

SUR LA DÉTERMINATION DE QUANTITÉS D'AZOTE PURIQUE DE L'ORDRE
DE 10 A 40 GAMMAS
APPLICATION AUX ACIDES NUCLÉIQUES, NUCLÉOPROTÉIDES, TISSUS,
MICROORGANISMES

par

R. VENDRELY

*Laboratoire de Morphologie expérimentale et de physiologie cellulaire, Université libre de Bruxelles (Belgique) **

Toutes les méthodes anciennes et récentes concernant le dosage des bases puriques n'envisagent en général que l'évaluation précise de quantités d'azote de l'ordre de 500 à 1.000 gammes ou davantage. Nous les énumérons pour mémoire. Ce sont les techniques de SALKOWSKI¹, de KRÜGER ET SCHMIDT², SCHMIDT ET ENGEL³, de SCHMIDT⁴, de GRAFF ET MACULLA⁵, de RAEKALLIO⁶, de WIAME⁷. Toutes sont basées sur des principes voisins et comportent une ou deux précipitations des purines en un complexe argentique ou cuivreux, avec parfois alternance des deux procédés. Nous avons assez récemment présenté une technique analogue utilisant le cuivre⁸, mais pour laquelle nous avons étudié d'une manière plus complète l'action de l'hydrolyse acide sur des mélanges complexes, mettant en garde à la fois contre une éventuelle destruction des bases puriques lors d'un chauffage trop prolongé et contre une surcharge protéique lors d'un chauffage trop bref.

Notre technique simple et relativement rapide s'est révélée très fidèle et très précise; c'est pourquoi, connaissant en outre l'insolubilité très grande des combinaisons cuivreuses des purines (la solubilité variant de 1 p. 200.000 à 1 p. 360.000 suivant les purines), nous avons songé à l'adapter à la détermination de quantités très faibles d'azote purique. Par une telle mise au point, nous pensons rendre de grands services aux cytochimistes et à tout chercheur s'attaquant à des matières rares ou peu riches en substances nucléiques. On connaît aussi par ailleurs l'importance toujours croissante que prend l'étude du rôle des acides nucléiques et l'intérêt qu'il y a par conséquent à posséder une méthode de dosage aussi spécifique que possible permettant l'estimation de quantités extrêmement réduites de ces acides.

Lorsqu'on opère sans précaution spéciale sur un matériel complexe, (tissus, microorganismes), le dosage exprime l'ensemble des purines libres et des purines¹ combinées en nucléotides, nucléosides, acides nucléiques. Quand on désire doser les seuls acides nucléiques, il convient de se débarrasser au préalable des bases libres, des nucléosides et des mononucléotides en épousant les tissus ou les microorganismes par l'acide trichloracétique *froid*; l'hydrolyse chlorhydrique puis le dosage des purines portant sur le résidu d'épuisement.

* * *

La technique que nous allons décrire repose sur le même principe que celle précédemment publiée, mais comporte toute une série de modifications et d'adaptations qui nécessitera une rédaction détaillée de ses principales phases.

* Adresse actuelle de l'auteur: Laboratoire de Biochimie, Faculté de Médecine, Strasbourg (France).

PRINCIPE

1° La matière à analyser (acide nucléique — fragment de tissu ou d'organe) est hydrolysée en milieu CIH N.

2° Les purines libérées par hydrolyse sont séparées à l'état pur par deux précipitations successives en un complexe cuivreux.

3° L'azote des bases puriques ainsi séparées est déterminé par micro Kjeldahl, après minéralisation.

TECHNIQUE

1. Hydrolyse

On utilise pour effectuer l'hydrolyse, de petits ballons d'une capacité totale de 3 à 4 cc fermés par un bouchon et surmontés comme réfrigérant soit d'un mince tube de verre soit, pour les hydrolyses de longue durée, d'un modèle plus efficace à circulation d'eau.

La prise d'essai est mesurée avec une pipette de LINDERSTRØM-LANG s'il s'agit d'une solution, ou exactement pesée s'il s'agit d'un tissu. On ajoute suffisamment d'acide CIH d'un titre convenablement choisi pour obtenir un volume total de 1,20 à 2,0 cc et un titre final 1 N.

Le chauffage s'effectue de préférence dans un bain de paraffine muni d'un thermostat. Les micro-ballons y sont immergés jusqu'au niveau supérieur du liquide qu'ils renferment et chauffés 2 heures s'il s'agit d'un acide nucléique, 8 heures s'il s'agit d'une substance complexe.

