

CHROM. 5851

COEFFICIENTS DE PARTAGE D'OLIGORIBONUCLÉOTIDES DANS LES SYSTÈMES SOLVANTS SALINS*

JEAN-PIERRE GAREL**, JEAN-CLAUDE JORDAN ET PAUL MANDEL

Centre de Neurochimie du CNRS et Institut de Chimie biologique, Université Louis Pasteur, Strasbourg (France)

(Reçu le 29 novembre 1971)

SUMMARY

Partition coefficients of oligoribonucleotides in saline solvent systems

The behaviour of thirty-one 3'-exoguaninic and 3'-exopyrimidyl oligoribonucleotides was studied in a 'saline solvent system' used for the countercurrent distribution of transfer ribonucleic acid, based on 1.50 M potassium phosphate buffer, pH 7.0, 2-methoxyethanol and 2-butoxyethanol. Partition isotherms for di- and trinucleotides are given as well as countercurrent distribution profiles of pancreatic ribonuclease digests of rat liver ribosomal ribonucleic acid and of tetra-, penta- and hexaribonucleotides.

The basic contribution of two structural parameters, nucleotide composition and chain length (n), has been evaluated from their partition coefficients (K) at 20°. The logarithm of the partition coefficient ($\log K$) of 3'-exopyrimidyl oligoribonucleotides varies with the relative levels of Ap and Gp, expressed as the Ap/(Ap + Gp) ratio; $\log K$ for the 3'-exoguaninic oligoribonucleotides is a function of the A/Py ratio. $\log K$ is also a linear function of n (within $2 \leq n \leq 7$) for nucleic compounds of the type $(Ap)_x(Gp)_yPyp$ with $x + y = n - 1$. Sequential isomers are not distinguishable. The theoretical importance and applications of these results are discussed.

INTRODUCTION

Les techniques analytiques ou préparatives mettant en oeuvre le principe de la séparation liquide-liquide en continu (chromatographie de partage) et en discontinu (distribution à contre-courant) d'acides ribonucléiques (RNA) ou de leurs composantes se fondent sur l'existence de coefficients de partage (K) différents. La valeur du coefficient de partage est fonction de la nature du soluté ribonucléique caractérisé par les cinq paramètres suivants: composition nucléotidique, séquence, longueur ou

* Ce mémoire fait partie de la thèse de Doctorat d'État de J. P. GAREL, Attaché de recherche au CNRS.

** Adresse: Jean-Pierre Garel, Centre de Neurochimie du CNRS, 11, rue Humann, F-67 Strasbourg, France.

masse, taux d'hélicité, et conformation. À notre connaissance, l'étude systématique de ces paramètres n'a pas été entreprise pour les oligoribonucléotides.

Dans un "système solvant salin" défini par une composante inorganique saline (sulfate ou phosphate) et deux ou trois composantes organiques (acide, amide, amine ou éther-alcool), WARNER ET VAIMBERG¹, puis KIRBY^{2,3} observaient que les fractions de RNA distribuées par contre-courant étaient hétérogènes. Les RNA solubilisés préférentiellement dans la phase supérieure mobile (correspondant aux fractions à coefficient de partage élevé) sont plus riches en AMP que ceux à coefficient de partage faible qui renferment davantage de GMP. McCORMICK ET DOCTOR^{4,5} confirmaient ces observations sur des oligoribonucléotides obtenus par action de la ribonucléase pancréatique; ils isolaient par distribution à contre-courant deux hexanucléotides, deux heptanucléotides et un nonanucléotide provenant de tRNA de levure. Dans un "système solvant organique" où les acides nucléiques sont solubilisés sous la forme de sels d'ammonium quaternaire, ZACHAU⁶ a montré que la chromatographie de partage est plus sensible à la composition en bases qu'à la charge nette des oligoribonucléotides (acides oligoadényliques par exemple).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

*Préparation des oligoribonucléotides**

Les oligoribonucléotides 3'-exopyrimidyliques du type (Pu)_{n-1}Pyp ont été préparés par action de la ribonucléase pancréatique (EC 2.7.7.16) sur du rRNA, puis fractionnés sur une colonne de DEAE-cellulose à pH légèrement basique, en présence d'urée 7 M, selon la méthode de TOMLINSON ET TENER⁷. Chaque fraction, après desalage, est rechromatographiée sur une colonne de Dowex 1 X2 à pH acide.

72 mg de rRNA de foie de Rat (préparé dans notre laboratoire⁸ par extraction phénolique à froid et élimination des tRNA en solution dans l'acétate de sodium 3 M pH 5.0) sont dissous dans 6 ml de tampon Tris-HCl 0.025 M pH 7.8 et additionnés d'une solution (0.1 ml) de ribonucléase pancréatique (Sigma) à 10 mg/ml. La solution est maintenue à pH 7.8 pendant 16 h par addition de KOH 0.33 N, dans un bain-marie à 37°. La solution est ensuite déposée sur une colonne (1 × 60 cm) de DEAE-cellulose (Serva) préalablement équilibrée dans le tampon Tris-HCl 0.025 M pH 7.8-urée (Merck) 7 M, puis éluee au moyen d'un gradient linéaire en NaCl (0.00-0.30 M, 2 l). Les fractions (15 ml/10 min) de chaque oligonucléotide (di- aux hexanucléotides) sont rassemblées, diluées cinq fois avec de l'eau bidistillée, puis adsorbées sur une couche de DEAE-cellulose disposée à la surface d'un entonnoir à verre fritté et lavées abondamment jusqu'à la disparition des ions Cl⁻. Les oligonucléotides sont alors élusés dans 50-100 ml d'une solution à 1% de bicarbonate de triéthylammonium fraîchement préparée. La triéthylamine est ensuite chassée sous courant d'air froid et la solution lyophilisée.

Les dinucléotides (360 U.A. à 260 nm) sont fractionnés selon la technique de AOYAGI ET INOUE⁹ sur colonne de Dowex 1 X2 (200-400 mesh), équilibrée dans HCl 0.005 N, à l'aide d'un gradient linéaire en NaCl (0.00-0.35 M, 2 l). Les trinucléotides (450 U.A.) sont fractionnés de la même manière, au moyen cette fois d'un gradient linéaire en NaCl (0.00-0.60 M, 2 l) dans HCl 0.01 N. L'identification des di- et des

* Abbreviations: Pu = purine; Py = pyrimidine; rRNA = RNA ribosomique.

trinucléotides purs a été vérifiée par spectrométrie d'absorption en ultraviolet, à partir des constantes spectrophotométriques indiquées par STANLEY ET BOCK¹⁰ et TOAL *et al.*¹¹. Les fractions des tétra-, penta- et hexanucléotides ont été directement distribuées par contre-courant.

