partir de nos résultats actuels, qu'il ne parait pas possible de caractériser directement, dans les hydrolysats ribonucléasiques, des séquences nucléotidiques caractéristiques des ARN cancéreux. Ce travail nous a paru, à certains égards, décevant car il ne permet pas de confirmer, d'emblée, l'hypothèse fondamentale que nous avions posée à l'origine de notre expérimentation. Nous pouvons, cependant, en guise de conclusions générales, retirer de nos résultats un certain nombre d'enseignements fructueux.

C O N C L U S I O N S G E N E R A L E S

1 – Le principe de la caractérisation d'ARN anormaux, caractéristiques de l'état cancéreux, nous a posé, d'emblée, le problème de l'extraction quantitative d'ARN macromoléculaires, purs et intacts. Une étude critique de différentes méthodes classiques d'extraction des ARN du tissu total nous a conduit :

a – à proposer une modification de la technique classique de SCHMIDT et THANNHAUSER, qui permet d'éviter au maximum les pertes d'ARN au cours de la délipidation. Cette méthode modifiée est parfaitement applicable à la détermination des compositions nucléotidiques des ARN tissulaires totaux.

b – à décrire, à partir des travaux de COX et ARNSTEIN, une méthode générale d'extraction quantitative des ARN, applicable à la fois aux tissus et aux fractions cytoplasmiques. Cette technique d'extraction par la guanidine fournit, avec un rendement optimum, des préparations pures d'ARN, exemptes des contaminations phosphorylées caractéristiques des méthodes à l'acide trichloracétique.

L'étude, poussée des conditions de délipidation nous a, en outre, conduit à confirmer l'existence d'une fraction d'ARN entrainée par les lipides. Une étude plus poussée de cette fraction pourrait permettre de faire progresser le problème de l'existence d'ARN liés aux lipides, dont l'importance métabolique serait fondamentale.

2 – L'étude de la composition qualitative des hydrolysats totaux d'ARN, nous a conduit à définir des conditions rigoureusement standardisées d'analyse électrochromatographique ; l'autoradiographie permet d'atteindre une sensibilité très poussée. L'application de cette technique à la

détermination de la composition qualitative des ARN obtenus par les différentes méthodes d'extraction que nous avons étudiées, permet de caractériser, dans tous les cas, 16 dérivés nucléotidiques. Les ARN normaux et cancéreux présentent la même composition globale. Ces différents composés, dont nous effectuons actuellement l'identification, correspondent aux nucléotides mineurs présents dans les ARN. Une comparaison quantitative, impliquant l'élution et le dosage de ces dérivés, pourrait nous permettre de confirmer, ultérieurement, des variations caractéristiques de l'état cancéreux. La caractérisation de traces d'oligonucléotides alcali-résistants pose, en outre, le problème de leur nature. En dépit de la difficulté technique, l'étude de leur composition et de leurs variations quantitatives de l'état normal à l'état cancéreux nous parait digne d'intérêt. A la lumière des connaissances actuelles dans ce domaine, nous pouvons, en effet, poser l'hypothèse de l'existence de segments nucléotidiques tout à fait particuliers, dont l'importance structurale serait fondamentale. Ces fractions sont présentes dans les extraits trichloracétiques et pourraient présenter une relation importante avec les dérivés d'origine lipidique qui accompagnent ces extraits.

3 - Le problème de la recherche de séquences nucléotidiques anormales dans les ARN cancéreux, nous a conduit également à une mise au point technique. Nous avons décrit une technique d'électrochromatographie, inspirée des travaux de RUSHIZKY et KNIGHT. L'autoradiographie permet, dans des conditions de séparation rigoureusement standardisées, de caractériser plus de 40 oligonucléotides présents dans les hydrolysats ribonucléasiques des ARN tissulaires totaux. Nos résultats montrent qu'il n'est pas possible de caractériser directement des séquences nucléotidiques caractéristiques de l'état cancéreux. Nous poursuivons actuellement nos recherches, dans ce domaine, selon plusieurs orientations complémentaires:

a - effectuer une étude quantitative et structurale des différents oligonucléotides que nous avons caractérisés, en appliquant, après isolement, les techniques classiques de détermination des séquences nucléotidiques

(nucléotides 3' et 5' terminaux ; hydrolyses sélectives et récurrentes, par les voies enzymatique et chimique).

b - entreprendre une étude comparative identique sur les fractions cytoplasmiques normales et cancéreuses. Nos travaux effectués sur ces substrats, en relation avec W.DEFERT, démontrent l'intérêt de ce programme.

c - entreprendre des travaux similaires au moyen de ribonucléases possédant une spécificité d'action différente et (notamment la RNase T_1).

La récente technique d'hydrolyse spécifique décrite par GILHAM (695) pourrait également présenter un grand intérêt, dans ce cas. Cette méthode associe une action chimique à une action enzymatique. L'ARN est traité, dans un premier temps, avec le N - toluène sulfonate de cyclohexyl - N - méthylmorpholino - éthylcarbodi-imide qui réagit uniquement sur l'uracile ; l'ARN, ainsi modifié sélectivement, au niveau des résidus d'acide uridylique, libère, par action de la ribonucléase, uniquement des oligonucléotides C terminaux. De même, à la suite des travaux de ZILLIG et al. (696), l'association d'une réaction par l'hydroxylamine (qui agit au niveau de C et de U) avec l'hydrolyse enzymatique peut constituer un type d'expérimentation comparative intéressant.

d - envisager, enfin, une étude comparative des fractions résistant à l'hydrolyse ribonucléasique. Des travaux, actuellement en cours, sur le fractionnement par chromatographie de gel filtration sur Séphadex, permettent d'envisager une étude comparative du "CORE" obtenu dans le cas des ARN normaux et cancéreux. Ce travail portera, à la fois, sur une étude chimique et sur la recherche de variations d'activité métabolique.

Loin de clore un chapitre, nos travaux ouvrent donc le champ à de vastes expérimentations. Nos résultats ne nous ont pas permis, jusqu' alors, de confirmer l'existence d'ARN caractéristiques de l'état cancéreux. Loin d'infirmer cette hypothèse nous poursuivons notre travail, en ayant

conscience de n'avoir pas exploité, encore, les outils que nous nous sommes forgés. Parallélement à cette orientation personnelle de travail, nous souhaitons que les techniques mises au point se révèlent très efficaces dans d'autres domaines. Le travail d'équipe, poursuivi au laboratoire sur les ARN nucléaires et nous avons indiqué les résultats préliminaires, parait, à cet égard, très prometteur.

Nos résultats ont fait l'objet de 2 communications (697, 698) et de 4 notes et mémoires (699, 700, 701, 702).

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE
Section de SCIENCES
LILLE

BIBLIOGRAPHIE

A

ALBERT, A. et BROWN, D.J.,
J. Chem. Soc., 1956, p.2060 (388)

ALLEN, R.J.L.,
Biochem. J., 1940, 34, 858 (448, 501, 511 et 527)

ALLEN, F.W.,
"Ribonucleoproteins and Ribonucleic Acids", 1962,
Elsevier Publ. Co., Amsterdam & New York (136)

ALLFREY, V.G. et MIRSKY, A.E.,
Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.), 1962, 48, 590 (427)

ALTMANN, R.,
Archiv. für Anatomie und Physiologie, 1889, p.524 (3 et 125)

ANDERSON, N.G., GREEN, G.J., BARBER, M.L. et LADD, Sr., F.C.,
Anal. Biochem., 1963, 6, 153 (417)

ANDERSON, N.G. et LADD, Sr., F.C.,
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 55, 275 (417)

ANDOH, T., NATORI, S. et MIZUNO, D.,
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 76, 477 (432)

ANNAU, E.,
Cand. J. Biochem. Physiol., 1954, 32, 178 (311)

ARMSTRONG, A., HAGOPIAN, H., INGRAM, V.M., SJOQUIST, I. et SJOQUIST, J.,
Biochem., (U.S.), 1964, 3, 1194 (680)

ARNSTEIN, H.R.V., COX, R.A. et HUNT, J.A.,
Biochem. J., 1964, 92, 648 (261)

ARONSON, A.I.,
J. Mol. Biol., 1962, 5, 453 ;
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 72, 176 (643)

AUBEL-SADRON, G., BECK, G., EBEL, J.P. et SADRON, C.,
Biochim. Biophys. Acta, 1960, 42, 542 (240)

B

BACHER, J.E. et ALLEN, F.W.,
J. Biol. Chem., 1950, 183, 641 (60)

BACHER, J.E. et KAUZMANN, W.J.,
J. Am. Chem. Soc., 1952, 74, 3779 (295)

BADER-HIRSCH, A.M., SEWSENBRENNER, M. et MANDEL, P.,
Bull. Soc. Chim. Biol., 1964, 46, 495 (490)

BANDURSKI, R.S. et AXELORD, B.,
J. Biol. Chem., 1951, 193, 405 (536)

BATES, H.M., CRADDOCK, V.M. et SIMPSON, M.V.,
J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 1000 (17)

BAUMANN, E.J.,
J. Biol. Chem., 1918, 33, XIV ;
J. Biol. Chem., 1924, 61, 1 (133)

BAWDEN, F.C. et PIRIE, N.W.,
Biochem. J., 1940, 34, 1278 (205)

BEAVEN, G.H., HOLIDAY, E.R. et JOHNSON, E.A.,
In "Nucleic Acids", 1955, 1, 493
eds : CHARGAFF, E. & DAVIDSON, J.N.,
Acad. Press, New York. (529, 532 et 592)

BENDETSKII, K.M. et SHADMANOV, R.K.,
Biochem., U.S.S.R., (traduction en anglais Biokhimya),
1964, 29, 380 (480)

BERENBLUM, I. et CHAIN, E.,
Biochem. J., 1938, 32, 286 et 295 (506)

BERG, P., LAGERKVIST, U. et DIECKMANN, M.,
J. Mol. Biol., 1962, 5, 159 (30)

BERGQUIST, P.L. et SCOTT, J.F.,
Biochim. Biophys. Acta, 1964, 87, 199 ;
(J. Chromatog., 1965, 19, 615) (649 et 686)

BERNLOHR, R.W. et WEBSTER, G.C.,

J. Bacteriol., 1958, 76, 233 (322)

BIELESKI, R.L.

Anal. Biochem., 1965, 12, 230 (476)

BISERTE, G.,

Biochim. Biophys. Acta, 1950, 32, 601 (684 et 687)

BISERTE, G., BOULANGER, P. et PAYSANT, P.,

Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, 40, 2079 (558 et 579)

BOEDTKER, H.,

Biochim. Biophys. Acta, 1959, 32, 519 ;
J. Mol. Biol., 1960, 2, 171 (121, 123)

BONAR, R.A. et DUGGAN, E.L.,

J. Biol. Chem., 1955, 212, 697 (306)

BONNAR, R.A. et DUGGAN, E.L.,

J. Biol. Chem., 1955, 212, 697 (191)

BONNER, J.,

Forschr. Chem. Org. Naturstoffe, 1958, 16, 139 (16)

BOULANGER, P. et MONTREUIL, J.

