

no 2892C



UNIVERSITÉ DE LIÈGE  
FACULTÉ DES SCIENCES

---

ÉTUDE DE L'HÉTÉROGÉNÉITÉ  
DE  
L'ACIDE RIBONUCLÉIQUE DE LA LEVURE

---

Thèse présentée pour l'obtention du grade  
de  
Docteur en Sciences Chimiques  
*par J.-M. GHUYSEN*

---

Laboratoire de Chimie-Physique  
1951

391590 102892C

UNIVERSITE DE LIEGE  
Valorisation des minerais  
Génie nucléaire  
Professeur R. COLLÉ  
Institut de Chimie et Métallurgie  
2, rue A. Stévert  
LIÈGE-Belgique

UNIVERSITE DE LIEGE  
FACULTE DES SCIENCES

ETUDE DE L'HETEROGENEITE DE L'ACIDE  
RIBONUCLEIQUE DE LA LEVURE

Thèse présentée pour l'obtention du grade de  
Docteur en Sciences chimiques

par J.M. Ghuysen

Laboratoire de Chimie-Physique  
1951

EMC 111

30 NOV. 1990

Je prie Monsieur le Professeur DESREUX d'accepter mes plus sincères remerciements.

L'intérêt qu'il m'a témoigné, l'esprit d'entre-aide et de confiance qui règne en son laboratoire, m'ont été le meilleur stimulant au cours de la réalisation de ce travail.

Je tiens également à remercier l'I.R.S.I.A pour l'octroi de deux bourses de spécialisation.

P L A N.  
=====

	Page.
<u>INTRODUCTION:</u> =====	1.
<u>Position du problème - résumé du travail</u>	
 <u>CHAPITRE I.</u> =====	 15.
<u>Obtention et caractéristiques du matériel utilisé.</u>	
 <u>CHAPITRE II.</u> =====	 21.
<u>L'étude de la solubilité comme critère de pureté et méthode de fractionnement.</u>	
I. Courbes de solubilité du type Kunitz-Northrop.	22.
A. La loi des phases et son application comme critère de pureté.	22.
B. Etude de quelques cas théoriques de mélanges.	26.
C. Les solutions solides.	29.
D. Écarts à la loi de Raoult. Application aux polymères.	33.
II. Courbes de solubilité dans les solutions salines concentrées.	38.
A. L'effet de Salting-out.	38.
B. Application du salting-out comme critère de pureté	40.
III. Courbes de solubilité aux faibles forces ioniques.	43.
A. Les interactions protéine-ion.	43.
B. Application au fractionnement des protéines.	46.
 <u>CHAPITRE III.</u> =====	
<u>Etude de la solubilité du ribonucléate de soude de levure.</u>	49.
I. Introduction.	50
II. Etude du système solvant-précipitant de Chantrenne.	52.
A. Résultats expérimentaux.	52.
B. Conclusions.	54.
C. Inconvénients du précipitant de Chantrenne	57.
D. Remarques: écarts à la loi de Raoult.	58.

	Page.
III. Recherches de nouveaux systèmes solvant-précipitant	61.
A. Résultats expérimentaux.	61.
B. Conclusions.	64.
C. Influence du pH sur les conditions de fractionnement.	66.
D. Fractionnement de la fraction A <sub>1</sub> .	71.
IV. Conclusions.	75.
V. Techniques expérimentales.	77.
 CHAPITRE IV. =====	
<u>Fractionnement de l'acide ribonucléique.</u> <u>(extraction fractionnée).</u>	82.
I. Principe.	83.
II. Techniques expérimentales.	86.
III. Résultats expérimentaux.	88.
A. Extraction en système continu à pH 3,5.	88.
B. Extraction à pH 5,5.	92.
1° Extraction en système discontinu.	92.
2° Extraction en système continu.	94.
IV. Conclusions.	98.
 CHAPITRE V. =====	
<u>Polydispersité de l'acide ribonucléique.</u> <u>1re partie: poids moléculaire.</u> <u>(Diffusion Brownienne et vitesse de sédimentation)</u>	99.
I. Principes.	100.
A. Diffusion brownienne libre: D.	100.
1° Méthodes de calcul.	100.
2° Écarts aux courbes de Gauss.	102.
3° D en fonction des propriétés moléculaires.	105.
4° Conclusions.	105.
B. Diffusion brownienne et vitesse de sédimentation	107.
II. Techniques expérimentales.	110.
A. Constante de diffusion.	110.
B. Constante de sédimentation.	111.
C. Volume spécifique partiel apparent.	112.
III. Résultats expérimentaux et conclusions.	114.

CHAPITRE VI.

	Polydispersité de l'acide ribonucléique. (2ème partie: composition chimique. (chromatographie et électrotitration).	116.
I.	Résumé bibliographique.	117.
	A. Chromatographie sur papier.	117.
	B. Chromatographie sur échangeur <sup>u</sup> d'ions.	121.
II.	Techniques expérimentales.	123.
III.	Résultats expérimentaux.	126.
IV.	Etude électrotitrimétrique.	129.
	A. Principe.	129.
	B. Conditions expérimentales.	129.
	C. Tracé des courbes expérimentales.	131.
	D. Tracé des courbes théoriques.	132.
V.	Conclusions.	135.
	A. Fractions obtenues par extraction fractionnée à pH 5,5.	135.
	B. Fractions obtenues par précipitation fractionnée	138.
	C. Liaisons secondaires dans les fractions de haut poids moléculaire.	140.
	Appendice: valeurs de $\sum \alpha_i (c_i \times v)$ en fonction du pH.	143.
	<u>CONCLUSIONS GENERALES.</u>	145.

I  
II  
III  
VI  
V  
A  
ROYAL

INTRODUCTION.  
=====

L'obtention d'un acide pentose-nucléique pur et non dégradé, en particulier celui de la levure, a été tenté par de nombreux auteurs, en outre par Chantrenne (1)

Ce chercheur se basant essentiellement sur les courbes de solubilité avait cru montrer que ~~des~~ échantillons d'acide ribonucléique de la levure étaient homogènes.

