

L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE DES MOISISSURES

I. UNE TECHNIQUE RAPIDE DE DOSAGE

par

JACQUES DIRKX

Institut Pasteur, Bruxelles (Belgique)

INTRODUCTION

En étudiant les phénomènes qui précèdent la germination des spores de diverses moisissures, nous avons été amené à rechercher une méthode rapide et sûre de dosage de l'acide ribonucléique pouvant s'appliquer à ce matériel.

Les principales techniques existantes se sont révélées de peu d'utilité dans le cas des Ascomycètes. La détermination colorimétrique des pentoses à l'orcine, employée par MEJBAUM¹, est inutilisable en raison des hautes teneurs en polysaccharides des moisissures. De même, la mesure quantitative de la basophilie au moyen du bleu de toluidine, mise au point par JEENER ET BRACHET² ne peut être employée lorsqu'il s'agit de spores à membranes très épaisses qui ne se laissent que très difficilement pénétrer par le colorant. Plus récemment, OGUR et ses collaborateurs^{3, 4} ont mis au point des méthodes spécifiques d'extraction des acides nucléiques par les solutions d'acide perchlorique à 5 ou 10% à la température ordinaire et à +4°. Le dosage proprement dit consiste à mesurer l'absorption dans l'ultra-violet, à 260 m μ , des extraits ainsi obtenus et à en déduire par calcul la quantité d'acide nucléique qu'ils contiennent. On peut de cette manière extraire spécifiquement chaque type d'acides nucléiques⁴ et doser ceux-ci séparément. Ces résultats ont été confirmés par SULKIN ET KUNTZ⁵.

La méthode d'extraction à l'acide perchlorique est utilisable avec de bons résultats sur les spores des moisissures. Cependant, elle présente l'inconvénient d'être assez longue, l'extraction devant se faire pendant une quinzaine d'heures avec agitation constante; d'autre part, il est toujours assez peu avantageux, dans les déterminations spectrophotométriques, d'avoir des blancs dont l'absorption est déjà assez forte: or tel est le cas des solutions d'acide perchlorique en lumière ultra-violette.

Nous nous sommes demandé si la technique histologique de ROBINOW⁶ ne pourrait pas être utilisée avec succès dans le cas présent. La méthode de ROBINOW, couramment utilisée pour mettre en évidence les noyaux bactériens, consiste à traiter le matériel étudié par l'acide chlorhydrique normal à 60° pendant une dizaine de minutes et à le colorer ensuite, après lavage, par un colorant basique. Dans ces conditions, on constate que la basophilie cytoplasmique a complètement disparu et que seuls les noyaux fixent encore le colorant. Il semble donc que l'acide chlorhydrique chaud ait la propriété

d'extraire quantitativement du cytoplasme l'acide ribonucléique contenu dans celui-ci, ainsi que l'avaient déjà signalé VENDRELY ET LIPARDY⁷.

Les conditions d'hydrolyse de la réaction de ROBINOW étant également celles de la réaction de FEULGEN, on peut s'attendre à ce que l'acide désoxyribonucléique ne reste pas inattaqué. Effectivement, VENDRELY ET LIPARDY⁷ et THOMAS⁸ ont montré que, dans ces conditions, les purines de l'acide désoxyribonucléique étaient libérées tandis que STEDMAN ET STEDMAN⁹, travaillant sur des noyaux isolés du foie, voient ceux-ci perdre 35% de leur poids et 50% de leur acide désoxyribonucléique lorsqu'on les chauffe pendant 10 minutes dans l'acide chlorhydrique normal à 60°.

Toutefois, chez les moisissures, levures et bactéries, l'erreur due à une hydrolyse partielle de l'acide désoxyribonucléique est faible et même négligeable, en raison de la faible proportion de cet acide chez ces organismes où l'acide ribonucléique existe presque toujours en quantités considérables.