In "Chromatographie", 1960, tome II, p.471,
éd. E. LEDRER, Masson et Cie, Paris (383)

BOULANGER, P. et MONTREUIL, J.,

Bull. Soc. Chim. Biol., 1951, 33, 784 (447)

BOULANGER, P. et MONTREUIL, J.,

Bull. Soc. Chim. Biol., 1951, 33, 784 et 791 ;
Biochim. Biophys. Acta, 1952, 9, 619 (525, 533, 548, 549, 551, 557 et 593)

BOULANGER, P., MONTREUIL, J. et MASSE, L.,

C.R. Acad. Sci., 1951, 232, 1256 ;
C.R. Acad. Sci., 1951, 234, 565 (324)

BRACHET, J.,

Arch. Biol., LIEGE : 1933, 44, 519 ;
1937, 48, 529 ;
1940, 51, 151 ;
1942, 53, 207 ;
C.R. Soc. Biol. 1940, 133, 88 ;
Enzymologia 1941, 10, 87 ; (8)

BRACHET, J.,

"The Biological Role of Ribonucleic Acids",
1960, Elsevier Publ. Co. Amsterdam & New York (43 et 8)

BRACHET, J., DECROLY, M., FICQ, A. et QUERTIER, J.,

Biochim. Biophys. Acta, 1963, 72, 660 (433, 436)

BRADLEY, D.W. et RICH, A.,

J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 5898 (87)

BRADBEER, J.W. et JARVIS, B.C.,

J. Chromatog., 1965, 20, 624 (456)

BRAWERMAN, G. et CHARGAFF, E.,

Biochim. Biophys. Acta, 1959, 31, 172 (332)

BRAWERMAN, G. et CHARGAFF, E.,

Biochim. Biophys. Acta, 1954, 15, 549 (444)

BREDERECK, H., MARTINI, A. et RICHTER, F.,

Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1941, 74, 694 (269)

BRIGGS, A.P.,

J. Biol. Chem., 1922, 53, 13 (504)

BRITTEN, R.J. et ROBERTS, R.B.,

Science, 1960, 131, 32 (95)

BROWN, G.L.,

In "Progress in Nucleic Acid Research" 1963, 2, 259
éd : DAVIDSON, J.N. & COHN, W.E. , Acad. Press, New York (28)

BROWN, D.M., FRIED, M. et TODD, A.R.,

Chemistry & Industry, 1953, p. 352 (606)

BROWN, D.M., FRIED, M. et TODD, A.R.,

J. Chem. Soc, 1955, p. 2206 (292)

BROWNHILL, T.J., JONES, A.S. et STACEY, M.,

Biochem. J., 1959, 73, 434 (62)

BROWN, F. et STEWART, D.L.,

Virology, 1959, 7, 408
Nature . 1960, 187, 714 (223)

BROWN, D.M. et TODD, A.R.,

J. Chem., Soc., 1952, p. 52 (36 et 330)

BROWN, D. et TODD, A.,

J. Chem. Soc., 1953, p. 2040 (608)

BROWN, D.M. et TODD, A.R.,

In "Nucleic Acids", 1955, 1, 409
éds : CHARGAFF, E. & DAVIDSON, J.N.,
Acad. Press, New York (608)

BULL, H.B. et NEURATH, H.,

voir : NEURATH et BULL (204)

BURMA, D.P.,

Science, 1953, 118, 694 ;
(Sci. Cult. India, 1953, 19, 103). (391)

BURTON, K.,

In "Essays in Biochemistry", 1965, 1, 57,
éds : CAMPBELL, P.N. & GREVILLE, G.D.,
Academic Press, New York (610)

BURTON, K. et PATTERSON, E.K.,

Biochim. Biophys. Acta, 1957, 26, 667 (278)

BUTANANDT, A.,

Endeavour, 1952, XI, n°44, p. 188 (45)

C

CANELLAKIS, E.S. et HERBERT, E.,

Biochim. Biophys. Acta, 1960, 46, 133 (86)

CANTONI, G.L., GELBOIN, H.V., LUBORSKY, S.W., RICHARDS, H.H. et SINGER, M.F.,

Biochim. Biophys. Acta, 1962, 61, 354 (26 et 430)

CARPENTIER, D.C.,

Anal. Chem., 1952, 24, 1203 (451)

CARTER, C.E.,

J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 1466 (449)

CARTER, C.E. et COHN, W.E.,

J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 2604 (398)

CASPERSSON, I.,

Skand. Arch. Physiol., 1936, 73, suppl. 8 ;
Nature, 1939, 143, 602 ; Naturwiss, 1941, 29, 33 ;
J. Roy. Microscop. Soc., 1940, 60, 8 ;
Cell Crowth and Cell. Function, Norton, New York, 1950 (7)

CASPERSSON, T., HAMMARSTEN, E. et HAMMARSTEN, H.,

T. Faraday Soc., 1935, 31, 367 (161)

CAVALIERI, L.F.,

J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 4899 (294)

CHARGAFF, F., MAGASANIK, B., DONIGER, R. et VISCHER, E.,

J. Am. Chem. Soc., 1949, 71, 1513 (440)

CHARGAFF, E., MAGASANIK, B., VISCHER, E., GREEN, C., DONIGER, R. et ELSON, D.,

J. Biol. Chem., 1950, 186, 51 (97, 140, 146 et 277)

CHARGAFF, F. et ZAMENHOF, S.,

J. Biol. Chem., 1948, 173, 327 (514)

CHAUVEAU, J., MOULE, Y. et ROUILLER, C.,

Exptl. Cell. Res., 1957, 13, 398 (52)

CHAUVEAU, J., MOULE, Y. et ROUILLER, C.,

Exp. Cell. Res., 1956, 11, 317 (603)

CLARKE, G. et SCHRYVER, S.B.,

Biochem. J., 1917, 11, 319 (132 et 141)

CLAUDE, A.,

Science, 1940, 91, 77 (18)

COCITO, C. et LADURON, P.,

Anal. Biochem., 1964, 7, 429 (365 et 497)

COHN, W.E.,

Science, 1949, 109, 377 ;
J. Cell. and Comp. Phys., 1951, 38, suppl. 1, 21 ;
In "The Nucleic Acids", 1955, 1, 211
éds : E. CHARGAFF et J.N. DAVIDSON, Acad. Press, New York (379)

COHN, W.E.,

Science, 1949, 109, 377 (397 et 400)

COHN, W.E.,

J. Am. Chem. Soc., 1949, 71, 2275 (399)

COHN, W.E.,

J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 1471 (405)

COHN, W.E.,

J. Biol. Chem., 1960, 235, 1488 (414)

COHN, W.E.,

In "Nucleic Acids", 1955, 1, 211
éds : CHARGAFF, E. & DAVIDSON, J.N.,
Academic Press, New York,
J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 1421 (629 et 658)

COHN, W.E. et BOLLUM, F.J.,

Biochim. Biophys. Acta, 1961, 48, 588 (377 et 415)

COHN, W.E. et CARTER, C.E.,

J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 2606 (410)

COHEN, S.S. et STANLEY, W.W.,

J. Biol. Chem., 1942, 144, 589 (101)

COHN, W.E. et VOLKIN, E.,

Nature, 1951, 167, 358 (412)

COLLINS, F.D.,

Nature, 1962, 196, 671 (58)

COLTER, J.S., BIRD, H.H. et BROWN, R.A.,

Nature, 1957, 179, 859 (220)

COLTER, J.S. et BROWN, R.A.,

Science, 1956, 124, 1077 (108)

COOPER, W.D. et LORING, H.S.,
J. Biol. Chem., 1957, 228, 813 (82 et 304)

COX, R.A. et ARNSTEIN, H.R.V.,
Biochem. J., 1963, 89, 574 (119, 260, 262, 566, 588, 597 et 598)

CRESTFIELD, A.M. et ALLEN, F.W.,
Chromatog. Methods, 1957, 2, 9 ;
(J. Biol. Chem., 1955, 216, 185) (234)

CRESTFIELD, A.M. et ALLEN, F.W.,
Chromatog. Methods, 1957, 2, 422 (446)

CRESTFIELD, A.M. et ALLEN, F.W.,
Anal. Chem., 1955, 27, 424 (487)

CRESTFIELD, A.M., SMITH, K.C. et ALLEN, F.W.,
J. Biol. Chem., 1955, 216, 185 (103, 208 et 336)

CROSBIE, G.W., HUTCHINSON, W.C., Mc INDOE, W.M., CHILDS, M. et DAVIDSON, J.N.
Biochim. Biophys. Acta, 1954, 14, 580 (73)

CROSBIE, G.W., SMELLIE, R.M.S. et DAVIDSON, J.N.,
Biochem. J., 1953, 54, 287 (149, 267, 283, 285 et 485)

D

DALY, M.M. et MIRSKY, A.E.,
J. Biol. Chem., 1949, 179, 981 (381)

DAOUST, R. et HOOPER, C.E.S.,
Cand. J. Biochem. Physiol., 1957, 35, 721 (177, 298 et 357)

DAVIDSON, J.N., FRAZER, S.C. et HUTCHISON, W.C.,
Biochem. J., 1951, 49, 311 (70 et 175)

DAVIDSON, J.N. et SMELLIE, R.M.S.,
Biochem. J., 1952, 52, 594 (72, 347, 362, 481 et 531)

DAVIDSON, J.N. et SMELLIE, R.M.S.,
Biochem. J., 1952, 52, 599 (72, 100 et 145)

DAVIDSON, J.N. et WAYMOUTH, C.,
Biochem.J., 1944, 38, p. 39 et 399 (98)

DAVIDSON, J.N. et WAYMOUTH, C.,
Biochem. J., 1944, 38, 375 (147 et 159)

DAVIES, J.W. et HARRIS, G.,
Biochim. Biophys. Acta, 1960, 45, 28 (55)

DECROLY, M., CAPE, M. et BRACHET, J.,
Biochim. Biophys. Acta, 1964, 87, 34 (434 et 437)

DE DEKEN-GRENSEN, M. et DE DEKEN, R.H.,
Biochim. Biophys. Acta, 1959, 31, 195 (370)

DEFERT-KOBUS, W. et al.,
Résultats non publiés (190)

DEFERT-KOBUS, W., SEGARD, E. et MONTREUIL, J.,
C.R. Acad. Sci., 1966, 263, 842 (15, 602, 689, 690 et 691)