Au cours de notre travail de licence, nous avons pensé avoir confirmé partiellement ce résultat, mais il nous était apparu clairement que les courbes de solubilité devaient être interprétées avec beaucoup de prudence, surtout dans la région des faibles quantités de phase solide. C'est d'ailleurs cette région, comme nous le rappellerons dans la suite, qui expérimentalement est la plus difficile à obtenir mais qui aussi théoriquement est la plus importante.

Nous avons donc repris ce travail, utilisant cette fois plusieurs techniques physico-chimiques et nous aidant également de l'analyse chimique.

Les analyses complètes portant sur l'homogénéité chimique et physique des acides nucléiques n'ont jusqu'à ce jour jamais été faites. Les tests de pureté renseignés par la grande majorité des auteurs portent uniquement sur la présence éventuelle de substances étrangères ; parmi ces tests nous pouvons mentionner les plus courants :

- 1) la réaction du biuret et le dosage P/N permettant la recherche des protéines.
- 2) la limpidité des solutions aqueuses contenant 4% d'alcool utilisée dans le même but.
- 3) la réaction à la diphénylamine (2) pour la recherche de l'acide désoxyribonucléique.
- 4) l'unicité du "pic" obtenu à l'électrophorèse et à l'ultra-centrifuge analytique est utilisée depuis quelques années pour la recherche de toute substance étrangère en général.

Il est impossible de décider à partir de résultats analytiques semblables si le matériel est une substance pure ou un mélange. Cette difficulté se retrouve dans toute étude de substances biologiques macromoléculaires telles que les enzymes et les protéines.

Quelques auteurs ont tenté de déterminer une éventuelle hétérogénéité en comparant les constantes de diffusion calculées

par la méthode "air-hauteur maximum" et la méthode des moments, ou encore, en comparant d'une façon purement qualitative la constante de diffusion et la vitesse d'aplatissement du pic à l'ultracentrifuge.

Malheureusement les résultats que l'on peut ainsi obtenir sont très limités, parce que ces essais étaient probablement effectués sur des échantillons très polydispersés.

Les résultats extrêmement divergents renseignés dans la littérature sur les propriétés physico-chimiques des acides ribonucléiques (poids moléculaire, assymétrie, viscosité, charge électrique) montrent clairement d'ailleurs que les expériences ont été réalisées à partir d'échantillons qui devaient être différents alors que les tests généraux de pureté présentés par la plupart de ceux-ci étaient concordants.

Le nombre de publications relatives à la composition chimique des acides nucléiques en général croît cependant d'année en année, alors que presque tous les auteurs ignorent les caractéristiques macromoléculaires des échantillons qu'ils soumettent à l'analyse.

Il était donc urgent qu'une étude fut entreprise concernant les méthodes éventuelles qui permettraient de caractériser la nature et le degré d'une éventuelle hétérogénéité des acides nucléiques.

189

Le travail que nous avons donc entrepris a eu pour premier objet l'étude de la solubilité de l'acide ribonucléique obtenu à partir de la levure par la méthode classique d'extraction à la soude.

Ainsi que nous le démontrons en détail dans les chapitres suivants nous avons pu montrer que les divers échantillons examinés se caractérisent par une hétérogénéité continue. Le tracé des courbes de solubilité lui-même de même que l'analyse de la composition des phases solide et solution révèlent que cette hétérogénéité continue est due à un mélange présentant les propriétés caractéristiques des solutions solides. De plus, une étude plus poussée nous a permis de mettre en évidence des écarts importants de la loi de Raoult, écarts qui se manifestent par une augmentation de la solubilité des composants les moins solubles lorsqu'ils sont en présence des composants les plus solubles.

L'intensité de cet effet dépend du pH et semble diminuer lorsque le pH diminue. Ces différentes caractéristiques de solubilité ont été mises en évidence pour un grand nombre de solvant-précipitant, de pH, de force ionique et de constante diélectrique variables.

Grâce aux résultats ainsi obtenus, nous avons pu discuter sur des bases plus solides, les conditions expérimentales

susceptibles de conduire à un fractionnement rentable et nous avons pu montrer que la meilleure méthode de préparation consiste à équilibrer un grand nombre de fois une grande quantité de phase solide et un faible volume de phase liquide dont le pouvoir dissolvant est judicieusement augmenté après chaque série d'équilibrages.

L'application de cette technique nous a permis d'obtenir dix fractions. L'étude physico-chimique de ces fractions faite par diffusion et ultracentrifugation a montré que le poids moléculaire variait suivant une courbe continue de 7000 à 46.600. Au contraire, la composition chimique moyenne de ces fractions déterminée par analyse chromatographique des produits d'hydrolyse et vérifiée par électrotitration était indépendante du poids moléculaire. La composition moyenne ramenée par 4 atomes de phosphore est la suivante :

adénine : 1,07 môle

guanine : 1,20 môle

cytosine : 0,82 môle

uracile : 0,96 môle

OH phosphorique secondaire : 0,50 équivalent

Le principal résultat du présent travail est donc de montrer comment on peut fractionner l'acide ribonucléique extrait

par la soude à partir de la levure, que cet acide se caractérise par une hétérogénéité continue présentant les propriétés des solutions solides avec des écarts importants à la loi de Raoult. Cette hétérogénéité est fonction du poids moléculaire mais non de la composition chimique.

Secondairement d'autres résultats ont été obtenus. Nous avons constaté que l'emploi, lors du fractionnement, de différents systèmes solvant-précipitant relativement riches en liquide organique (acétone-méthanol) et de pH inférieur à 5,5, conduit à l'obtention de fractions fortement dégradées et présentant une composition chimique moyenne tout à fait différente. Ce résultat nous permet de postuler -ainsi que Chargaff l'a fait pour les acides désoxyribonucléiques- une distribution non statistique des différentes bases dans la chaîne polynucléotidique. Il s'en suit que l'on peut admettre la présence éventuelle d'un grand nombre d'isomères de poids moléculaire et de composition chimique moyenne identiques.

De plus, les fractions de poids moléculaire élevé présentent une instabilité remarquable. Le simple fait d'amener à 25° leur solution aqueuse à pH 3,5 provoque une importante dépolymérisation.

