Bull. Soc. Chim. Belg., 59, pp. 490-507, 8 fig., 1950

III. Etude de l'homogénéité de l'acide ribonucléique de la levure

par

J.-M. GHUYSEN (Liège)

RÉSUMÉ. — L'acide ribonucléique A isolé par Chantrenne à partir de la levure n'est pas homogène et semble être constitué de deux fractions A_1 et A_2.

Par fractionnement répété à l'aide du précipitant utilisé par cet auteur, on peut isoler la fraction A_1 de solubilité constante en fonction de la quantité de phase solide présente (diagramme de Kunitz-Northrop).

L'emploi d'autres milieux solvant-précipitant montre cependant que cette constance de solubilité n'est qu'apparente. D'une manière générale, il suffit, pour faire apparaître l'hétérogénéité d'une fraction apparemment homogène dans un milieu, de tracer le graphique de Kunitz-Northrop en utilisant un autre précipitant dans lequel cette fraction est plus soluble.

Il est donc vraisemblable que l'acide ribonucléique de Chantrenne est caractérisé par une hétérogénéité continue dont la nature est encore à déterminer, et qui influence la solubilité de cette macromolécule suivant une loi actuellement à l'étude.

I. Introduction

L'étude de la composition des acides ribonucléiques purifiés et l'obtention d'échantillons satisfaisant à des critères différents d'homogénéité, constitue le problème préliminaire à résoudre avant toute étude physico-chimique de ces macromolécules.

Le travail entrepris par H. Chantrenne [1] sur la purification et les courbes d'électrotitration de l'acide ribonucléique de la levure, fut le point de départ d'une série de recherches actuellement en cours. Le produit obtenu par extraction à la soude à 3 % pendant nonante minutes à une température de 0° C fut soumis à l'analyse par la technique des courbes de

[1] H. CHANTRENNE, thèse Liège (1945); *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **55**, 5 (1946); **55**, 118 (1946).

solubilité de Kunitz-Northrop. Le milieu précipitant adopté par Chantrenne était constitué de deux volumes d'acide acétique, un volume d'acétone et deux volumes d'eau; un volume égal de la solution de nucléate à analyser était additionné à ce mélange. Chantrenne distingua ainsi deux fractions appelées respectivement A de très faible solubilité ($\gtrsim$ 30 mg d'acide nucléique par litre) et B de solubilité supérieure à 30 g par litre. Par précipitations fractionnées, il obtint le produit A ne contenant plus que 1 à 2 % de B. La solubilité très faible de l'acide ribonucléique rendait cependant difficile l'étude de la première partie du graphique de Kunitz-Northrop. On ne pouvait donc affirmer avec certitude que cette substance était constituée d'une seule espèce moléculaire.

II. Analyse de la fraction A de Chantrenne

Nous avons repris l'étude de la solubilité de la fraction A en opérant dans des conditions expérimentales plus précises; la température de 0° C était strictement constante au cours de toutes les manipulations et le dosage colorimétrique du phosphore minéralisable ou spectrophotométrique direct de l'acide nucléique était plus exact. Le système solvant-précipitant utilisé au cours des premiers essais était identique à celui imaginé par Chantrenne.

La courbe de solubilité ainsi obtenue (fig. 1*a*) révèle deux points importants :

La solubilité du produit A n'est constante en fonction de la quantité de phase solide qu'à partir d'une certaine valeur d'abscisse; d'autre part, aux faibles quantités de phase solide, l'allure du graphique milite en faveur de deux fractions que nous appelons A_1 et A_2. De nombreux graphiques de ce genre ont été obtenus à partir de différents échantillons d'acide ribonucléique de levure. On observe toujours avec le précipitant de Chantrenne une discontinuité nette dans la courbe de solubilité. Quelle que soit la valeur quantitative que l'on puisse attribuer à ces graphiques (voir plus loin) on peut dire que la fraction A de Chantrenne est hétérogène. Par deux fractionnements répétés à l'aide du même milieu et en travaillant à des concentrations très faibles, nous avons pu obtenir un enrichissement progressif en A_1 (fig. 1*b*) et isoler finalement cette fraction de solubilité très faible et apparemment constante dans tout le domaine de concentration étudié (fig. 1*c*).

Par la suite nous ne sommes plus passés par le stade de la

fraction A, mais nous avons obtenu le produit A_1 en fractionnant directement l'acide ribonucléique brut et déprotéinisé dans des conditions de dilution suffisante. Le rendement en A_1 dépend du temps de contact de la levure avec la soude à 3 % lors de l'extraction. Pour un temps de contact de 90 minutes