Les oligoribonucléotides 3'-exoguanosyliques du type (A, Py)_{n-1}Gp ont été préparés par action de la ribonucléase T₁ (EC 2.7.7.26) sur du rRNA, fractionnés sur colonne de DEAE-Sephadex en présence d'urée 7 M, puis après dessalage de chaque fraction, chromatographiés sur une colonne de Dowex à pH acide.

23 mg de rRNA de foie de Rat, dissous dans 3 ml de tampon Tris-HCl 0.025 M pH 7.6-KCl 0.025 M-MgCl₂ 0.01 M, sont abandonnés 20 h à 37°, en présence de 100 µl d'une solution de ribonucléase T₁ (Sankyo) à 2,500 U/ml. La solution est déposée sur une colonne (2 × 60 cm) de DEAE-Sephadex A-25 équilibrée dans le tampon Tris-HCl 0.025 M pH 7.8-urée 7 M, puis éluée au moyen d'un gradient linéaire en NaCl (0.10-0.30 M, 2 l). Les fractions (18 ml/10 min) des di- et des trinucléotides sont rassemblées, diluées cinq à dix fois et adsorbées sur une colonne de Dowex 1 X2 (200-400 mesh) équilibrée dans HCl 0.01 N, puis éluées avec un gradient linéaire en NaCl, respectivement de 0.00 à 0.30 et 0.50 M selon la technique de AOYAGI ET INOUE¹².

Mesure et calcul du coefficient de partage

Le système solvant salin utilisé, décrit ailleurs¹³, est constitué par 6 ml de tampon au phosphate de potassium 1.50 M pH 7.0, 2 ml de méthoxy-2 éthanol et d'un volume variable de butoxy-2 éthanol (0.8-3.0 ml). D'après nos conventions, c'est le système PMB à 9.1-27.3% de butoxy-2 éthanol. Chacun de ces systèmes solvants est introduit dans un tube de verre à bouchon rodé et équilibré au bain-marie à la température voulue ($\pm 1^\circ$). Par tube, on ajoute 1-3 U.A. à 260 nm de l'oligonucléotide à analyser, préalablement dissout dans 10 µl d'eau. L'ensemble est équilibré après trois cycles d'agitation manuelle de 30 sec chacun environ. Après quelques minutes de repos, les deux phases sont prélevées séparément et la concentration en oligonucléotide de chacune d'elles est déterminée à deux longueurs d'onde adéquates au spectrophotomètre Zeiss PM Q II. Le coefficient de partage *K* est le rapport de l'absorbance mesurée dans la phase supérieure à l'absorbance mesurée dans la phase inférieure.

La connaissance des coefficients de partage *k_i* de deux ou plusieurs solutés *i* d'un mélange constitués par les taux *p_i* de chaque soluté, tel que *p_i = i/a + b + ... + i*, permet de calculer le coefficient de partage résultant *K* en appliquant la nouvelle relation :

$$K = \frac{\sum_{i=1}^t p_i \frac{k_i}{1 + k_i}}{\sum_{i=1}^t \frac{p_i}{1 + k_i}} \quad (1)$$

Lorsqu'un oligonucléotide ou un mélange d'oligonucléotides a été distribué par contre-courant, le coefficient de partage *K* du soluté qui apparaît au niveau de l'élément de rang *r* après *n* transferts, pour un distributeur possédant *t* éléments, est donnée par les relations :

$$K = \frac{r}{n - r} \quad \text{quand } r \leq t \quad (2)$$

$$K = \frac{t}{n - r} \quad \text{quand } r > t \quad (3)$$

Distribution à contre-courant

Elle est effectuée avec un appareil EV-800 de 160 éléments de 3 ml de capacité pour chaque phase, commercialisé par la firme Wright Scientific, Kenley, Great Britain. Le distributeur est placé dans une salle à température réglable à 0.5° près. Le système solvant salin PMB utilisé est constitué par 1.2 l de tampon phosphate de potassium 1.50 M pH 7.0, 0.4 l de méthoxy-2 éthanol et d'un volume adéquat de butoxy-2 éthanol (indiqué sur les figures). Les distributions ont été réalisées à 20°. Après pipettage de la phase inférieure du système solvant préalablement équilibré à 20°, on dissout 75-150 U.A. à 260 nm du mélange d'oligonucléotides dans 100 µl d'eau bidistillée qu'on dépose dans l'élément O du distributeur. Le réservoir contenant 500 ml environ de phase supérieure est connecté avec l'élément O. Les périodes d'agitation et de décantation sont respectivement fixées à 3 et 4 min. Après le dernier transfert, on ajoute 1 ml de méthoxy-2 éthanol dans chaque élément, on agite une nouvelle fois pendant 5 min et après une dernière décantation, on prélève la phase supérieure pour mesurer son absorbance à 260 et 280 nm, dans une cuve de 1.00 cm de trajet optique. Lorsqu'on désire conserver le soluté, on effectue une distribution préparative avec une quantité dix à vingt-cinq fois supérieure d'oligonucléotides. Le contenu des éléments est rassemblé par fractions de cinq à dix éléments distributeurs. Pour transférer la totalité du soluté dans la phase supérieure, on ajoute 10 ml de méthoxy-2 éthanol et on équilibre à -15°. On prélève la phase supérieure qu'on extrait deux à trois fois avec un volume d'éther diéthylique. On recueille la phase aqueuse qui est diluée dix fois environ avec de l'eau distillée et adsorbée sur une petite colonne de DEAE-cellulose. Après un lavage abondant, les oligonucléotides sont extraits comme indiqué précédemment par une solution à 1% de bicarbonate de triéthylammonium.

Composition en bases

Nous avons adopté la méthode de dosage spectrométrique de EAST¹⁴ en chromatographiant l'hydrolysat alcalin sur une courte colonne (0.5 × 2 cm) de Dowex 50 W X4 (200-400 mesh) élue avec 15 ml environ d'eau distillée. Chaque composante des deux paires de nucléotides (UMP + GMP), puis (CMP + AMP) est dosée par spectrophotométrie à deux longueurs d'onde à pH 1.0. La quantité en picomoles de chacun des nucléotides est calculée à partir des relations suivantes:

$$\text{UMP} = 0.285 A_{275} - 0.346 A_{285} \quad (4)$$

$$\text{GMP} = 0.201 A_{285} - 0.044 A_{275} \quad (5)$$

$$\text{CMP} = 0.086 B_{280} - 0.019 B_{267} \quad (6)$$

$$\text{AMP} = 0.078 B_{267} - 0.035 B_{280} \quad (7)$$

où A et B représentent les absorbances aux longueurs d'onde indiquées en indice (nm) du volume total de chaque élut, iu à pH 1.0.