Après hydrolyse le mélange est refroidi par immersion dans un bain d'eau froide. Au moyen d'une pipette munie d'une poire en caoutchouc, on prélève l'hydrolysat et on le filtre sur un micro-filtre poreux (SCHOTT, Iena 12 G-3), directement dans les tubes à centrifuger coniques (capacité 5 cc) où s'effectuera la précipitation des purines. Une aspiration légère facilite la filtration, le tube à centrifuger se trouvant placé à l'intérieur d'une fiole à vide. On effectue 2 à 3 lavages du petit ballon avec chaque fois 1/2 cc d'eau distillée que l'on verse ensuite sur le filtre poreux. Le même filtre peut servir plusieurs fois.

Le filtrat (2 à 3 cc) renferme la totalité des purines correspondant à un essai. On l'amène à l'alcalinité (indicateur : rouge de méthyle : 1 goutte) * avec de la soude à 40% en agitant au moyen d'un très fin agitateur de verre, puis on revient en milieu acide par addition de quelques gouttes d'acide acétique à 10%.

2. Précipitation des purines

Les tubes garnis de la liqueur d'hydrolyse sont placés dans un petit bain d'eau bouillante. (Si le chauffage entraîne à ce stade la formation d'un précipité, il est nécessaire de l'éliminer par centrifugation, de transvaser le liquide dans de nouveaux tubes au moyen d'une pipette à poire et de laver le culot avec 1/2 cc d'eau acétique en joignant cette eau de lavage à la fraction principale).

a. 1^{ère} précipitation. On ajoute successivement à l'hydrolysat, en agitant chaque fois, 5 gouttes de solution de métabisulfite à 30%, 4 gouttes de SO₄Cu à 10%; il se forme un fin précipité visible en contrejour qui se colore peu à peu par surcharge d'oxyde

* Solution obtenue en dissolvant 0,25 g de rouge de méthyle dans 200cc d'alcool à 90°, 100 cc d'eau distillée. On laisse reposer 24 heures, on filtre.

cuivreux. On retire les agitateurs en les lavant avec quelques gouttes d'eau. Par centrifugation 5 minutes à 3.000 tours-min, on rassemble un culot brunâtre très perceptible. La liqueur surnageante est décantée au moyen d'une pipette à poire ; il est préférable de laisser 2 à 3 mm de liquide au-dessus du précipité.

b. *Décomposition du complexe cuivreux.* Le culot repris par 1,5 cc d'eau distillée chaude, est replacé dans le bain-marie. On ajoute 4 gouttes de solution de sulfure neutre de sodium * et 6 gouttes d'acide acétique à 10% (2 gouttes de plus si, ultérieurement, la liqueur tarde à s'éclaircir).

On agite soigneusement au moyen des agitateurs. Il se forme un précipité noir plus ou moins colloïdal (sulfure de cuivre et soufre), qui, peu à peu, par chauffage prolongé au bain-marie (20 à 25 minutes) se rassemble ; la liqueur presque incolore doit être parfaitement limpide.

On centrifuge et transvase sans perte au moyen d'une pipette à poire la presque totalité de la liqueur dans une nouvelle série de tubes coniques préparés à cet effet. La pipette utilisée est lavée par aspiration d'un peu d'eau (1/2 cc) que l'on verse sur le précipité résiduel, ceci à 2 reprises ; le précipité délayé soigneusement est à nouveau séparé par centrifugation, l'eau de lavage est ajoutée au liquide initial.

c. *2e précipitation.* L'ensemble des liqueurs ainsi réunies est précipité une nouvelle fois par le bisulfite et cuivre comme précédemment. Par centrifugation de 5 minutes on obtient un liquide que l'on élimine avec la pipette à poire et un culot qui, repris à son tour par de très faibles quantités d'eau (3 à 4 fois 0,4 cc), est entraîné à la pipette dans les fioles spéciales

Fioles à minéralisation

Fig. 1.

pour microminéralisation (Voir Fig. 1).

3. Détermination de l'azote du précipité purique

a. *Minéralisation.* Réactif pour minéralisation : De l'acide sulfurique pur pour analyse est soumis à une ébullition de 15 minutes en présence d'un excès de mélange catalyseur (5 g pour 50 cc SO_4H_2). Nous utilisons le mélange suivant : Se pulvérisé, 1 partie + SO_4Hg , 5 parties + SO_4K_2 , 30 parties. L'acide parfaitement déshydraté est transvasé bouillant dans une fiole à fermeture émeri préalablement chauffée. On ferme et laisse refroidir. La liqueur claire surnageante est seule utilisée. Ce réactif se conserve en bon état pendant plus d'un mois si l'on prend quelques précautions contre la rehydratation.

