

LES CONSTITUANTS MINEURS DES ACIDES RIBONUCLÉIQUES SOLUBLES

I. — DOSAGE DES DÉRIVÉS MÉTHYLÉS DE LA GUANINE

G. PÉTRISSANT, P. GAYE

*Laboratoire de Physiologie de la Lactation,
Centre national de Recherches zootechniques, 78 - Jouy-en-Josas*

SOMMAIRE

Une méthode de dosage quantitatif des dérivés méthylés de la guanine dans les acides ribonucléiques solubles bruts est proposée. L'hydrolysate alcalin est analysé par chromatographie sur colonne d'échangeurs d'ions. Une suite déterminée d'opérations conduit à l'isolement progressif des nucléotides ou nucléosides de guanyliques. Ceux-ci sont ensuite convertis en bases dont la séparation est totale. Le rendement de chacune des techniques utilisées est examiné. Les résultats obtenus pour les ARNs de levure et de divers tissus animaux sont comparés aux résultats correspondants de différents auteurs.

De très nombreux nucléotides atypiques, pour la plupart méthylés, ont été mis en évidence dans les acides ribonucléiques solubles de sources variées. Le dosage quantitatif de ces constituants, l'identification des séquences auxquelles ils appartiennent, doivent contribuer à élucider leur rôle.

L'étude des sARNs ⁽¹⁾ purifiés, accepteurs spécifiques d'un amino-acide, est la plus fructueuse ; mais, elle implique la préparation de lots très importants de sARN total réalisée, seulement à partir de levures (MONIER, STEPHENSON et ZAMECNIK 1960 ; HOLLEY, 1963) et de bactéries (ZUBAY, 1962).

Les quantités de ce matériel qu'il est possible d'obtenir à partir des tissus animaux sont toujours limitées et seule peut être envisagée actuellement, l'étude de la composition nucléotidique du sARN total. Il en résulte que la détermination des composés mineurs est souvent incomplète et leur dosage approximatif.

Nous avons mis au point une méthode qui permet l'estimation reproductible et suffisamment quantitative de sept nucléotides atypiques ainsi que de l'acide pseudouridylique, à partir de vingt à vingt-cinq milligrammes de sARN total.

Nous décrivons ici le dosage des dérivés méthylés de la guanine.

⁽¹⁾ sARN = Acide ribonucléique soluble.

Quatre dérivés méthylés de l'acide guanylique sont rencontrés dans les sARNs. Les bases dont ils dérivent sont la 1-méthylguanine, la 2-méthylamino-6-hydroxypurine, la 2-diméthylamino-6-hydroxypurine (SMITH et DUNN, 1959) et la 7-méthylguanine (DUNN, 1963).

Notre étude a porté sur les trois premiers de ces nucléotides.

De nombreux auteurs ont identifié et dosé ces composés ou les produits de leur dégradation chimique et enzymatique.

Les techniques utilisées sont :

— soit la chromatographie et l'ionophorèse sur papier (SMITH et DUNN, 1959 ; DAVIS, CARLUCCI et ROUBEIN, 1959 ; BERGQUIST et MATTHEWS, 1962) ;

— soit la chromatographie sur colonne d'échangeurs d'ions (CANTONI et *al.*, 1962) ;

— soit une association de cette dernière technique avec la chromatographie sur papier (ADLER, WEISSMANN et GUTMAN, 1958 ; BELL, TOMLINSON et TENER, 1964), la fluorométrie (TADA, TADA et YAGI, 1964) ou la détermination d'une radioactivité spécifique (BANK et *al.*, 1964).

Il faut encore signaler la méthode originale de HALL (1965) qui utilise la chromatographie de partage sur célite.

La recherche d'estimations quantitatives nous a conduit à employer exclusivement la chromatographie sur colonne d'échangeurs d'ions et la filtration sur gel de dextrans.

Les méthodes utilisées sont, à peu d'exception près, celles décrites par COHN (1955). Les très nombreuses indications recueillies dans les publications de SMITH et DUNN (1959) ont grandement facilité notre travail.

A. — MATÉRIEL

1. ARN soluble

a) *levure* : commercial (Sigma préparé selon HOLLEY (1963) ;

b) *glande mammaire de Brebis* : préparé par extraction phénolique du surnageant obtenu par centrifugation d'un homogénat, pendant 3 h 15 à 30 000 tours/minute dans le rotor n° 30 de l'ultra-centrifugeuse Spinco, modèle L, et purification sur colonne de DEAE-cellulose (NISHIYAMA et *al.* 1961) ;

c) *foie de Lapin* : préparation identique à celle de l'ARN soluble de glande mammaire.

2. Matériel de chromatographie

Dowex 1 × 8 (AG 1 × 8 minus 400 mesh, Biorad).
DEAE cellulose 0,87 méq/g (SCHLEICHER et SCHUELL,
Sephadex G 25, médium (Pharmacia).

3. Marqueurs purifiés

Nucléotides, nucléosides et bases (Sigma).

4. Enzymes

Phosphomonestérase bactérienne (WORTHINGTON., Bioch, Corporation).

B. — MÉTHODES

1. *Spectrophotométrie*

A la sortie des colonnes de chromatographie, un détecteur d'absorption ultraviolette couplé avec un enregistreur donne une image de la courbe d'éluion (Uvicord LKB).

La mesure des densités optiques est effectuée au spectrophotomètre (Jobin et Yvon). Pour l'établissement des spectres, la densité optique est mesurée tous les 5 mμ (tous les 2 mμ au voisinage du maximum et du minimum) contre un blanc approprié, à pH 1, pH 9 et pH 13.

Les coefficients d'extinction molaire utilisés au cours de ce travail sont les suivants.