DOSAGE DE L'ACIDE NUCLÉIQUE PAR EXTRACTION CHLORHYDRIQUE A 60° C

Matériel et méthodes

a. *Acide ribonucléique.* L'acide nucléique utilisé comme substance de référence au cours de ce travail est l'acide nucléique commercial de la firme "Nutritional Biochemicals Corporation" purifié suivant la technique décrite par SMITH ET MARKHAM¹⁰.

b. *Protéines.* Sulfate de protamine de la société "Hoffmann-Laroche", Bâle et albumine de plasma de bœuf (fraction V) de "Armour Laboratories", Londres, conservée sèche à + 4°.

c. *Souches.* Les souches de moisissures utilisées proviennent du "Centraalbureau voor Schimmelcultuur", de Baarn, Hollande. Elles ont été cultivées et entretenues sur mout de brasserie gélosé non sucré.

d. *Obtention des spores.* Après culture des moisissures en boîtes de Roux sur mout gélosé à 26-27° pendant huit jours, on introduit dans chaque boîte environ 100 grammes de billes de verre et 50 ml d'eau physiologique tamponnée à pH 7.2. On agite doucement les billes dans la boîte en veillant à ne pas détacher de fragments mycéliens. La suspension de spores ainsi obtenue est recueillie par pipetage; elle contient de 10⁸ à 10¹⁰ spores par ml.

e. *Technique du dosage.* 2 ml de la suspension de spores sont centrifugés et lavés deux fois à l'eau physiologique tamponnée, pH 7.2. Le culot est repris, soit dans 2 ml d'acide perchlorique 5% (dosage selon OGUR), soit dans 2 ml d'acide chlorhydrique normal pour l'hydrolyse selon ROBINOW-FEULGEN. Les suspensions perchloriques sont agitées pendant la nuit à la température du laboratoire, alors que les suspensions chlorhydriques sont portées au bain-marie à 60° pendant une dizaine de minutes. Après les extractions, les suspensions sont à nouveau centrifugées et les liquides surnageants recueillis. Ceux-ci sont dilués, soit dans l'acide perchlorique à 5%, soit dans l'acide chlorhydrique normal et l'on mesure l'absorption des extraits dilués dans l'ultraviolet à 260 m μ contre un blanc à l'acide perchlorique ou à l'acide chlorhydrique selon le cas. Le dosage se fait par rapport à la droite obtenue en portant sur un graphique, en abscisse les concentrations, en ordonnée les extinctions à 260 m μ de solutions d'acide nucléique de concentrations connues, traitées de manière identique aux extraits à doser. Toutes les mesures spectrophotométriques ont été faites au spectrophotomètre Beckman modèle DU à prisme de quartz.

Résultats

A. Dosage, par l'acide chlorhydrique, de l'acide ribonucléique mélangé à des protéines

Nous avons d'abord réalisé des mélanges en proportions connues d'acide nucléique et de protéines et, appliquant la méthode de dosage à l'acide chlorhydrique, cherché si l'on retrouvait quantitativement l'acide nucléique mis en oeuvre. Ces expériences devaient aussi nous montrer si l'acide chlorhydrique à 60° était capable de dissocier les combinaisons entre l'acide nucléique et les protéines.

Une solution d'acide nucléique de concentration connue dans du tampon aux phosphates pH 7.5 est mélangée à une solution de sulfate de protamine dans le même tampon. La combinaison est immédiate et il apparaît un abondant précipité blanc contenant la totalité de l'acide nucléique mis en œuvre. Le précipité ainsi obtenu est centrifugé, lavé à l'alcool et à l'éther puis séché sous vide. Après dessiccation, il est traité par $HCl\ N$ à 60° pendant 10 minutes; il se dissout complètement et la solution claire obtenue est diluée dans $HCl\ N$ pour être dosée spectrophotométriquement comme il a été décrit plus haut.

Des expériences identiques ont été réalisées en remplaçant la protamine par de l'albumine. Le Tableau I résume les résultats obtenus.

TABLEAU I

Protéine mg	Acide nucléique mg	Acide nucléique retrouvé par dosage à $HCl\ N\ 60^\circ$
Protamine 11.3	1.1	1.08
Albumine 16.2	1.4	1.33
Albumine 9.7	0.8	0.85

Comme on le voit, la méthode à l'acide chlorhydrique est quantitative même en présence d'un excès appréciable de protéines puisqu'elle permet de retrouver, aux erreurs d'expérience près, la totalité de l'acide nucléique mis en œuvre.

B. Dosage comparatif de l'acide nucléique par l'acide chlorhydrique et l'acide perchlorique sur matériel biologique

Nous avons essayé de comparer le dosage à l'acide perchlorique selon OGUR ET ROSEN au dosage à l'acide chlorhydrique pour voir si les résultats donnés par les deux méthodes sont identiques. Les dosages ont été effectués sur une suspension de levure et sur diverses suspensions de spores de moisissures. Les résultats sont résumés dans le Tableau II.