Technique : La prise d'essai, suspension aqueuse du complexe purique, est évaporée à sec à l'étuve à 105° directement dans le tube à minéraliser.

Ceci terminé on fait tomber au fond de la fiole quelques filaments de laine de verre

* Saturer NaOH à 1 p. cent avec SH_2 , ajouter un volume égal de NaOH à 1 p. cent.

préalablement lavée à l'acide chromique et à l'eau distillée. Une petite mèche de ces filaments très fins est coupée sur une longueur de 3 à 5 mm au-dessus de l'axe du tube. On ajoute ensuite 80 λ de réactif pour minéralisation. On dispose les fioles en éventail

sur une plaque d'amiante (épaisseur 4 mm) percée de petits trous de 2 mm. de diamètre, en appuyant leur partie supérieure contre un anneau métallique échancré. La plaque d'amiante recouvre la résistance (600 watts) d'un réchaud électrique (Voir Fig. 2). Le chauffage d'une durée totale de 30 minutes est discontinu. On coupe le courant suivant besoin en se contentant de maintenir une ébullition douce (l'acide monte et retombe le long de la paroi à un tiers environ de la hauteur totale du tube).

La minéralisation terminée, on laisse refroidir les tubes et reprend le produit de l'attaque par 1 cc d'eau distillée.

b. *Distillation.* On utilise l'appareil de MARKHAM¹⁰ (se référer à la publication de cet auteur pour sa description et son emploi).

Le chargement de l'appareil se fait avec une pipette à poire, les fioles à minéraliser sont lavées à 2 reprises avec 1 cc d'eau. La soude (0,6 cc) est introduite dans l'appareil en fonctionnement en soulevant légèrement le bouchon émeri de l'entonnoir à chargement, un rinçage avec un égal volume d'eau est effectué de la même manière.

On recueille le distillat dans de petits récipients de 3,5 cc constituées par la base d'ampoules de 5 cc coupées à l'encolure et renfermant 90 λ d'acide sulfurique N/30, 1 goutte d'indicateur (Voir formule page 3) et 4 gouttes d'eau distillée. L'extrémité du réfrigérant plonge dans l'acide par un tube effilé qui sera lavé extérieurement à la fin de la distillation au moyen de 2 gouttes d'eau. La distillation de 2 cc environ se fait en 5 à 7 minutes.

c. *Titrage.* On utilise pour le titrage une burette de LINDERSTRØM-LANG⁹ de capacité 100 λ .

Dans un premier temps on détermine la valeur en N de la soude N/30 utilisée en choisissant un virage facile à saisir par l'expérimentateur (jaune champagne par exemple).

On effectue ensuite le titrage d'au moins 3 essais à blanc comparativement à la titration initiale soude-acide (teinte équivalente).

Enfin on titre les essais proprement dits (minimum de 3 essais) toujours comparativement au virage initial.

4. *Calcul des résultats.*

Rien de particulier si ce n'est que nous faisons intervenir une correction calculée en tenant compte de la destruction des bases puriques au cours de l'hydrolyse. Voir

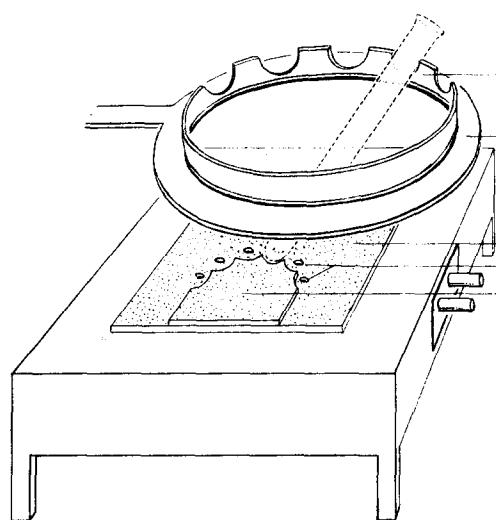


Fig. 2.

le Tableau I se rapportant à chaque base purique prise isolément : adénine, guanine et à leur mélange équimoléculaire tel qu'on le rencontre dans les acides nucléiques de type courant.