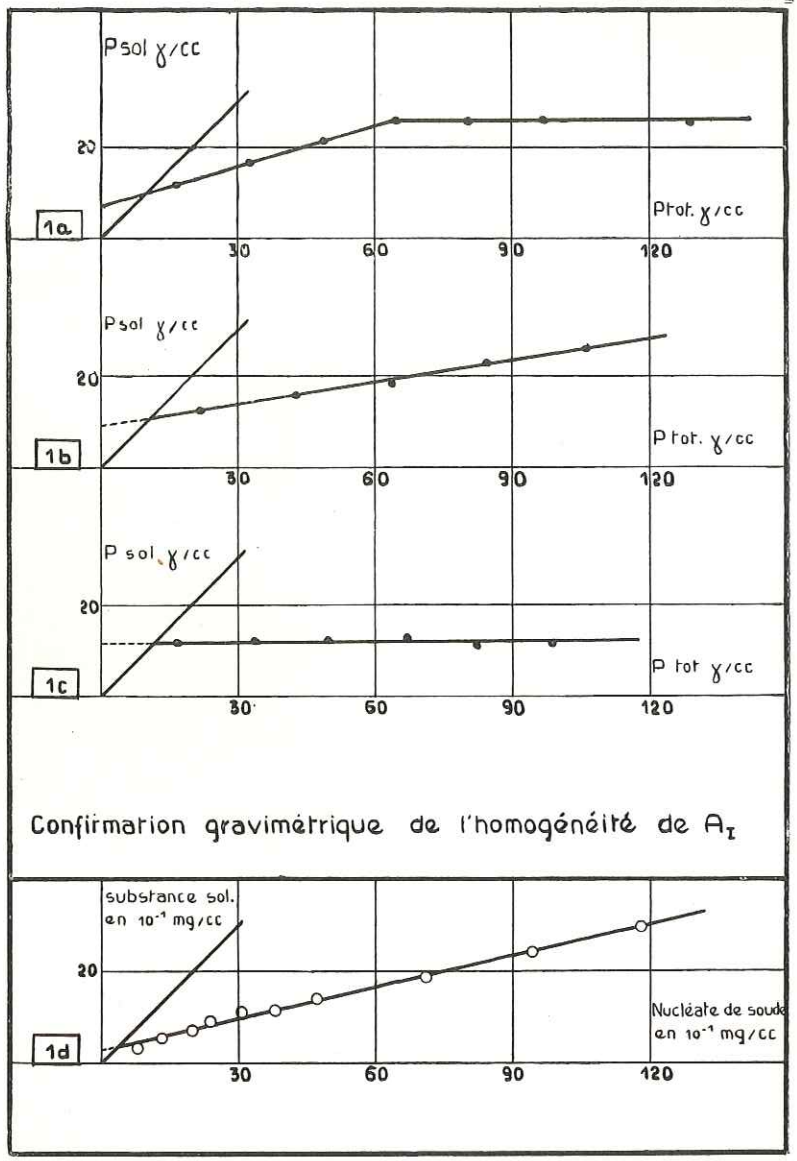


Fig. 1. — Hétérogénéité de A. Obtention de A_1 (précipitant : Chantrenne).

à 0° C, on obtient généralement, par kilo de levure, 9 g de produit brut et 2 g de la fraction A_1.

Nous reviendrons dans la partie expérimentale sur les conditions optimales d'extractions.

Signalons que la solubilité extrapolée peut varier considérablement d'une fraction A_1 à une autre (4 et 12 γ g de phosphore minérisable par cm^3, par exemple). Nous verrons plus loin que ceci peut être dû à plusieurs causes.

La détermination de la quantité d'acide en solution était basée sur un dosage de phosphore; il était nécessaire d'établir également les courbes de solubilité de la fraction A_1 par dosage d'azote et gravimétriquement. En opérant sur un échantillon caractérisé par une solubilité de 4 P γ/cm^3 nous avons, dans le premier cas, trouvé que la solubilité exprimée en γ d'azote par cm^3 était constante (6,5 N γ/cm^3).

Dans le second cas, on obtient une droite dont l'inclinaison représente environ 24 % de produit soluble (fig. 1*d*).

Comme le nucléate de soude se trouve en solution sous forme de sel tétrasodique, et comme il est précipité par le milieu de Chantrenne sous forme acide avec formation d'acétate de sodium, les 24 % de produit soluble représentent donc 6,7 % de sodium. Or le pourcentage de sodium calculé pour un polynucléotide constitué par l'union de tétranucléotides sodiques de composition statistique

$$(C_{38}H_{45}O_{29}N_{15}P_4Na_4)_x \text{ est égal à } 6{,}61.$$

L'accord est donc très satisfaisant, considérant la précision de ces déterminations.

Conclusion. — De la fraction A hétérogène de Chantrenne, on peut isoler un acide ribonucléique A_1 de solubilité apparemment constante en fonction de la quantité de phase solide.

III. Inconvénients du précipitant de Chantrenne

L'emploi de ce précipitant est critiquable à plusieurs points de vue :

1. Le graphique 2 montre que ce milieu a une légère action dégradante sur la fraction A_1. Après 26 heures de contact, on retrouve pour cette substance un tracé de solubilité similaire à celui de la figure 1*a*. Après 120 heures de contact, il semble y avoir en plus formation d'un certain pourcentage de

la fraction soluble B. Cette influence dégradante joue très probablement un rôle perturbateur important lors de l'établissement des premiers points de la courbe de solubilité. En effet, la floculation de la solution colloïdale d'acide ribonucléique est souvent très lente lorsque la quantité de phase solide est faible. Dès que la quantité d'acétate de sodium formée atteint une certaine valeur, la floculation est rapide. Nous avons essayé d'augmenter la vitesse de floculation par adjonction de sulfate de magnésium au précipitant de Chantrenne.

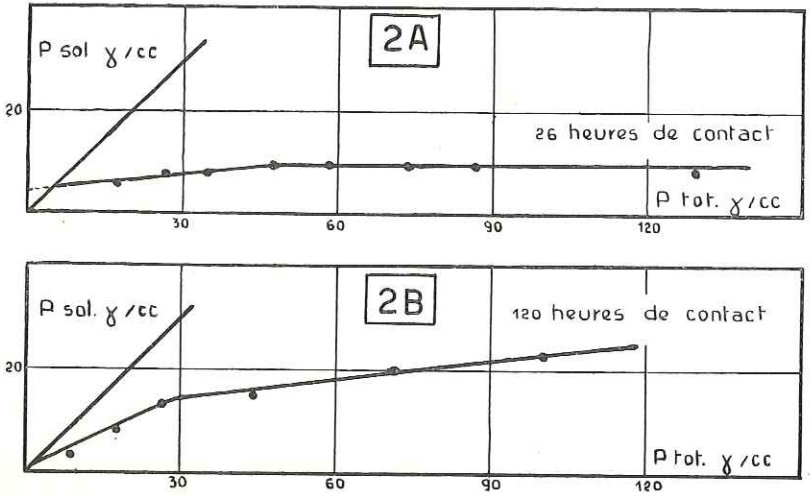


FIG. 2. — Action dégradante du précipitant Chantrenne sur la fraction A_1 (Temp. 0° C).

On se heurte cependant à un grave inconvénient; la présence de faibles quantités de sulfate de magnésium abaisse considérablement la solubilité des composants de l'acide ribonucléique et par conséquent diminue la sélectivité du précipitant. C'est ainsi que la solubilité d'un mélange A_1—A_2—B (21 γ P sol/cm³) pour un P total de 88 γ/cm³ (diagramme 2*b*) s'abaisse à 4 Pγ/cm³ par addition de 1.000 γ de sulfate de magnésium par cm³ (graphique 3*a*).

2. Ainsi qu'il ressort du graphique 3*b*, la solubilité de la fraction A_1 est abaissée par addition de ses produits de dégradation obtenus par chauffage à 100° C à *p*H 9 pendant 3 heures (*).