En exposant notre plan de travail nous avons pensé qu'il était préférable de résumer par la même occasion l'ensemble des résultats que nous avons obtenus et cela avant de discuter en général le problème de l'isolement des acides nucléiques et de décrire les expériences qui ont été faites.

La bibliographie relative aux acides nucléiques est en effet extrêmement confuse et la lecture d'un tel exposé serait fastidieuse. Tenant compte de nos résultats, il nous est plus aisé de faire un exposé critique des méthodes d'isolement de ces substances.

Tout procédé d'extraction comporte trois opérations fondamentales : l'obtention de la nucléoprotéine à l'état libre, la scission du complexe protéine-acide nucléique, la purification de l'acide.

Il est essentiel que l'isolement final d'un acide ribonucléique se fasse suivant un procédé excluant toute dégradation par voie enzymatique, physique ou chimique.

Comme jusqu'à présent personne n'a encore obtenu avec certitude un acide ribonucléique dans un état identique ou proche

à l'état natif, il est impossible de décider si une préparation a subi une dégradation par un ou plusieurs de ces mécanismes. D'autre part, il n'existe pas de méthode générale de préparation et il semble que chaque source d'acide ribonucléique présente un problème particulier. La résolution de celui-ci dépend de plusieurs facteurs :

a) L'état de liberté de la ribonucléoprotéine.

La ribonucléoprotéine peut parfois être obtenue directement dans un état de grande pureté, comme c'est le cas pour le virus de la mosaïque du tabac. Ce virus est en effet constitué par une ribonucléoprotéine dont 5 à 6% est un acide ribonucléique (3). Mais le plus souvent les ribonucléoprotéines font partie d'une entité cellulaire, soit à l'état libre dans le protoplasme, soit combinées à un phospholipide comme particules distinctes du cytoplasme. Enfin les bactéries sont également une source importante d'acide ribonucléique. Dans ces deux derniers cas l'éclatement des membranes devra être réalisé soit par broyage mécanique, congélation, action des ultra-sons, osmose, etc...

b) La nature de la liaison protéine-acide nucléique.

Le complexe protéine-acide nucléique une fois isolé doit être scindé. Il est possible que ce complexe se présente sous la forme d'un nucléate de protéine aisément séparable par électro-

phorèse dans des conditions bien déterminées de force ionique et de pH. Cette espèce d'association a été clairement étudiée par Longworth et Mac Innes (4) à partir d'un mélange synthétique d'acide ribonucléique et d'ovalbumine.

L'association protéine-acide ribonucléique est parfois tellement labile que la séparation peut se faire, comme l'ont montré Markham, Matthews et Smith à partir du virus de la mosaïque du navet, par une centrifugation à grande vitesse (5).

Toutefois, les acides nucléiques doivent le plus souvent être considérés comme un véritable groupement prosthétique dont la nature de la liaison avec la protéine reste encore inconnue.

Dans ce cas de nombreux procédés de séparation ont été proposés : la digestion enzymatique (trypsine-nucléophosphatase (6) la dénaturation thermique (7) ou à l'alcool ou par l'action des détergents, la concentration de la protéine à une interface (8) l'action de NaCl à demi saturé (9) la précipitation des protéines au point isoélectrique. Parfois aucune de ces nombreuses méthodes ne donnent de résultat et il est nécessaire -dans l'état actuel de nos connaissances- de recourir à une hydrolyse par la soude à froid, voire même à chaud.

c) Dégradation enzymatique.

La digestion enzymatique de l'acide ribonucléique est un fait connu depuis très longtemps. Parmi les nombreuses phosphatases susceptibles de réaliser cette digestion, la ribonucléase est celle qui présente la plus forte activité (10) Kunitz signale qu'à pH 8, <sup>une</sup> ~~la~~ partie de ribonucléase par 2000 parties de substrat solubilise après 10 minutes à 25°C, 73 % du phosphore total.

Or, lors de l'extraction on peut obtenir en solution l'acide ribonucléique et les nucléases correspondantes.

La ribonucléase est très stable à des températures inférieures à 25°C ; le pH de stabilité maximum est compris entre 2 et 4,5 et celui d'activité maximum se situe aux environs de 7,7.

La dénaturation de ce ferment s'opère graduellement par la chaleur à 100°C surtout à des pH supérieurs à 4,5 ou par l'action des alcalis à pH 12 ou plus élevé.

On voit que cette nucléase ne peut être inactivée thermiquement ou par pH que dans les conditions où probablement l'acide ribonucléique se dégrade. Comme, rappelons le une fois de plus, l'isolement d'un acide ribonucléique non dégradé n'a pas été réalisé, il est encore impossible de définir ces conditions.

D'autre part, la dénaturation de la ribonucléase par l'action

des détergents a été envisagée ; mais à nouveau quelle est l'action de ces détergents sur l'acide nucléique natif ?

On sait que la pepsine de son côté digère rapidement la ribonucléase en milieu acide. Il serait peut être possible de trouver d'autres protéinases agissant à un pH où l'acide ribonucléique est stable. On pourrait également soustraire l'acide à l'action de la ribonucléase en se basant sur les propriétés antigéniques de cet enzyme (11) ou sous la formation de composés insolubles et inactifs de celle-ci avec certaines substances comme c'est le cas avec le virus de la mosaïque du tabac (12) ou encore en trouvant un inhibiteur spécifique susceptible d'agir dans les conditions de stabilité de l'enzyme. Malgré toute l'importance de ce problème, aucune recherche systématique portant sur l'inactivation ou l'inhibition certaine de ce ferment n'a encore été réalisée (x)

(x) Il est signalé qu'une étude en vue d'inhiber la désoxyribonucléase lors de l'extraction de l'acide désoxyribonucléique a été entreprise par Mac Carty (13) L'auteur propose de réaliser l'extraction en présence d'ions citrate qui complexent légèrement les ions  $Mg^{++}$  nécessaires à l'activation de cette nucléase. Il a cependant été reconnu plus tard que cette inhibition est loin d'être complète.

De ce qui précède on comprend tout l'intérêt que présenterait une technique permettant l'isolement de l'acide nucléique sous la forme d'un complexe inattaqué par la nucléase et la décomposition ultérieure de celui-ci en l'absence de nucléase, par une méthode adéquate.

d) Présence éventuelle de désoxyribonucléine.