TABLEAU I

| Correction à appliquer au résultat obtenu après hydrolyse de la matière étudiée pendant une durée de . . . heures | 0 | 1 | 2 | 4 | 8 | 16 |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| multiplier par . . . pour Adénine | 1.000 | 1.010 | 1.030 | 1.045 | 1.104 | 1.256 |
| Guanine | 1.000 | 1.000 | 1.010 | 1.012 | 1.036 | 1.075 |
| Mélange équimoléculaire Adénine-Guanine . . . | 1.000 | 1.012 | 1.022 | 1.038 | 1.071 | 1.165 |

La technique que nous préconisons nous a donné de bons résultats appliquée à l'étude d'acides nucléiques et de nucléoprotéides. Ainsi pour une prise d'essai d'acide nucléique renfermant 110,1 γ d'acide pur soit 11,78 γ d'N purique nous avons obtenu au cours de trois séries d'expériences respectivement 11,54 γ—12,40 γ—11,86 γ. L'analyse de 3 échantillons différents de granas de tabac * nous a permis d'en estimer la richesse en N purique à 0,183 p. cent—0,159 p. cent—0,154 p. cent (dosages effectués sur des quantités d'azote variant de 9 γ à 32 γ). Nous avons vérifié en outre que de fortes quantités de levure (15 fois le poids de l'acide mis en oeuvre) ou de protéine étrangère (25 fois le poids de l'acide) ne gênaient pas la précipitation et le dosage. Nous avons trouvé par exemple pour un mélange d'acide nucléique et de levure dans les proportions indiquées ci-dessus 19,90 γ et pour la levure seule 4,48 γ ; la différence s'exprime par 15,42 γ (valeur attendue 16,50 γ d'N purique). La richesse de la levure en amino purines, estimée à partir de ces doses très faibles est de 0,64 p. cent, résultat encore très en rapport avec ceux obtenus habituellement.

Analysant des oeufs de grenouille dont la teneur précise en N purique nous était inconnue, nous avons trouvé pour deux essais portant chacun sur 15 oeufs, respectivement 42,95 γ et 43,59 γ. Un oeuf renfermerait en moyenne 3,10 γ d'N purique, soit sensiblement 0,08 p. cent du produit frais si l'on évalue le poids de l'unité à 4000 γ. Des essais effectués sur des quantités d'oeufs croissantes 4, 8, 12 oeufs d'une autre ponte, nous ont donné 14,61, 26,01, 44,55 γ, soit en moyenne pour un oeuf : 3,65, 3,25 et 3,71 γ de N purique. On voit que l'on peut être satisfait de la technique indiquée ; cependant il ne faut pas considérer les résultats obtenus comme exacts à plus de 5 p. cent près, lorsqu'il s'agit de doses faibles d'N purique (8 à 15 γ) ; ceci est plus inhérent au titrage final lui-même qu'à la méthode utilisée. Une appréciation à 5 p. cent près est malgré tout déjà très suffisante pour mener à bien l'étude de nombreux problèmes biologiques.

* Nous devons ce matériel à l'obligeance de Monsieur le Professeur JEENER, qui s'est toujours intéressé à notre travail. Nous sommes heureux de lui adresser nos très sincères remerciements.

RÉSUMÉ

Une microméthode pour le dosage de petites quantités d'azote purique (10—50γ N) est décrite en détails.

SUMMARY

A micromethod for the estimation of small amounts of purines nitrogen (10—50γ N) is described in details.

ZUSAMMENFASSUNG

Ausführliche Beschreibung einer Mikromethode zur Bestimmung von kleinen Purinstickstoffmengen (10—50 γ N).

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ E. SALKOWSKI, *Pflüger's Archiv*, **69** (1898) 280.
- ² M. KRÜGER UND G. SCHMIDT, *Ztschr. f. physiol. Chem.*, **45** (1905) 1.
- ³ G. SCHMIDT UND E. ENGEL, *Ztschr. f. physiol. Chem.*, **208** (1932) 225.
- ⁴ G. SCHMIDT, *Ztschr. f. physiol. Chem.*, **219** (1933) 14.
- ⁵ S. GRAFF AND A. MACULLA, *Journ. of biol. Chem.*, **110** (1935) 71.
- ⁶ T. RAEKALLIO, *Skand. Ark. Physiol.*, **81** (1939) 1.
- ⁷ J. WIAME, *Thèse*, Bruxelles 1945.
- ⁸ R. VENDRELY ET R. SARCIRON, *Bull. Soc. Chim. biol.*, **26** (1944) 214.
- ⁹ K. LINDERSTRØM-LANG AND H. HOLTER, *C. R. Lab. Carlsberg*, **19** (1931) nr. 4.
- ¹⁰ R. MARKHAM, *Biochem. J.*, **36** (1942) 790.

Reçu le 30 avril 1946