(*) Nous ne pouvons actuellement affirmer que cette fraction artificielle B est identique à celle de Chantrenne, débarrassée complètement du produit A, cette séparation quantitative n'ayant pas encore pu être réalisée par précipitation.

L'allure de la variation de la solubilité en fonction de la quantité de B artificiel est très similaire à celle observée avec le sulfate de magnésium, et est à rapprocher des observations faites sur la solubilité des polyélectrolytes en présence de faibles quantités d'électrolytes. Il s'ensuit que la solubilité de A_1 dépend du degré d'homogénéité de la fraction examinée. C'est ce que l'on peut d'ailleurs observer sur les graphiques 1*a*, *b*, *c* et 2. Il ressort de plus qu'il est dangereux de vouloir tirer des conclusions quantitatives à partir de courbes de solubilité lorsque celles-ci ont été établies dans des conditions où il y a

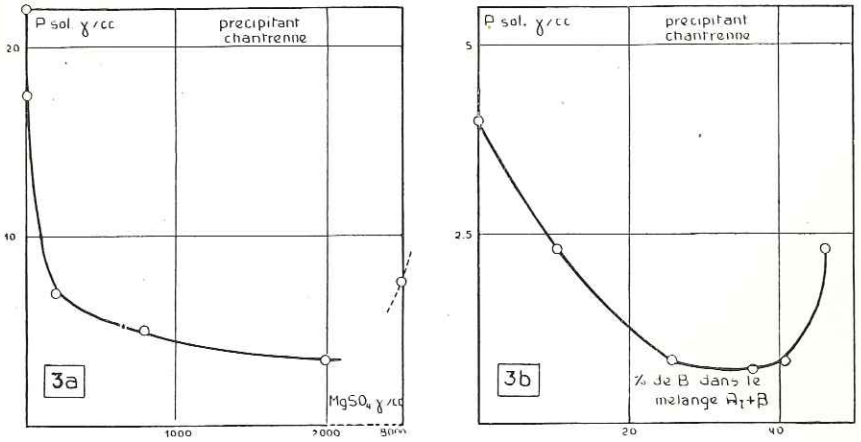


FIG. 3.

Influence de $MgSO_4$ sur la solubilité d'un produit brut.

Influence de B artificiel sur la solubilité de la fraction A_1.

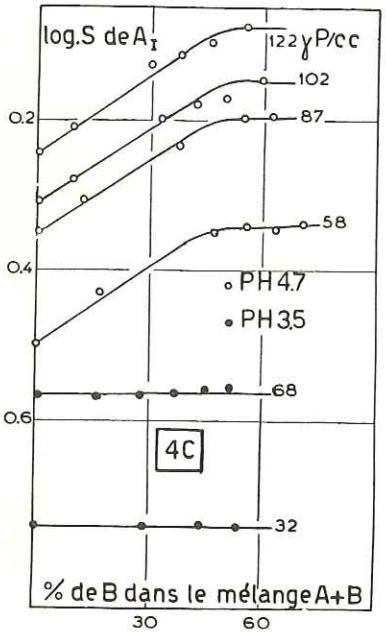
possibilité d'interactions entre les différents composants. Il est donc essentiel de pouvoir disposer d'un milieu précipitant non dégradant et dans lequel les possibilités d'interactions seraient exclues.

3. La solubilité de la fraction A_1 est trop faible pour permettre d'affirmer que la droite parallèle à l'abscisse caractérise une substance homogène et non pas une solution solide.

Conclusion. — Nous nous sommes donc efforcés de trouver d'autres précipitants ne présentant pas les inconvénients que nous venons de signaler : action dégradante, influence de B sur la solubilité de A_1, solubilité trop faible de A_1.

IV. Recherche de nouveaux milieux solvant-précipitant

Après des essais préliminaires de solubilité dans divers milieux (solutions aqueuses de précipitants organiques-solutions salines) nous avons observé l'action prépondérante des électrolytes, soit seuls ($MgSO_4$ par exemple) soit en présence d'un précipitant organique (*).



Influence de B artificiel sur A_1 aux *p*H 4,7 et 3,5. Précipitant : μ 1,7 — CH_3OH : 20 %.

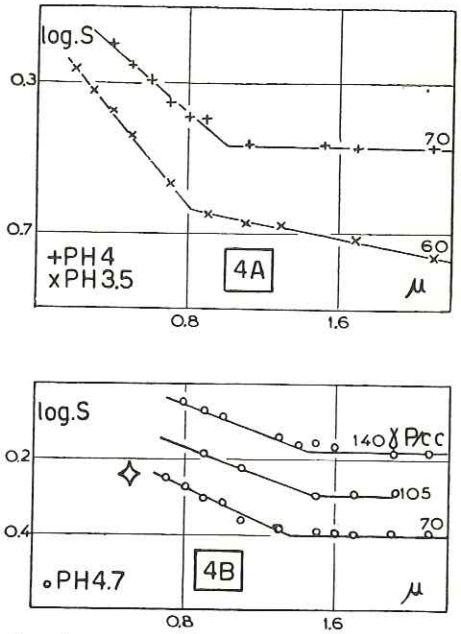


FIG. 4.

Variation de la solubilité de A_1 en fonction de μ. *p*H et conc. en A_1 variables, CH_3OH : 20 %.

Nous avons essayé d'appliquer à la purification de l'acide ribonucléique et lors de tracés des courbes de solubilité, les principes qui sont à la base des méthodes expérimentales appliquées par Cohn et ses collaborateurs dans le cas des protéines.

Le nombre de variables caractérisant un système précipitant du type Cohn est élevé; le *p*H, la force ionique apparente; le pourcentage en précipitant organique; la concentration en substance à précipiter; enfin, la température. On pouvait donc espérer trouver les conditions expérimentales de solubilité plus élevée, de sélectivité convenable et de stabilité de l'acide ribonucléique. Notre choix s'est porté sur un mélange d'alcool méthylique et d'un tampon acide acétique-acétate de sodium de force ionique $\mu = 0{,}10$, le complément éventuel de force ionique étant apporté par NaCl; la température est toujours de 0° C.

Nous avons tout d'abord étudié l'influence de la force ionique apparente, du *p*H et de la concentration en acide ribonucléique, le pourcentage en alcool méthylique dans le milieu précipitant étant de 20 % en volume.