Il peut se faire que la source utilisée contienne les deux types d'acide. Dans ce cas l'obtention d'acide ribonucléique pur peut se faire en le séparant de l'acide désoxyribonucléique grâce, par exemple, à la différence remarquable de solubilité que présentent les nucléines respectives dans des solutions de NaCl de force ionique variable (14) (15) (16) (17) (18)

On peut également se débarrasser de l'acide désoxyribonucléique par action de la désoxyribonucléase.

La désoxyribonucléase du pancréas du boeuf est bien connue.

Selon Chargaff il a été trouvé récemment que la levure renfermait également une désoxypentose nucléase ; mais que cette enzyme -dans l'extrait frais obtenu des cellules- était presque complètement inhibée par la présence d'un inhibiteur protéinique. Cet inhibiteur présente une spécificité remarquable car il inhibe uniquement la désoxypentose nucléase de la levure et non celle de source différente comme celle du pancréas.

Au contraire la désoxypentose-5-phosphatase de levure dépolymérise l'acide ribonucléique de n'importe quelle origine. C'est un bel exemple de spécificité d'inhibiteur mais non de substrat(19)

Il ressort de ce qui précède que l'obtention d'acide ribonucléique pur et proche de l'état natif constitue un problème extrêmement ardu et nous ne nous étions pas rendus compte en débutant ce travail de la complexité de ce problème parce que trop de caractéristiques des acides nucléiques nous étaient inconnues. Nous avons déjà signalé les caractères contradictoires et touffus de la bibliographie sur les acides nucléiques. On comprend aisément que les propriétés chimiques et physico-chimiques varient considérablement suivant la source dont les acides sont extraits et les méthodes d'extraction et de purification employées.

L'ensemble de ces considérations situe donc notre travail dans l'état actuel de nos connaissances sur les acides pentose-nucléiques.

CHAPITRE I.

OBTENTION ET CARACTERISTIQUE DU  
MATERIEL ANALYTIQUE UTILISE.

L'extraction de l'acide ribonucléique de la levure présente de nombreuses difficultés. Celles-ci résident, comme nous l'avons signalé dans l'introduction, d'une part dans l'extraction de la ribonucléoprotéine étant donné la grande résistance des membranes cellulaires, et, d'autre part dans la séparation protéine-acide nucléique dont la liaison est ici particulièrement solide.

Notre but de travail n'était pas à l'origine de rechercher une nouvelle technique d'extraction. En effet, les répercussions des différentes méthodes de séparation susceptibles d'être employées étaient au début de ce travail imprévisibles et incontrôlables.

Nous avons donc employé la méthode classique de Johnson et Harkins (21) modifiée légèrement par Chantrenne (22) et plus récemment par Junger et Allgén (23).

En principe, l'extraction de la ribonucléoprotéine et la scission de celle-ci sont réalisées dans un premier temps par action de la soude à 3 % à 0°C pendant 60 minutes. Le ribonucléate est ensuite débarrassé des substances étrangères par une série de précipitations opérées à pH acide.

Nous donnons uniquement pour mémoire les techniques de préparation et de purification utilisées. Il a été en effet établi par la suite que ce procédé exerçait une action dégradante.

### I.- Isolement de l'acide nucléique brut déprotéiné.

Nous rappelons le principe de la méthode adoptée par Chantrenne. Après extraction de l'acide de la 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.

Nous avons constaté que, si après neutralisation à l'acide acétique, on précipite le nucléate par l'éthanol directement à un pH voisin de 6, on entraîne une substance étrangère de mobilité presque nulle ainsi que le démontre la figure électrophorétique 1 a obtenue à partir d'une solution tamponnée à pH 3,5.

On peut éliminer cette substance par une série de précipitations à pH 4,2, ou, comme nous l'avons reconnu plus tard, par une précipitation à l'aide du milieu : alcool méthylique 20 % - pH 3,5- $\mu$  1,7. Nous avons ainsi utilisé 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 fraîche est mis en suspension dans 6 litres de soude à 3% refroidi à 0°C pendant 60 minutes sous agi-

tation (x)Après centrifugation, le liquide surnageant est amené à pH 4,2 par de l'acide acétique, et 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 pH vers 2 par addition de HCl à 10%, et on 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 pH de 5,5. La solution opalescente est ramenée à pH 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 pH 4,2 est filtrée et le nucléate est à nouveau précipité à pH 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 la figure électrophorétique 1 b et ne contient plus qu'une faible proportion de la substance étrangère ( rendement : 7 grs de nucléate brut à partir d'un kilo de levure) .

(x) L. Delcambe (24) 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 insoluble dans ce précipitant. La figure 16 a du chapitre suivant obtenue à l'aide du précipitant "  $\text{CH}_3\text{OH}$  20%- pH 3,5- $\mu$  1,7 " nous montre également que pour une quantité de phosphore 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.

Contrôle électrophorétique de l'obtention d'un nucléate  
brut débarrassé de substances étrangères. \_\_\_\_\_

