

## ÉTUDES SUR LES ACIDES NUCLÉIQUES

III. ÉCHANGE DU PHOSPHORE RADIOACTIF DANS LES  
RIBONUCLÉOTIDES DU FOIE DE RAT\*

par

PAUL BOULANGER ET JEAN MONTREUIL\*\*

*Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine et  
Institut de Recherches sur le Cancer, Lille (France)*

Il est maintenant bien établi que les acides ribonucléiques contiennent selon leur origine des proportions très variables des différents nucléotides. D'autre part, l'étude de l'hydrolyse par la ribonucléase montre que les liaisons des nucléotides entre eux sont inégalement stables; en effet, l'action de cet enzyme n'est pas quantitative, elle libère surtout des nucléotides pyrimidiques et laisse subsister une fraction de poids moléculaire élevé, riche en nucléotides puriques.

L'application de notre technique chromatographique<sup>1</sup> à l'étude des produits de l'hydrolyse ménagée des acides ribonucléiques par la soude ou l'ammoniaque nous a conduits à des résultats similaires: en suivant le clivage de la molécule, on voit apparaître d'abord l'acide uridylique, qui est rapidement libéré en totalité, tandis que la séparation des nucléotides puriques est beaucoup plus lente. Les schémas proposés récemment par MAGASANIK ET CHARGAFF<sup>2</sup> s'efforcent de rendre compte de ces constatations.

Enfin, le rapprochement s'impose avec les observations de COHN<sup>3</sup> et de CARTER<sup>4</sup>, qui ont isolé, par fractionnement des hydrolysats d'acides ribonucléiques sur des échangeurs d'ions, des nucléotides isomères dont le radical phosphoryle est attaché respectivement en 3', 5' et peut-être 2' (isomère *a*?).

Il était intéressant d'essayer de confirmer les notions précédentes en utilisant le phosphore radioactif <sup>32</sup>P<sup>5,6</sup>. On pouvait penser, en effet, que le radical phosphoryle des nucléotides "mobiles" s'échangerait plus rapidement que celui des nucléotides appartenant aux fractions plus stables de la molécule. Nous avons donc été amenés à mettre au point une technique de séparation par chromatographie de partage sur papier des ribonucléotides obtenus par hydrolyse sodique *directe* du tissu, sans isolement préalable de l'acide nucléique: cette façon de procéder permet d'effectuer l'ensemble des opérations dans un temps assez bref pour que les radioactivités restent mesurables et les écarts très supérieurs aux erreurs expérimentales.

Le Tableau I indique comment la radioactivité spécifique de chacun des nucléotides varie avec la quantité de <sup>32</sup>P injectée.

\* Cf. (1).

\*\* Avec la collaboration technique de Mademoiselle N. TRAUTTMANN.

TABLEAU I

Quantité de $^{32}\text{P}$ injectée par 100 g d'animal, en $\mu\text{C}$		20	40	100	250	300
Radioactivité spécifique en coups-minute par mg de P (prélèvement 2 h après l'injection):	Acide Adénylique	1,611	2,124	5 616	13,847	34,161
	Acide Uridylique	1,394	1,823	5,308	12,993	29,516
	Acide Cytidylique	1,303	1,628	5 075	10,865	26,188
	Acide Guanylique	877	1,196	3,255	8,116	19,113

