

LA COMPOSITION DE L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE
DE LEVURE ET LE PROBLÈME DE LA SPÉCIFICITÉ DES
ACIDES NUCLÉIQUES

par

R. THOMAS

Laboratoire de Morphologie Animale, Université Libre de Bruxelles (Belgique)

Le problème de la "spécificité" des acides nucléiques a suscité, au cours des dernières années, un intérêt croissant, justifié par l'importance des hypothèses sur le rôle génétique des acides désoxyribonucléiques et sur le pouvoir d'autoduplication des particules nucléoprotéiques^{1, 2, 3, 4}.

Le terme spécificité prête toutefois à équivoque. Plutôt qu'à une spécificité au sens zoologique du mot, les hypothèses génétiques sur le rôle des acides désoxyribonucléiques feraient croire à l'existence, dans chaque noyau diploïde d'un même organisme, d'un même équipement de molécules spécialisées de ce constituant. Le rôle présumé des acides ribonucléiques ferait attendre une différenciation fonctionnelle moins directement liée à l'espèce et, peut-être, des différences plus marquées d'un organe à l'autre⁵.

Si de nombreux travaux sur cette question ont déjà été publiés, la possibilité d'une variabilité, en un même organisme, selon les conditions de milieu n'avait guère été envisagée jusqu'à ces derniers mois. Une large variabilité en fonction des facteurs extérieurs semble, en effet, caractériser plutôt des substances de réserve, telles que les glycérides. En serait-il de même des acides nucléiques? Les hypothèses sur la continuité génétique des granules ribonucléoprotéiques en seraient sérieusement compromises. D'où l'importance de la question soulevée par la récente recherche de DIMROTH ET JAENICKE⁶ sur la composition de l'acide ribonucléique de levure.

Ces auteurs cultivent une souche de levure (*TORULA*) en milieu synthétique dans des conditions contrôlées et uniformes (32°, pH 5.8). Seule la source d'azote diffère d'une culture à l'autre; le milieu synthétique est rendu *M/20* en l'une des substances azotées suivantes: sulfate ammonique, glycine, sérine, adénine, guanine.

100 g de levure sont ensemencées dans 500 ml de la solution; après quelques heures de croissance un égal volume de solution est ajouté, additionné dans certains cas de faibles quantités ($10^{-3} M$) d'azoture de sodium ou de chlorure de beryllium. La culture terminée, la levure est recueillie par centrifugation, lavée et extraite pendant 10 heures à 90–95° par un égal volume d'une solution à 20% de NaCl. L'acide ribonucléique ainsi extrait est isolé par précipitation à pH 2, lavé, séché et pesé. Les bases puriques, libérées par hydrolyse au méthanol-HCl, sont séparées par cristallisation fractionnée et dosées.

Le rapport guanine/adénine trouvé par DIMROTH ET JAENICKE varie dans de très larges limites selon la source d'azote utilisée (voir Tableau II). En raison de l'importance

théorique que présenterait une telle influence du milieu extérieur sur la composition des acides ribonucléiques, nous avons repris, en utilisant d'autres techniques, des essais parallèles.

Avant d'exposer les méthodes et les résultats, une discussion s'impose, concernant la valeur des conclusions que permettent les études sur la distribution des bases azotées. La proportion des bases constitue, à l'heure actuelle, le plus abordable des critères de différenciation des acides nucléiques. Il ne faut pas cependant se dissimuler les difficultés d'interprétation des résultats expérimentaux, même en admettant l'existence de techniques hydrolytiques parfaites.

Il convient en tout premier lieu de remarquer qu'un résultat négatif n'exclut en aucune manière l'idée de spécificité. Ce point sera approfondi plus loin.

Que peut-on, d'autre part, attendre de résultats expérimentaux indiquant, d'un acide nucléique à l'autre, des différences dans les proportions des bases? Deux grands écueils se présentent:

1. Un début d'hydrolyse au cours des phénomènes d'extraction fausserait totalement les résultats. Les récents travaux sur l'hydrolyse enzymatique^{8, 9, 10} ou chimique très ménagée⁷ des acides nucléique montrent la variété de composition des fragments diffusibles successivement détachés au cours de ces réactions. La fraction précipitable varie rapidement de composition en bases au cours de ces réactions.