Acide guanylique 2'-3'	11,6 × 10 ³ (a)	260 mμ	pH 1
Guanosine	11,8 × 10 ³ (a)	260 mμ	pH 1
Guanine	8 × 10 ³ (b)	260 mμ	pH 2
1-méthylguanosine	12,2 × 10 ³ (c)	258 mμ	pH 1
2-méthylamino-6-hydroxypurine riboside .	13,1 × 10 ³ (c)	258 mμ	pH 1
2-diméthylamino-6-hydroxypurine riboside	15,1 × 10 ³ (c)	265 mμ	pH 1
1-méthylguanine	{ 11,4 × 10 ³ (e)	250 mμ	pH 1
	{ 8,44 × 10 ³ (d)	260 mμ	pH 9
2-méthylamino-6-hydroxypurine	{ 12,3 × 10 ³ (e)	250 mμ	pH 1
	{ 6,65 × 10 ³ (d)	260 mμ	pH 9
2-diméthylamino-6-hydroxypurine	{ 14,5 × 10 ³ (e)	258 mμ	pH 1
	{ 10,15 × 10 ³ (g)	260 mμ	pH 9
Acide uridylique 2'-3'	9,89 × 10 ³ (f)	260 mμ	pH 2-7

- (a) BOCK *et al.*, 1959.
- (b) BEAVEN, HOLIDAY et JOHNSON, 1955.
- (c) SMITH et DUNN, 1959.
- (d) ADLER, WEISSMANN et GUTMAN, 1958.
- (e) ELION, LANGE et HITCHINGS, 1956.
- (f) MARKHAM, 1955.
- (g) Donnée personnelle.

2. *Hydrolyses*

a) *Hydrolyse alcaline de l'ARN soluble.*

Vingt à vingt-cinq milligrammes de sARN de levure ou 450 unités de densité optique à 260 mμ de sARN de glande mammaire ou de foie sont dissous dans 2 ml de soude 0,3 N et incubés à 37° pendant 24 heures. Dans ces conditions, l'augmentation de la densité optique à 260 mμ après hydrolyse est de 35 p. 100 environ.

b) *Hydrolyse enzymatique.*

Le matériel à hydrolyser est dissous dans 10 ml de tampon : bicarbonate d'ammonium 0,01 M, Mg⁺⁺ 0,01 M, ajusté à pH 8,5; 0,05 ml de la solution de phosphomonoestérase bactérienne sont ajoutés et le mélange est incubé 6 heures à 37° en présence d'une goutte de chloroforme.

c) *Hydrolyse acide des nucléotides et nucléosides guanyliques.*

Le bicarbonate d'ammonium est évaporé sous vide à 50°. Le matériel à hydrolyser est transféré quantitativement dans un ballon de 80 ml. Après addition de 1,5 ml d'HCl, 1 N, l'hydrolyse est poursuivie une heure à 100°.

C. — SCHÉMA GÉNÉRAL

Le processus expérimental se résume ainsi :

I. *Obtention d'une fraction nucléotidique* qui contient, outre l'UMP et le GMP, le Ψ UMP ⁽¹⁾ et le TMP ⁽²⁾, l'IMP ⁽³⁾ et les nucléotides guanyliques méthylés.

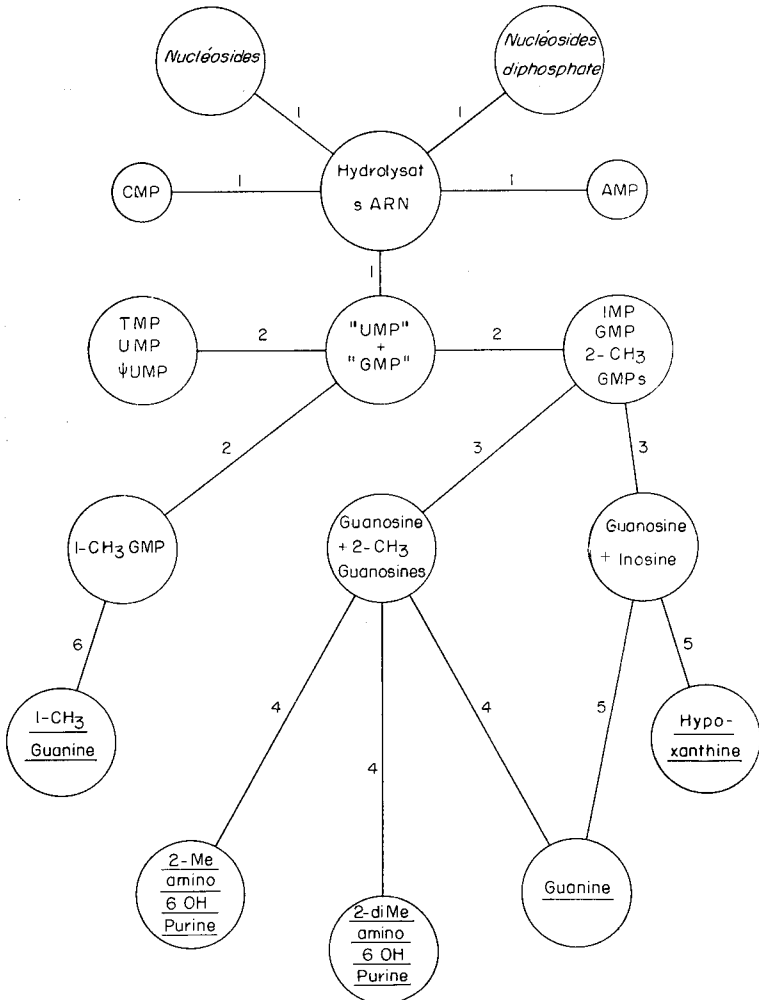


FIG. 1. — Schéma général

2. *Division de cette fraction en trois groupes.*

- a) 1-méthylguanylique et corps non identifiés.
- b) UMP, Ψ UMP, TMP.

(1) Ψ UMP = acide pseudouridylique 2'-3' monophosphate.
 (2) TMP = thymine ribotide.
 (3) IMP = inosine -2'3' monophosphate.

c) GMP, IMP, 2-méthylamino-6-hydroxypurine ribotide, 2-diméthylamino-6-hydroxypurine ribotide.

3. *Transformation des nucléotides guanyliques et de l'IMP en nucléosides et séparation partielle de ces nucléosides en deux sous-groupes dont l'un contient les guanosines méthylées et l'autre l'inosine.* La guanosine se répartit entre les deux sous-groupes.

4. *Hydrolyse acide de chaque sous-groupe.*

Séparation et dosage de la guanine, des méthylguanines et de l'hypoxanthine.