Pour obtenir la précision maxima dans les mesures de radioactivité, nous administrons une dose relativement élevée de  $^{32}\text{P}$ : 250  $\mu\text{C}$  pour 100 g d'animal. Des rats de 200 g sont injectés par voie intra-péritonéale et sacrifiés à des temps variables, échelonnés entre 15 minutes et 10 jours. Les foies sont immédiatement homogénéisés trois fois dans une solution d'acide trichloracétique à 10 %. Le précipité, lavé trois fois à l'alcool absolu froid, est ensuite délipidé trois fois par un mélange alcool-éther (1:1) bouillant. Enfin, on hydrolyse par 60 ml de soude  $N/2$  à 37° C pendant 18 heures. La solution obtenue est amenée à pH 4.0-4.2 par addition d'acide formique concentré (environ 1.2 ml). Après un repos de 1 h, le précipité, constitué par de l'acide désoxyribonucléique et des produits de clivage des protéines, est éliminé par centrifugation. La liqueur surnageante, amenée à un volume de 100 ml, est passée lentement sur une colonne de résine à échange d'anions (*Deacidite*) [hauteur: 20 cm, diamètre: 16 mm, poids de résine: 15 g], préalablement régénérée par 500 ml d'une solution  $M/4$  d'acétate de sodium. Un lavage par 500 ml d'eau distillée élimine les ions  $\text{Na}^+$  et la majeure partie des substances d'origine protéique qui gêneraient la séparation chromatographique. Le développement sélectif par 400 ml d'une solution d'acide formique à 1 % fournit une fraction  $F_1$  contenant les acides adénylique et cytidylique. Ensuite, le passage de 1,000 ml d'acide formique à 15 % fournit une fraction  $F_2$  qui comporte, outre les acides guanylique, uridylique et phosphorique, une ou plusieurs substances  $X$  contenant de l'acide phosphorique, dont l'identification est en cours. Les fractions sont concentrées séparément sous pression réduite à 40° C, puis évaporées à sec. Le résidu est repris par 1 à 2 ml d'eau ammoniacale à 25 %. Après centrifugation, 6 à 12  $\mu\text{l}$  de la solution obtenue sont soumis à la chromatographie sur papier. Pour vérifier d'une part la valeur de notre technique chromatographique, d'autre part l'absence de composés autres que ceux que révèle le réactif de HANES ET ISHERWOOD<sup>7</sup>, nous avons effectué des autoradiographies de nos chromatogrammes et mesuré la radioactivité de bandes de 5 mm découpées successivement depuis le point de départ jusqu'au front atteint par le solvant. La figure ci-contre montre que le développement par l'acide formique à 1 % n'est pas absolument sélectif et que la fraction  $F_1$  contient un peu de "substance  $X$ " et d'acide uridylique. Mais aucun autre composé radioactif n'a pu être décelé.

Nous avons, dans nos séries d'expériences, déterminé la radioactivité directement sur une rondelle de papier découpée à l'emporte-pièce dans le milieu des taches correspondant à chacun des nucléotides. Après microdosage du phosphore nucléotidique dans le même échantillon, selon la technique d'ALLEN<sup>8</sup>, la radioactivité spécifique est calculée et exprimée en coups-minute par milligramme de phosphore (Tableau II).

TABLEAU II

RADIOACTIVITÉS SPÉCIFIQUES (EN COUPS-MINUTE PAR MG DE PHOSPHORE)

Temps écoulé après l'injection de $^{32}\text{P}$	15 min	30 min	1 h	2 h	4 h	24 h	2 j	5 j	6 j	8 j	10 j
Acide uridylique	1,100	3,350	6,150	9,280	19,300	38,400	63,300	72,100	78,700	45,600	42,270
Acide cytidylique	830	2,680	4,980	8,120	18,040	28,500	65,300	78,900	84,800	50,000	41,900
Acide adénylique	697	2,117	5,945	10,010	22,820	41,300	64,800	79,800	84,300	48,200	41,600
Acide guanylique	375	1,950	3,770	5,820	13,350	27,400	64,800	76,400	84,400	49,000	43,700