Les résultats obtenus sont consignés dans le graphique 4*a*, *b*, et interprétés en fonction de la relation $\log S = \beta - k_s \mu$ où S désigne la solubilité en grammes de P soluble $\times$ 10 par litre et β représente la solubilité à *p*H et température déterminés et à force ionique nulle; k_s est une constante indépendante du *p*H, caractérisant une espèce particulière de molécule précipitée. Le graphique 4*a* représente la variation du logarithme de la solubilité de la fraction A_1 en fonction de μ, aux *pH* 3,5 et 4, la quantité totale de substance dans chaque essai étant approximativement la même (70 et 60 P γ/cm³). De même la courbe (◊) du graphique 4*b* représente la même variation au *p*H 4,7 pour une concentration totale de 70 γ P A_1/cm³ également.

Par application stricte de la relation précédente, on pourrait supposer que dans ce milieu, A_1 se comporte comme un mélange d'au moins deux composants. A *p*H 4 et 4,7 ce deuxième composant ne précipiterait qu'à des concentrations ioniques élevées que nous ne pouvons atteindre par suite de la présence d'alcool méthylique. A *p*H 3,5 au contraire, ce composant hypothétique précipiterait à une force ionique apparente de 0,82.

Le graphique 4*b* montre de plus que la solubilité à *p*H 4,7 et à toutes les forces ioniques examinées, est fonction de la quantité totale d'acide ribonucléique utilisée dans chaque essai de solubilité; ceci démontre également l'hétérogénéité de la fraction A_1. Il s'ensuit donc qu'une séparation sur la base de ces graphiques devait être aisée et que, d'autre part, à *p*H et μ constants, une courbe de solubilité Kunitz-Northrop ne pouvait être une droite parallèle à l'axe des abscisses.

Toutefois nous avons préalablement recherché le *p*H auquel

(*) L. Delcambe a utilisé à différentes reprises le sulfate de magnésium comme agent précipitant en vue de différencier les acides ribonucléiques obtenus de différentes sources (voir les articles suivants).

la présence de la fraction B (*) n'influencerait pas la solubilité de la fraction A_1 (graphique 4*c*) (**).

On constate qu'à *p*H 4,7 et μ 1,7, la solubilité augmente en fonction de la proportion de B artificiel jusqu'à atteindre une valeur maxima; au contraire, à *p*H 3,5 la solubilité reste inchangée. Il s'ensuit qu'en principe il est préférable de travailler à ce *p*H, auquel d'ailleurs l'action dégradante est pratiquement nulle même après 72 heures de contact (***).

Comme il fallait s'y attendre, le graphique 5*a* montre qu'à *p*H 3,5 μ 1,7 (température 0° C; alcool méthylique 20 %), la solubilité de deux fractions différentes A_1, toutes deux homogènes au précipitant de Chantrenne, est à nouveau fonction de la quantité de phase solide.

Par fractionnements répétés on obtient finalement une fraction appelée A_1' de solubilité apparemment constante dans le même milieu (graphique 5*b*, *c*). Le fractionnement est d'abord effectué dans des conditions expérimentales identiques à celles adoptées pour le tracé des courbes de solubilité. Notons que l'obtention de cette fraction A_1' de pureté apparente (96-98 %) est pénible. Mais nous avons pu simplifier le procédé en introduisant le précipitant graduellement dans la solution de nucléate par dialyse (voir partie expérimentale).

Toutefois la solubilité de A_1' est à nouveau très faible et le nouveau précipitant présente — à ce point de vue — le même inconvénient que celui de Chantrenne. Or, nous disposions avec ce milieu, de la possibilité de modifier deux facteurs : μ et le pourcentage en alcool méthylique. Nous avons donc cherché à modifier ces variables de façon à augmenter la solubilité de A_1'. Il résulte de ces essais qu'il est impossible d'isoler une fraction de solubilité constante dans tous les milieux étudiés. En effet, si nous analysons cette fraction A_1 en traçant la courbe de solubilité à force ionique constante (1,7) mais en modifiant pour chaque courbe la concentration en alcool (de 20 à 0 %), nous obtenons la série de courbes du graphique 5*d*.

(*) Voir remarque de la page 494.

(**) Signalons que d'après les graphiques 4*a*, *b*, le *p*H influence anormalement la valeur de k_s

*p*H	k_s
4,7	0,21
4	0,39
3,5	0,60.

(***) Cette stabilité est vérifiée à partir d'une fraction renfermant 98 % de A'_1 par le tracé d'une courbe de solubilité.