PH 3,5

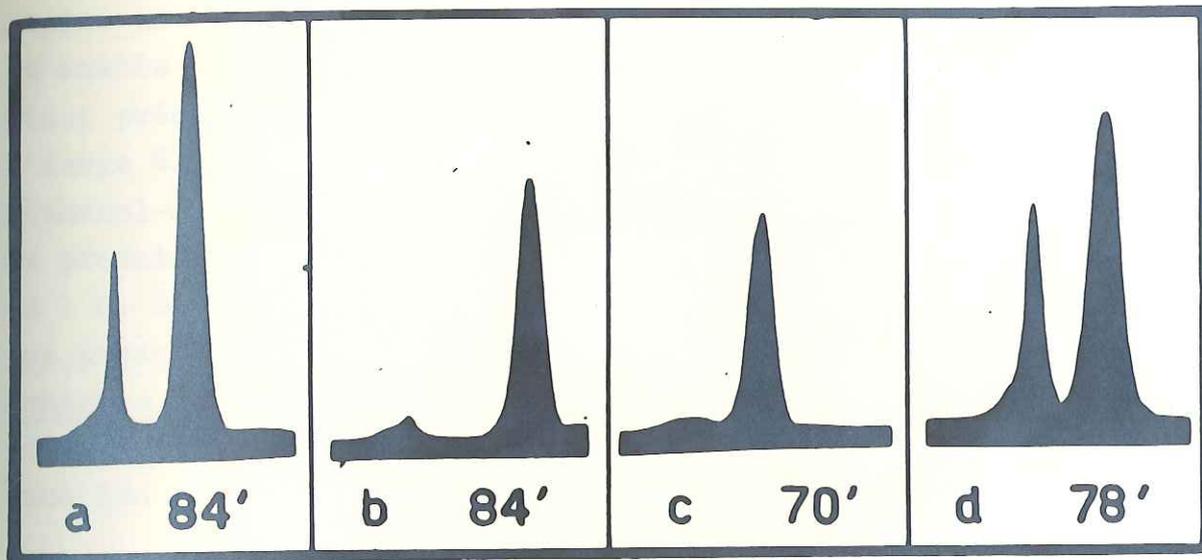


fig. 1

PH 7

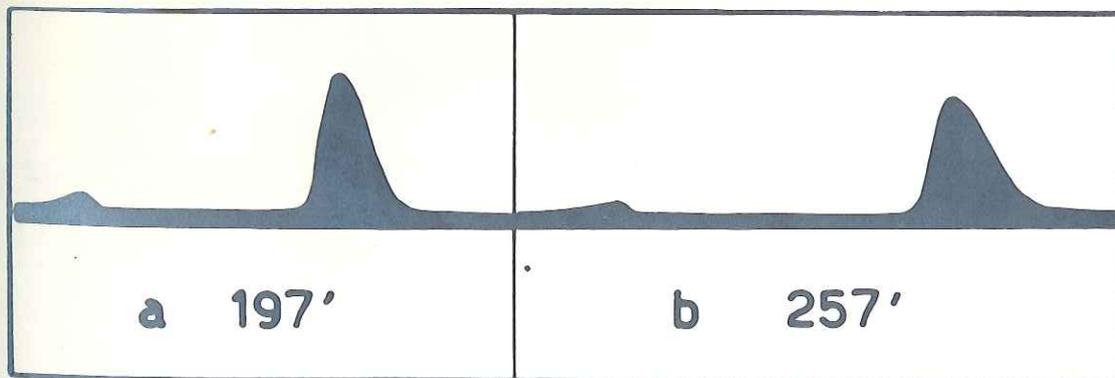


fig. 2

2) On peut également éliminer la substance étrangère de la façon suivante : après précipitation de l'acide nucléique par HCl-éthanol, l'acide est dissous à l'aide de soude à 1% comme indiqué plus haut. Un volume de cette solution filtrée et contenant de 1500 à 2000  $\gamma$  de phosphore/cm<sup>3</sup> est ajouté à 4 volumes de précipitant " CH<sub>3</sub>OH 20% - pH 3,5-  $\mu$  1,7 " dont la préparation est donnée page 48. Après floculation à 0°C, le précipité est dissous dans le minimum d'eau. A la solution filtrée et amenée à pH 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 1 c, et celle du produit obtenu par précipitation de la solution surnageante en 1 d. On constate que l'élimination de la substance étrangère est presque complète en une seule opération.

Remarque : Les électrophorèses ont été réalisées dans un appareil Tiselius équipé du système optique Tiselius-Longsworth dans les conditions suivantes :

temps de dialyse à 4°C : 48 heures

température : 0,3°C

pH 3,5 : tampon HAc - NaAc

force ionique :  $\mu$  0,05 en NaAc + 0,15 en NaCl

dissipation calorifique :  $\frac{i}{\chi \rho^2} < 0,09$  watt/cm<sup>3</sup> (x)

gradient de potentiel :  $\frac{i}{\chi \rho} = 3$  volts/cm<sup>3</sup><sup>1</sup>

temps de migration : 84' (1a), 84' (1b), 70' (1c)  
78' (1d)

(x)  $i$  = intensité en ampère ;  $\chi$  = conductivité en ohm.cm<sup>-1</sup> ;  
 $\rho$  = section de la cellule : 0,75 cm<sup>2</sup>

## II.- Tests de pureté des échantillons bruts déprotéinés.

- 1) Réaction au biuret et à la diphénylamine : négatif.
- 2) Rapport P/N = 0,56. Ce rapport est légèrement inférieur au rapport théorique d'un polynucléotide où les 4 bases se trouveraient en quantité statistiquement égale ( 0,59 ).
- 3) Les figures électrophorétiques lb et lc obtenues après un temps de migration de 84' et 70' montrent qu'à pH 3,5,  $\mu$  0,20, l'acide ribonucléique se présente comme une substance électrochimiquement homogène. Toutefois, si l'électrophorèse est maintenue pendant un temps beaucoup plus considérable et surtout si le pH est amené vers 7, le pic, tout en restant unique, devient nettement asymétrique. C'est ce que montrent les figures 2 a et b obtenues à partir de l'échantillon relatif à la figure lb dans les conditions électrophorétiques suivantes :

pH 7 : tampon  $H_3PO_4$  + NaOH : 0,05  $\mu$  + NaCl 0,15  $\mu$   
dissipation calorifique : 0,094 watt/cm<sup>3</sup>  
gradient de potentiel : 3,06 vol s/cm<sup>-1</sup>  
temps d'électrophorèse : 197' et 257'

- 4) Comportement à l'ultracentrifuge : Comme le montre la figure 3, le même échantillon, examiné à l'ultracentrifuge Spinco équipée du système optique Svensson-Philpot, ne donne qu'un pic unique et légèrement asymétrique dans les conditions expérimentales suivantes : tampon pH 5,5 : acétate Na-HAc ;  $\mu$  0,10 ; température 26°7 ; vitesse de centrifugation ; 59.780 r.p.m. ;