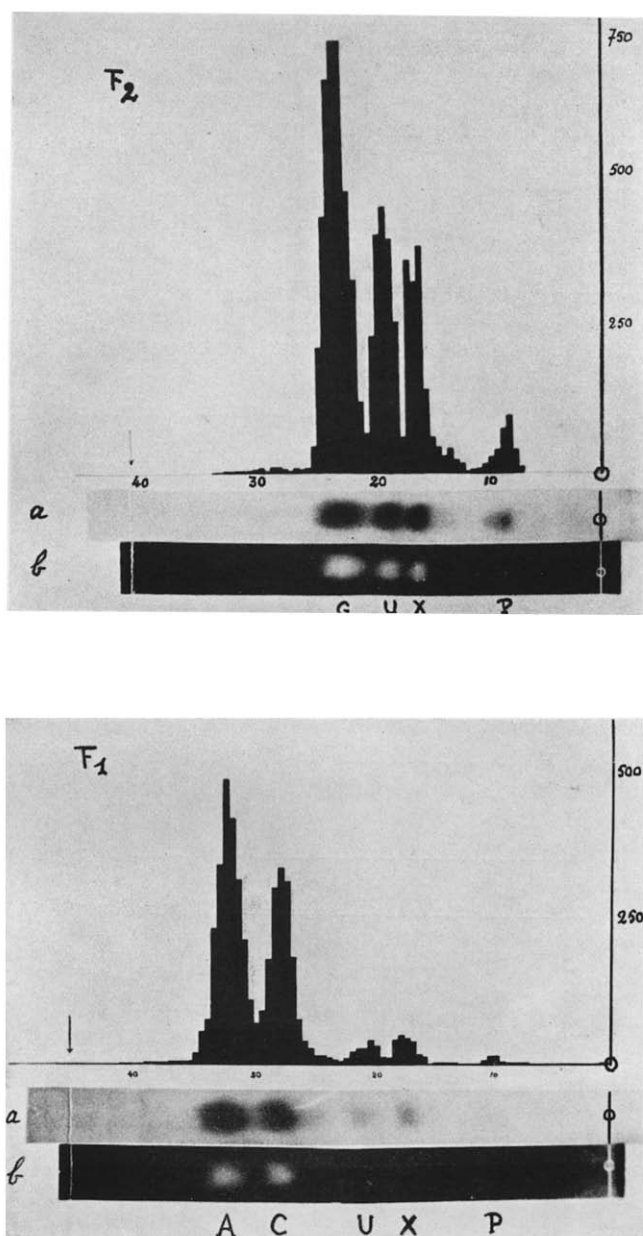


Fig. 1. Autoradiographies de chromatogrammes des fractions  $F_1$  et  $F_2$ ; en *a*: négatif, en *b*: positif. Les diagrammes représentent les variations de la radioactivité depuis le point de départ jusqu'au front du solvant (signe ↓). En *abscisses*: distances en centimètres, en *ordonnées*: radioactivités en coups-minute. *P*: acide phosphorique, *X*: substance non identifiée, *U*: acide uridylique, *G*: acide guanylique, *C*: acide cytidylique, *A*: acide adénylique.

Dans les 30 premières minutes, l'échange porte principalement sur les nucléotides pyrimidiques et plus spécialement sur l'acide uridylique; puis, au bout de 2 heures, la radioactivité de l'acide adénylique rattrape et dépasse celle des autres nucléotides. Jusqu'à la 24<sup>ème</sup> heure, l'acide guanylique demeure le nucléotide le moins radioactif. A partir du second jour, les radioactivités s'égalisent, croissent jusqu'au 6<sup>ème</sup> jour, puis diminuent lentement.

Nos constatations s'écartent notablement de celles de MARSHAK<sup>9</sup> et de VOLKI CARTER<sup>10</sup>: ces auteurs ne trouvent pas de différences sensibles entre les radioactivités spécifiques des ribonucléotides, ce qui tient sans doute à leur mode opératoire général. Au contraire, des résultats du même ordre ont été obtenus par SMELLIE ET DAVIDSON<sup>6</sup> après séparation des nucléotides par électrophorèse sur papier. Mais l'étude cinétique du processus n'a pas été réalisée; les mesures ont porté uniquement sur des foies prélevés 2 heures après l'injection et l'acide adénylique apparaît comme le nucléotide le moins radioactif.

Le comportement le plus frappant est évidemment celui de l'acide guanylique, dont le radical phosphoryle est le moins échangeable. Ainsi, à la notion de "noyau" purique, il semble préférable de substituer celle, plus précise, de "noyau" guanylique, qu'avait déjà mise en évidence l'étude des produits d'hydrolyse chimique ou enzymatique des acides ribonucléiques et qu'illustrent les récents schémas de MAGASANIK ET CHARGAFF<sup>2</sup>.