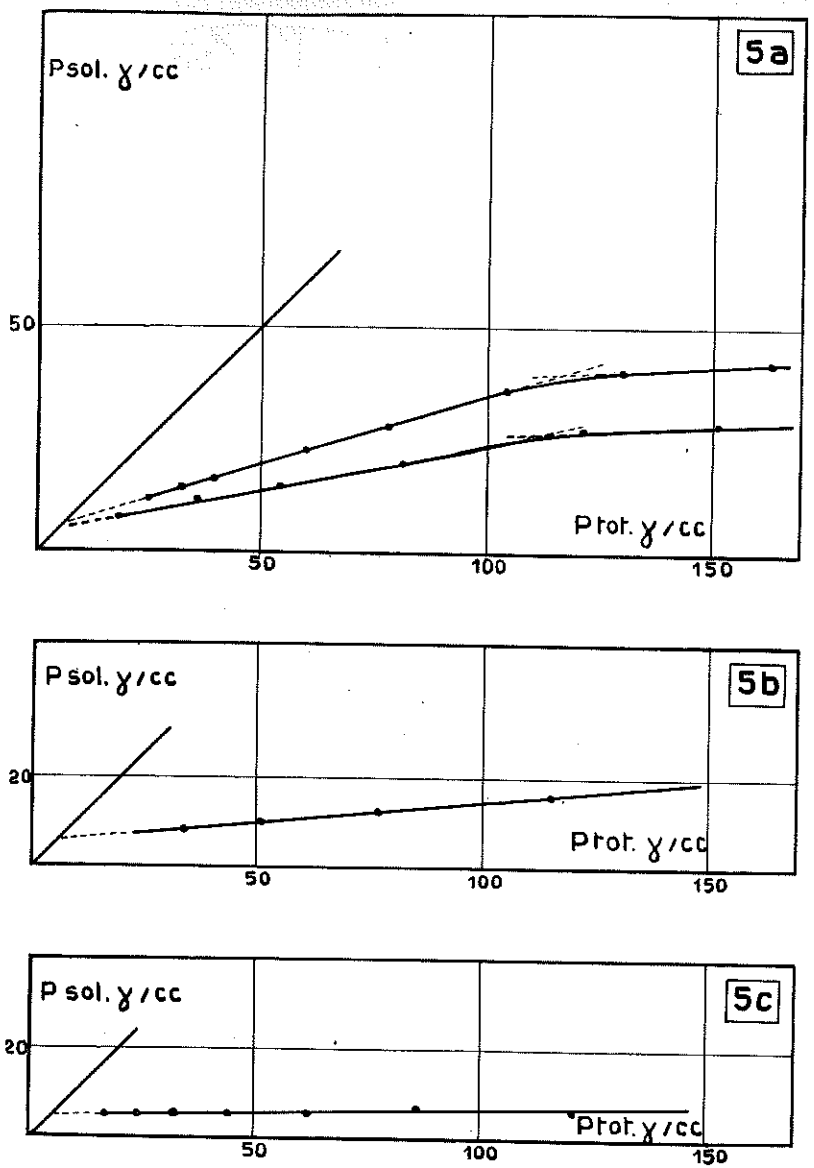


FIG. 5. — Hétérogénéité de A_1. Obtention de A'_1. Précipitant : CH_3OH 20 % — μ 1,7 — *p*H 3,5.

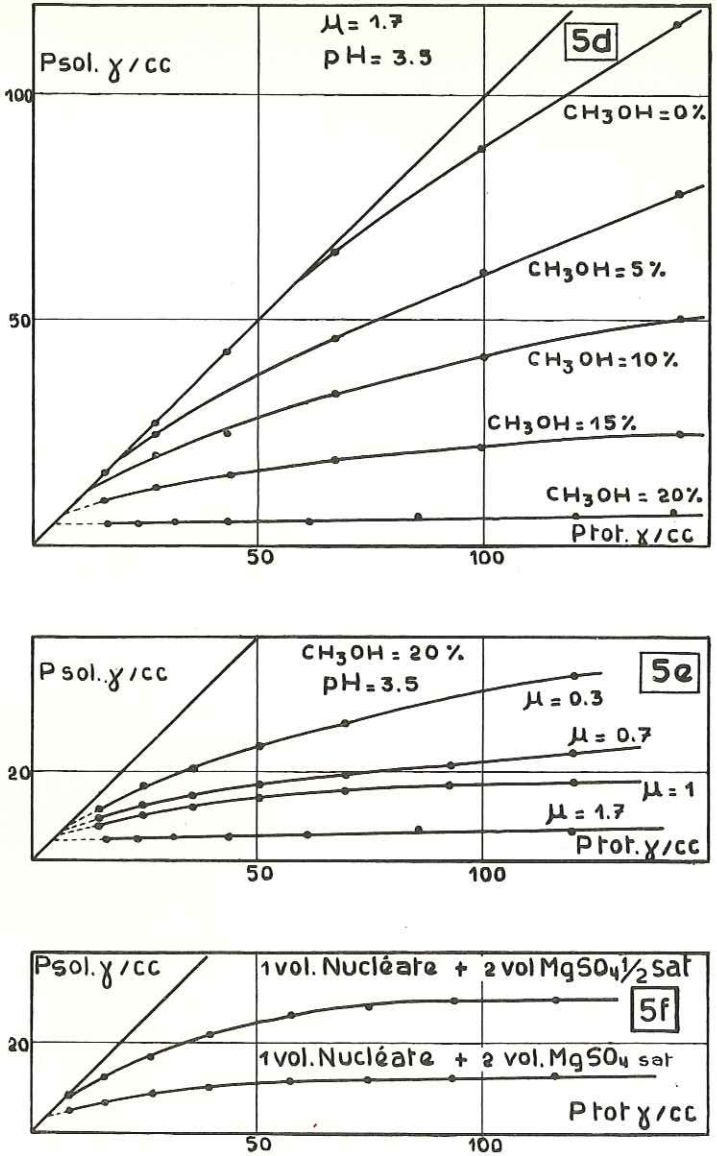


Fig. 5. — Hétérogénéité de A'_1.

De même, en conservant cette fois la concentration en alcool constante mais en modifiant la force ionique apparente de 1,7 à 0,3, nous obtenons à nouveau une série de courbes révélant une hétérogénéité manifeste de cette fraction A_1' (graphique 5*e*). De plus, on observera l'insolubilité presque totale dans ces différents milieux lorsque l'on descend aux très faibles quantités de phase solide. Remarquons enfin (graphique 5*f*) que le même type de courbe s'obtient en utilisant comme précipitant le sulfate de magnésium saturé ou demi-saturé (le *p*H étant également de 3,5).

Toutes ces courbes sont caractéristiques de solutions solides (*).

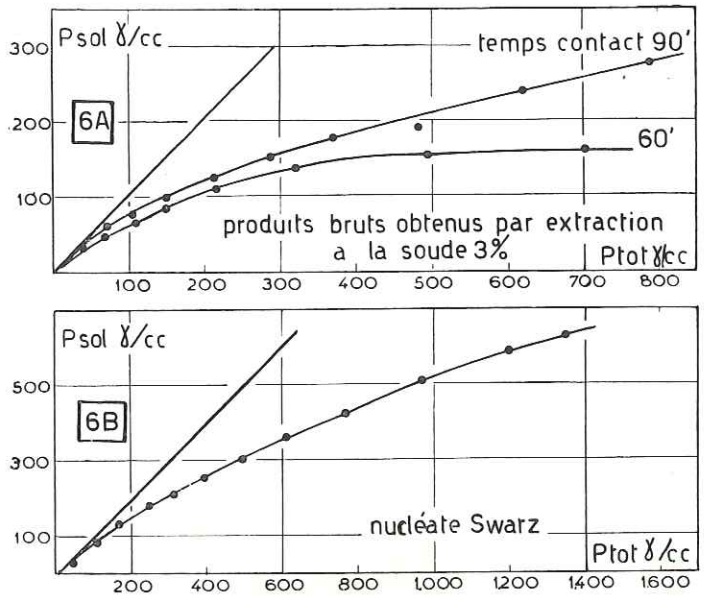


Fig. 6. — Hétérogénéité de produits non fractionnés vis-à-vis du précipitant (CH_3OH 20 % — μ 1,7 — *p*H 3,5).