Homogénéité à l'Ultracentrifuge

pH 5,5

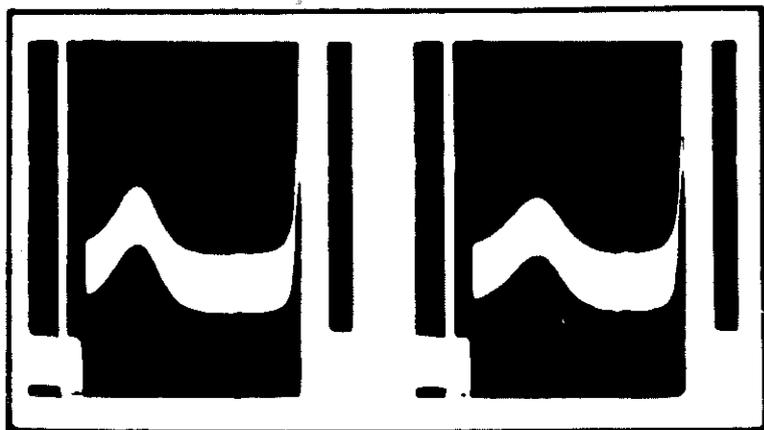
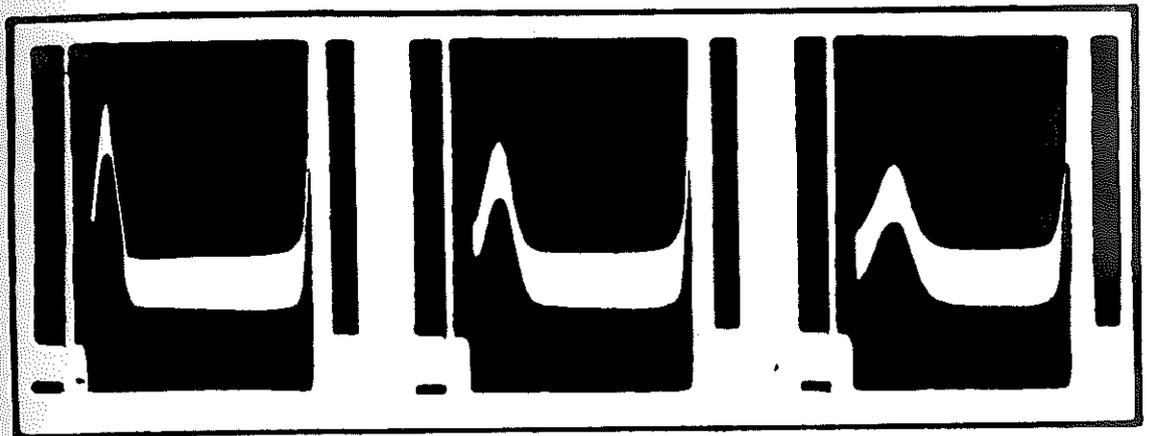


fig 3

temps écoulé entre la première et la cinquième photo : 4 x 16 minutes.

Appendice.

Nous avons également utilisé pour l'étude qui suit un échantillon commercial de ribonucléate sodique de levure fourni par Fédéra. Cet échantillon répondait aux exigences du Codex français et présentait les mêmes tests de pureté que ceux renseignés ci haut.

CHAPITRE II.

L'ETUDE DE LA SOLUBILITE COMME CRITERE DE  
PURETE ET METHODE DE FRACTIONNEMENT.

## I. Courbes de solubilité du type Kunitz-Northrop (25-26-27-28-29).

### A. La loi des phases et son application comme critère de pureté.

Rappelons que dans un système en équilibre, la loi des phases de Gibbs est habituellement représentée par la relation:

$$F = C - P + 2 \quad \text{où}$$

P: est le nombre de phases, c'est-à-dire les parties d'un système, homogènes, physiquement distinctes et mécaniquement séparables.

C: est le nombre de composants, c'est-à-dire le nombre minimum de constituants indépendants par lesquels la composition de chaque phase participant à l'état d'équilibre peut être exprimée sous la forme d'une équation chimique.

F: est le degré de liberté ou la variance, c'est-à-dire le nombre de facteurs variables - température, pression, concentration de chaque composant - qui doivent être fixés afin de définir complètement la condition du système à l'équilibre.

Cette relation n'est cependant vraie qu'en admettant que l'équilibre entre les phases du système n'est pas sous l'influence d'un champ gravitationnel, ou électrique ou magnétique, mais seulement de la température, la pression et la concentration des composants.

On néglige également d'autres variables éventuelles telles que la tension superficielle et le diamètre moléculaire (voir plus loin).

La loi des phases de Gibbs est couramment appliquée comme test classique de pureté en chimie organique sous la forme de détermination de point de fusion ou d'ébullition. Ces critères ne sont pas applicables à beaucoup de composés biologiques et peuvent être remplacés par la détermination de la solubilité.

Le point de fusion et la solubilité d'un solide cristallin sont reliés l'un à l'autre de la façon suivante:

Soit un éristal en équilibre avec sa solution. Nous avons l'équation:

$$\Delta H = H_{\text{dissout}} - H_{\text{non dissout}} = TS_{\text{dissout}} - TS_{\text{non dissout}} = T\Delta S$$

Comme pour une solution idéale, l'entropie partielle de mixtion s'exprime par  $\Delta S = -R \ln N$  où  $N$  représente la fraction molaire du solide dans la solution saturée, on peut écrire

$$\Delta H = -RT \ln N.$$

Or, pour un solide cristallin, la chaleur de solution est égale à la somme de la chaleur de fusion  $\Delta H_f$  et de la chaleur de mixtion  $\Delta H_m$ . Pour une solution idéale  $\Delta H_m = 0$ .

Par conséquent,  $\Delta H_f = -RT \ln N$ . et

$$N = e^{-\frac{\Delta H_f}{RT}} \text{ ou } \ln N = -\frac{\Delta H_f}{R} \cdot \frac{T - T_f}{T \cdot T_f}$$

ou  $T_f$  représente la température de fusion.

Ces équations furent vérifiées à partir de plusieurs systèmes;

citons par exemple le système naphthalène-benzène.

C'est sur ces considérations que l'on a basé la technique des courbes de solubilité comme test d'homogénéité.