Nos résultats font également ressortir les différences sensibles qui existent dans les stabilités des liaisons des divers nucléotides entre eux. Cette notion s'affirme encore à l'étude des radioactivités spécifiques des isomères *a* et *b* des acides guanylique et adénylique. Nous avons séparé ces isomères par chromatographie sur papier en utilisant le solvant à base de sulfate d'ammonium de MARKHAM ET SMITH<sup>11</sup>. Le Tableau III reproduit les résultats des mesures des radioactivités spécifiques correspondantes.

TABLEAU III

Isomères		Radioactivités spécifiques en coups-minute par mg de P
Acide adénylique	<i>a</i>	10,675
	<i>b</i>	8,170
Acide guanylique	<i>a</i>	4,700
	<i>b</i>	2,715

La nature exacte des isomères *a* et *b* (isomérisie  $\alpha$ - $\beta$  de la liaison osidique ou isomérisie 2'-3' de la position du radical phosphoryle) n'est pas encore précisée, mais l'écart entre les mobilités de leurs radicaux phosphoryles doit être souligné, surtout dans le cas de l'acide guanylique.

Il y a donc une concordance remarquable entre les résultats des études de la cinétique de l'échange du <sup>32</sup>P *in vivo* et de l'hydrolyse partielle *in vitro* des acides ribonucléiques: les nucléotides qui sont le plus facilement et le plus rapidement détachés sont aussi ceux dont le radical phosphoryle est le plus mobile.

D'après la conception actuelle du mode d'enchaînement des ribonucléotides, selon laquelle un radical phosphoryle est uni au ribose de deux nucléotides voisins, le remplacement de PO<sub>4</sub>H<sub>3</sub> ne peut s'effectuer qu'après rupture de la chaîne. Si la macromolécule ribonucléique est constituée d'une chaîne linéaire unique, il faut admettre un

processus continu et réversible de polymérisation — dépolymérisation. Aussi les constatations expérimentales s'expliquent-elles beaucoup plus simplement par une structure ramifiée dont les schémas de MAGASANIK ET CHARGAFF donnent des exemples: sur une chaîne principale, où prédominent les nucléotides puriques et surtout l'acide guanylique, grefferaient des chaînes latérales, dont la longueur ne peut encore être précisée, et qui auraient formées d'une proportion importante de nucléotides pyrimidiques.

Nos résultats sont d'autre part favorables à l'existence de plusieurs types de liaisons inter-nucléotidiques, de *stabilité inégale*; la comparaison des isomères *a* et *b* est à cet égard très démonstrative, mais ne peut encore être interprétée avec certitude: s'il avait prouvé que l'on eût affaire à une isomérisation 2'-3', l'influence du point d'attache du radical phosphoryle apparaîtrait décisive.

On peut reprocher à nos conclusions d'être entachées d'une erreur à la base: nos chiffres correspondent en effet à l'ensemble des fractions ribonucléoprotéidiques cellulaires, dont les vitesses de renouvellement sont très différentes et dont les compositions mêmes ne sont probablement pas identiques. En fait, seul l'acide ribonucléique du nucléole se distingue nettement des autres fractions, et il existe en proportions trop faibles pour que son comportement altère la signification générale des résultats. Nous nous proposons néanmoins de réaliser une étude séparée des différents acides ribonucléiques cellulaires; un premier essai dans ce sens a été effectué par DAVIDSON, McINDOE ET SMELLIE<sup>12</sup>, mais il est limité à un prélèvement unique (2 heures après l'injection): on se trouve donc en réalité pour chaque fraction en des stades différents de l'évolution du phénomène.

Ce travail a été réalisé grâce à une subvention de la *Caisse Nationale de Sécurité Sociale*, à laquelle nous adressons nos plus vifs remerciements.

#### RÉSUMÉ

L'étude cinétique de l'échange du phosphore radioactif dans les acides ribonucléiques du foie de Rat révèle des différences très grandes entre les nucléotides. Les radicaux phosphoryles de l'acide uridylique et de l'acide cytidylique sont d'abord les plus radioactifs, puis celui de l'acide adénylique dépasse tous les autres, l'acide guanylique restant nettement en arrière pendant plus de 24 heures. D'autre part, les isomères *a* et *b* des acides guanylique et adénylique ont au même instant des radioactivités spécifiques très différentes.