D. — RÉSULTATS

a) Isolement des méthylguanines

1) *Obtention de la fraction dite « UMP + GMP »* (Colonne n° 1 — figure 2).

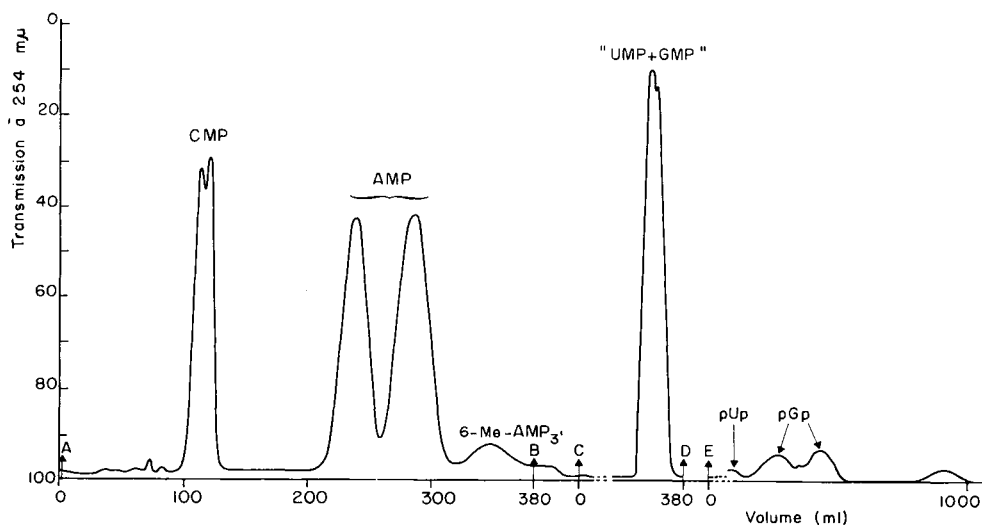


FIG. 2. — Colonne n° 1 (Dowex 1 × 8 HCOO⁻)
Fractionnement d'un hydrolysât alcalin de sARN

- A. Gradient formique.
- B. Eau distillée.
- C. Acide chlorhydrique.
- D. Eau distillée.
- E. Gradient de bicarbonate d'ammonium.

L'hydrolysât alcalin neutralisé par l'acide formique est dilué à 20 ml. Après mesure de la densité optique à 260 mμ, il est adsorbé sur une colonne de Dowex 1 × 8, formate : hauteur 2 cm, diamètre 1,6 cm.

La colonne est lavée à l'eau distillée. Effluent et lavage contiennent les nucléosides.

L'élution est réalisée par un gradient linéaire d'acide formique de 0 à 0,4 N en 600 ml. Sont élués successivement : le CMP, l'AMP et l'isomère 3'-phosphate du 6-monométhylaminoadénylique.

La colonne est neutralisée, puis lavée à l'acide chlorhydrique 0,02 N. Après 300 ml environ, est éluée une fraction complexe dite « UMP + GMP ». La colonne est lavée à nouveau à l'eau distillée et l'éluion poursuivie par un gradient linéaire de bicarbonate d'ammonium pH 8,2, de 0 à 1 M en 2 litres. On obtient ainsi les nucléosides diphosphate pUp et pGp et quelques oligonucléotides.

2. *Rechromatographie de la fraction « UMP + GMP »* (colonne n° 2 — figure 3).

Après détermination de la densité optique à 260 m μ , la fraction « UMP + GMP », 100 ml environ, est amenée à pH 10, diluée et adsorbée sur une colonne de Dowex 1 \times 8 chlorure, hauteur 4 cm, diamètre 0,9 cm, préalablement lavée à l'ammoniaque 0, 1N.

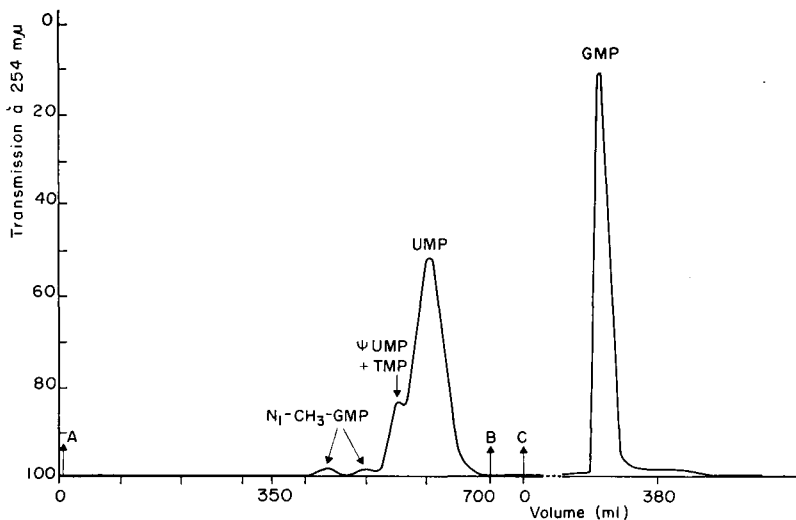


FIG. 3. — Colonne n° 2. (Dowex 1 \times 8 Cl⁻)
Rechromatographie de la fraction « UMP + GMP »

- A. Gradient de bicarbonate d'ammonium.
- B. Eau distillée.
- C. Acide chlorhydrique.

L'effluent ne contient aucune substance absorbant en ultraviolet. Après lavage à l'eau, on applique un gradient linéaire de bicarbonate d'ammonium pH 9,2 de 0 à 0,25 M en 1 litre. Dans l'ordre sont élués, les isomères 2' et 3' phosphate du 1-méthyl GMP et un sommet complexe qui contient le Ψ UMP, le TMP et l'UMP. La densité optique retombe alors à 0.

La colonne est neutralisée et lavée à l'HCl 0,02 N. Après 300 ml environ, le GMP et ses dérivés sont élués dans un faible volume (80 ml environ).

3. *Hydrolyse phosphatasique des nucléotides guanyliques. Isolement partiel des méthyl-guanosines* (colonne n° 3 — figure 4).