Cette technique repose sur le principe suivant:

Soit une substance A en présence d'eau, de sel, d'acide et d'alcool. Le nombre de composants du système est 5. Supposons que le système se présente comme une solution homogène. Le nombre de phases est 1. Par application de la loi de Gibbs, on trouvera que la variance d'un tel système est 6. Mais si la concentration en sel, en acide et en alcool, de même que la température et la pression sont maintenues constantes, le nombre de variable est diminué de 5, et le système est univariant. Supposons au contraire que la concentration en A soit telle qu'une phase solide apparaisse on trouvera aisément que dans les mêmes conditions, le système est devenu invariant.

Il s'ensuit donc que, si l'on ajoute des quantités croissantes d'un cristal homogène à un système solvant-précipitant dont la composition est maintenue constante à température et pression constantes, la quantité de substance dissoute ira en augmentant jusqu'à apparition d'une seconde phase. A partir de ce moment, la solubilité reste constante en fonction de la quantité de phase

solide.

Remarquons que le choix du système solvant-précipitant est très important. Il faut en effet que, après apparition de la phase solide, celle-ci ne contienne aucun des composants supposés constants (eau-sel-acide-alcool). Dans l'un de ces cas, le nombre de variables serait supérieur à 1 et le nombre de phase restant égal à 2, le système serait au moins univariant.

Le gonflement de la phase solide - caractéristiques des polymères amorphes (voir plus loin) - peut aussi se présenter dans le cas de substances cristallisées. L'analyse aux R-X a permis de mettre en évidence deux types de gonflements différents, soit par pénétration du liquide entre les cristallites (gonflement<sup>s</sup> intermicellaire), soit dans les cristallites elles-mêmes (gonflement intramicellaire). En négligeant cette possibilité, une substance homogène pourrait anormalement présenter une solubilité croissante en fonction de la quantité de phase solide.

Par ailleurs, une combinaison entre le substance à analyser et un des composants du système solvant-précipitant (sel ou acide par exemple) ne donnera pas naissance à un nouveau composant dans le sens de la loi des phases, car sa composition peut être complètement spécifiée par la quantité de substance originale et de sel ou d'acide qu'il contient.

Remarquons enfin que la dimension des cristallites joue un rôle important dans la solubilité. Ostwald et Freundlich ont établi une relation quantitative suivant laquelle la solubilité dépend de la dimension des cristallites et de la tension superficielle à l'interface solide-liquide. Ils montrent ainsi que la solubilité d'une substance homogène n'est indépendante de la phase solide que si celle-ci présente un seul type bien défini de cristallites. (30)

### B. Etude de quelques cas théoriques de mélange.

Le tracé des diagrammes de solubilité se fait en portant sur un graphique la concentration du corps dissout en fonction de la concentration totale. Supposons que la même échelle soit prise en abscisse et en ordonnée.

1. Une seule substance A. Le point représentatif du système suit d'abord la bissectrice de l'angle formé par les coordonnées. Dès que la phase solide apparaît, on obtient une droite, parallèle à l'abscisse et dont l'extrapolation sur l'ordonnée donne la solubilité de la substance.

2. Deux substances A et B. Soit A la substance la moins soluble

B la substance la plus soluble

$$F = \frac{\text{concentration molaire de B}}{\text{concentration molaire de A}} = \frac{B}{A}$$

(X) Les solubilités sont également exprimées en nombre de moles  $c = \frac{\text{solubilité de B}}{\text{solubilité de A}}$  (X)

En admettant que la loi de Raoult est respectée - c'est-à-dire que la solubilité d'un composant est indépendante de la présence de l'autre - on peut démontrer en se basant sur la loi des phases que si  $F = C$  le mélange se comporte comme un corps unique.

$F < C$  le point représentatif suit d'abord la bissectrice de l'angle jusqu'à apparition d'une première phase solide A pur. Le point parcourt ensuite un segment de droite représentant la zone de précipitation de la substance A pur. L'inclinaison de ce segment donne le % de B présent dans le mélange et son extrapolation sur l'ordonnée donne la solubilité de A. Enfin, pour une certaine valeur d'abscisse, B commence également à précipiter. Dès l'apparition de cette seconde phase solide, le point suit une droite parallèle à l'abscisse dont la valeur sur l'ordonnée donne la somme des solubilités de A et de B.

$F > c$ : le tracé complet de la courbe de solubilité est similaire et présente également deux angles de cassure. Toutefois, le premier représente le début de la précipitation de B et le second celui de A. le segment de droite compris entre ces deux cassures représente donc la zone de précipitation de B pur. Son extrapolation donne la solubilité de B et son inclinaison le % de A. Par contre, la valeur sur l'ordonnée du segment de droite parallèle à l'abscisse donne toujours la somme des solubilités

de A et de B.

On distinguera donc le premier cas du second au fait que l'extrapolation du segment compris entre les 2 cassures donne la solubilité la plus faible.

3. Trois ou plusieurs substances: on peut traiter de façon semblable des cas de plus en plus compliqués. On verra que la courbe présente autant de cassures qu'il y a de substances différentes dans le mélange.

Conclusion: Une solubilité indépendante de la quantité de phase solide depuis la première apparition d'un trouble se rencontre donc dans les cas suivants: a) une substance homogène (la phase solide est unique);

b) un mélange de deux ou plusieurs substances présentes dans des quantités proportionnelles à leur solubilité (la phase solide est en réalité double ou multiple). On pourra distinguer ces deux cas en se basant sur le fait qu'un changement de  $p_H$  ou de concentration saline ou de % d'alcool etc.. n'affectera pas également la solubilité des deux ou diverses substances. Il s'ensuit que l'établissement du critère de pureté d'une substance nécessite non seulement l'établissement d'un diagramme de solubilité complet couvrant la zone précédant et suivant le point d'apparition de la phase solide, mais également la vérification de la constante de solubilité éventuelle dans