(*) On observe la même allure de courbes avec le système solvant-précipitant « *p*H : 3,5, μ : 1,7, CH_3OH : 20 % », lorsque l'échantillon examiné contient une assez forte proportion de produits dégradés (graphique 6*a*, *b*).

V. Conclusion

Si la séparation de la fraction A de Chantrenne de la fraction soluble B, ainsi que la séparation du composant A_1 du composant hypothétique A_2, semble se faire suivant la loi des mélanges, il n'en est plus de même pour les fractions ultérieures.

Par fractionnement, on isole chaque fois une substance de solubilité très faible et donc apparemment constante en fonction de la quantité de phase solide présente.

Dès que l'on augmente cette solubilité en modifiant un des paramètres du système précipitant, on met en évidence l'hétérogénéité de la fraction. Il est donc très vraisemblable que, à l'instar de toutes les protéines réputées homogènes, il y a quelques années, l'acide ribonucléique de la levure est polydispersé tout au moins lorsque cette substance a été isolée à partir de ce microorganisme, par la soude.

Des recherches sont actuellement en cours afin de déterminer si cette polydispersité est fonction d'une modification de masse, de charge ou de structure chimique.

Partie expérimentale

I. Isolement de l'acide nucléique brut déprotéinisé

Nous rappelons le principe de la méthode d'extraction et d'isolement de l'acide nucléique brut adopté par Chantrenne (²). Après extraction de l'acide de levure par la soude, neutralisation par l'acide acétique et filtration, on précipite l'acide nucléique par addition de HCl et d'éthanol. On répète deux fois ce processus après avoir remis en solution par la soude, le précipité lavé à l'alcool et séché. A première vue, il était désavantageux de précipiter l'acide nucléique à *p*H acide vu le danger de dégradation et la nécessité de redissoudre par après le précipité sous forme de sel par la soude. Nous avons donc préféré effectuer la précipitation du nucléate par l'éthanol directement à un *p*H voisin de 6. Dans ces conditions cependant, on entraîne une substance étrangère de mobilité électrique presque nulle ainsi que le démontre le graphique électrophorétique *7a* obtenue à partir d'une solution tamponnée à *p*H 3,5 (*).

(*) A ces *p*H, l'acide nucléique brut paraît homogène à l'électrophorèse (voir le travail suivant de L. Delcambe). Tout pic supplémentaire révèle donc la présence d'une substance étrangère.

(²) H. Chantrenne, thèse Liège (1945); *Bull Soc. Chim. Belg.*, **55**, 5 (1946).

On peut éliminer cette substance par une série de précipitations à *p*H 4,2, ou, comme nous l'avons reconnu plus tard, par une précipitation à l'aide du milieu : alcool méthylique 20 % — *p*H 3,5 — μ 1,7.

Nous basant sur ces observations, nous avons élaboré les méthodes suivantes d'isolement de l'acide ribonucléique brut de la levure. Toutes les opérations décrites ci-dessous sont réalisées en chambre froide (4° C).

1. Un kilo de levure est mis en suspension dans six litres de soude à 3 % refroidis à 0° C, pendant 60 minutes sous agitation (*). Après centrifugation, le liquide surnageant amené à *p*H 4,2 par de l'acide acétique, est additionné d'assez d'éthanol pour obtenir une solution renfermant 4 % d'alcool. On filtre sous pression sur filtre Seitz (Klärschichte n° 5), on abaisse le *p*H vers 2 par addition de HCl à 10 % et on

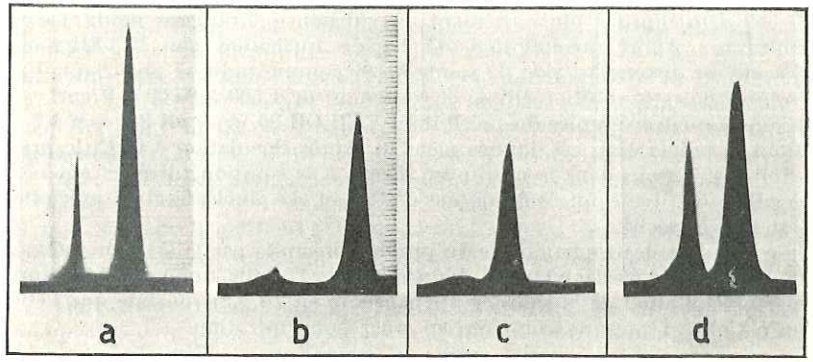


Fig. 7. — Contrôle électrophorétique (*) de l'obtention d'un nucléate brut débarrassé de substances étrangères.

Conditions électrophorétiques :
temps de dialyse à 4° C : 48 heures
température : 0,3° C
*p*H 3,5 : tampon HAc—NaAc
force ionique : 0,05 en NaAc + 0,15 en NaCl

Dissipation calorique : $\frac{i^2}{\chi\rho^2} < 0{,}09$ watt/cc (**)

Gradient de potentiel : $\frac{i}{\chi\rho} = 3$ volt/cm^{-1} (**)

(*) Les images électrophorétiques se rapportent au ménisque descendant dans la solution de nucléate.

(**) i = intensité en ampère ; χ = conductivité en ohm.cm^{-1} ; ρ = section de la cellule : 0,75 cm^2 .

(*) L. Delcambe a montré par tracé de courbes de solubilité au moyen du précipitant de Chantrenne que, compte tenu du rendement total de l'extraction, un temps de contact de 60 minutes permettait d'extraire une quantité plus grande de produit A. Le graphique 6 a obtenu à l'aide du précipitant « CH_3OH 20 % — *p*H 3,5 — μ 1,7 » montre également que pour une quantité de P total donnée la solubilité de l'échantillon brut examiné augmente avec le temps d'extraction à la soude et qu'il est préférable de ne pas dépasser un temps de contact de 60 minutes.

ajoute un volume égal d'éthanol. Le culot d'acide nucléique obtenu par centrifugation est remis en suspension dans le minimum d'eau et dissous à l'aide de soude à 1 % sans dépasser un *p*H de 5,5. La solution opalescente est ramenée à *p*H 4,2 et filtrée sur Seitz. Le nucléate est ensuite précipité par addition d'un volume égal d'alcool éthylique. Le précipité obtenu est centrifugé et, sans être séché, est remis en solution dans le minimum d'eau.