Ces résultats confirment les "mobilités" inégales des nucléotides, déjà mises en évidence par l'étude de l'hydrolyse partielle; ils montrent l'existence de plusieurs types de liaisons inter-nucléotidiques, de stabilités différentes, et ils sont en faveur d'une structure ramifiée des acides ribonucléiques, se rapprochant des représentations schématisques proposées par MAGASANIK ET CHARGAFF.

#### SUMMARY

The kinetics of <sup>32</sup>P exchange in the ribonucleic acids of rat liver reveal striking differences between the nucleotides. First of all, the phosphoryl groups of uridylic and cytidylic acid are the most radioactive; then, the phosphoryl group of adenylic acid gets beyond the others, guanylic acid remaining the least radioactive during more than 24 hours. Moreover, it could be shown that the specific radioactivities of the *a* and *b* isomers of guanylic and adenylic acids are very different.

These results confirm the unequal "mobilities" of the nucleotides, already demonstrated by the study of the stepwise hydrolysis; they prove the existence of several types of inter-nucleotidic bonds, unequally stable, and they support the view of a branched structure of the ribonucleic acids, similar to the schemes proposed by MAGASANIK AND CHARGAFF.

#### ZUSAMMENFASSUNG

Eine kinetische Untersuchung des Austausches von radioaktivem Phosphor in den Ribonukleinsäuren der Rattenleber zeigt grosse Unterschiede unter den Nukleotiden. Zuerst zeigen die Phosphorylgruppen der Uridyl- und Cytidylsäure die grösste Radioaktivität, dann übertrifft die Phosphorylgruppe der Adenylsäure alle anderen, während diejenige der Guanylsäure während 24 Stunden

bedeutend weniger radioaktiv ist. Die Isomeren *a* und *b* der Guanyl- und der Adenylsäure haben im gleichen Augenblick sehr verschiedene spezifische Radioaktivitäten.

Diese Ergebnisse bestätigen die verschiedenen "Mobilitäten" der Nukleotide, welche schon bei dem Studium der stufenweisen Hydrolyse aufgezeigt worden waren; sie zeigen, dass es verschiedene Typen von Internukleotid-Bindungen von verschiedener Stabilität gibt und lassen für die Ribonukleinsäuren eine verzweigte Struktur, ähnlich den Schemata von MAGASANIK UND CHARGAFF vermuten.

#### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> P. BOULANGER ET J. MONTREUIL, *Bull. soc. chim. biol.*, 33 (1951) 784 et 791.
- <sup>2</sup> B. MAGASANIK ET E. CHARGAFF, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 396.
- <sup>3</sup> W. E. COHN, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 1471 et 2811; *J. Cell. Comp. Physiol.*, 38, suppl. 1 (1951) 21.  
W. E. COHN ET E. VOLKIN, *Nature*, 167 (1951) 483.
- <sup>4</sup> C. E. CARTER, *J. Amer. Chem. Soc.*, 72 (1950) 1466.
- <sup>5</sup> P. BOULANGER, J. MONTREUIL ET L. MASSE, *Compt. rend.*, 232 (1951) 1256; 234 (1951) 565.
- <sup>6</sup> R. M. S. SMELLIE ET J. N. DAVIDSON, *Biochem. J.*, 49 (1951) XV.
- <sup>7</sup> C. S. HANES ET F. A. ISHERWOOD, *Nature*, 164 (1949) 1107.
- <sup>8</sup> R. J. ALLEN, *Biochem. J.*, 34 (1940) 858.
- <sup>9</sup> A. MARSHAK ET H. J. VOGEL, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 36 (1950) 97.
- <sup>10</sup> E. VOLKIN ET C. E. CARTER, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 1519.
- <sup>11</sup> R. MARKHAM ET J. D. SMITH, *Biochem. J.*, 49 (1951) 401.
- <sup>12</sup> J. N. DAVIDSON, W. M. MCINDOE ET R. M. S. SMELLIE, *Biochem. J.*, 49 (1951) xxxvi.

Reçu le 18 avril 1952