2. L'extrait étudié peut renfermer un mélange d'espèces moléculaires, distinctes notamment par leur composition en bases. Cette situation peut provenir du début d'hydrolyse cité plus haut. Si au contraire cette variété reflète l'état réel des acides nucléiques *in vivo*, le matériel étudié ne donnera une idée d'ensemble de la population ribonucléique de la cellule que dans la mesure où les différentes espèces moléculaires ribonucléiques se comportent de la même manière vis-à-vis des agents d'extraction et de purification.

L'expérience montre la possibilité d'obtenir un fractionnement, variable selon les agents précipitants, dans le cas d'acides nucléiques faiblement dégradés comme l'acide ribonucléique de pancréas de bœuf préparé par KERR et ses collaborateurs¹¹. Dans le cas des acides ribonucléiques de levure on observe également des différences de composition d'une préparation à l'autre⁵; le fait que les échantillons préparés par purification d'acides commerciaux accusent, comme les résidus d'hydrolyse enzymatique, un net déficit en bases pyrimidiques, fait supposer qu'ici aussi le fractionnement reflète un processus de dégradation plutôt que des différences préexistant dans la cellule.

A défaut de méthode d'isolement certaine d'une seule espèce chimique, une extraction totale de la fraction ribonucléique, suivie d'hydrolyse sans isolement préalable par précipitation paraît échapper à beaucoup d'objections. Cette remarque est à la base de la technique utilisée dans ce travail.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Les levures sont cultivées dans les conditions utilisées par DIMROTH ET JAENICKE. La sensibilité des méthodes de dosage permet toutefois de réduire au dixième les quantités de levure et de solution. La culture, correspondant à 0.5 g de poids humide environ, est recueillie par centrifugation, lavée plusieurs fois au tampon phosphate *M*/200 de *pH* 6.8, extraite trois fois pendant 5 minutes à 0° dans de l'acide trichloracétique à 10%, délipidée à l'alcool et à l'éther, et séchée. Le produit est suspendu dans 1 ml HCl *N*.

Une extraction de 30 minutes à 100° peut être considérée comme quantitative: la figure montre les spectres d'absorption comparés d'un tel extrait et d'un second, effectué dans les mêmes conditions après lavage: la première extraction rend compte de 99% de l'absorption à 260 m μ . Au cours de cette même opération, l'hydrolyse libère quantitativement les bases puriques et les nucléotides pyrimidiques. Les quatre produits d'hydrolyse (adénine, guanine, acide cytidylique et acide uridylique), sont séparés par chromatographie sur papier en utilisant le solvant alcool butylique tertiaire-HCl de MARKHAM ET SMITH¹². Chaque substance est identifiée par sa valeur R_F et son spectre d'absorption. Le dosage utilise les techniques usuelles de spectrophotométrie en U.V.

Nous n'avons observé aucune différence significative entre les compositions des extraits, quelle que soit la source d'azote utilisée. Le Tableau I donne les proportions des quatre bases obtenues sur les diverses cultures. Le Tableau II met en parallèle la constance des rapports molaires guanine/adénine que nous avons obtenus et la variabilité du même rapport selon DIMROTH ET JAENICKE.