Après mesure de la densité optique, le GMP et les nucléotides guanyliques qui lui sont associés sont neutralisés et hydrolysés en nucléosides (voir méthodes). Après

hydrolyse, une solution de borate de sodium 0,1 M est ajoutée en quantité suffisante pour obtenir une concentration de 0,005 M.

Le volume est amené à 40 ml avec le tampon bicarbonate d'ammonium 0,02 M, borate de soude 0,005 M. L'hydrolysats est adsorbé sur une colonne de DEAE-cellulose, hauteur 35 cm, diamètre 1,5 cm, préalablement lavée à la soude 0,1 N et à l'eau, puis équilibrée avec le même tampon.

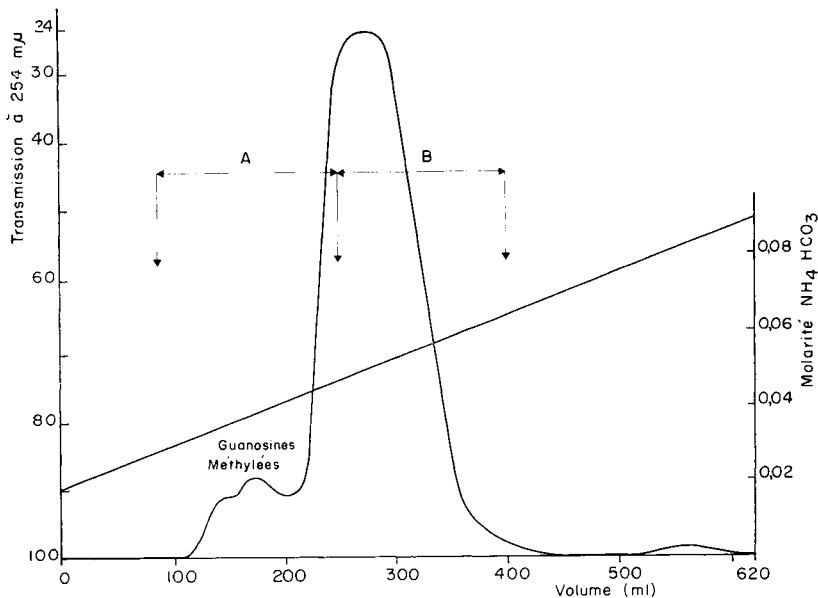


FIG. 4. — Colonne n° 3.
Fractionnement des guanosines (DEAE-cellulose)

Les méthylguanosines apparaissent sous la forme d'un ou plusieurs sommets mineurs précédant le pic de guanosine. Les tubes (10 ml) sont groupés en deux fractions délimitées comme le montre la figure 3. La première fraction contient ainsi la totalité des méthylguanosines.

4. Séparation de la guanine et des mono et diméthylamino-6-hydroxypurine (colonnes n° 4 et 5 — figures 5 et 6).

Chaque fraction de la colonne n° 3 est hydrolysée (voir méthodes), diluée à 30 ml, amenée à pH 11 avec de l'ammoniaque concentrée et adsorbée sur une colonne de Dowex 1 × 8 Cl⁻ hauteur 34 cm, diamètre 0,9 cm, lavée à l'ammoniaque 0,1 N.

L'éluion est réalisée avec une solution de chlorure d'ammonium 0,07 M pH 9,2, puis 0,1 M pH 8,5.

La fraction A, colonne n° 4, se décompose en trois sommets : la guanine, la monométhylamino-6-hydroxypurine, la diméthylamino-6-hydroxypurine qui contient des traces d'adénine.

La fraction B, colonne n° 5, contient de la guanine] et une faible quantité d'hypoxanthine.

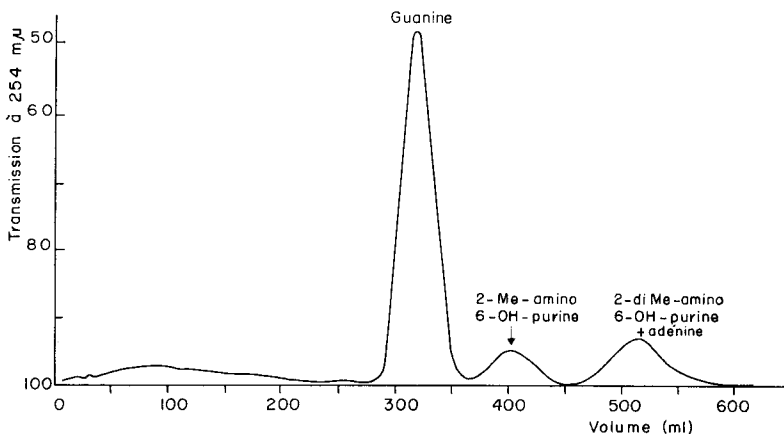


FIG. 5. — Colonne n° 4 (Dowex 1 × 8 Cl⁻).
 Rechromatographie de la fraction A :
 la guanine précède les mono- et diméthylamino-6-OH purine

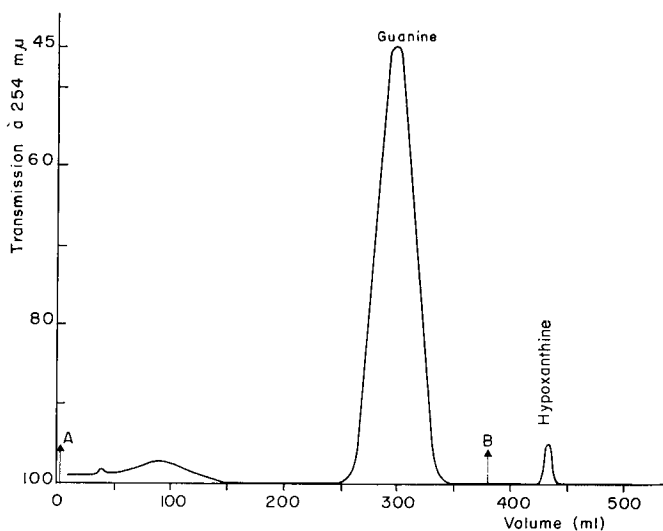


FIG. 6. — Colonne n° 5 (Dowex 1 × 8 Cl⁻)
 Rechromatographie de la fraction B : absence de méthylguanine
 L'abaissement du pH provoque l'éluion de l'hypoxanthine

A. NH₄Cl 0,07 M, pH 9,2.
 B. NH₄Cl 0,1 M, pH 8,5.

5. Obtention et purification de la 1-méthylguanine (colonne n° 6).

Après hydrolyse acide, le 1 CH₃ guanylique est adsorbé sur une colonne de Dowex 1 × 8 Cl⁻ hauteur 25 cm, diamètre 0,9 cm. L'éluion est réalisée avec une solution de chlorure d'ammonium 0,06 M pH 9,2.