RÉSULTATS

L'isolement de di- et de trinucléotides de composition et de séquence définies

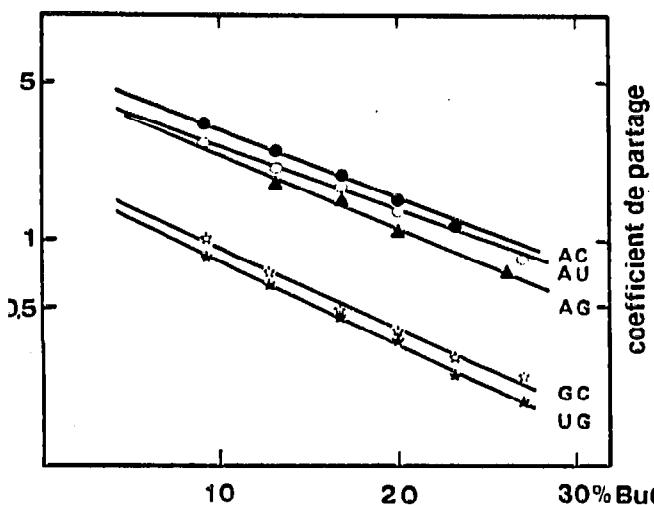


Fig. 1. Isothermes de partage à 20° de dinucléotides 3'-exopyrimidyl dans le système solvant PMB (phosphate de potassium 1.50 M pH 7.0-méthoxy-2 éthanol-butoxy-2 éthanol, 300: 100: variable).

Fig. 2. Isothermes de partage à 20° de trinucléotides 3'-exopyrimidyl dans le système solvant PMB.

nous a permis de déterminer leur isotherme de partage à 20° dans le système solvant PMB, pour des teneurs croissantes en butoxy-2 éthanol. Les courbes représentatives sont indiquées par les Figs. 1-3. On remarque l'influence déterminante des teneurs en Ap (ou A) et en Gp (ou G) sur la valeur du coefficient de partage. Les valeurs maximales sont attribuées aux composés ApUp ou ApCp, ApApUp ou ApApCp et ApApGp, les valeurs les plus faibles aux composés riches en G tels GpCp et UpGp, GpGpCp et CpCpGp. Généralement la contribution des nucléotides pyrimidiques (Cp et Up) est très voisine, sinon identique. Les pentes de l'ensemble de ces isothermes sont beaucoup plus faibles que celles de polynucléotides comme les RNA de transfert¹³. Comme nous l'indiquions, la pente est fonction de la masse du composé ribonucléique; elle est d'autant plus prononcée que la longueur de la chaîne est plus grande. Cet effet

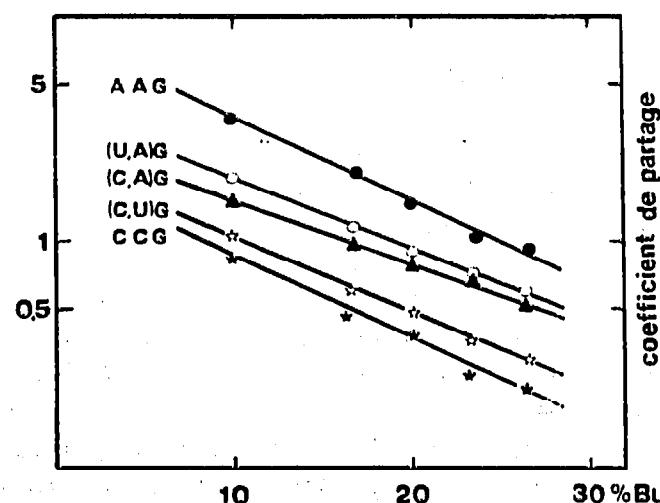
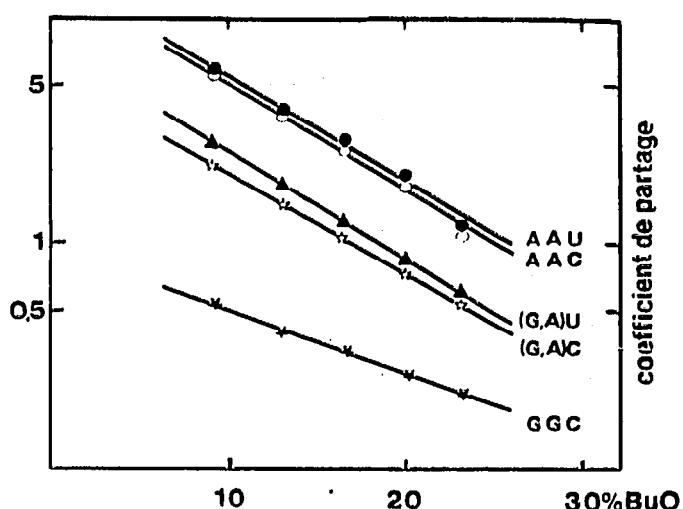


Fig. 3. Isothermes de partage à 20° de trinucléotides 3'-exoguanosyl dans le système solvant PMB.

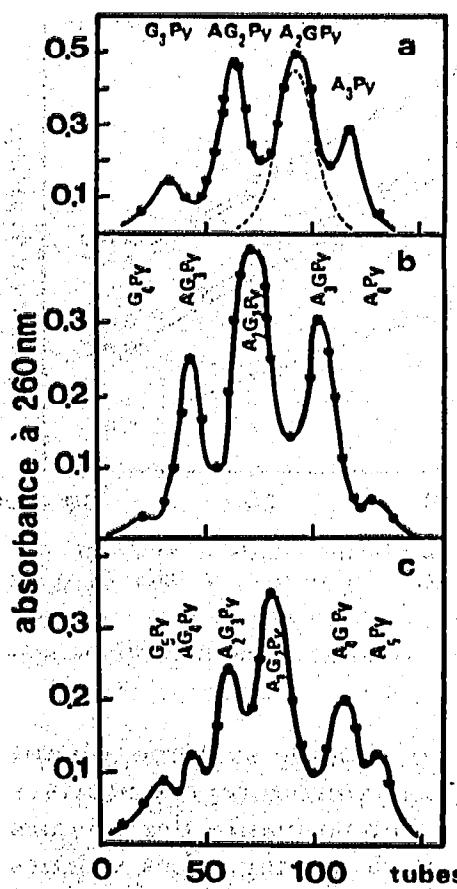


Fig. 4. Distribution à contre-courant d'oligoribonucléotides 3'-exopyrimidyliques à 20° sur 160 transferts dans le système solvant PMB à 20% de butoxy-2 éthanol. (a) Tétraribonucléotides; (b) pentaribonucléotides; (c) hexaribonucléotides. Ces oligonucléotides ont été obtenus par action de la ribonucléase pancréatique sur du rRNA de foie de Rat (voir MÉTHODES). La courbe en pointillé en (a) représente le profil calculé d'un composé ayant le coefficient de partage du tétranucléotide $(Ap)_4GpCp$ ou $(Ap)_4GpUp$.

apparaît déjà quand on compare les pentes des familles des dinucléotides à celle des trinucléotides.