TABLEAU II

Souche utilisée	Spores par ml	Gammas d'acide nucléique par ml de spores	
		méthode de OGUR	méthode à l' HCl
Penicillium expansum	$2.55 \cdot 10^8$	154	154
Aspergillus tamari	$1.92 \cdot 10^7$	36.8	37
Levure	—	20.5	20.8
Asp. tamari	$6.68 \cdot 10^6$	12.8	13.1
Penicillium citrinum	$4.52 \cdot 10^7$	6.55	7.1
Penicillium notatum	$2.0 \cdot 10^7$	3.2	4.3

Comme on peut le voir, la concordance entre les deux méthodes est très satisfaisante jusqu'à une concentration en acide nucléique voisine de environ 10 gammas par ml de spores. En-dessous de cette valeur les résultats ne concordent plus et en réalité aucune

des deux méthodes ne donne le résultat exact. Nous avons pu déterminer que la méthode à l'acide perchlorique donne des valeurs légèrement trop basses tandis que l'extraction à l'acide chlorhydrique, au contraire, conduit à des teneurs en acide nucléique trop fortes. Par souci de précision, la méthode à l'acide chlorhydrique doit donc être limitée au dosage de quantités d'acide nucléique supérieures ou égales à 10 gammes pour un ml de suspension de matériel à doser.

Sous cette réserve, la méthode est parfaitement quantitative et elle présente l'avantage d'une grande rapidité. Son emploi doit être réservé à des produits biologiques dont le rapport acide ribonucléique/acide désoxyribonucléique est élevé (de 50 à 100), comme c'est le cas chez les bactéries et les champignons. Signalons enfin que l'absorption dans l'ultra-violet de l'acide ribonucléique chauffé pendant 10 minutes à 60° dans HCl N suit remarquablement la loi de BEER-LAMBERT alors que la réaction à l'orcine par exemple, effectuée en tube ouvert à 100°, ne la suit pas.

TRANSFORMATION SUBIE PAR L'ACIDE NUCLÉIQUE AU COURS DE L'HYDROLYSE PAR HCl N, 60°

Il nous a semblé intéressant de rechercher la nature de la transformation que subit l'acide nucléique au cours de l'hydrolyse par HCl N 60° pendant 10 minutes.

Deux faits de base nous ont servi de guides au cours de cette étude, ce sont:

1. Après hydrolyse dans les conditions de ROBINOW, l'acide nucléique n'est plus précipitable par l'alcool en milieu acide ce qui semble indiquer une dépolymérisation complète et l'absence de polynucléotides.

2. L'hydrolyse ne s'accompagne pas de libération d'acide phosphorique. 10 mg d'acide nucléique hydrolysé contiennent seulement 3.5 gammes de P minéral, proportion beaucoup trop faible pour être significative. L'absence d'acide phosphorique libre exclut d'emblée l'hypothèse d'une hydrolyse libérant des nucléosides.

Il s'ensuit que l'hydrolyse par HCl N 60° pendant 10 minutes peut donc libérer exclusivement:

1. des bases puriques et pyrimidiques,
2. des nucléotides.

D'autre part, SMITH ET MARKHAM, en hydrolysant par l'acide chlorhydrique normal à 100° pendant une heure de l'acide ribonucléique ont observé sa transformation quantitative en bases puriques (adénine et guanine) et en nucléotides pyrimidiques (acide uridylique et acide cytidylique) et n'ont assisté à aucune libération de bases pyrimidiques. Nos conditions d'hydrolyse étant sensiblement plus douces, on pouvait s'attendre à une notable libération de nucléotides, à une apparition probable de purines et à l'absence de pyrimidines libres.

RECHERCHE CHROMATOGRAPHIQUE DES PRODUITS D'HYDROLYSE DE L'ACIDE NUCLÉIQUE

Nous avons recherché par chromatographie de partage sur papier la nature des produits libérés par l'acide nucléique dans les conditions d'hydrolyse du ROBINOW-FEULGEN.

Les chromatogrammes ont été réalisés sur papier Whatman no. 1 et nous avons utilisé sans modification la technique mise au point par CARTER¹¹ pour les dérivés des acides nucléiques.

Les solvants employés furent:

- Le butanol-urée pour la recherche des bases;
- Le solvant à deux phases, alcool *isoamylique*-citrate d'ammonium 5% pH 9.6 pour la recherche des nucléotides.