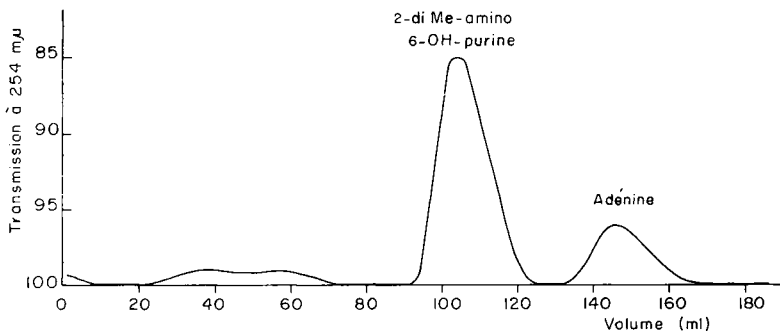


FIG. 7. — Colonne n° 7 (Sephadex G25)
Séparation de la 2-diméthylamino-6-hydroxypurine et de l'adénine

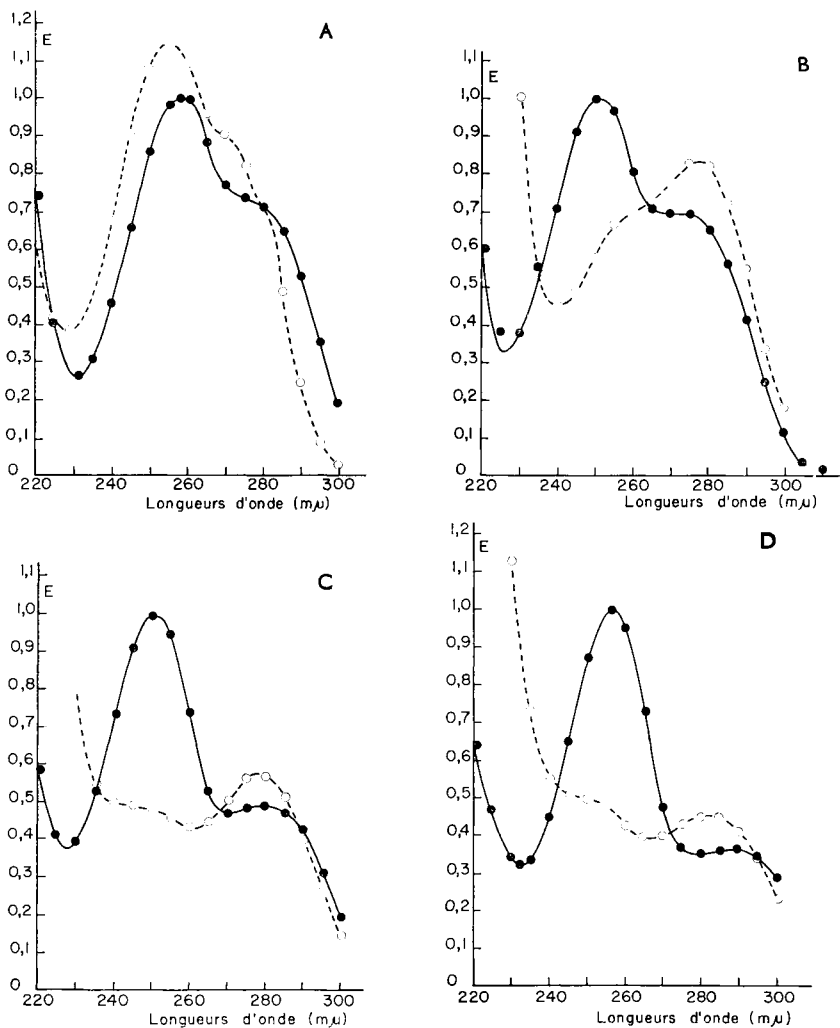


FIG. 8. — Spectres d'absorption en lumière ultraviolette de la 1-méthylguanosine (A), de la 1-méthylguanine (B), de la 2-méthylamino-6-hydroxypurine (C) et de la 2-diméthylamino-6-hydroxypurine (D).
——— pH 1 - - - - - pH 13

6. Purification de la 2-diméthylamino-6-hydroxypurine (colonne n° 7 — figure 7).

Le mélange 2-diméthylamino-6-hydroxypurine-adénine est évaporé à sec, repris quantitativement par 1,5 ml d'eau distillée et déposé sur une colonne de Sephadex

TABLEAU I

Comparaison des caractéristiques spectrales des produits synthétiques et des composés correspondants isolés des sARNs

		pH 1					pH 13				
		λ max.	λ min.	$\frac{250}{260}$	$\frac{280}{260}$	$\frac{290}{260}$	λ max.	λ min.	$\frac{250}{260}$	$\frac{280}{260}$	$\frac{290}{260}$
1-CH ₃ guanosine	S	258	231	0,84	0,70	0,52	255	230	0,96	0,60	0,23
	E	258	230	0,86	0,72	0,53	255	230	0,99	0,65	0,23
1-CH ₃ guanine	S	250	226	1,27	0,81	0,46	277	242	0,77	1,20	0,81
	E	250	227	1,24	0,80	0,51	277	242	0,82	1,18	0,78
2-diméthylamino-6-OH purine	S	256	$\frac{232,5}{280}$	0,89	0,36	0,38	282	267	1,19	1,05	0,95
	E	256	$\frac{232,5}{280}$	0,91	0,37	0,38	282	267	1,16	1,06	0,95
2-méthylamino-6-OH purine	S	250	228	1,33	0,64	0,53	280	260	1,06	1,32	0,88
	E	250	228	1,36	0,67	0,58	280	260	1,10	1,32	0,94

S — Valeurs calculées d'après les spectres publiés par SMITH et DUNN, 1959.