Les Figs. 4a-c définissent le profil d'absorbance à 260 nm de tétra-, penta- et hexanucléotides 3'-exopyrimidyliques, après une distribution à contre-courant à 20° sur 160 transferts, dans le système solvant PMB à 20% de butoxy-2 éthanol. On remarque que les pics isolés correspondent par leur nombre et leur importance relative au nombre et à la nature des isomères séquentiels du type A_xG_yPy avec $x + y = n - 1$, caractérisés de gauche à droite par la substitution progressive de G par A. La superposition de la courbe de distribution gaussienne (Fig. 4a), calculée point par point au moyen des formules de récurrence données par HECKER¹⁵, indique d'une part un comportement normal des composés nucléotidiques dans un "système solvant salin" et d'autre part l'équivalence des nucléotides pyrimidiqnes en bout de chaîne. Aucun de ces pics ne se dédouble, même légèrement.

On notera cependant que les composantes riches en G sont un peu moins abondantes que celles riches en A. Ce fait s'expliquerait en partie par notre mode d'extraction sommaire: le ml de méthoxy-2 éthanol rajouté aux 6 ml de solution contenue dans chacun des éléments du distributeur après le 160^{me} transfert détruit

TABLEAU I

CARACTÉRISATION SPECTROMÉTRIQUE DES TÉTRA-, PENTA- ET HEXARIBONUCLÉOTIDES DISTRIBUÉS À CONTRE-COURANT (Figs. 4a-c)

Oligoribo-nucléotide	Distribution théorique	Distribution observée	pH 1				pH 7			
			Taux d'absorbance ^a				Taux d'absorbance ^a			
			250	270	280	290	250	270	280	290
G ₃ Py	1	0.8	1.00	0.76	0.56	0.36	1.15	0.73	0.53	0.25
G ₂ APy	3	2.6	0.84	0.80	0.56	0.33	0.98	0.76	0.50	0.25
GA ₃ Py	3	3.0	0.81	0.87	0.60	0.40	0.72	0.80	0.46	0.20
A ₃ Py	1	1.3	0.80	0.80	0.46	0.22	0.86	0.74	0.36	0.15
G ₄ Py	1	0.7								
G ₃ APy	4	3.2	0.83	0.79	0.59	0.37	1.02	0.78	0.50	0.20
G ₂ A ₂ Py	6	6.2	0.83	0.80	0.56	0.35	0.98	0.80	0.50	0.24
GA ₃ Py	4	4.0	0.82	0.77	0.45	0.22	0.88	0.78	0.44	0.20
A ₄ Py	1	0.8	0.85	0.78	0.30	0.15	0.84	0.72	0.32	0.08
G ₅ Py	1	0.8								
G ₄ APy	5	1.2								
G ₃ A ₂ Py	10	4.1	0.90	0.78	0.52	0.33	0.99	0.76	0.47	0.23
G ₂ A ₃ Py	10	9.0	0.87	0.77	0.47	0.24	0.94	0.77	0.44	0.19
GA ₄ Py	5	4.2	0.85	0.80	0.46	0.20	0.90	0.75	0.39	0.10
A ₅ Py	1	1.3	0.84	0.80	0.47	0.12	0.84	0.76	0.39	0.10

^a Taux d'absorbance calculé à partir des absorbances à 250, 270, 280 et 290 nm rapportées à celle lue à 260 nm.

l'équilibre des phases réalisé avec le système solvant initial et permet de transférer dans la nouvelle phase supérieure—utilisée pour la mesure de l'absorbance—la quasi totalité des composantes solubilisées dans la phase inférieure. Il est possible qu'une partie des substances à faible coefficient de partage, du type G_{n-1}Py ou AG_{n-2}Py, ne soit pas complètement extraite. Il est toutefois plus vraisemblable que la répartition de ces oligonucléotides donnée dans le Tableau I reflète la composition du rRNA hépatique. HIGASHI *et al.*¹⁰ ont montré que la répartition des di- et trinucléotides obtenus par action de la ribonucléase pancréatique sur des rRNA 18 S et 28 S de foie de Rat s'écartent d'une distribution aléatoire. Le taux des ApApUp et ApApCp est nettement supérieur à celui des GpGpUp et GpGpCp.

Les isothermes de partage des di- et trinucléotides et les distributions à contre-courant des tétra-, penta- et hexanucléotides permettent de calculer le coefficient de partage de 31 composés, dans le système solvant PMB à 20% et à 20°. Ces valeurs sont indiquées dans le Tableau II. Nous avons également mentionné (colonne de droite) le coefficient de partage qu'aurait un mélange de nucléotides correspondant à la composition de l'oligonucléotide situé sur la colonne de gauche. Ces résultats font appel à l'éqn. 1—with les valeurs indiquées en tête pour les quatre nucléotides fondamentaux. Les valeurs ainsi calculées de ces coefficients de partage sont relativement groupées tandis que celles des nucléotides enchaînés en oligomères divergent considérablement de 1 à 50 pour les hexanucléotides contre simplement de 1 à 4 pour les mononucléotides. Les coefficient de partage est donc directement influencé par le nombre de nucléotides constitutifs d'un oligonucléotide. Il est par contre insensible