Après développement pendant une vingtaine d'heures, les taches sont révélées par fluorescence dans l'U.V. au moyen d'une lampe Mineralight SL 2537 de la "Ultra-Violet Products Corporation", mise aimablement à notre disposition par le Professeur BRACHET.

Les taches révélées sont découpées et éluées:

- Dans $HCl N$ à 37° pendant 24 heures pour les bases;
- Dans NH_4OH à 37° pendant 24 heures pour les nucléotides.

Résultats

A. Purines

Au cours de la chromatographie dans le butanol-urée, deux taches se détachent de l'hydrolysat d'acide nucléique. Après élution, le spectre ultra-violet des solutions obtenues est déterminé.

Désamination: Aux éluats chlorhydriques obtenus, on ajoute 5 λ d'une solution saturée de nitrite de sodium et les solutions sont portées au bain-marie à 100° pendant 10 minutes. On détermine à nouveau les spectres contre un blanc ayant subi le même traitement, les composés nitreux absorbant sensiblement dans l'U.V. en-dessous de $240 m\mu$.

Les Fig. 1 et 2 donnent les spectres de deux taches éluées avant et après désamination. Les résultats sont résumés dans le Tableau III, les deux taches données par

l'hydrolysat ayant été appelées respectivement RNA I et RNA II, λ_{max} représente la longueur d'onde correspondant au maximum d'extinction et $\Delta\lambda M$ les longueurs d'onde de plus grande différence d'extinction entre les spectres avant et après désamination.

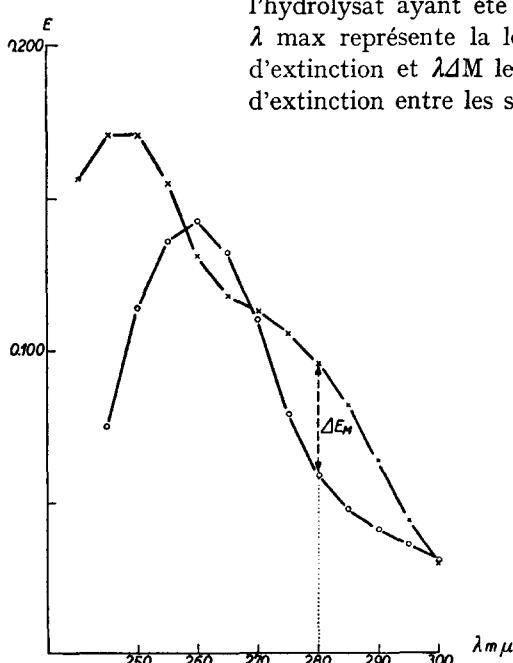


Fig. 1. RNA I avant et après désamination

—x—x avant désamination
—o—o après désamination

La longueur d'onde de plus grande différence entre les deux courbes se situe à $280 m\mu$

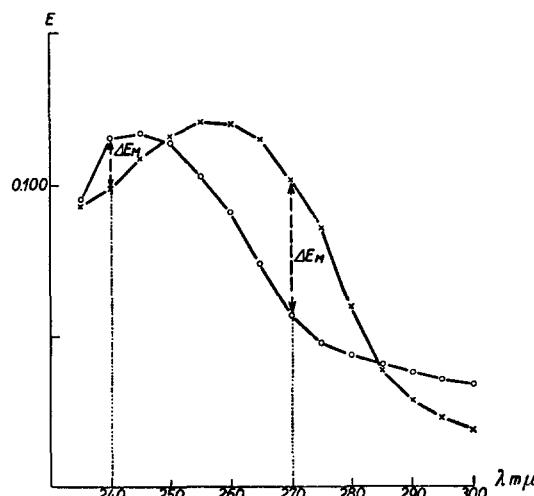


Fig. 2. RNA II avant et après désamination

—x—x avant désamination
—o—o après désamination

Les longueurs d'onde de plus grande différence entre les deux courbes se situent respectivement à 240 et $270 m\mu$

TABLEAU III

Substance	λ_{max}	E_{280}/E_{260}	ΔM
RNA I RNA I désaminé	245-250 260	0.74	280
Guanine Xanthine	245-250 260	0.74	280
RNA II RNA II désaminé	255-260 250		240 et 270
Adénine Hypoxanthine	260 250		240 et 270

RNA I est donc de la guanine, RNA II de l'adénine. Ainsi que l'on pouvait s'y attendre, il n'y a pas libération de bases pyrimidiques.