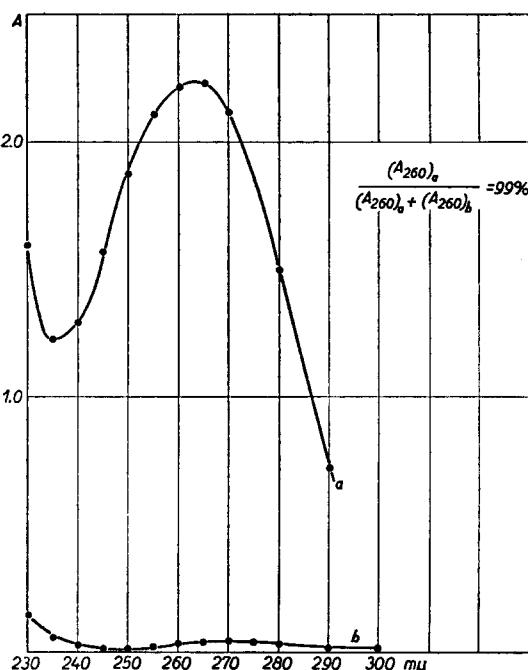


Fig. 1. Spectre d'absorption d'un extrait de 0.5 g. de levure (poids humide) par 2 ml HCl N, 30 min à 100°. a. 1^{re} extraction; b. 2^{me} extraction, après lavage

TABLEAU I

	Source d'azote						
	(NH ₄) ₂ SO ₄	Adénine	Uracile	(NH ₄) ₂ SO ₄ + NaN ₃ 10 ⁻³ M			
Adénine	I.0 ₇	I.0 ₇	I. I ₁	I. I ₂	I. I ₅	I.0 ₆	I.0 ₈
Guanine	I.0 ₉	I.0 ₀	I.0 ₃	I.0 ₀	I. I ₅	I. I ₇	I.0 ₉
Cytosine	0.8 ₀	0.9 ₂	0.8 ₄	0.8 ₄	0.7 ₆	0.8 ₅	0.8 ₀
Uracile	I.0 ₃	0.9 ₉	I.0 ₂	I.0 ₃	0.9 ₃	0.9 ₂	I.0 ₃

Les proportions molaires sont ramenées à une moyenne de I. Chaque résultat est la moyenne de 3 à 8 mesures effectuées sur une même culture.

Outre la constance observée ici dans la distribution des bases dans la population ribonucléique totale de la levure, on peut constater une grande analogie entre la composition de cette dernière et celle des acides ribonucléiques purifiés par les méthodes les plus récentes (CHARGAFF⁵). Comme il fallait s'y attendre tous les échantillons purifiés à partir de préparations commerciales accusent un net déficit en bases pyrimidiques.

TABLEAU II

		Source d'azote							
		$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Adénine	Guanine	Uracile	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 + \text{NaN}_3$			
Guanine Adénine en môles	DIMROTH	0.9 à 1.1		0.7	1.3	—		0.6	
	Résultats personnels	1.0 ₁	0.9 ₃	0.9 ₃	—	0.9 ₀	1.0 ₀	1.1 ₀	1.0 ₁

Les résultats de DIMROTH ET JAENICKE, exprimés en masses de chlorhydrates, ont été transposés en môles.

TABLEAU III
PROPORTIONS DES BASES, RAMENÉE À UNE MOYENNE DE 1

	Résultats personnels	CHARGAFF (préparation 4)
Adénine	1.0 ₉	1.0 ₃
Guanine	1.0 ₇	1.0 ₈
Cytosine	0.8 ₃	0.8 ₂
Uracile	1.0 ₀	1.0 ₅

Cette identité des proportions des bases dans un extrait total et dans un acide isolé et purifié semble indiquer une certaine homogénéité dans la composition en bases des molécules d'acide ribonucléique présentes dans la cellule. On pourrait rapprocher de ceci la grande similitude de composition entre les acides désoxyribonucléiques de provenances diverses¹³, et, d'autre part, entre les acides ribonucléiques animaux. Ces analogies de composition au sein de chacune des grandes classes d'acides nucléiques excluent-elles la possibilité d'une différenciation poussée? Il semble que l'activité biologique tienne, plutôt qu'à la configuration générale d'une macromolécule, à la présence de groupements à activité spécifique. Dans le cas des acides nucléiques, des chaînes polynucléotidiques de composition voisine ou même identique pourraient se différencier l'une de l'autre par l'acquisition d'une structure secondaire, formée par exemple de liaisons labiles, électrovalentes ou pont hydrogène, soit entre chaînes, soit au sein même d'une chaîne.