DEFERT-KOBUS, W., SEGARD, E. et MONTREUIL, J.,
Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, 2293 (601)

DE FILLIPPES, F.M.,
Science, 1964, 144, 1350 (496)

DEIMEL, M.,
Biochem. Z., 1954, 325, 358 (373)

DE LAMIRANDE, G., ALLARD, C. et CANTERO, A.,
Cancer Research, 1955, 15, 329 ;
Biochim. Biophys. Acta, 1958, 27, 395 ;
J. Biophys. Biochem. Cytol., 1950, 61, 291 (408)

DE LUCA, H.F., CARBUS, J., LOOMANS, M.E., STRONG, F.M. et BLOOM, S.,
Federation Proc., 1962, 21, 54 (56)

DERUMEZ, P.,
"Etude sur la composition et le métabolisme des Acides Ribonucléiques des Tissus du Rat", Thèse de Doctorat-ès-Sciences Naturelles, Faculté des Sciences, Université de Lille, 1966
(77, 115, 202, 313, 316, 352, 402, 552, 553, 555, 590 et 591)

DIMROTH, K., JAENICKE, L. et VOLLBRECHTSHAUSEN, I.,
Z. Phys. Chem., 1952, 289, 71 (389)

DIMROTH, K. et WITZEL, H.,

Ann. Chem., 1959, 620, 109 (636)

DISCHE, Z.,

Microchemie, 1930, 8, 4 ;
In "Nucleic Acids", 1955, 1, 285,
éds : CHARGAFF, E. et DAVIDSON, J.N.
Academic Press, New York (581)

DOCTOR, B.P., CONNELLEY, C.M., RUSHIZKY, G.W. et SOBER, H.A.,

J. Biol. Chem., 1963, 238, 3985 (675)

DORSKOCIL, J.J. et SORM, F.,

Biochim. Biophys. Acta, 1962, 55, 953 (637)

DRASHER, M.L.,

Science, 1953, 118, 181 (300)

DURRUM, L.,

J. Am. Chem. Soc., 1950, 72, 2943 ;
J. Colloïd. Science, 1951, 35, 89 (684, 687)

DUTTA, S.K.,

Indian J. Pharm , 1959, 21, 8 (192)

DUTTA, S.K., JONES, A.S. et STACEY, M.,

J. Gen. Microbiol., 1956, 14, 160 (288)

DYER, T.A.,

J. Chromatog., 1963, 11, 414 (473)

E

EBEL, J.P., DIRHEIMER, G., STAHL, A.J.C. et YACOUB, M.,

Bull. Soc. Chim. Biol., 1963, 45, 865, 875 et 887 (32 et 111)

EDMANN, P., HAMMARSTEN, E., LOW, B. et REICHARD, P.,

J. Biol. Chem., 1949, 178, 395 (380)

EDSTRÖM, J.E.,

Nature, 1953, 172, 809 (493)

ELMES, P.C., SMITH, J.D. et WHITE, J.C.,

2ème Congrès International de Biochimie, Paris
21-27 Juillet 1952, Résumé p.8, Soc. d'Ed. Enseig. Sup. (281)

ELSON, D. et CHARGAFF, E.,
Nature, 1954, 173, 1037 (443)

ERICKSON, R.O., SAX, K.B. et OGUR, M.,
Science, 1949, 110, 472 (162)

ERNSTER, L., ZETTERSTROM, R. et LINDBERG, O.,
Acta Chem. Scand., 1950, 4, 942 (508)

EULER, H., et HANN, L.,
Svensk. Kem. Tidskrift, 1946, 58, 251 (518)

F

FINAMORE, F.J. et VOLKIN, E.,
J. Biol. Chem., 1961, 236, 443 (166 et 341)

FISKE, C.H. et SUBBARROW, Y.,
J. Biol. Chem., 1925, 66, 375 (499 et 505)

FLECK, A. et BERG, D.,
Biochim. Biophys. Acta, 1965, 108, 333 (516)

FLECK, A. et MUNRO, H.N.,
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 55, 571 (293, 308, 315, 351, 354, 526, 528 et 541)

FLETCHNER, W.E., GULLAND, J.M. et JORDAN, D.O.,
J. Chem. Soc., 1944, p. 33 (34)

FOSTER, A.B., JONES, A.S. et RIZVI, S.B.H.,
Chemistry and Industry, 1956, p. 914 (392)

FRANKEL-CONRAT, H., SINGER, B. et WILLIAMS, R.C.,
Biochim. Biophys. Acta, 1957, 24, 540 (61)

FRANKEL-CONRAT, H., SINGER, B. et WILLIAMS, R.C.,
Biochim. Biophys. Acta, 1957, 25, 87 (207 et 246)

FRESCO, J.R., ALBERTS, B.M. et DOTY, P.,
Nature, 1960, 188, 98

FRICK, G.,
Biochim. Biophys. Acta, 1952, 8, 625) (84)

FRISCH-NIGGEMEYER, W. et REDDI, K.K.,

Biochim. Biophys. Acta, 1957, 26, 40 (620)

FRONTALI, N.,

Acta Chem. Scand., 1959, 13, 390 (494)

G

GEBICKI, J.M. et FREED, S.,

Anal. Biochem., 1965, 13, 505 (495)

GELOTTE, B.,

Naturwissen, 1961, 48, 554 (462 et 650)

GEORGIEV, G.P., MANTIEVA, V.L. et ZBARSKY, I.B.,

(Biokhimiya U.S.S.R., 1960, 25, 143); Biochim. Biophys. Acta, 1960, 37, 373 ; (Biochim. Biophys. Acta, 1961, 46, 399) (253)

GERLASH, E., FREISBACH, C.H. et DEUTICKE, B.,

J. Chromatog., 1965, 18, 81 (455)

GIERER, A. et SCHRAMM, G.,

Z. Naturforch., 1956, B-11, 138 ;
Nature, 1956, 177, 702 (124, 217, 218, 233, 572, 584)

GILHAM, P.T.,

J. Am. Chem. Soc., 1962, 84, 687 (695)

GOLD, N.I. et STURGIS, S.H.,

J. Biol. Chem., 1954, 206, 51 (139)

GOLDTHWAIT, D.A.,

J. Biol. Chem., 1959, 234, 3245 (88)

GRAHAM, A.F.,

Canad. J. Res., E., 1950, 28, 271 (173)

GREEBAUM, A.L. et SLATER, T.F.,

Biochem. J., 1957, 66, 155 (81)

GRIESEMER, R.D.,

J. Biophys. Biochem. Cytol., 1956, 2, 523 (307)

GRINNAN, E.L. et MOSHER, W.A.,
J. Biol. Chem., 1951, 191, 719 (144, 255 et 257)

GRIPPO, P., IACCARINO, M., ROSSI, M. et SCARANO, E.,
Biochim. Biophys. Acta, 1965, 95, 1 (471)

GRISEWOLD, B.L., HUMOILLER, F.L. et Mc INTYRE, A.R.,
Anal . Chem., 1951, 23, 192 (507)

GUERIN, J.,
Bull. Soc. Chim. Biol., 1954, 36, 1453 (537)

GUERRITORE, D. et BELLELLI, L.,
Nature, 1959, 184, 1638 (212)

H

HABERMANN, V.,
Biochim. Biophys. Acta, 1959, 32, 297 (228 et 582)

HAKIM, A.A.,
J. Biochem. Soc., 1957, 225, 689 (296)

HAKIM, A.A.,
Enzymologia, 1956, 17, 315 (660)

HALL, R.H.,
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 68, 278 (335)

HALL, J.B. et ALLEN, F.W.,
Biochim. Biophys. Acta, 1960, 45, 163 (349)

HALL, B.D. et DOTY, P.,
J. Mol. Biol., 1959, 1, 111 (21, 211, 232 et 574)

HALLINAN, T., FLECK, A. et MUNRO, H.N.,
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 68, 131 (83, 180, 186, 523 et 544)

HAMMARSTEN, O.,
Z. Physiol. Chem., 1894, 19, 19 (6 et 126)

HANCOCK, R.L. et COLEMAN, D.L.,
Anal. Biochem., 1965, 10, 367 (478)

HANES, C.S. et ISHERWOOD, F.A.,

Nature, 1949, 164, 1107 (534, 539, 554 et 594)

HANSON, V., HERMODSSON, L.H. et TOSCHI, G.,

J. Ultrastructure Res., 1959, 3, 216 (53)

HAREL, J., HUPPERT, J., LACOUR, F. et LACOUR, J.,

Compt. Rend. Acad. Sci., 1958, 247, 795 (573)

HAREL, J., HUPPERT, J., LACOUR, J. et LACOUR, F.,

Bull. du Cancer, 1959, 46, 75 (573)

HAWTHORNE, J.N.,

Biochim. Biophys. Acta, 1957, 26, 636 (76 et 355)

HAYASHI, M. et SPIEGELMAN, S.,

Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 1961, 47, 1564 (435)

HENDLER, R.W.,

Science, 1958, 128, 143 ;
J. Biol. Chem., 1959, 234, 1466 ;
Biochim. Biophys. Acta, 1961, 49, 297 et
Nature, 1962, 193, 821 (46)

HENDLER, R.W.,

Biochim. Biophys. Acta, 1963, 74, 667 (57)

HENSHAW, E.C., REVEL, M. et HIATT, H.H.,

J. Mol. Biol., 1965, 14, 241 (11 et 14)

HEYES, J.K.,

Proc. Roy. Soc. Br., 1960, 152, 218 (165 et 309)

HIATT, H.H.,

J. Mol. Biol., 1962, 5, 217 (428)

HIRAMARU, M., UCHIDA, T. et EGAMI, F.,

Anal. Biochem., 1966, 17, 135 (626 bis)

HITCHBORN, J.H. et DUNN, D.B.,

Biochim. Biophys. Acta, 1963, 68, 139 (599)

HOAGLAND, M.B.,

In "Nucleic Acids" 1960, 3, 349
éds : CHARGAFF, E. & DAVIDSON, J.N.,
Acad. Press, New York ; (29)

HOAGLAND, M.B., STEPHENSON, M.L., SCOTT, J.F., HECHT, L.J. et ZAMECNIK, P.C.,
J. Biol. Chem., 1958, 231, 241
voir aussi : SCHWEET & HEINTZ (1966) (25 et 29)

HONN, V. Th., et POLLMANN, W.,
Z. Naturforschg., 1963, 18b, 919 (384, 463 et 654)

HOLLEY, R.W., APGAR, J., EVERETT, G.A., MADISON, J.T., MARQUISEE, M.,
MERRILL, S.H., PENSWICK, J.R. et ZAMIR, A.,
Science, 1965, 147, 1462 (38, 40 et 42)

HOLLEY, R.W., APGAR, J., MERRIL, S. et ZUBKOFF, P.L.,
J. Am. Chem. Soc., 1961, 83, 4861 (652)