E — Valeurs expérimentales.

TABLEAU 2

Comportement chromatographique des méthylguanines (vitesse de migration exprimée par rapport à la guanine)

	a	b
1-CH ₃ guanine	1	1,04
2-méthylamino- 6-OH purine	1,93	1,98
2-diméthylamino- 6-OH purine	1,65	1,67

a : SMITH et DUNN (1959)

b : donnée personnelle

G 25, hauteur 55 cm, diamètre 1,5 cm, équilibrée avec une solution de chlorure de sodium à deux grammes p. 1 000. On obtient une séparation complète des deux corps.

b) *Identification*

1. *Spectres d'absorption.*

Les spectres des guanines méthylées et de la 1-méthylguanosine obtenus au cours d'une série d'analyses, sont représentés sur la figure 8. Le tableau 1 compare leurs principales caractéristiques à celles des produits purs obtenus par synthèse.

2. *Chromatographie.*

Après migration dans le solvant de WYATT (1951) les R_f sont comparés aux valeurs correspondantes publiées par SMITH et DUNN (1959) (tabl. 2).

c) *Teneurs de divers sARNs en guanines méthylées*

Les tableaux 3 et 4 regroupent les résultats obtenus par la technique qui a été décrite et permettent de les comparer à ceux publiés par différents auteurs.

DISCUSSION

La discussion portera sur les points suivants : justification du plan expérimental, reproductibilité et rendement des techniques, critique des différentes étapes, appréciation des résultats.

TABLEAU 3

Teneurs de divers sARNs en guanines méthylées
(moles pour 100 moles de nucléotides totaux)

Origine du sARN	1—méthyl-guanine	2—diméthyl-amino-6—OH purine	2—méthyl-amino-6—OH purine	Références
Levure	0,78 ± 0,03 (3)*	0,84 ± 0,03 (4)	0,72 ± 0,04 (3)	Résultats personnels
	0,95 (impure)	0,60	—	BELL, TOMLINSON et TENER (1964)
	1,92		—	CANTONI <i>et al.</i> (1962)
Foie de lapin	0,60	0,66	1,47	Résultats personnels
	2,34		—	CANTONI <i>et al.</i> (1962)
Glande mammaire de brebis	0,69	0,87	1,23	Résultats personnels

* Le nombre entre parenthèses correspond au nombre d'analyses utilisées pour déterminer la déviation standard.

TABLEAU 4
Teneurs de divers s.ARNs en guanines méthylées
 (exprimées en moles pour 100 moles de guanine et d'uracile)

	Levure						Foie						Glande mammaire			
	a		b		c		a		c		e		f		a	
	% G	% U	% G	% U	% G	% U	% G	% U	% G	% U	% G	% U	% G	% U	% G	% U
1-méthylguanine (3) *	2,78 ± 0,08	4,54 ± 0,06	3,60	5,40	7,24	11,30	2,24	3,92	7,50	14,8	4,71	3,3	2,52	4,05		
2-diméthylami- no-6-OH purine (4)	2,98 ± 0,12	4,85 ± 0,25	2,27	3,40			2,43	4,2			3,02	2,3	3,12	5,05		
2-méthylamino- 6-OH purine (3)	4,22 ± 0,16	2,59 ± 0,24					5,39	9,36			2,40	3	4,49	7,20		

a : Résultats personnels.

b : BELL, TOMLISON et TENER, 1964.

c : CANTONI *et al.*, 1962.

e : BERGQUIST et MATTHEWS, 1962.

f : DUNN, 1959.

* Le nombre entre parenthèses correspond au nombre d'analyses utilisées pour déterminer la déviation standard.

I. — *Le schéma général* tel que nous l'avons défini (paragraphe C) s'inspire de deux principes

a) les composés à doser doivent être isolés sous forme de nucléotides et dégradés successivement en nucléosides et bases afin que soit établie sans équivoque leur existence au sein des chaînes de sARN ;

b) le dosage des dérivés méthylés de l'acide guanylique ne représente qu'une partie de l'étude des nucléotides atypiques. Il importe que le plus grand nombre possible de ces constituants soit identifié au cours d'une seule analyse.

Ceci nous a conduit à réaliser au cours des deux premières étapes, une séparation en divers groupes dont chacun contient une famille de corps voisins par leur structure et leurs propriétés chromatographiques. Le mode d'élu-tion utilisé à ce stade (acide dilué — sel volatil), autorise les fractionnements secondaires.

II — *Contrôle de la reproductibilité et du rendement des techniques.*

Notre travail étant essentiellement orienté vers la mise au point d'une méthode reproductible et quantitative de dosage des guanines méthylées, nous avons vérifié le recouvrement de chacune des analyses chromatographiques ainsi que celui des hydrolyses chimiques ou enzymatiques qu'elle comporte. Les résultats consignés dans les tableaux 5, 6 et 7, témoignent du rendement satisfaisant à tous les stades du fractionnement.

TABLEAU 5

Rendement moyen des fractionnements chromatographiques

Col. I	Col. II	Col. III	Col. IV—V	Col. VII
94 %	95,60 %	97,60 %	92,72 %	95 %

Le rendement est estimé par le rapport la DO₂₆₀ de l'échantillon adsorbé à la somme des DO₂₆₀ des composés élués. Les chiffres représentent la moyenne de cinq analyses.

TABLEAU 6

Contrôle de l'hydrolyse acide de la guanosine

Corps soumis à l'hydrolyse	DO ₂₆₀	μ moles	Hydrolyse	Isolement de la guanine	DO ₂₆₀	μ moles	Rendement
Guanosine	77,500	6,69	HCl 1 N 1 ml 5 1 h 100°	colonne DW1 × 8 0,9 × 32	51,600	6,57	98,2 %

III. — Critique des différentes étapes

a) *Isolement des nucléotides guanyliques et uridyliques.*

L'utilisation des colonnes d'échangeurs d'anions (Dowex I) éluées par un gradient d'acide formique, nous a donné des résultats analogues à ceux de CANTONI *et al.* (1962). Cependant, le chevauchement partiel des divers composés, leur dédoublement en isomères 2' et 3' phosphate, les volumes d'éluion importants, l'absorption non négligeable de l'éluant en lumière ultraviolette, nuisent à la précision du dosage.