B. Nucléotides

Dans le solvant employé, les isomères a et b des nucléotides puriques sont séparés, tandis que les nucléotides pyrimidiques, migrant ensemble, ne forment qu'une seule tache. La Fig. 3 montre la position des taches sur un chromatogramme réalisé à partir d'un hydrolysat d'acide nucléique par $\text{HCl } N 60^\circ$. De l'acide adénylique de levure et de l'acide guanylique purs, chromatographiés en même temps, servent de substance de référence. Le dosage des constituants de l'hydrolysat est effectué en mesurant l'absorption à $260 \text{ m}\mu$ des solutions obtenues après élution des taches.

Fig. 3. Chromatographie de l'acide nucléique hydrolysé dans les conditions de ROBINOW

G: guanine

A: adénine

AA b: acide adénylique b

AA a: acide adénylique a

AG a: acide guanylique a

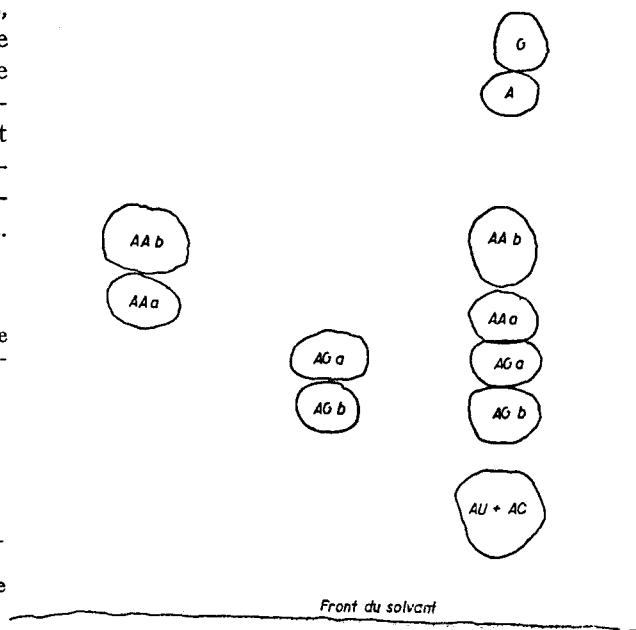
AG b: acide guanylique b

AU + AC: acide uridylique +

acide cytidylique

Solvant: alcool isoamylique-citrate d'ammonium 5% pH 9.6

Bibliographie p. 201.



Le Tableau IV donne les résultats du dosage. Pour les bases puriques libérées, la quantité équivalente de nucléotides correspondant à ces bases a été calculée, de même que la somme des nucléotides libérés théoriquement par l'hydrolyse complète en mononucléotides d'un tétranucléotide statistique de haut poids moléculaire.

TABLEAU IV
DOSAGE, APRÈS SÉPARATION CHROMATOGRAPHIQUE, DES CONSTITUANTS LIBÉRÉS AU COURS DE L'HYDROLYSE DE 296 γ D'ACIDE RIBONUCLÉIQUE PAR HCl N (60° 10 minutes)

Composé libéré	Quantité (γ)	Équivalence en nucléotides (γ)	Total théorique de nucléotides (γ)
Guanine	13.2	31.8 d'ac. guanylique	
Adénine	5.4	13.9 d'ac. adénylique	
Acide adénylique Acide guanylique	49.4 68.5	49.4 68.5	
nucléotides pyrimidiques	136	136	
Total		299.6	312

On retrouve donc à 4% près la totalité de l'acide nucléique mis en oeuvre. Cette erreur étant du même ordre que les erreurs expérimentales commises au cours des différentes manipulations, on peut considérer que l'acide nucléique, dans les conditions du ROBINOW-FEULGEN, est entièrement hydrolysé en bases puriques et nucléotides. Le rendement en nucléotides de l'opération est de 81%.