HOLDEN, M. et PIRIE, N.W.,
Biochem. J., 1955, 60, 39, 46 & 53 (619)

HOLLEY, R.W. et PROCK, P.,
Federation Proc., 1958, 17, 244 (225)

HORI, M. et KONISHI, E.,
J. Biochem (Japan), 1964, 56, 375 (418)

HOSODA, J., SHIGEMATZU, H., TAKESHITA, H., MIZUNO, S., TATAHASHI, H.
et MARJO, B.,
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 72, 544 (420)

HOTCHKISS, R.D.,
J. Biol. Chem., 1948, 175, 315 (273)

HUNTER, G.D. et GODSON, G.N.,
Nature, 1961, 189, 140 (47 et 54)

HUPPERT, J., LACOUR, F., LACOUR, J. et HAREL, J.,
C.R. Acad. Sci., 1959, 248, 1587 (222)

HUPPERT, J. et SANDERS, F.K.,
Nature, 1958, 182, 515 (221)

HURLBERT, R.B., SCHMITZ, H., BRUMM, A.F. et POTTER, J.R.,
J. Biol. Chem., 1954, 209, 23 (411)

HUTCHINSON, W.C., CROSBIE, G.W., MENDES, C.B., Mc INDOE, W.M., CHILOS, M. et DAVIDSON, J.N.,
Biochim. Biophys. Acta, 1956, 21, 44 (74, 559, 561)

HUTCHISON, W.C., DOWNIE, E.D. et MUNRO, H.N.,
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 55, 561 et 570 (80)

HUTCHISON, W.C., DOWNIE, E.D. et MUNRO, H.N.,
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 55, 561 (156 et 184)

HUTCHISON, W.C. et MUNRO, H.N.,
Analyst, 1961, 86, 765 (71, 155, 179, 194, 199, 203 et 353)

HYMER, W.C. et KUFF, E.L.,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1964, 15, 56 (93)

I

INGRAM, V.M.,
Nature, 1956, 178, 792 (667)
Biochim. Biophys. Acta, 1958, 28, 539 (667)

INGRAM, V.M. et PIERCE, J.G.,
Biochemistry, U.S., 1962, 1, 580 (604, 605 et 676)

ISHIHAMA, A., MIZUNO, N., TAKAI, M., OTAKA, E. et OSAWA, S.,
J. Mol. Biol., 1962, 5, 251 (424)

IVERSON, R.M. et GIESE, A.C.,
Biochim. Biophys. Acta, 1957, 25, 62 (303)

J

JACOBSON, K.B.,
Science, 1962, 138, 515 (460)

JACOBSON, K.B.,
J. Chromatog., 1964, 14, 542 (461)

JAENICKE, L. et VOLLBRECHTSHAUSEN, I.,
Naturwiss., 1952, 39, 86 (372)

JONES, A.S., MIAN, A.M. et WALKER, R.T.,
J. Chem. Soc. (Org.), 1966, 7, 692 (343)

JONES, W. et RAWNTREE, L.G.,

J. Biol. Chem., 1908, 4, 289 (129)

JORDAN, D.O.,

"The Chemistry of the Nucleic Acids", 1960, Butterworths Publications Ltd. (Publishers), London (135)

JOSEFSSON, L.,

Biochim. Biophys. Acta, 1963, 72, 133 (470)

K

KALTREIDER, H.B. et SCOTT, J.F.,

Biochim. Biophys. Acta, 1962, 55, 379 (297)

KAPLAN, H.S. et HEPPEL, L.A.,

J. Biol. Chem., 1956, 222, 907 (613)

KARINOYE, T. et INOUE, T.,

J. Pharm. Soc., Japon, 1954, 74, 301 (394)

KATZ, S. et COMB, D.G.,

J. Biol. Chem., 1963, 238, 3065 (403 et 404)

KAWADE, Y.,

Virus (Osaka), 1960, 10, 29
(voir : Chemical Abstracts, vol. 54, 250 (35b)) (259)

KAY, E.R.M. et DOUNCE, A.L.,

J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 4041 (63 et 150)

KEIR, H.M.,

Biochem. J., 1962, 85, 265 (653)

KEMP, J.W. et ALLEN, F.W.,

Biochim. Biophys. Acta, 1958, 28, 51 (209 et 338)

KERR, S.E. et SERAIDARIAN, K.,

J. Biol. Chem., 1949, 180, 1203 (138)

KERR, S.E., SERAIDARIAN, K., et BROWN, G.B.,

J. Biol. Chem., 1951, 188, 207 (368)

KHORANA, H.G.,

Enzymes, 1961, 5, 79 (610/2)

KHYM, J.X. et COHN, W.E.,

Biochim. Biophys. Acta, 1954, 15, 139 (376)

KIDSON, C., KIRBY, K.S. et RALPH, R.K.,

J. Mol. Biol., 1963, 7, 312 ;
(Cancer Research, 1964, 24, 1604) (114, 577 et 587)

KIMURA, L.,

Biochim. Biophys. Acta, 1962, 55, 22 (252)

KING, E.J.,

Biochem. J., 1932, 26, 292 (500)

KINNORY, D.S., ZORN, E.M. et GAINES, D.S.,

Federation Proc., 1956, 15, 289 (492)

KIRBY, K.S.,

Biochem.J., 1956, 64, 405 ; (65, 107, 216, 131, 242, 571 et 576)

KIRBY, K.S.,

In "Progress in Nucleic Acid Research" (General Review on the extraction of Nucleic Acids), 1964, 3, 1, eds : DAVIDSON, J.N. & COHN, W.E., Academic Press, New York, (110 et 136)

KIRBY, K.S.,

Biochim. Biophys. Acta, 1962, 55, 545 (239)

KIRBY, K.S.,

Biochim. Biophys. Acta, 1960, 40, 193
Biochem..J., 1965, 96, 266 (247)

KIRBY, K.S.,

Biochim. Biophys. Acta, 1960, 41, 338 (251)

KIRBY, K.S.,

Biochim. Biophys. Acta, 1955, 18, 575 (275 et 452)

KITAZUME, Y. et YCAS, M.,

Biochem. Biophys. Acta, 1963, 76, 391 (431)

KLAMERTH, O.,

Nature, 1965, 208, 1318 (89)

KLEINSCHMIDT, W.J., et MANTHEY, J.A.,

Arch. Biochem. Biophys., 1958, 73, 52 (266, 284 et 350)

KOSSEL, A.,

Arch. Anat. Physiol., (Physiol. Abt.), 1891, p. 181 (4)

KOSTERLITZ, H.W.,

J. Physiol., 1947, 106, 194 (318)

KRSMANOVIC, V.,

"Synthèse des acides nucléiques in vitro, dans les noyaux isolés de cellules HeLa", Thèse de Doctorat de Sciences, Faculté des Sciences, Université de Lille, 1966 (96)

KRUTILINA, A.I., MARZABEKOV, A.D., VENKSTERN, T.V. et BAEV, A.A.,

Biokhimiya, 1965, 30, 1225
(traduction en Anglais : Biochem. U.S.S.R., 1965, 30, 1051) (664)

KRUTILINA, A.I., VENKSTERN, T.V. et BAEV, A.A.,

Biokhimiya, 1964, 29, 333 (traduction en anglais : Biochem, U.S.S.R., 1964, 29, 288) voir aussi : KRUTILINA, MARZABEKOV, VENKSTERN et BAEV (1965). (664)

KUFF, E.L., HOGEBOOM, G.H., et DALTON, A.J.,

J. Biophys. Biochem. Cytol., 1956, 2, 33 (51)

KUNITZ, M.,

J. Gen. Physiol., 1940, 24, 15 (611)

L

LACKS, S. et GROS, F.,

J. Mol. Biol., 1959, 1, 301 (224, 236 et 244)

LAGERKVIST, U. et BERG, P.,

J. Mol. Biol., 1962, 5, 139 (voir aussi p. 159) (644)

LAMIRANDE, G. de, ALLARD, C. et CANTERO, A.,

J. Biol. Chem., 1955, 214, 519 (344)

LANE, B.G.,

Biochim. Biophys. Acta, 1963, 72, 110 (454)

LANE, B.G. et ALLEN, F.W.,

Can. J. Biochem. Physiol., 1961, 39, 721 (327)

LANE, B.G. et BUTLER, G.D.,

Biochim. Biophys. Acta, 1959, 33, 281 (326, 329 et 340)

LANE, B.G. et BUTLER, G.C.,

Can. J. Biochem. Physiol., 1959, 37, 573 (326)

LANE, B.G. et BUTLER, G.C.,

Cand. J. Biochem. Physiol., 1959, 37, 1239 (340)

LASKOWSKI, M. Sr.,

Enzymes, 1961, 5, 123 (610/1)

LEDIG, M., FEIGENBAUM, H. et MANDEL, P.,

C.R.Acad. Sci., 1961, 253, 2003 ;
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 72, 332 (560)

LEDIG, M. et MANDEL, P.,

J. Neurochem., 1964, 11, 210 (560)

LEGAULT-DEMARE, J., REBEYROTTE, N., LEPPIEUR, A. et ROSSAUX, J.,

Biochim. Biophys. Acta, 1964, 87, 165 (91)

LEHMAN, I.R.,

In "Progress in Nucleic Acid Research", 1963, 2, 83
ed : DAVIDSON, J.N. & COHN, W.E., Academic Press, New York (610/3 et 623)

LELOIR, L.F. et CARDINI, C.E.,

In "Methods in Enzymology", 1957, vol.III, p. 840 ;
éd. : COLOWICK, S.P. & KAPLAN, N.O.,
Acad. Press Inc., New York, (510)

LEVENE, P.A.,

J. Biol. Chem., 1918, 33, 425 ;
J. Biol. Chem., 1919, 40, 415 ; (290)

LEVENE, P.A. et BASS, L.W.,

"Nucleic Acids", ACS Monographs, Chemical catalog company, New York, 1931 (5 et 270)

LEVENE, P.A. et JACOBS, W.A.,

Ber. Dtsch. Chem. Ges., 1910, 43, 3154 (268)

LEVENE, P.A. et LAFORGE, T.B.,

Ber., 1910, 43, 3164 (131)

LEVENE, P.A. et SIMMS, H.S.,

J. Biol. Chem., 1926, 70, 332 (33)

LEVIN, D.,

J. Biol. Chem., 1963, 238, 1096 (678)

LEVY, H.B. et LYNT, R.K.,

Biochim. Biophys. Acta, 1963, 72, 529 (78 et 542)

LINDBERG, O. et ERNSTER, L.,

In "Methods of Biochemical Analysis", 1956, vol.III, p. 1,
éds : GLICK, D., Interscience Publishers Inc., New York, (509)