L'idée de telles liaisons avait été émise par GULLAND¹⁴ pour rendre compte de la brusque chute de la viscosité des acides désoxyribonucléiques en dehors de certaines limites de pH , et de l'irréversibilité de leur courbe d'électrotitration. Il semble que des arguments plus directs puissent être tirés d'études sur la valeur du coefficient d'extinction du maximum d'absorption dans l'ultra-violet. L'augmentation de ce coefficient, observée après hydrolyse enzymatique¹⁵, chimique¹⁵ ou dépolymérisation thermique¹⁶, et attribuée à la variation massive du degré de polymérisation, serait plutôt imputable à la rupture de liaisons particulièrement labiles. Nous avons, en effet, pu observer ce phénomène, rapide et irréversible, par des actions trop douces pour produire une dépolymérisation massive immédiate ($\text{pH } 3.2$; t° de l'ordre de 35 à 40°). Ces questions sont traitées plus en détail ailleurs¹⁶.

Remarquons pour terminer que l'attribution à ces liaisons de certaines activités

biologiques peut être rapprochée de l'hypothèse de BRACHET⁴ sur le rôle dans le choc thermique d'une inactivation des granules ribonucléoprotéiques: la dénaturation correspondant à la rupture supposée de ces liaisons débute à des températures voisines de celles des chocs thermiques.

RÉSUMÉ

1. Des cultures de levure dans des milieux de source d'azote variable n'ont pas montré de variations dans la composition de l'acide ribonucléique total.

2. L'hypothèse est émise, d'une spécificité des acides nucléiques basée surtout sur la différenciation des molécules par une structure secondaire à liaisons labiles.

SUMMARY

1. When yeasts are grown on media containing different nitrogen sources, no variation in the composition of total ribonucleic acid can be demonstrated.

2. It is suggested that the specificity of ribose nucleic acids is chiefly based on a differentiation of the molecular structure owing to secondary labile bonds.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Hefekulturen zeigen beim Wachstum auf Nährböden mit verschiedener Stickstoffquelle keine Änderung der Zusammensetzung der Gesamtribonukleinsäure.

2. Die Ansicht wird geäußert, dass die Spezifität der Nukleinsäuren hauptsächlich auf der Differenzierung einer sekundären Molekülstruktur mit labilen Bindungen beruht.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ J. BRACHET, *Embryologie chimique*, Masson, Paris, 1945.
- ² A. BOIVIN, *Experientia*, 3 (1947) 32.
- ³ R. VENDRELY, *Bull. soc. chim. biol.*, 32 (1950) 427.
- ⁴ J. BRACHET, *Unités biologiques douées de continuité génétique*, Paris, C.N.R.S., 1949.
- ⁵ E. CHARGAFF, *Experientia*, 6 (1950) 201.
- ⁶ K. DIMROTH ET L. JAENICKE, *Z. Naturforsch.*, 5b (1950) 185.
- ⁷ S. E. KERR, M. WARGON ET K. SERAIDARIAN, *Ier Congrès intern. Biochimie*, Cambridge, p. 625 (1949).
- ⁸ J. E. BACHER ET F. W. ALLEN, *Federation Proc.*, 8 (1949) 181.
- ⁹ S. ZAMENHOF ET E. CHARGAFF, *J. Biol. Chem.*, 178 (1949) 531.
- ¹⁰ J. N. DAVIDSON, *Ann. Rev. Biochem.*, 18 (1949) 155.
- ¹¹ S. E. KERR, K. SERAIDARIAN ET M. WARGON, *J. Biol. Chem.*, 181 (1949) 773.
- ¹² J. D. SMITH ET R. MARKHAM, *Biochem. J.*, 46 (1950) 509.
- ¹³ M. M. DALY, V. G. ALFREY ET A. E. MIRSKY, *J. Gen. Physiol.*, 33 (1950) 497.
- ¹⁴ J. M. GULLAND, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 12 (1900) 95.
- ¹⁵ K. K. TSUBOI ET R. E. STOWELL, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 192.
- ¹⁶ R. THOMAS, *Experientia* (sous presse).

Reçu le 9 février 1951