CONCLUSIONS

La méthode d'extraction de l'acide ribonucléique par l'acide chlorhydrique normal à 60° pendant 10 minutes peut donc être employée avantageusement pour le dosage de cet acide nucléique, même en présence d'un gros excès de protéines, sur un matériel pauvre en acide désoxyribonucléique (bactéries et champignons) à la condition toutefois que la quantité d'acide nucléique à doser ne soit pas inférieure à 10 gammes par ml de la suspension du matériel étudié. En dessous de cette valeur, on obtient des résultats trop forts alors que la méthode à l'acide perchlorique donne des valeurs trop faibles. La méthode présente l'avantage d'une grande rapidité et donne des blancs n'absorbant pas l'U.V. D'autre part, les spectres d'absorption obtenus de cette manière sont remarquablement purs et l'on ne peut y déceler d'absorption due à des corps étrangers.

Conduite dans les conditions de la réaction ROBINOW-FEULGEN, l'hydrolyse de l'acide nucléique libère une légère quantité de bases puriques et une quantité beaucoup plus abondante de nucléotides. Ces résultats sont en parfait accord avec ceux de SMITH ET MARKHAM⁹ qui par une hydrolyse plus poussée décomposent totalement les nucléo-

tides puriques en purines libres, tandis que les nucléotides pyrimidiques restent intactes.

La méthode d'hydrolyse précédemment décrite pourrait servir de base à la préparation des nucléotides en faisant suivre l'hydrolyse d'un fractionnement sur résines échangeuses d'ions tel que l'a décrit COHN¹².

RÉSUMÉ

Une méthode de dosage de l'acide ribonucléique sur un matériel pauvre en acide désoxyribonucléique (bactéries, champignons) est décrite en détail. Elle est basée sur l'hydrolyse de l'acide nucléique par l'acide chlorhydrique normal à 60° pendant 10 minutes et le dosage par absorption de l'extrait dans l'U.V.

Au cours de cette hydrolyse, 81% de l'acide nucléique est transformé en nucléotides. De petites quantités d'adénine et de guanine sont également libérées. Aucun autre composé purique ou pyrimidique n'a été décelé.

SUMMARY

A method for ribose nucleic acid determination is described in details. This method is to be used on biological material of low desoxyribose nucleic acid content (moulds, bacteria). It is based on the hydrolysis of RNA by normal hydrochloric acid at 60° C during 10 minutes. Determination of RNA is made, on the supernatant fluid after extraction, by U.V. absorption in the 260 m μ band.

During the hydrolytic process, 81% of the RNA are converted into nucleotides. Adenine and guanine are also liberated in smaller quantities. No other purine or pyrimidine compound has been detected.

ZUSAMMENFASSUNG

Eine Methode zur Bestimmung von Ribonukleinsäure in biologischem Material von geringem Desoxyribonukleinsäure-Gehalt (Bakterien, Schimmelpilze) wurde eingehend beschrieben. Das Prinzip der Methode ist die Hydrolyse der Nukleinsäure mit normaler Salzsäure bei 60° während 10 Minuten, Zentrifugieren, und Messung der Absorption im U.V. (260 m μ) der überstehenden Flüssigkeit.

Während der Hydrolyse werden 81% der Nukleinsäure in Nukleotide verwandelt. Kleine Mengen von Guanin und Adenin werden gleichfalls in Freiheit gesetzt. Andere Purin- oder Pyrimidinverbindungen wurden nicht gefunden.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 W. MEJBAUM, *Z. physiol. Chem.*, 258 (1939) 117.
- 2 R. JEENER ET J. BRACHET, *Enzymologia*, 11 (1944) 222.
- 3 M. OGUR ET G. ROSEN, *Federation Proc. Am. Soc. Exptl Biol.*, 8 (1949) 234.
- 4 R. O. ERICKSON, K. B. SAX ET M. OGUR, *Science*, 110 (1949) 472.
- 5 N. M. SULKIN ET A. KUNTZ, *Proc. Soc. Exptl Biol. Med.*, 73 (1950) 413.
- 6 C. F. ROBINOW, Addendum à *The Bacterial Cell* de R. J. DUBOS. Harvard University Press, Massachusetts, U.S.A., 1947.
- 7 R. VENDRELY ET J. LIPARDY, *Compt. rend.*, 223 (1946) 342.
- 8 R. THOMAS, *Bull. soc. chim. biol.*, 32 (1950) 469.
- 9 E. STEDMAN ET E. STEDMAN, *Biochem. J.*, 47 (1950) 508.
- 10 J. D. SMITH ET R. MARKHAM, *Biochem. J.*, 46 (1950) 509.
- 11 C. E. CARTER, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 1466.
- 12 W. E. COHN, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 1471.

Reçu le 11 avril 1951