LIPSETT, M.N., HEPPEL, L.A. et BRADLEY, D.F.,

J. Biol. Chem., 1961, 236, 857 (681)

LIPSHITZ, R. et CHARGAFF, E.,

Biochim. Biophys. Acta, 1960, 42, 544 (445)

LIPSHITZ-WIESNER, R. et CHARGAFF, E.,

Biochim. Biophys. Acta, 1963, 76, 372 (662)

LITTAUER, U.Z. et EISENBERG, H.,

Biochim. Biophys. Acta, 1959, 32, 320 (106, 241, 567 et 575)

LORING, H.S.,

In "Nucleic Acids", 1955, 1, 191,
éds : CHARGAFF, E. & DAVIDSON, J.N.,
Academic Press, New York, (264)

LORING, H.S., BORTNER, H.W., LEVY, L.W. et HAMMELL, M.L.,

J. Biol. Chem., 1952, 196, 807 (348)

LOWRANCE, P.B. et CARTER, C.E.,

J. Cell. Comp. Physiol., 1950, 35, 387 (301)

LUNDIN, P.M.,

Acta Endocr. (Copenhagen), 1958, 28,(suppl.), 40 (176 et 195)

LUST, J.,

Anal. Biochem., 1965, 10, 1 (210)

M

MAC DONALD, I.W.,

Biochem. J., 1954, 57, 566 (272)

MAC FARLANE, M.G.,

Nature, 1962, 196, 126 (59)

MACHEBOEUF, M., REBEYROTTE, P., DUBERT, J.M. et BRUNERIE, M.,

"Microélectrophorèse sur papier", Expansion Scientifique, Paris, 1954 ;
(voir aussi : BISERTE ; et DURRUM) (684 et 687)

MAGASANIK, B.,

In "The Nucleic Acids", 1955, 1, 373,
éd : CHARGAFF, E. & DAVIDSON, J.N.,
Publ. : Acad. Press Inc., New York, (134)

MAGASANIK B. et CHARGAFF, E.,

Biochim. Biophys. Acta, 1951, 7, 396 (323)

MAGASANIK, B., VISCHER, E., DONIGER, R., ELSON, D. et CHARGAFF, E.,

J. Biol. Chem., 1950, 186, 37 (442, 661, 663 et 665)

MAIN, R.K. et COLE, L.J.,

Arch. Biochem. Biophys., 1957, 68, 186 (85)

MANDEL, P. et REVEL, M.,

C.R. Soc. Biol., 1958, 152, 152 (438)

MANDEL, P., WEILL, J.D. et LEDIG, M.,

Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, 38, 71 (345)

MANDEL, P., WEILL, J.D. et LEDIG, M.,

C.R. Acad. Sci., 1955, 24, 257 ;
Bull. Soc. Chim. Biol., 1956, 38, pages 71 & 81 (366)

MANDEL, P., WEILL, J.D. et LEDIG, M.,

Bull. Soc. Chim. Biol., 1956, 38, 71 (453)

MANDELL, J.D. et HARSHEY, A.D.,

Anal. Biochem., 1960, 1, 66 (92)

MARKHAM, R.,

In "Moderne Methoden der Pflanzenanalyse", 1955, vol.IV, p. 246,
éds : PAECH, K. & TRACRY, M.V., Springer-Verlag, Berlin, (287 et 359)

MARDHAM, R.,

British Medical Bulletin, 1954, 10, 214 (439)

MARKHAM, R., MATTHEWS, R.E.F. et SMITH, J.D.,
Nature, 1954, 173, 537 (334)

MARKHAM, R. et SMITH, J.D.,
Research, 1951, 4, 344 (35)

MARKHAM, R. et SMITH, J.D.,
Biochem.J., 1950, 46, 513 (271)

MARKHAM, R. et SMITH, J.D.,
Biochem. J., 1949, 45, 294 (385)

MARKHAM, R. et SMITH, J.D.,
Biochem. J., 1951, 49, 401 (450)

MARKHAM, R. et SMITH, J.D.,
Biochem. J., 1952, 52, 558 (538, 562, 564 et 659)

MARKHAM, R. et SMITH, J.D.,
Biochem. J., 1952, 52, 558 (677 et 486)

MARKHAM, R. et SMITH, J.D.,
Biochem. J., 1952, 52, pages, 552, 558 & 565 (612 et 627)

MARRIAN, D.H., SPICER, V.L., BALIS, M.E. et BROWN, G.W.,
J. Biol. Chem., 1951, 189, 533 (346 et 367)

MARSHAK, A.,
Biol. Bull., 1950, 99, 332 (280)

MARSHAK, A. et MARSHAL, C.,
Exp. Cell. Res., 1953, 5, 288 (302)

MARSHAK, A. et VOGEL, H.G.,
J. Biol. Chem., 1951, 189, 597 (279)

MARTIN, J.B. et DOTY, D.M.,
Anal. Chem., 1949, 21, 965 (507 bis)

MARTIN, E.M. et MORTON, R.K.,
Biochem. J., 1956, 64, 221 (163)

MATTHEWS, R.E.F.,
Biochim. Biophys. Acta, 1960, 38, 552 (618)

MA, T.S. et ZUAZAGA, G.,

Ind. Eng. Chem. (Anal. ed.), 1942, 14, 280 (502)

MC CARTER, J.A. et STELJES, E.L.,

Cand. J. Res. E., 1948, 26, 333 (172)

MC CULLY, K.S. et CANTONI, G.L.,

J. Mol. Biol., 1962, 5, 80 (635)

MC GEE, J.,

Federation Proc., 1964, 23, Abstract 2575 ;
Anal. Biochem., 1966, 14, 305 (395)

MC INDOE, W.M. et DAVIDSON, J.N.,

Brit. J. Cancer, 1952, 6, 200 (483)

MC INTIRE, F.C. et SPROULL, M.F.,

Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1957, 95, 458 (314 et 361)

MEJBAUM, W.,

Hoppe-Seyl. Z., 1939, 258, 117 (517)

MICHL, H.,

Monatsh. Chem., 1951, 82, 489 (647 bis)

MIESCHER, F.,

Hoppe Seyler's Med. Chem. Untersuch., 1871, 441, 502,
Die Histochemischen und Physiologischen Arbeiten, Leipzig, 1897,
éd : VOGEL, F.C.W. (2)

MILES, H.I. et FALES, H.M.,

Anal. Chem., 1962, 34, 860 (477)

MINAGAWA, T., WAGNER, B. et STRAUSS, B.,

Arch. Biochem. Biophys., 1959, 80, 442 (317)

MIRSKY, A.E. et POLLISTER, A.W.,

J. Gen. Physiol. 1946, 30, 101 (137)

MITSUI, H., ISHAMA, A. et OSAWA, S.,

Biochim. Biophys. Acta, 1963, 76, 401 (421)

MIURA, K.,

J. Biochem., (Japon), 1964, 55, 452 (628 et 694)

MONIER, R.,

Bull. Soc. Chim. Biol., 1962, 44, 109 ;
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 55, 100 (237)

MONTREUIL, J.,

Annales Biol. Clin., 1960, n° 3-4, p. 1 (48 et 50)

MONTREUIL, J.,

"Etude sur les Acide Pentose Nucléiques", Thèse de Doctorat-ès-Sciences, Faculté des Sciences, Université de Lille, 1952 (325, 356, 401, 503, 513, 535, 550 et 589)

MONTREUIL, J. et BOULANGER, P.,

C.R. Acad. Sci., 1954, 239, 367 (312)

MONTREUIL, J., DERUMEZ, P. et BOULANGER, P.,

C.R. Acad. Sci., 1962, 254, 4516 (75)

MONTREUIL, J., DERUMEZ, P. et BOULANGER, P.,

C.R. Acad. Sci., 1960, 251, 3100 (530)

MONTREUIL, J., DUPONT, A., DAMAILLE, A. et DRIESSENS, J.,

C.R. Soc. Biol. (Paris), 1960, 154, pages 1127 & 2079 (600)

MONTREUIL, J., MASSE, L. et BOULANGER, P.,

Résultats non publiés
(voir : C.R. Acad. Sci., 1951, 232, 1256 et
C.R. Acad. Sci., 1951, 234, 565) (371)

MONTREUIL, J. et SEGARD, E.,

C.R. Acad. Sci., 1961, 252, 4217 (229, 570 et 583)

MONTREUIL, J., SEGARD, E., SINGHAL, R.P. et SAGNIEZ, G.,

"Etude Critique des procédés de détermination des rapports molaires et de la radioactivité spécifique des nucléotides constituant les acides ribonucléiques", Présentée à la "Réunion commune de la Société Belge de Biochimie et de la Société de Chimie Biologique" Institut Léon Fédéricq, Liège - 21-22 mai 1965 ;
Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, 2328 (189 et 697)

MORGAN, W.T. et PARTRIDGE, S.M.,

Biochem. J., 1941, 35, 1140 (214)

MORISAWA, S. et CHARGAFF, E.,

Biochim. Biophys. Acta, 1963, 68, 147 (333 et 466)

MORTREUIL, M. et KHOUVINE, Y.,

Bull. Soc. Chim. Biol., 1957, 39, 161 (413)

MOULE, Y.,

Arch. Sci. Physiol., 1953, 7, 161 (174 et 187)

MUKHERJEE, S.N.,

Proc. Indian Sci. Congr., 1955, 3, 111 ;
(Voir aussi : J. Indian Chem. Soc., 1956, 33, 573) (393)

MULLER, E.,

Hoppe-Seyl. Z., 1935, 237, 35 (512)

N

NASH, C.W.,

Cand. Pharm. J., 1949, 82, 251 (321)

NAUGHTON, M.A. et DINTZIS, H.N.,

Présenté à "The 1964 Technicon International Symposium", New York, Technicon Instrument Corporation, Research Park, Chauncey, New York (498)

NEURATH, H. et BULL, H.B.,

Chem. Rev., 1938, 23, 391 (204)

NOLL, H.,

In "Proceedings of the nineteenth Annual Symposium on Cancer Research" Mars 1965, The University of Texas, Texas
voir : WETTSTEIN & NOLL (1965) (12 et 13)

NOMURA, M., HALL, B.D. et SPIEGELMAN, S.,

J. Mol. Biol., 1960, 2, 306 (423)

O

OGUR, M. et ROSEN, G.,

Arch. Biochem., 1950, 25, 262 (152, 167 et 181)

OLMSTED, P.S. et VILLEE, C.A.,

J. Biol. Chem., 1955, 212, 179 (310 et 407)

OSAWA, S., TAKATA, K. et HOTTA, Y.,

Biochim. Biophys. Acta, 1958, 28, 271 (422)

OSBORNE, T.B. et HARRIS, I.F.,
Z. Physiol. Chem., 1902, 36, 85 (127)