TABLEAU II

COEFFICIENTS DE PARTAGE DE QUELQUES OLIGORIBONUCLÉOTIDES DANS LE SYSTÈME SOLVANT PMB à 20% ET 20°

	<i>K</i>	<i>log K</i>	<i>K^a</i>
Ap	1.10	0.04	
Gp	0.53	-0.28	
Cp	0.35	-0.46	
Up	0.30	-0.52	
ApCp	1.40	0.15	A,C 0.64
GpCp	0.40	-0.40	G,C 0.43
ApUp	1.30	0.12	A,U 0.60
ApGp	1.10	0.04	A,G 0.77
CpGp	0.43	-0.36	C,G 0.43
UpGp	0.34	-0.47	U,G 0.47
ApApCp	1.80	0.25	A,A,C 0.78
(ApGp)Cp	0.76	-0.12	A,G,C 0.61
GpGpCp	0.27	-0.57	G,G,C 0.46
ApApUp	1.80	0.25	A,A,U 0.76
(ApGp)Up	0.84	-0.07	A,G,U 0.60
ApApGp	1.50	0.18	A,A,G 0.87
(ApCp)Gp	0.80	-0.10	A,G,C 0.61
CpCpGp	0.48	-0.32	C,C,G 0.41
(ApUp)Gp	0.95	-0.02	A,U,G 0.60
(CpUp)Gp	0.59	-0.23	C,U,G 0.40
(Gp) ₃ Pyp	0.20	-0.70	0.48
Ap(Gp) ₂ Pyp	0.63	-0.20	0.56
(Ap) ₂ GpPyp	1.38	0.14	0.69
(Ap) ₃ Pyp	2.65	0.42	0.84
(Gp) ₄ Pyp	0.14	-0.86	0.49
Ap(Gp) ₃ Pyp	0.36	-0.44	0.55
(Ap) ₂ (Gp) ₂ Pyp	0.82	-0.09	0.66
(Ap) ₃ GpPyp	1.76	0.25	0.76
(Ap) ₄ Pyp	3.70	0.57	0.88
(Gp) ₅ Pyp	0.10	-1.00	0.50
Ap(Gp) ₄ Pyp	0.33	-0.48	0.56
(Ap) ₂ (Gp) ₃ Pyp	0.57	-0.25	0.64
(Ap) ₃ (Gp) ₂ Pyp	1.00	0.00	0.72
(Ap) ₄ GpPyp	2.65	0.42	0.81
(Ap) ₅ Pyp	4.95	0.70	0.94

^a Coefficient de partage calculé au moyen de la formule I pour le mélange des nucléotides constitutifs de l'oligonucléotide correspondant. Système solvant PMB à 20% (phosphate de potassium 1.50 M, pH 7.0-méthoxy-2 éthanol-butoxy-2 éthanol, 6:2:2).

à la séquence. Les différences trouvées entre GpCp et CpGp, entre (Ap,Gp)Cp et (Ap,Cp)Gp ou (Ap, Gp)Up et (Ap, Up)Gp n'apparaissent pas significatives.

La distribution à contre-courant d'un hydrolysat de rRNA soumis à l'action de la ribonucléase pancréatique a un profil complexe (Fig. 5). On remarque la prédominance de composés à coefficient de partage moyen (entre 0.6 et 1.2) et aux deux extrémités d'oligonucléotides de nature différente: à gauche (coefficients de partage petits) des composés ayant une teneur élevée en G, à droite au contraire (coefficients de partage grands) des composés riches en A. Le Tableau III indique la composition en bases et quelques paramètres structuraux de neuf fractions isolées par distribution

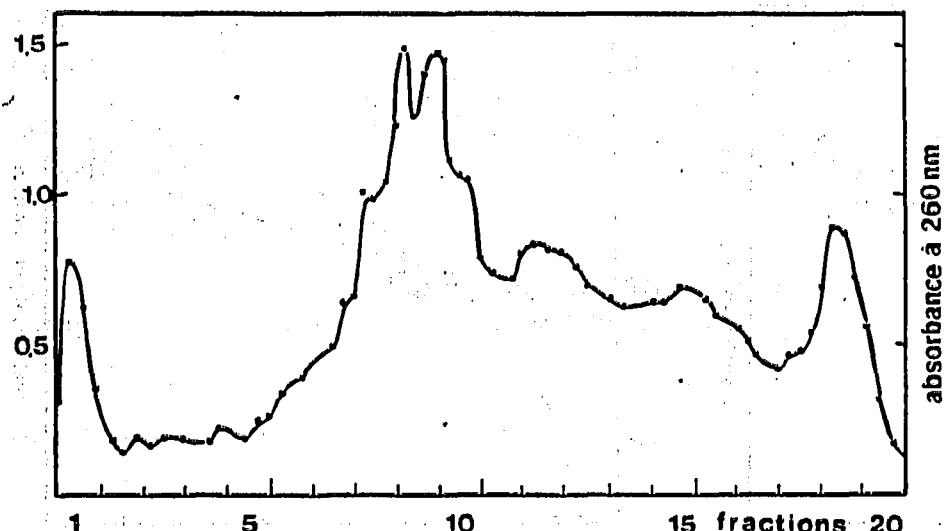


Fig. 5. Distribution à contre-courant d'oligoribonucléotides 3'-exopyrimidyliques, obtenus par action de la ribonucléase pancréatique sur du rRNA de foie de Rat (voir MÉTHODES), à 20° sur 160 transferts dans le système solvant PMB à 20% de butoxy-2 éthanol.

à contre-courant sur 160 transferts à 20°, dans le système PMB à 20%. Le rapport Pu/Py permet d'estimer la longueur moyenne des oligonucléotides, de l'ordre de 4-5 pour les fractions extrêmes, plus courte (2-3) pour les fractions moyennes. Si l'on admet les résultats de HADJIOLOV *et al.*^{17,18}, on peut penser que les oligonucléotides des fractions extrêmes sont localisés au voisinage des bouts de chaîne des rRNA hépatiques. Les composés des fractions riches en G (fractions 1 et 2 de la distribution à contre-courant) seraient constitutives de l'extrémité 5'-p et des fragments isolées par DELIHAS¹⁹ et DELIHAS ET BERTMAN²⁰. Les oligonucléotides isolés dans les fractions de tête (18 et 19) seraient par contre localisés préférentiellement dans la séquence 3'-OH des rRNA. Ainsi, la distribution non aléatoire des oligonucléotides 3'-exopyrimidyliques des rRNA de foie de Rat serait doublée d'une inégale répartition topographique.

TABLEAU III

COMPOSITION EN BASES ET PARAMÈTRES STRUCTURAUX DES FRACTIONS DE rRNA HYDROLYSÉ PAR LA RIBONUCLÉASE PANCRÉATIQUE ET DISTRIBUÉ À CONTRE-COURANT DANS LE SYSTÈME SOLVANT PMB (Fig. 5)

Distribution à contre-courant: 160 transferts, 20°, système solvant PMB à 20% de butoxy-2 éthanol. Les coefficients de partage sont calculés selon la formule 2. Chaque fraction rassemble le contenu de huit tubes du distributeur. La composition en bases est faite selon la technique de dosage spectrophotométrique de EAST¹⁴ (voir MÉTHODES).