TABLEAU 7

Contrôle de l'hydrolyse phosphatasique

Composé soumis à l'hydrolyse	DO ₂₆₀	μ moles	Enzyme	Isolement de la guanosine	DO ₂₆₀	μ moles	Rendement
GMP 2'-3'	182	15,68	phospho-mono-estérase	colonne Dowex 1 × 8 Cl ⁻	175,720	15,14	96,55 %

Ces inconvénients se retrouvent, souvent aggravés, dans d'autres systèmes chromatographiques (acide chlorhydrique pH 2, formate pH 4, bicarbonate pH 8). L'utilisation de la DEAE-cellulose ne nous a pas donné des résultats plus satisfaisants.

Les échangeurs de cations sous forme H⁺ (Amberlite IR 120) permettent d'obtenir une fraction guanylique dans laquelle les dérivés méthylés sont partiellement individualisés. Mais, les propriétés hydrolytiques de ces résines sont un obstacle au dosage quantitatif des nucléotides pures.

C'est pourquoi nous avons adopté, au cours des premiers stades de l'analyse, l'éluion globale par l'acide chlorhydrique à pH 2 des dérivés guanyliques et uridyliques. La fraction ainsi obtenue est aussitôt neutralisée pour éviter tout risque d'hydrolyse.

b) *Séparation des dérivés guanyliques et uridyliques.*

Elle peut être réalisée à pH 9,2. En même temps, le 1-méthylguanylique, dont le groupement 6-OH n'est pas dissocié, est séparé de l'un et l'autre groupe. Après hydrolyse acide, la 1-méthylguanine est obtenue dans un état de pureté satisfaisant : il peut arriver, toutefois, que l'isomère 3' phosphate soit partiellement mélangé aux groupes des uridyliques ; mais, la faible valeur de la déviation standard (voir tabl. 3 et 4) reflète la bonne reproductibilité du dosage. L'éluion à pH 2 du GMP et des 2-méthylguanyliques ne présente pas d'inconvénients. En effet, l'hydrolyse en guanosines sera réalisée volontairement à l'étape suivante. Sur DEAE-cellulose, la guanine, s'il s'en formait, précéderait les méthylguanosines. Nous n'avons constaté qu'une seule fois une telle dégradation. La guanine représentait 3 p. 100 des guanosines.

c) *La chromatographie des guanosines sur DEAE-cellulose en présence de borate* est très reproductible et quantitative. Les guanosines méthylées sont incomplètement séparées de la guanosine ; mais, dans tous les cas, la séparation arbitraire en deux fractions au niveau du maximum d'absorption permet de localiser la totalité des méthylguanosines dans la fraction A. Pour 600 DO₂₆₉ d'hydrolysats initial, celle-ci correspond à environ 80 DO. La fraction B représente 120 DO.

La concentration en borate du tampon d'éluion a été fixée à 0,005 M. Dans ces conditions, les guanosines sont suffisamment chargées pour être captées sur l'échangeur et la quantité de sels, après évaporation, n'influe pas sur la qualité de l'hydrolyse acide et du fractionnement des bases.

d) *Fractionnement de la guanine et des guanines méthylées.*

La chromatographie des guanines à pH élevé, sur des échangeurs d'anions fortement réticulés, présente des difficultés dues à la faible solubilité de ces substances et à leur forte rétention sur ces résines. Pour éviter l'étalement ou le dédoublement des pics, il convient de respecter strictement les dimensions des colonnes et de limiter à 80 DO, la quantité, exprimée en guanosines, du matériel adsorbé.

Comme le montre l'expérience de contrôle (tabl. 6), le rendement de cette analyse est satisfaisant.

Pourtant la moyenne des recouvrements obtenus au cours d'une série de dosages ne dépasse pas 92,72 p. 100 (91 p. 100-94 p. 100).

Deux raisons permettent d'expliquer le rendement parfois inférieur des dernières étapes de la technique.

a) les manipulations nombreuses nécessitées par la concentration des éluats et l'élimination complète du bicarbonate d'ammonium ;

b) l'insolubilité de la guanine à pH 9. Nous avons constaté que celle-ci peut, à la température du laboratoire, reprécipiter, dans des proportions parfois très importantes. Cette cause d'erreur peut être évitée par l'acidification rapide (pH 2.) du contenu des tubes de guanine. Après une première lecture, la valeur de la DO est contrôlée quarante huit heures plus tard.

e) *Filtration sur gel de dextrans.*

L'utilisation du Sephadex G 25, pour la purification ou la séparation de certaines guanines méthylées, s'est avérée très intéressante.

Les composés sont élués dans un faible volume de solution saline très diluée.

L'application de cette technique permet d'obtenir des spectres UV de bonne qualité.

IV. — *Appréciation des résultats*

La méthode décrite permet de doser de façon reproductible, à partir d'une quantité relativement faible de sARN, la guanine et trois de ses dérivés méthylés ainsi que l'hypoxanthine.

Son pouvoir de résolution est identique à celui de la chromatographie sur papier (SMITH, DUNN, 1959). A la différence des méthodes proposées par CANTONI et al.

(1962), BELL, TOMLINSON et TENER (1964), elle a l'avantage de permettre l'estimation de la 2-méthylamino-6-hydroxypurine.

La proportion molaire de guanine que nous avons déterminée dans le sARN de levure est légèrement supérieure à celle établie par d'autres auteurs. Ces variations peuvent s'expliquer par l'origine différente du matériel analysé.

Nos résultats concernant la 1-méthylguanine et la 2-diméthylamino-6-hydroxypurine sont comparables à ceux de BELL, TOMLINSON et TENER (1964) pour la levure et à ceux de BERGQUIST et MATTHEWS (1952) pour le foie de lapin. Ils diffèrent sensiblement de ceux de CANTONI *et al.* (1962) dans les deux cas.

Les teneurs en 2-méthylamino-6-hydroxypurine que nous avons déterminées dans le foie de lapin sont plus élevées que celles rapportées par BERGQUIST et MATTHEWS (1962).