OTAKA, E., HOTTA, Y. et OSAWA, S.,
Biochem. Biophys. Acta, 1959, 35, 267 (23)

OTAKA, E., OSAWA, S., OOTA, Y., ISHIHAMA, A. et MITSU, H.,
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 55, 310 (429)

P

PALMER, J.W. et GERLOUGH, T.D.,
Science, 1940, 92, 155 (213)

PARTRIDGE, S.M.,
Biochem. J., 1948, 42, 238 (556)

PAUL, J.,
Analyst, 1958, 83, 37 (185)

PERRY, R.P.,
"The Nucleolus and the Synthesis of ribosomes", présenté au "Symposium on Genes and Chromosomes - Structure and function", Buenos Aires, Argentina, 30 Novembre à 4 décembre, 1964 ;
Exptl. Cell. Res., 1960, 20, 216 ;
Exptl. Cell. Res., 1963, 29, 400 (9)

PERRY, R.P., ERRERA, M., HELL, A. et DURWALD, H.,
J. Biophys. Biochem. Cytol., 1961, 11, 1 (9)

PERRY, R.P., SRINIVASAN, P.R. et KELLY, D.E.,
Science, 1964, 145, 504 (9)

PETERMANN, M.L.,
"The Physical & Chemical Properties of Ribosomes"
Elsevier Publ. Coy., 1964 (20)

PHILLIPS, G.R. et WEST, J.,
Biochim. Biophys. Acta, 1964, 91, 416 (112)

PILERI, A. et LEDOUX, L.,
Biochim. Biophys. Acta, 1957, 26, 309 (320)

PLESNER, P.,
Acta Chem. Scand., 1955, 9, 197 (374)

PONTIS, H.G. et BLUMSON, N.L.,

Biochim. Biophys. Acta, 1958, 27, 618 (409)

POTTER, J.L. et DOUNCE, A.L.,

Federation Proc. 1956, 15, 329 ;
J. Am. Chem. Soc., 1956, 78, 3078 (339)

PRIVAT DE GARILHE, M.,

"Les Nucléases", Actualités Scientifiques et Industrielles n° 1303, HERMANN, Paris 1962 (609 et 610/4)

R

RABINOVITCH, M. et DOHI, S.R.,

Arch. Biochem. Biophys., 1957, 70, 239 (617)

RAJBHANDARY, U.L. et STUART, A.,

Ann. Rev. Biochem., (Nucleic Acids - Sequence Analysis) 1966, 35, 759 (610)

RALPH, R.K. et BELLAMY, A.R.,

Biochim. Biophys. Acta, 1964, 87, 9 (109 et 238)

RANDERATH, K.,

Biochim. Biophys. Acta, 1963, 76, 622 ;
(voir aussi : Biochim. Biophys. Acta, 1962, 61, 852 ;
Experientia, 1964, 20, 406 ;
"Thin Layer Chromatography", verlag chemie Weinheim an der Bergstrasse, Academic Press, New York, 1963) (378)

RANDERATH, K.,

J. Chromatog., 1963, 10, 235 (458)

RANDERATH, K.,

Biochem. Biophys. Res. Commun. (U.S.), 1962, 6, 452 (468)

RANDERATH, K.,

Angew. Chem. Internat. Edit. 1962, 1, 435
(Angew. Chem., 1962, 74, 780) (469 et 472)

RANDERATH, K. et RANDERATH, E.,

J. Chromatog., 1964, 16, 111 (474)

RANDERATH, K. et STRUCK, H.,

J. Chromatog., 1961, 6, 365 (467)

REEVES, J.E. et MUNRO, J.,
Ind. Eng. Chem., Anal. Ed., 1940, 12, 551 (519)

REICHARD, P., BALDESTEN, A. et RUTBERG, L.
J. Biol. Chem., 1961, 236, 1150 ;
(voir aussi : Acta Chem. Scand., 1958, 12, 2048) (375)

REICHMANN, M.E. et STACE-SMITH, R.,
Virology, 1959, 9, 710 (258)

REID, E. et NODES, J.T.,
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1959, 81, 618 (615)

RICE, S.A. et DOTY, P.,
J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 3937 (120)

RICH, A.,
Brookhaven Symposia in Biology, 1959, 12, 17 (328)

RICH, A.,
Proc. Natl., Acad. Sci., U.S., 1960, 46, 1044 (342)

ROBERTS, W.K., DEKKER, C.A., RUSHIZKY, G.W. et KNIGHT, C.A.,
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 55, 664 (674)

ROBINOVITCH, M., ROTSCHILD, H.A. et JUNQUEIRA, L.C.U.,
J. Biol. Chem., 1952, 194, 835 (319)

ROTH, J.S.,
J. Biol. Chem., 1957, 227, 591 ;
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1959, 81 (Art.3), p. 511-804) (614)

ROTH, J.S.,
Ann. N.Y. Acad. Sci., 1959, 81 (Art.3), p. 511-804 (616)

RUDNER, R. et CHARGAFF, E.,
Biochim. Biophys. Acta, 1961, 55, 997 (631)

RUSHIZKY, G.W., BARTOS, E. et SOBER, H.A.,
Biochem., (U.S.), 1964, 3, 626 (656)

RUSHIZKY, G.W. et KNIGHT, C.A.,
Virology, 1960, 11, 236 (666, 670, 683 et 685)

RUSHIZKY, G.W. et KNIGHT, C.A.,
Biochem. Biophys. Res. Commun., U.S., 1960, 11, 236 (668 et 679)

RUSHIZKY, G.W. et KNIGHT, C.A.,
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S., 1960, 46, 945 (669)

RUSHIZKY, G.W., KNIGHT, C.A., ROBERTS, W.K. et DEKKER, C.A.,
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 55, 674 (671)

RUSHIZKY, G.W., SHAVENSKI, I.H. et GRECO, A.E.,
Biochem., (U.S.), 1966, 5, 3328 (646)

RUSHIZKY, G.W. et SOBER, H.A.,
J. Biol. Chem., 1962, 237, 834 (625 et 672)

RUSHIZKY, G.W. et SOBER, H.A.,
J. Biol. Chem., 1962, 237, 2883 ;
(J. Biol. Chem., 1963, 238, 371) ;
(voir aussi : RUSHIZKY, SHAVENSKI & GRECO (1960)) (646)

RUSHIZKY, G.W., SOBER, H.A. et KNIGHT, C.A.,
Biochim. Biophys. Acta, 1962, 61, 56 (673)

S

SAMIS, H.V., WULFF, V.J. et FALZONE, J.A.,
Biochim. Biophys. Acta, 1964, 91, 223 (113)

SANDERS, F.K.,
Nature, 1960, 185, 802 (245)

SANGER, F., BROWNLEE, G.G. et BARRELL, B.G.,
J. Mol. Biol., 1965, 13, 373 (647)

SATO-ASANO, K., et EGAMI, F.,
Biochim. Biophys. Acta, 1959, 29, 655 (626)

SATO, K. et EGAMI, F.,
J. Biochem. (Japan), 1957, 44, 753 (624)

SCARANO, E. et KALCKAR, H.M.,
Publ. Staz. Zool. Napoli, 1953, 24, 188 (363)

SCHERRER, K. et DARNELL, J.,
Biophys. Biochem. Res. Commun., (U.S.), 1962, 7, 486 (10)

SCHERRER, K., LATHAM, H. et DARNELL, J.E.,

Proc. Natl. Acad. Sci., (U.S.), 1963, 49, 240 (10 et 118)

SCHMIDT, G.,

In "Methods in Enzymology", 1957, vol.III, p. 671,
éds : COLOWICK, C.P. & KAPLAN, N.O.,
Academic Press Inc., New York (364)

SCHMIDT, G., HECHT, L. et THANNHAUSER, S.J.,

J. Gen. Physiol., 1948, 31, 203 (358)

SCHMIDT, G. et THANNAUR, S.J.,

J. Biol. Chem., 1945, 161, 83 (68, 153, 169, 170, 193, 198, 200, (263, 299, 521, 522, 524, 540 et 595)

SCHNEIDER, W.C.,

J. Biol. Chem., 1945, 161, 293 ;
J. Biol. Chem., 1946, 164, 746 (66, 79, 151, 171 et 183)

SCHNEIDER, W.C.,

In "Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology-12",
The Biological Laboratory edition, Cold Spring Harbor, 1947 (49)

SCHNEIDER, W.C. et EDNER, H.,

Experientia, 1955, 11, 491 (282)

SCHNEIDER, W.C. et HOGEBOOM, G.H.,

J. Biol. Chem., 1948, 176, 259
J. Biol. Chem., 1950, 183, 123 ;
(voir aussi : HOGEBOOM, G.H., SCHNEIDER, W.C. et STRIEBICH, M.J.,
J. Biol. Chem., 1952, 196, 111) (688)

SCHNEIDER, W.C., HOGEBOOM, G.H. et ROSS, H.E.,

J. Natl. Cancer Inst., 1950, 10, 977 (154 et 182)

SCHOLTISSEK, C.,

Biochem. Z., 1959, 331, 138 (633)

SCHOLTISSEK, C. et ROTT, R.,

Z. Naturfors., 1961, 166, 109 (634)

SCHRAM, G. et DANNENBERG, H.,

Ber. Chem. Ges., 1944, 77, 53 (158)

SCHWEET, R. et HEINTZ, R.,

Ann. Rev. Biochem., 1966, 35, 723 (29, 30 et 31)

SCOTT, J.F. et FRACCASTORO, A.P.,
J. Natl. Cancer Inst., 1952, 13, 244 (305)

SCOTT, J.F., FRACCASTORO, A.P. et TAFT, E.B.,
J. Histochem. Cytochem., 1956, 4, 1 (305)

SEBRING, E.D. et SALZMAN, N.P.,
Anal. Biochem., 1964, 8, 126 (94 et 491)

SELA, M., AFINSEN, C.B. et HARRINGTON, W.F.,
Biochim. Biophys. Acta, 1957, 26, 502 (64)

SEVAG, M.G., LACKMAN, D.B. et SMOLENS, J.,
J. Biol. Chem., 1938, 124, 425 (143)

SEVAG, M.G., SMOLENS, J. et LACKMAN, D.B.,
J. Biol. Chem., 1938, 134, 523 (160)

SHORTMAN, K. et FUKUHARA, H.,
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 76, 501 (235)

SIBATANI, A., DE KLOET, S.B., ALLFREY, V.G. et MIRSKY, A.E.,
Proc. Natl. Acad. Sci., (U.S.), 1962, 48, 471 (250, 425, 568, 569, 578 et 584)

SIBATANI, A., YAMANA, K., KIMURA, K. et TAKAHASHI, T.,
Nature, 1960, 186, 215 (248 et 568)