Fraction	2	4	6	8	10	12	14	16	18
U, %	7.8	12.1	15.3	17.2	17.4	18.4	21.5	22.9	20.0
G, %	66.2	51.8	44.7	41.0	37.0	33.8	27.0	20.2	10.2
C, %	13.7	22.0	24.1	21.8	20.1	15.7	12.6	10.1	9.3
A, %	12.3	14.2	15.9	20.4	25.5	32.1	39.0	46.8	60.5
A/(A + G), %	15.7	21.5	26.5	33.2	40.8	48.9	59.1	70.0	85.6
Pu/Py	3.6	1.9	1.5	1.5	1.6	1.9	1.9	2.3	2.4
K	0.08	0.21	0.38	0.60	0.90	1.35	2.08	3.45	7.0

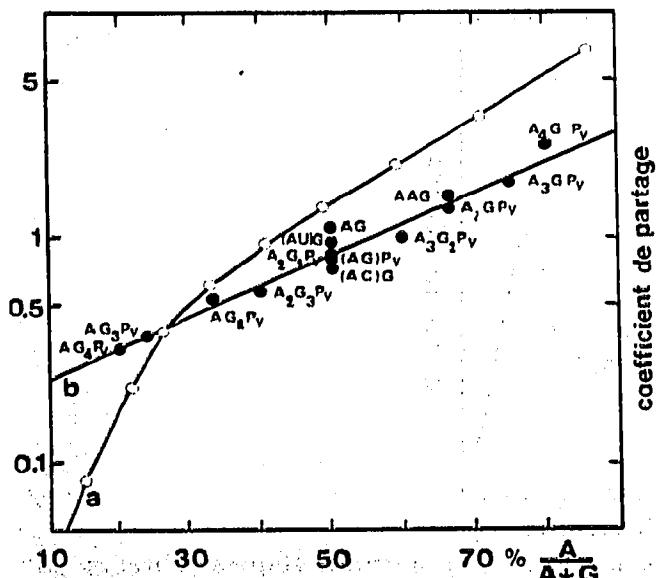


Fig. 6. Diagramme semilogarithmique donnant la variation du coefficient de partage K d'oligo-ribonucléotides en fonction de leur teneur relative en A et G. Les valeurs de K sont indiquées dans le Tableau II pour la courbe b et dans le Tableau III pour la courbe a; elles ont été établies à 20° avec le système solvant PMB à 20% de butoxy-2 éthanol.

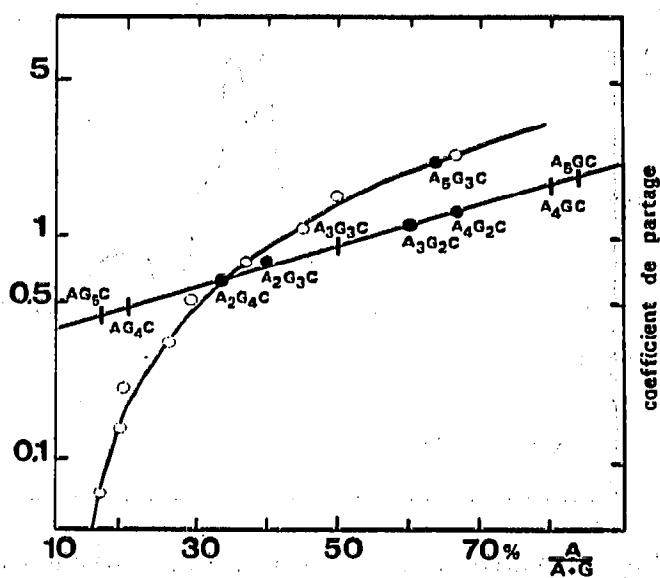


Fig. 7. Diagramme semilogarithmique donnant la variation du coefficient de partage K d'oligo-ribonucléotides 3'-exopyrimidyliques en fonction de la teneur relative en A et G. Les valeurs de K sont indiquées dans le tableau IV et ont été mesurées dans le système solvant SAFE à pH 3.25 selon MCCORMICK ET DOCTOR⁴.

La courbe (a) de la Fig. 6 montre la variation progressive des taux de A et de G pour différentes fractions d'un hydrolysat de rRNA hépatique. La courbe (b) représente l'évolution du coefficient de partage d'oligonucléotides bien définis. Cette évolution est linéaire pour l'ensemble des oligonucléotides tels que $2 < n < 6$. Les résultats rapportés par McCORMICK ET DOCTOR⁴ autorisent l'établissement d'une courbe (a) d'allure semblable à la notre (voir Fig. 7). Les valeurs des coefficients de partage que nous avons calculés pour cinq oligonucléotides (Tableau IV), distribués dans le système solvant salin SAFE (sulfate d'ammonium-acide acétique-formamide-

TABLEAU IV

McCORMICK ET DOCTOR⁴ ont utilisé le système solvant SAFE: 1200 g de sulfate d'ammonium dissout dans 4,000 ml d'eau contenant 40 ml d'acide acétique (pH final 3.25), 160 ml de formamide et 1,600 ml d'éthoxy-2 éthanol. La distribution à contre-courant a été faite sur 225 transferts. Chaque fraction rassemble le contenu de six tubes.

<i>Fraction</i>	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19
A/(A+G), %	17.0	15.7	18.8	19.5	25.8	29.1	37.2	44.7	49.8	66.8
Pu/Py	4.5	8.1	3.5	2.0	1.8	1.7	2.2	3.0	3.5	3.0
K	0.016	0.074	0.14	0.21	0.34	0.52	0.77	1.10	1.56	2.34

éthoxy-2 éthanol, pH 3.25) se placent sur la droite (b), sauf le point représentatif du nonanucléotide $(Ap)_6(Gp)_3Cp$, isolé de tRNA de levure.

Les courbes (b) des Fig. 6 et 7 expriment une loi générale de comportement des oligoribonucléotides 3'-exopyrimidyliques dans un "système solvant salin" que décrit la relation :

$$\log K = c[A/(A + G)] + d \quad (8)$$

et pour les dérivés 3'-exoguanyliques, la relation précédente est corrigée pour tenir compte du poids des nucléotides pyrimidiqes :

$$\log K = c' [A/(A + G)] (Pu/Py) + d' \quad (8')$$

qui se simplifie en :

$$\log K = c' (A/Py) + d' \quad (8'')$$

Les paramètres c , c' , d et d' dépendent de la nature du système solvant et de la famille de composés nucléiques considérés. Dans l'ensemble homogène des tri- aux hexanucléotides, la substitution d'un G par un A se traduit par un doublement du coefficient de partage. Les familles à chaîne plus longue ($8 < n < 15$) auront une pente c (ou c') plus forte. La substitution d'un seul nucléotide guanylique par un nucléotide adénylique aura un effet moins important sur l'augmentation du coefficient de partage.