La solution à *p*H 4,2 est filtrée et le nucléate est à nouveau précipité à *p*H 7 par addition d'un volume égal d'alcool. Le précipité est lavé à l'alcool et séché sous vide. Le produit obtenu se caractérise par le graphique électrophorétique 7*b* et ne contient plus qu'une faible proportion de la substance étrangère (rendement 7 g de nucléate brut à partir d'un kilo de levure).

2. On élimine plus aisément la substance étrangère de la façon suivante : Après précipitation de l'acide nucléique par HCl-Ethanol, l'acide est dissous à l'aide de soude à 1% comme indiqué plus haut. Un volume de cette solution filtrée et contenant de 1.500 à 2.000 γ P/cm³ est ajouté à quatre volumes du précipitant « CH_3OH 20 % — *p*H 3,5 — μ 1,7 » dont la préparation est donnée page 13. Après floculation à 0° C, le précipité est dissous dans le minimum d'eau. A la solution filtrée et amenée à *p*H 7, on ajoute un égal volume d'éthanol. Le nucléate ainsi précipité est lavé et séché.

L'image électrophorétique du produit précipité par le système méthanol-solution d'électrolytes est donnée en 7*c*, et celle du produit obtenu par précipitation de la solution surnageante en 7*d*. On constate que l'élimination est presque complète en une seule opération.

II. Courbes de solubilité

a) Les modifications suivantes ont été apportées à la technique suivie par Chantrenne pour l'établissement des courbes de solubilité à l'aide de son milieu (HAc-acétone). Tous les tubes où s'effectue la précipitation de quantités variables d'acide nucléique, sont maintenus strictement à la température de 0° C même pendant la centrifugation à 3.000 tours. Les tubes d'une capacité de 10 cm³ sont fixés dans les larges godets (500 cm³) d'une grosse centrifuge à angle, à l'aide d'un support constitué de deux disques découpés en croix et soudés à un tube d'un diamètre légèrement supérieur à celui des tubes à centrifuger. L'espace vide est rempli de glace.

Le dosage du phosphore, après minéralisation, se fait par le réactif sulfomolybdique ([3]) sur une prise d'essai contenant de 5 à 50 γ P.

A la prise d'essai on ajoute 1 cm³ de réactif sulfomolybdique 2 cm³ de réactif de sulfite-hydroquinone et on complète à 10 cm³. Après 30 minutes de contact, on évalue la coloration bleue au spectrophotomètre de Beckman (640 mμ).

b) Les caractéristiques des précipitants à force ionique et pourcentage d'alcool variables, se rapportent au volume final : quatre volumes du précipitant plus un volume de la solution de nucléate à précipiter. La force ionique est donc apparente puisque nous ne tenons pas compte

([3]) Technique de Macheboeuf et Delsal, *Bull. Soc. Chimie Bio.*, **25**, 116-120 (1943). Réduction par le sulfite-hydroquinone.

de l'influence de l'alcool méthylique sur l'ionisation des sels. Les teneurs en P total et soluble sont également exprimées en γ par cm³ de volume final. Dans ce système, les *p*H renseignés sont ceux que donnerait un tampon acide acétique-acétate de soude μ 0,10 établi d'après le nomogramme de Boyd ([4]) pour un volume d'eau égal à la somme des volumes : précipitant plus solution de nucléate. C'est ainsi que le précipitant « *p*H 3,5, γ 1,7, CH_3OH 20 % » est préparé de la manière suivante : Dans un flacon jaugé de 500 cm³, on introduit 125 cm³ d'alcool méthylique, 58,45 g de NaCl, 15,6 cm³ d'acétate sodique 4 M, 81,25 cm³ d'acide acétique 10 M et on complète à 500 cm³.

La courbe de solubilité est établie de la manière suivante : Dans une série de tubes contenant tous 2 cm³ de précipitant refroidi à 0° C, on ajoute 0,5 cm³ d'une solution de nucléate de concentration graduellement décroissante. On laisse en contact à 0° C jusqu'à floculation complète (environ 90 minutes pour des échantillons assez homogènes et 12 heures pour des échantillons bruts). On centrifuge à 0° C et on dose dans le liquide surnageant le nucléate soluble spectrophotométriquement à l'appareil de Beckman (258 mμ) ([5]) (*). Signalons que pour éviter les erreurs de dilution, nous déterminons également analytiquement le P total pour chacun des points de la courbe de solubilité.

Nous avons en effet vérifié que le nucléate Swarz, une fraction A_1 et une fraction B artificiel (**), présentaient tous un maximum d'absorption à 258 mμ mais un coefficient d'absorption légèrement différent (fig. 8*a*).

Les courbes d'étalonnage ont été établies à l'aide de ces trois échantillons (fig. 8*b*); mais les résultats analytiques sont donnés en fonction de la courbe relative à la fraction A_1 (***).

Remarque. — Les courbes de solubilité établies par le sulfate de magnésium ont été faites dans les conditions suivantes : La solution saturée de sulfate de magnésium est préparée à 25° C et amenée à un *p*H apparent de 3,5 par addition d'un peu d'acide sulfurique dilué. A deux volumes de ce précipitant éventuellement dilué une fois par un égal volume d'eau (*p*H 3,5), on ajoute un volume de solution de nucléate tamponnée à *p*H 3,5 par le mélange HAc-Na Ac de force ionique 0,05. La température est toujours de 0° C.

III. Fractionnement

Les précipitations préparatives se font dans des conditions identiques à celles de l'établissement des courbes de solubilité, soit avec le précipitant de Chantrenne (HAc-acétone; obtention de la fraction A_1) soit avec notre précipitant (méthanol, HAc-Na Ac-NaCl).

(*) La présence d'acétone dans le précipitant de Chantrenne rend cette méthode inutilisable lorsque la précipitation a été effectuée à l'aide de ce milieu.

(**) Voir remarque de la page 494.