SINGER, M.F. et CANTONI, G.L.,
Biochim. Biophys. Acta, 1960, 39, 182 (465)

SINGER, B. et FRAENKEL-CONRAT, H.,
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 72, 534 ;
(Biochim. Biophys. Acta, 1957, 25, 87) (246)

SINGER, M. et LEDER, P.,
Ann. Rev. Biochem., 1966, 35, 195 (14 bis)

SINGHAL, R.P.,
voir MONTREUIL, J., SEGARD, E., SINGHAL, R.P. et SAGNIEZ, G. (697)

SINGHAL, R.P. et MONTREUIL, J.,
"Description d'un procédé reproductible de "finger printing" des hydrolysats ribonucléasiques d'acides ribonucléiques". Présenté à la Réunion Commune de la Société Belge de Biochimie de la Société de Chimie Biologique, Institut Léon Fédéricq, Liège - 21-22 Mai 1965 ;
Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, 2328 (698)

SINGHAL, R.P. et MONTREUIL, J.,

"Description d'un procédé reproductible de "finger printing" des hydrolysats ribonucléasiques d'acides ribonucléiques".
Bull. Soc. Chim. Biol., 1967 (à paraître) (699)

SINGHAL, R.P. et MONTREUIL, J.,

"Application d'une méthode de 'finger printing" des hydrolysats ribonucléasiques à l'étude des ARN des fractions cytoplasmiques".
C.R. Soc. de Biol., Paris, 1967 (à paraître) (700)

SINGHAL, R.P. et MONTREUIL, J.,

"Etude critique des procédés d'extraction des ARN tissulaires en vue de la détermination de leur composition en nucléotides"
Bull. Soc. Chim. Biol. (à paraître) (701)

SINGHAL, R.P. et MONTREUIL, J.,

"Identification des composés phosphorylés non-nucléotidiques dans les hydrolysats alcalins des ARN tissulaires et les causes d'erreurs qu'ils introduisent dans la détermination de la radioactivité spécifique des nucléotides constituant les ARN".
Bull. Soc. Chim. Biol., 1967 (à paraître) (702)

SMELLIE, R.M.S., MC INDOE, W.M., LOGAN, R. et DAVIDSON, J.N.,

Biochem. J., 1953, 54, 280 (482)

SMILLIE, R.M.,

Arch. Biochem. Biophys., 1959, 85, 557 (457)

SMILLIE, R.M. et KROTKOV, G.,

Cand. J. Botany, 1960, 38, 31 (67, 188 et 360)

SMITH, J.D.,

In "The Nucleic Acids", 1955, 1, 267
éds : CHARGAFF, E. & DAVIDSON, J.N.,
Academic Press, New York (479)

SMITH, K.C.,

Biochim. Biophys. Acta, 1960, 40, 360 (24)

SMITH, K.C. et ALLEN, F.,

J. Am. Chem. Soc., 1953, 75, 2131 (337)

SMITH, J.D. et DUNN, D.B.,

Biochim. Biophys. Acta, 1959, 31, 573 (331)

SMITH, J.D. et DUNN, D.B.,

Biochem. J., 1959, 72, 294 (563)

SMITH, J.D. et MARKHAM, R.,

Biochem. J., 1950, 46, 509 ;
Biochim. Biophys. Acta, 1952, 8, 350 (396)

SMITH, K.C., REBHUM, S. et KAPLAN, H.S.,

Anal. Biochem., 1960, 1, 202 (90 et 489)

SMITH, J.D. et STOKER, M.G.P.,

British J. Experimental Pathology, 1951, 32, 433 (286)

SPENCER, J.H. et CHARGAFF, E.,

Biochim. Biophys. Acta, 1961, 51, 209 (632)

SPIEGELMAN, S., HALL, B.D. et STORCK, R.,

Proc. Natl. Acad. Sci., (U.S.), 1961, 47, 1135 (102 et 117)

SPIRIN, A.S.,

J. Mol. Biol., 1960, 2, 436 ;
Biochemistry (U.S.S.R.) (Trad. Anglais), 1961, 26, 454 ;
Collog. Intern. Centre Natl. Rech. Sci. (Paris), 1962, 106, 73 ;
In "Progress in Nucleic Acid Research", 1963, 1, 301,
éds : DAVIDSON, J.N. & COHN, W.E., Academic Press, New York (19, 27 et 122)

SPIRIN, A.S.,

Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1963, 28, 267 ;
Bakh Lectures, Acad. Sci., U.S.S.R., 1964, 19, 3 ;
"Macromolecular Structure of Ribonucleic Acids"
Reinhold Publ. Corporn., London, 1964 (116)

SREENIVASAYA, M. et PIRIE, N.W.,

Biochem. J., 1938, 32, 1707 (206)

SRINIVASAN, P.R.,

Biochim. Biophys. Acta, 1962, 61, 526 (426)

SRIPATI, C.E.,

Bull. Soc. Chim. Biol., 1964, 46, 214 (78 et 542)

STADE, H.B.,

Am. J. Physiol., 1905, 13, 464 (128)

STAEHELIN, M.,

Biochim. Biophys. Acta, 1961, 49, pages 11,20 & 27, (639)

STAEHELIN, M.,

Biochim. Biophys. Acta, 1961, 49, 27 (642)

STAEHELIN, M.,

In "Acides nucléiques et polyphosphates", 1962, 106, 249
Collog. Intern. Centre Nat. Rech. Sci., (Paris) (640)

STAEHELIN, M.,

In "Progress in Nucleic Acid Research", 1963, 2, 170
éds : DAVIDSON, J.N. & COHN, W.E., Acad. Press, New York (640 et 655)

STAEHELIN, M., SCHWEIGER, M. et ZACHAU, H.G.,

Biochem. J., 1962, 84, 106 P. ;
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 68, 129 (641)

STAEHELIN, M., SCHWEIGER, M. et ZACHAU, H.G.,

Biochim. Biophys. Acta, 1963, 68, 129 (645)

STAMBAUGH, R.L. et WILSON, D.W.,

J. Chromatog., 1960, 3, 221 (382)

STANSLEY, P.G. et CHU, M.W.,

Exp. Cell. Res., 1960, 20, 206 (164)

STEELE, W.J., OKAMURA, N. et BUSCH, H.,

Biochim. Biophys. Acta, 1964, 87, 490 (196, 543, 545, 546, 547, 565 et 596)

STETTEN, M.R., KATZEN, H.M. et STETTEN, D.,

J. Biol. Chem., 1958, 232, 475 (178)

STEUDEL, H. et BRIGL, P.,

Z. Physiol. Chem., 1910, 68, 40 (130)

STEUDEL, H. et PEISER, E.,

Z. Physiol. Chem., 1922, 120, 292 (197 et 289)

STICKLAND, R.G.,

Anal. Biochem., 1965, 10, 108 (464 et 475)

T

TANAKA, K. et CANTONI, G.L.,
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 72, 641 (622)

TENER, G.P., KHORANA, H.G., MARKHAM, R. et POL, E.H.,
J. Am. Chem. Soc., 1958, 80, 6223 (638)

TISSIERES, A.,
J. Mol. Biol., 1959, 1, 365 (230)

TOMLINSON, R.V. et TENNER, G.M.,
Biochemistry, (U.S.), 1963, 2, 697 (657)

TRIM, A.R., BAKER, J.E. et LEAH, A.B.,
Biochem.J., 1964, 93, 14 (104)

TSANEV, R. et MARKHOV, G.G.,
Biochim. Biophys. Acta, 1960, 42, 442 (69 et 515)

TSUBOI, K.K. et STOWELL, R.E.,
Biochim. Biophys. Acta, 1950, 6, 192 (99 et 148)

TYNDALL, R.L., JACOBSON, K.B. et TEETER, E.,
Biochim. Biophys. Acta, 1964, 87, 335 (648, 682 et 692)

U

UCHIDA, T.,
J. Biochem, (Japan), 1966, 60, 115 (626)

UCHIDA, T. et EGAMI, F.,
J. Japan Biochem. Soc., 1962, 34, 407 ;
In "Procedures in Nucleic Acid Research" p. 7,
éds : CANTONI, G.L. & DAVIES, D.R.,
Publ. : HARPER & ROW, New York, 1966 (626)

V

VENKATARAMAN, P.R.,
Biochim. Biophys. Acta, 1960, 39, 352 ;
Biochim. Biophys. Acta, 1963, 72, 24 (78 et 542)

VENKATARAMAN, P.R. et LOWE, C.U.,
Biochem.J., 1959, 72, 430 (78 et 542)

VERACHTERT, H., BASS, S.T., WILDER, J. et HANSEN, R.G.,
Anal. Biochem., 1965, 11, 497 (459)

VISCHER, E. et CHARGAFF, E.,
J. Biol. Chem., 1948, 176, 715 (274 et 276)

VISCHER, E., MAGASANIK, B. et CHARGAFF, E.,
Federation Proc., 1949, 8, 263 (441)

VOLKIN, E. et ASTRACHAN, L.,
Virology, 1956, 2, 149 (369)

VOLKIN, E. et CARTER, C.E.,
J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 1516 (105, 142, 254 et 256)

VOLKIN, E. et CARTER, C.E.,
J. Am. Chem. Soc., 1951, 73, 1519 (406)

VOLKIN, E. et COHN, W.E.,
J. Biol. Chem., 1953, 205, 767 (37 et 630)

VON WECKER, E. et SCHAFER, W.,
Z. Naturforsch., 1957, 12b, 415 (219)

VON WECKER, E. et SCHAFER, W.,
Virology, 1959, 7, 241 (226 et 243)

W

WADE, H.E.,
Biochem.J., 1960, 77, 534 (416)

WADE, H.E. et MORGAN, D.M.,
Biochem. J., 1955, 60, 264 (488)

WARBURG, O.,
"The Metabolism of Tumours",
Constable & Coy; Ltd Ed., London, 1930 (1)

WARBURG, O., GAWEHN, K. et GEISSLER, A.W.,
Z. Naturforschg., 1958, 13b, pages 61 et 588 (1)

WATSON, J.D.,
In "Compte rendu du Cinquantenaire de la Société de Chimie-Biologique - 1914-1964" 6 à 9 Avril 1964, Paris, p. 157 (22 et 44)

WATSON, J. et CRICK, F.,

Nature, 1953, 171, 737 (39)

WEBB, J.M. et LINDSTROM, H.V.,

Arch. Biochem. Biophys., 1965, 112, 273 (157 et 168)

WECKER & SCHAFER

voir VON WECKER, E. & SCHAFER, W. (1957) (219)

WECKER & SCHAFER

voir VON WECKER, E. & SCHAFER, W. (1959) (226 et 243)

WEILL, J.D.,

Thèse Université de Strasbourg, 1958
Faculté des Sciences, Strasbourg, France (201)