La courbe (a) résulte de la superposition, en une fraction donnée du distributeur à contre-courant, d'un nombre fini d'oligomères qui diffèrent par leur longueur, leur composition et leur taux dans l'hydrolysat. L'équation complexe de cette courbe

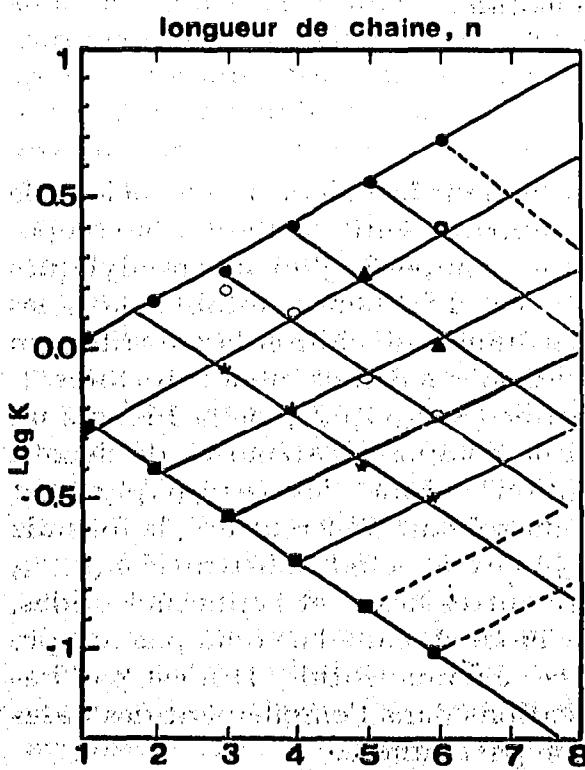


Fig. 8. Diagramme de filiation d'oligoribonucléotides. La valeur logarithmique des coefficients de partage K , indiquées dans le Tableau II (20° et système solvant PMB à 20% de butoxy-2 éthanol), sont portées en fonction de la longueur de chaîne, n .

est calculable à *priori* si l'on tient compte de l'ensemble de ces données, mais elle n'a pas d'intérêt.

Nous avons déjà remarqué que le coefficient de partage est fonction de la longueur de la chaîne. Pour un ensemble d'oligonucléotides ($2 < n < 6$), la Fig. 8 représente le diagramme de filiation où la variation logarithmique du coefficient de partage est une fonction linéaire du nombre n de nucléotides de la chaîne pour deux sous-ensembles d'oligonucléotides engendrés par les formules suivantes :

$$A_{n-(1+y)}G_yPy \quad (10)$$

avec $x + y = n - 1$

$$A_xG_{n-(1+x)}Py \quad (11)$$

Le sous-ensemble 10 est générateur des familles de droites à pente négative ; l'autre des familles de droites à pente positive, puisqu'un G est substitué par un A. Ces familles de droites définissent un réseau de droites sensiblement parallèles. Ce réseau toutefois ne peut être étendu sans précaution à des composés caténaires plus longs ($n \geq 8$), pour une raison simple. La substitution d'un nucléotide guanylique par un nucléotide adénylique n'a pas la même valeur pour des oligonucléotides de longueur de chaîne différente. Cet effet substitutif peut être défini comme :

$$\delta(G \rightarrow A) = \log K_{A_xG_yPy} - \log K_{A_{x+1}G_{y-1}Py} \quad (12)$$

L'effet sur K d'une telle substitution est d'autant moins prononcé que la chaîne s'allonge. On peut calculer, à l'aide des valeurs du Tableau II, que $\delta(G \rightarrow A)$ décroît de 0.55 à 0.34 quand on passe du di- à l'hexanucléotide.

DISCUSSION

Deux des cinq paramètres structuraux déterminant la valeur du coefficient de partage d'un soluté ribonucléique de petite taille apparaissent essentiels : la composition fondée sur le taux relatif de A et de G pour les composés 3'-exopyrimidyliques et la longueur de chaîne. La séquence n'exerce pas d'influence notable dans les "systèmes solvants salins". Il est actuellement très difficile de chiffrer la contribution d'une structure secondaire ou tertiaire d'oligonucléotides naturels monocaténaires.

On constatera néanmoins que le nonanucléotide $(Ap)_5(Gp)_2Cp$ de la Fig. 7 a un coefficient de partage deux fois supérieur à celui de composés caténaires de deux à trois nucléotides plus courts, mais de composition voisine, les $(Ap)_3(Gp)_2Cp$ et $(Ap)_4(Gp)_2Cp$ situés sur la courbe (b). Dans le système solvant SAFE utilisé, la formule 12 permet d'attribuer une valeur positive 0.16 ± 0.01 à l'effet substitutif $\delta(G \rightarrow A)$ et de prévoir les coefficients de partage des quatre autres hexa- et heptanucléotides, indiqués par une barrette verticale sur la Fig. 7. Ce mode de calcul ne rend pas compte de la valeur élevée du coefficient de partage de ce nonanucléotide. Il n'est pas impossible que cette différence soit due à des modifications dans l'empilement des bases consécutives à l'apparition d'une structure spatiale particulière.

Le diagramme de filiation de la Fig. 8 permet de calculer le coefficient de partage d'un oligonucléotide du type A_xG_yPy avec $x + y = n - 1$, en utilisant les relations :

$$\log K_{A_x G_y P_y} = (n-1) a_x + \log K_A + y b_x \quad (14)$$

$$= (n-1) a_y + \log K_G + x b_y \quad (15)$$

avec les valeurs numériques suivantes, pour le système solvant PMB à 20% et à 20°:

$$a_x = 0.13$$

$$a_n = -0.15$$

$$\log K_A = 0.04$$

$$b_x = -0.28$$

$$b_y = -0.35$$

$$\log K_G = -0.26$$

Les éqns. 14 et 15 sont utilisables indépendamment l'une de l'autre, puisqu'elles correspondent aux deux sous-ensembles définis par les relations 10 et 11.