(***) La courbe de solubilité du graphique 6*b* a toutefois été établie en se rapportant à la courbe d'étalonnage donnée par le nucléate Swarz.

([4]) W. C. Boyd, *J. A. C. S.*, **67**, 1035 (1945).

([5]) Kunitz, *J. B. C.*, **164**, 563 (1946).

Dans le dernier cas, on ajoute un volume de solution de la fraction A_1 ou de nucléate brut déprotéinisé de concentration convenable, à quatre volumes de précipitant refroidis à 0° C.

Dans le cas du nucléate brut, on choisit arbitrairement une concentration de 300 et 200 γ P/cm³ pour la première et la deuxième précipitation. Pour les précipitations ultérieures et dans le cas du fractionnement du produit A_1 la concentration correspond à une concentration en phosphore par cm³ légèrement inférieure à celle du point anguleux hypothétique du diagramme de solubilité établi préalablement.

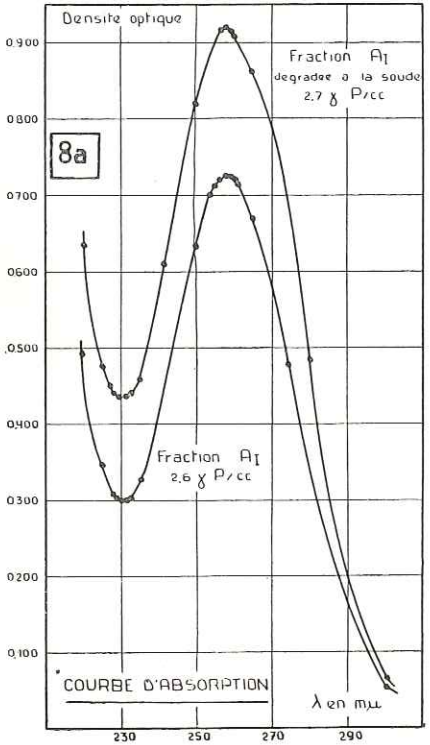


Fig. 8a.

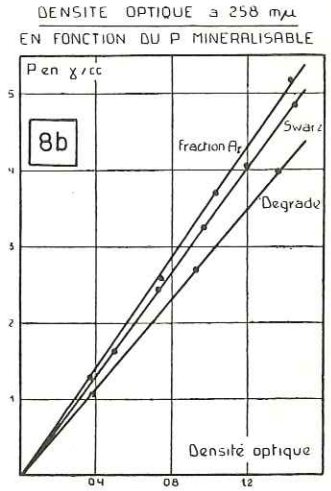


Fig. 8b.

C'est ainsi que la fraction A_1' a été obtenue par quatre précipitations successives, utilisant chaque fois un volume de nucléate et quatre volumes de mélange 20 % méthanol, *p*H 3,5 et μ 1,7 à 0° C. Le précipité obtenu après la première précipitation est centrifugé et remis en solution dans l'eau. Sans se préoccuper d'une légère opalescence (*) le produit obtenu, après la deuxième précipitation, contient environ 90 % du composant insoluble.

Les deux dernières précipitations se font par équilibrage au travers d'une membrane de cellophane. La solution de nucléate est enfermée dans un sac de cellophane que l'on plonge dans le même volume de précipitant que si l'on effectuait la prépicitation par mélange. L'équilibrage est toujours réalisé à 0° C. La floculation s'amorce rapidement et l'équilibre est généralement atteint après cinq heures. On centrifuge le contenu du sac de cellophane; le culot est remis en solution dans l'eau et la solution obtenue est soumise à un deuxième équilibrage.

(*) Ce phénomène est interprétable par les courbes 5*d*, *c*. Le faible pourcentage de méthanol et d'électrolyte dont le précipité est imprégné donne un milieu solvant-précipitant où la solubilité n'est pas totale.

Nous n'avons jamais constaté de passage de phosphore minéralisable dans le liquide extérieur.

Le produit ainsi obtenu contient de 96 à 98 % de la fraction insoluble A_1'.

A partir de 97.000 γ de phosphore d'une fraction A_1 supposée contenir 69 % de A_1', on obtient, après deux précipitations 52.500 γ de phosphore (91 % de A_1') et après les deux équilibrages, on obtient finalement 35.000 γ de phosphore, la pureté apparente étant égale à 98 % A_1' (fig. 5*a*, *b*, *c*).

L'obtention de la fraction A_1' à l'état sec a été faite par congélation de la solution du nucléate et évaporation de l'eau sous vide.

En effet, si à une solution aqueuse d'une fraction à 98 % en A_1', on ajoute un égal volume d'éthanol, le produit obtenu, après lavage à l'alcool et séchage sous vide est légèrement dégradé (environ 6 % de produits solubles). C'est pourquoi, après avoir remis le dernier culot en solution dans le minimum d'eau, on dialyse 24 heures contre de l'eau distillée à 4° C. La solution dialysée est congelée et évaporée sous vide. Le produit obtenu est rapidement soluble dans l'eau en donnant un *p*H acide de 3,5-4.

Si l'on désire un échantillon donnant à l'eau un *p*H moins acide, on met le dernier culot en solution dans un tampon phosphate *p*H 7 $\mu = 0{,}05$. On dialyse, congèle et sèche.

Il est indispensable d'utiliser un tampon. Le fait de remettre le culot en solution à *p*H 7 à l'aide de soude à 1 % même avec une forte agitation, ne permet pas d'obtenir un pourcentage en A_1' aussi élevé.

Le produit ainsi obtenu est extrêmement léger, parfaitement blanc, d'aspect floconneux et nacré et donne des solutions aqueuses de *p*H $\geqq 6$.

*
* *

Cette étude a été subsidiée par le Centre national de Biologie physico-chimique et par le Centre de Recherches pour la pénicilline et les autres antibiotiques.

Les électrophorèses ont été faites à l'aide de l'appareil mis à la disposition du laboratoire de chimie-physique par le Fonds national de la Recherche scientifique.

Nous tenons à remercier ces organismes pour leur appui, ainsi que l'I. R. S. I. A. pour l'octroi d'une bourse de spécialisation.

Université de Liège,
Laboratoire de chimie-physique
(Prof. V. Desreux.)

Communiqué à la Société chimique de Belgique, le 1er juillet 1950.