WERKHEISER, W.C. et WINZLER, R.J.,

J. Biol. Chem., 1953, 204, 971 (390 et 485)

WESTPHAL, O., LUDERITZ, O. et BISTER, F.,

Z. Naturfarschg., 1952, 7b, 148 (215 et 227)

WETTSTEIN, F. et NOLL, H.,

J. Mol. Biol., 1965, 11, 35 (12 et 13)

WHITFELD, P.R. et MARKHAM, R.,

Nature, 1953, 171, 1151 (607)

WITZEL, H.,

In "Progress in Nucleic Acid Research", 1963, 2, 221
éds : CHARGAFF, J.N. et COHN, W.E., Acad. Press, New York,
voir aussi : RUSHIZKY et al., Biochem.(U.S.), 1963, 2, 787 (621)

WYATT, G.R.,

Biochem. J., 1951, 48, 584 ;
J. Geu. Physiol., 1952, 36, 201 ;
In "Nucleic Acids" 1955, 1, 243,
éds : CHARGAFF, E. & DAVIDSON, J.N.,
Academic Press Inc. New York (265, 386, 387 et 580)

Y

YAMANA, K. et SIBATANI, A.,

Biochim. Biophys. Acta, 1960, 41, pages 295 et 304 (249, 419, 585 et 586)

YCAS, M. et VINCENT, W.S.,

Proc. Natl. Acad. Sci.,(U.S.), 1960, 46, 804 (520 et 693)

Z

ZADRAZIL, S., SORMOVA, Z. et SORM, F.,

Collection Czech. Chem. Commun., 1961, 26, 2643 (651)

ZAMECNIK, P.C.,

Harvey Lectures, 1960, 54, 256 (31)
voir aussi : SCHWEET & HEINTZ (1966)

ZILLIG, W., VERWOERD, D.W. et KOALHAGE, H.,

In "Acides Ribonucléiques et Polyphosphates" page 229,
Compte-rendu : Colloques Internl. du C.N.R.S., Strasbourg,
6 à 12 Juillet, 1961 (696)

ZITTLE, C.A.,

J. Biol. Chem., 1945, 163, 119 ;
J. Franklin Inst., 1946, 242, 221 (291)

LISTE DES FIGURES

Numéro	Titre	Page
1	Organisation moléculaire des ribosomes - - - - - - - - - - - -	9
2	Formules des bases hétérocycliques azotées composant les ARN	13
3	Formules des principaux nucléotides présents dans les hydrolysats d'ARN- -	17
4	Schéma de l'hydrolyse alcaline - - - - - - - - - - - - - - - - -	21
5	Mode d'union des Nucléotides dans les acides nucléiques - - -	22
6	Appariement des nucléotides dans les ARN - - - - - - - - - - -	25
7	Structure secondaire des ARN : a-structure hypothétique des ARN ribosomaux macromoléculaires ; b-structure de l'ARN - alanine	26
8	Rôle des différentes classes d'ARN dans la biosynthèse protéique	28
9	Schéma opératoire du procédé d'extraction de OGUR et ROSEN	50
10	Procédé de SCHMIDT-THANNHAUSER modifié par HUTCHISON et MUNRO	58
11	Structure d'un dinucléotide alcali-stable - - - - - - - - - - -	78
12	Dégradations des dérivés de l'adénine dans des solutions alcalines 0,3 N à 100°C pendant 1 heure - - - - - - - - - - - - - - - - - -	80
13	Variation du rendement d'ARN en fonction de la concentration en acide trichloracétique -	124
14	Séparation par chromatographie de 48 heures sur papier Whatman n°1 phénol-isopropanol-acide formique-eau de l'hydrolysat alcalin d'un extrait de foie obtenu par la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER modifiée -	132
15	Identification des spots X, Y et I - - - - - - - - - - - - - - -	133
16	Chromatographie descendante dans le système solvant de PARTRIDGE n-butanol-acide acétique-eau sur papier Whatman n°3 pendant 48 heures ; révélation par le nitrate d'argent ammoniacal	134
17	Séparation par électrophorèse en tampon citrate 0,02 M à pH 3,5 de l'hydrolysat alcalin d'un extrait de foie obtenu par la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER modifiée - - - - - - - - - - -	136
18	Séparation par électrophorèse en tampon formiate 0,06 M à pH 2,7 de l'hydrolysat alcalin d'un extrait de foie suivant la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER modifiée - - - - - - - - - - -	138
19	Hydrolysat total d'un extrait de foie de rat normal, obtenu par la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER modifiée - - - - - - - - - -	140
19/B	Chromatographie des hydrolysats alcalins d'un extrait de foie de rat normal, obtenu par la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER modifiée -	142

Numéro	Titre	Page
20	Comparaison de la composition qualitative des extraits de foie de rat normal, obtenu par les méthodes à la guanidine et à l'acide trichloracétique -	156
21	Composition comparée des extraits obtenus par la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER modifiée et par la méthode à la guanidine	160
22	Hydrolysat total d'un extrait de foie de rat normal, obtenu par la méthode à la guanidine -	161
23	Hydrolysats totaux d'extraits trichloracétiques :	
	a - Noyau total -	171 (a)
	b - Noyaux résiduels après diffusion - - - - - - - - - - - -	171 (b)
24	Hydrolysats totaux d'extraits trichloracétiques :	
	a - Fraction "Ribosomes Nucléaires" - - - - - - - - - - - - -	172 (a)
	b - Fraction microsomale - - - - - - - - - - - - - - - - - -	172 (b)
25	Hydrolysats totaux d'extraits trichloracétiques :	
	a - Fraction d'ARN type messager - - - - - - - - - - - - - -	174 (a)
	b - Précipité pH = 5 -	174 (b)
26	Hydrolysats totaux d'extraits obtenus par la méthode à la guanidine.	
	a - Foie de rat normal - - - - - - - - - - - - - - - - - - -	176 (a)
	b - Hépatome ascitique de ZEDJDELA - - - - - - - - - - - - -	176 (b)
27	Mécanisme d'action de la ribonucléase - I pancréatique	183
28	Electrochromatographie d'hydrolysat ribonucléasique - selon RUSHIZKY et KNIGHT -	191
29	'Finger print' d'hydrolysat ribonucléasique d'ARN de foie de rat effectué par la méthode de RUSHIZKY et KNIGHT - - - - - -	194
30	'Finger print' d'hydrolysat ribonucléasique de foie de rat normal effectué par la méthode de RUSHIZKY-KNIGHT modifiée : électrophorèse de 7 h 30 à 800 volts. - - - - - - - - - - - -	196
31	'Finger print' d'hydrolysat ribonucléasique de foie de rat normal effectué par la méthode de RUSHIZKY-KNIGHT modifiée : électrophorèse de 6-7 heures à 1000 volts - - - - - - - - - - -	198
32	'Finger print' d'hydrolysat ribonucléasique de foie de rat normal : électrophorèse de 6-7 heures à 1000 volts ; chromatographie : butanol tertiaire/formiate d'ammonium/alcool isoamylique (50:50:2)	199
33	'Finger print' d'hydrolysat ribonucléasique de foie de rat normal. Electrophorèse : 6-7 heures à 1000 volts. Chromatographie : butanol tertiaire / formiate d'ammonium (87:63)	200
34	Diagramme de référence d'un 'finger print' d'hydrolysat ribonucléasique de foie de rat normal effectué dans les conditions standard	201

Numéro	Titre	Page
35	'Finger print" d'hydrolysat ribonucléasique : - fraction noyau total	208
36	'Finger print' d'hydrolysat ribonucléasique : - fraction mitochondriale	206
37	'Finger print" d'hydrolysat ribonucléasique : - fraction ribosomale cytoplasmique	207
38	'Finger print" d'hydrolysat ribonucléasique : - précipité pH = 5	209
39	' Finger print' d'hydrolysat ribonucléasique : - fraction d'ARN type messager	211
40	'Finger print' d'hydrolysat ribonucléasique : - fraction noyau résiduel après diffusion	212
41	' Finger print' d'hydrolysat ribonucléasique : - foie de rat normal	214
42	'Finger print' d'hydrolysat ribonucléasique : - hépatome ascitique de Zedjdela	215
43	'Finger print' d'hydrolysat ribonucléasique : - mélange d'ARN de foie de rat + cellules ascitiques	216

LISTE DES TABLEAUX

	Titre	Page
A	Teneur approximative en certaines bases puriques méthylées dans les acides ribonucléiques des fractions cellulaires du foie de souris et de tumeur (déaprès ALLEN)	14
B	Nomenclature des principaux dérivés puriques et pyrimidiques	18
C	Vitesse d'échange de l'alanine marquée dans les protéines de tissus divers (d'après ZAMECNIK et al.)	30
D	Teneur en acide ribonucléique de différents tissus du rat et de la souris (d'après SCHNEIDER)	30
E	Quelques variations dans les conditions d'hydrolyse acide de l'ARN	71
F	Quelques variations dans les conditions d'hydrolyse alcaline d'extraits de tissus, avant leur séparation en ARN et ADN	74
G	Observation par différents auteurs d'une fraction d'ARN résistant à l'action de l'hydrolyse alcaline	77
H	Comparaison du rendement en ARN pour les procédés de FLECK et MUNRO et de SCHMIDT et THANNHAUSER	119
J	Variation du rendement en ARN en fonction du temps de contact avec l'acide trichloracétique à 10 pour cent	121
K	Variation du rendement en ARN en fonction de la concentration en acide trichloracétique	123
L	Variation du rendement en ARN en fonction de la concentration en acide perchlorique	127
M	Modification du rendement en ARN en présence du mélange éthanol - acétate	129

P Radioactivités spécifiques des nucléotides constituant les ARN du cytoplasme et de la phase aqueuse des extraits phénoliques, d'une part, et les ARN du noyau et de la phase phénolique d'autre part 148

Q Comparaison du rendement en ARN pour le procédé à la guanidine et la méthode de SCHMIDT et THANNHAUSER modifiée 152

R Caractéristiques spectrophotométriques des nucléotides obtenus à partir des ARN extraits par les différentes méthodes étudiées 154

S Causes d'erreur dans la détermination des radioactivités spécifiques 158

T Composition centésimale en nucléotides des ARN de foie de rat obtenus par les différentes méthodes d'isclement étudiées 163

U Comparaison de la composition molaire en nucléotides des ARN obtenus par les méthodes à l'acide perchlorique et à l'acide trichloracétique 164

V Propriétés des différentes ribonucléases d'origines diverses, actuellement connues 181

Y Comparaison des radioactivités spécifiques des différents ribo-oligonucléotides de foie de rat normal et d'hépatome ascitique de ZEDJDELA 217

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE Section de SCIENCES LILLE