L'hypoxanthine représente environ, tant dans la levure que dans les tissus animaux, 0,2 p. 100 des bases totales. Nous n'avons pas identifié la 7-méthylguanine. Sans doute, dans ce cas particulier, faut-il incriminer le type d'hydrolyse (LAWLEY et BROOKES, 1963).

Nous décrivons ultérieurement le dosage des acides 5-méthylcytidylique, 6-méthylaminoadénylique et pseudouridylique, ainsi que celui de la thymine ribotide, qu'il est possible de réaliser sur le même échantillon de sARN.

Reçu pour publication en mai 1966.

SUMMARY

THE MINOR CONSTITUENTS OF SOLUBLE RIBONUCLEIC ACIDS

A method of quantitative analysis of methylated derivatives of guanine in crude soluble ribonucleic acids is described.

Fractionations were obtained by an ion-exchange column chromatography procedure (Dowex-1, DEAE) and by dextran gel filtration (Sephadex G 25).

From an alkaline hydrolysate, GMP and its methylated derivatives were isolated first from CMP and AMP (nr 1 column), then from uridylic acids (UMP, TMP, UMP, nr 2 column). At this stage, 1-methyl-GMP was also isolated and estimated as 1-methylguanine.

Guanosine and its methylated derivatives on the amino-group obtained by phosphatase hydrolysis were partly dissociated. Their change into bases and the analysis of the two fractions (nr 4 and nr 5 columns) allowed us to obtain complete isolation of guanine, 2-methylamino and 2-dimethylamino-6-hydroxypurine. The latter was purified on Sephadex (nr 7 column).

Our results concerning s-RNAs from yeast, liver and mammary gland are compared to those described in the bibliography.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ADLER M., WEISSMANN B., GUTMAN A. B., 1958. Occurrence of methylated purine bases in yeast ribonucleic acid. *J. biol. Chem.*, **230**, 717-723.
- BANK A., GEE S., MEHLER A., PETERKOFKY A., 1964. Differences in the methylated base composition of valyl and leucyl soluble ribonucleic acids of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, **3**, 1406-1411.
- BEAVER G. H., HOLIDAY E. R., JOHNSON E. A., 1955. In CHARGAFF E., DAVIDSON J. N. *The nucleic acids*. Vol. I, 502, Academic Press, New York.

- BELL D., TOMLINSON R. V., TENER G. H., 1964. Chemical studies on mixed soluble ribonucleic acids from yeast. *Biochemistry*, **3**, 317-326.
- BERGQUIST P. L., MATTHEWS R. E. F., 1962. Occurrence and distribution of methylated purines in the ribonucleic acids of subcellular fractions. *Biochem. J.*, **85**, 305-313.
- BOCK R. M., NAN-SING LING, MORELL S. A., LIPTON S. H., 1956. Ultraviolet absorption spectra of adenosine 5'-triphosphate and related 5'-ribonucleotides. *Arch. Biochem. Biophys.*, **62**, 253-264.
- CANTONI G. L., GELBOIN H. V., LUBORSKY S. W., RICHARDS H. H., SINGER M. F., 1962. Studies on soluble ribonucleic acid of rabbit liver. III. Preparation and properties of rabbit liver soluble RNA. *Biochim. Biophys. Acta*, **61**, 354-367.
- COHN W. E., 1955. In CHARGAFF E., DAVIDSON J. N. *The nucleic acids*. Vol. I, 211-241, Academic Press, New York.
- DAVIS F. F., CARLUCCI A. F., ROUBEIN I. F., 1959. Trace nucleotides in certain ribonucleic acids from yeast. *J. Biol. Chem.*, **234**, 1525-1529.
- DUNN D. B., 1959. Additional components in ribonucleic acid of rat-liver fractions. *Biochim. Biophys. Acta*, **34**, 286-288.
- DUNN D. B., 1963. The isolation of 1-methyladenylic acid and 7-methylguanylic acid from ribonucleic acid. *Biochem. J.*, **86**.
- ELION G. B., LANGE W. H., HITCHINGS II., 1956. Studies on condensed Pyrimidine Systems. XIII. Some amino-substituted derivatives of guanine and 6-thioguanine. *J. Amer. Chem. Soc.*, **78**, 217-220.
- HALL R. H., 1965. A general procedure for the isolation of « minor » nucleosides from ribonucleic acid hydrolysed. *Biochemistry*, **4**, 661-670.
- HOLLEY R. W., 1963. Large scale preparation of yeast « soluble » ribonucleic acid. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **10**, 2, 186-188.
- LAWLEY P. D., BROOKES P., 1963. Further studies on the alkylation of nucleic acids and their constituent nucleotides. *Biochem. J.*, **89**, 127-138.
- MARKHAM R., 1955. In PAESCH K., TRACEY M. W. *Modern methods of plant analysis*. Vol. 4, 246, Springer Verlag, Berlin.
- MARKHAM R., SMITH J. D., 1949. *Biochem. J.*, **45**, 294.
- MONIER R., STEPHENSON M. L., ZAMECNIK P. C., 1960. The preparation and some properties of a low molecular weight ribonucleic acid from baker's yeast. *Biochim. Biophys. Acta.*, **43**, 1-8.
- NISHIYAMA K., OKAMOTO T., WATANABE I., TAKANAMI M., 1961. Fractionation of leucine-bound soluble ribonucleic acid by chromatography on DEAE-cellulose. *Biochim. Biophys. Acta.*, **47**, 193-194.
- SMITH J. D., DUNN D. B., 1959. The occurrence of methylated guanines in ribonucleic acids from several sources. *Biochem. J.*, **72**, 294-300.
- TADA M., TADA M., YAGI K., 1964. The base composition of fractionated transfer ribonucleic acids from yeast. *J. Biochem.*, **55**, 136-141.
- WYATT G. R., 1951. The purine and pyrimidine composition of deoxypentose nucleic acids. *Biochem. J.*, **48**, 584-590.
- ZUBAY G., 1962. The isolation and fractionation of soluble ribonucleic acid. *J. Mol. Biol.*, **4**, 347-356.