On peut aussi faire appel à une relation simplifiée pour calculer le coefficient de partage d'un oligonucléotide de longueur n connaissant celui d'un autre oligonucléotide de composition différente, mais de même longueur et, inversement connaissant le coefficient de partage d'un composé nucléique de longueur n , fixer les paramètres x et y :

$$\log K_{A_{x \pm a} G_{y \pm b}} = \log K_{A_x G_y} \pm a \cdot a_x \pm b \cdot a_y \quad (16)$$

Les relations précédentes ouvrent deux applications intéressantes au point de vue préparatif et analytique. À l'exemple de l'utilisation de la distribution à contre-courant à l'échelle semi-industrielle pour purifier les peptides, il devient possible de faire appel à la chromatographie de partage préparative sur colonne et/ou à la distribution à contre-courant dans un "système solvant salin" pour préparer en grande quantité des oligonucléotides de composition et de longueur bien définies. Comme nous le montrons ailleurs²¹, la combinaison de cette technique préparative avec la chromatographie échangeuse d'ions en milieu acide autorise le fractionnement de quatre sur huit des trinucléotides 3'-exopyrimidyliques, six sur neuf des trinucléotides 3'-exoguanyliques, la moitié des seize tétranucléotides 3'-exopyrimidyliques et dix sur vingt-quatre des tétranucléotides 3'-exoguanyliques.

À l'échelle analytique, nous travaillons actuellement à réaliser des empreintes sur couche mince d'oligoribonucléotides²² en procédant à une électrophorèse à pH acide dans la première dimension et, dans la deuxième dimension, à une chromatographie de partage avec un système solvant basique contenant du méthoxy-2 éthanol. De telles empreintes autorisent l'identification directe d'oligoribonucléotides (composition et longueur), en relation avec le diagramme de la Fig. 8.

Au point de vue théorique, il devient possible d'adoindre aux techniques physiques d'étude des biopolymères, la mesure et l'évolution du coefficient de partage. En milieu de force ionique très élevée (systèmes solvants salins) ou en milieu de force ionique faible (systèmes solvants organiques), on peut confirmer la nature hydrophile du couple de bases G-C dûe à son moment dipolaire élevé et la nature hydrophobe du couple A-U, réexaminer s'il y a lieu le problème de l'empilement des bases et de la structure secondaire de courts fragments ribonucléiques et de tenter de chiffrer la contribution de ces derniers paramètres à la constante d'équilibre d'une chaîne ribonucléique au contact de solvants organiques polaires. Les connaissances acquises dans ce domaine seront exploitées pour une meilleure connaissance des édifices macromoléculaires plus complexes comme les tRNA's.

REMERCIEMENTS

Nous voudrions remercier MM. D. BAUER et E. TAUBERT pour leur collaboration technique, Mlle A. M. AUBERTIN pour ses fructueux conseils en matière de chromatographie et M. le Professeur M. DAUNE pour ses nombreuses suggestions.

RÉSUMÉ

On a étudié le comportement de trente et un oligoribonucléotides 3'-exoguanosiques et 3'-exopyrimidylques dans un "système solvant salin" utilisé pour la distribution à contre-courant des RNA de transfert, constitué de tampon au phosphate de potassium 1.50 M pH 7.0, de méthoxy-2 éthanol et de butoxy-2 éthanol. On donne les isothermes de partage de di- et de trinucléotides. On a procédé à des distributions à contre-courant de tétra-, penta- et hexaribonucléotides obtenus par action de la ribonucléase pancréatique sur du RNA ribosomique de foie de Rat.

On décrit la contribution fondamentale de deux paramètres de structure: la composition nucléotidique et la longueur de chaîne (n) ont été évalués à partir des coefficients de partage (K) à 20°. Le logarithme du coefficient de partage ($\log K$) des oligoribonucléotides 3'-exopyrimidylques varie linéairement avec les taux relatifs en Ap et Gp, exprimés par le rapport Ap/(Ap + Gp); $\log K$ pour les oligoribonucléotides 3'-exoguanosiques est une fonction de rapport A/Py. $\log K$ est aussi une fonction linéaire de n (avec $2 < n < 7$) pour des composés nucléiques du type $(Ap)_x(Gp)_yPyp$ avec $x + y = n - 1$. Les isomères séquentiels ne sont pas différenciables. La portée théorique et pratique de ces résultats est discutée.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 R. C. WARNER ET P. VAIMBERG, *Fed. Proc.*, 17 (1958) 331.
- 2 K. S. KIRBY, *Biochim. Biophys. Acta*, 41 (1960) 338.
- 3 K. S. KIRBY, *Biochim. Biophys. Acta*, 61 (1962) 506.
- 4 G. J. McCORMICK ET B. P. DOCTOR, *Biochim. Biophys. Acta*, 76 (1963) 628.
- 5 B. P. DOCTOR ET G. J. McCORMICK, *Biochemistry*, 4 (1965) 49.
- 6 H. G. ZACHAU, *Z. Physiol. Chem.*, 342 (1965) 98.
- 7 R. V. TOMLINSON ET G. M. TENER, *Biochemistry*, 2 (1963) 697.
- 8 J.-P. GAREL ET P. MANDEL, *J. Chromatogr.*, envoyé pour publication.
- 9 S. AOYAGI ET Y. INOUE, *J. Biochem.*, 64 (1968) 603.
- 10 W. J. R. STANLEY ET R. M. BOCK, *Anal. Biochem.*, 13 (1965) 43.
- 11 J. N. TOAL, G. W. RUSHIZKY, A. W. PRATT ET H. A. SOBER, *Anal. Biochem.*, 23 (1968) 60.
- 12 S. AOYAGI ET Y. INOUE, *J. Biol. Chem.*, 243 (1968) 514.
- 13 J. P. GAREL ET P. MANDEL, *Eur. J. Biochem.*, 5 (1968) 474.
- 14 J. L. EAST, *Anal. Biochem.*, 24 (1968) 514.
- 15 E. HECKER, *Verteilungsverfahren im Laboratorium*, Verlag-Chemie, Weinheim/Bergstr., 1955, p. 191.
- 16 K. HIGASHI, S. GOTOH, T. MATSUHISA, N. TATEISHI ET Y. SAKAMOTO, *Biochim. Biophys. Acta*, 217 (1970) 408.
- 17 A. A. HADJILOV, P. V. VENKOV ET L. B. DOLAPCHIEV, *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 28 (1967) 166.
- 18 A. A. HADJILOV, P. V. VENKOV, L. B. DOLAPCHIEV ET D. D. GENCHEV, *Biochim. Biophys. Acta*, 142 (1967) 111.
- 19 N. DELIAS, *Biochemistry*, 6 (1967) 3356.
- 20 N. DELIAS ET J. J. BERTMAN, *J. Mol. Biol.*, 21 (1966) 391.
- 21 J. P. GAREL, D. FILLIOL ET P. MANDEL, en préparation.
- 22 D. HENTZEN ET J. P. GAREL, en préparation.