Types généraux de courbe de solubilité

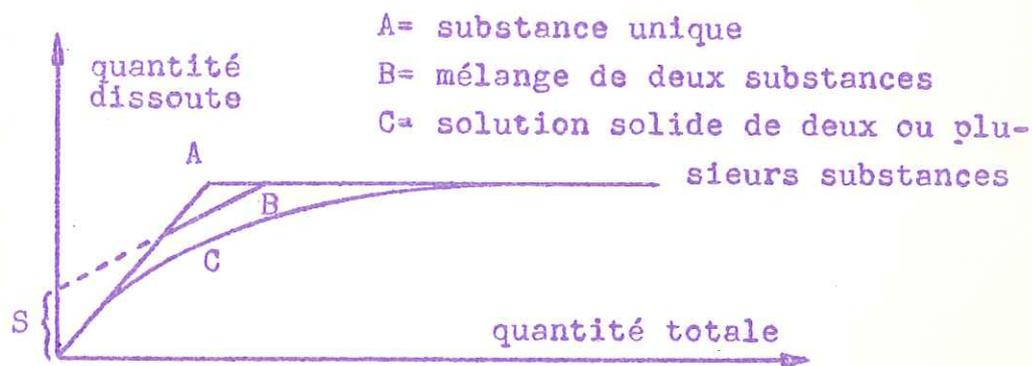


fig. 4

Rendement maximum d'un fractionnement de deux substances formant une solution solide

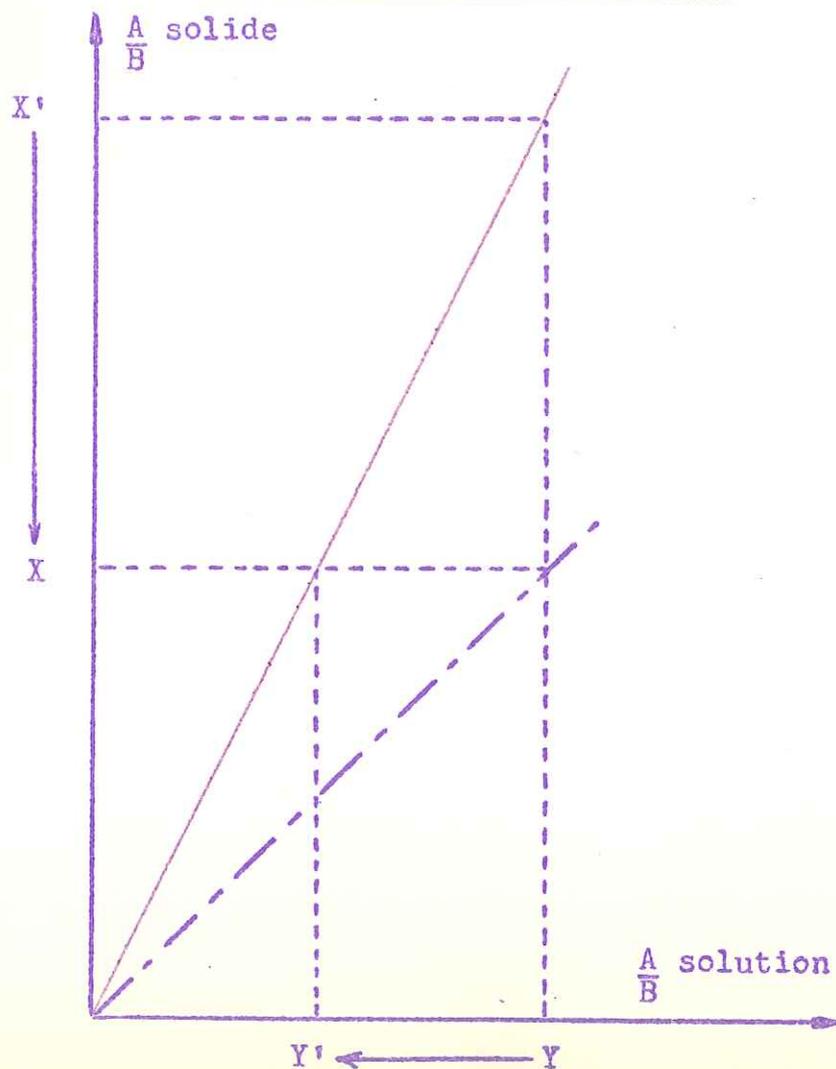


fig. 5

des systèmes solvant-précipitant de composition variable. Nous allons voir que cette précaution est également motivée par un troisième cas d'homogénéité apparente que peuvent présenter les solutions solides de deux ou plusieurs substances de même solubilité.

### C. Les solutions solides.

Deux ou plusieurs substances solides forment une solution solide lorsqu'elles sont miscibles en une phase unique. Si l'on ajoute des quantités croissantes d'un tel mélange à un système solvant-précipitant déterminé, le premier trouble qui apparaît est constitué d'une phase solide unique. On voit que, par application de la règle des phases, ce système est au moins univariant. La solubilité varie donc en fonction de la quantité de phase solide.

Aucune information sur la nature et l'importance de cette variation ne peut cependant être obtenue par application de la règle de Gibbs. Par contre, ce problème, comme l'ont fait remarquer Van't Hoff et Nernst, est analogue à celui de la pression de vapeur d'un mélange de deux ou plusieurs liquides miscibles. Dans le cas de liquides formant une solution idéale, la loi de Raoult exprime que la pression de vapeur partielle de l'un des constituants est égale à la fraction molaire de ce constituant dans le mélange multiplié par

sa pression de vapeur à l'état pur.

Supposons la loi de Raoult applicable aux solutions solides, et imaginons à nouveau que par addition, à un système solvant-précipitant donné, d'une certaine quantité d'un mélange de plusieurs substances susceptibles de former une solution solide, il apparaisse une séparation de phase. La solubilité (pression de vapeur) d'un des constituants sera égale à sa solubilité à l'état pur multipliée par la fraction molaire de ce constituant dans la phase solide en équilibre avec la solution.

A partir de cette hypothèse, Northrop et Kunitz ont calculé la forme de la courbe de solubilité dans le cas de deux substances dont on connaît les solubilités et proportions relatives. Ils montrent que depuis l'instant où la première trace <sup>de phase</sup> solide apparaît jusqu'au moment où la quantité de phase solide est très élevée par rapport à la quantité de substance dissoute:

- a) le rapport  $\frac{A}{B}$  dans la solution initialement égal à  $\frac{1}{F}$  tend vers  $\frac{1}{F \times c}$
- b) le rapport  $\frac{A}{B}$  dans le solide initialement égal à  $\frac{1 \times c}{F}$  tend vers  $\frac{1}{F}$ .
- c) le rapport  $\frac{A}{B}$  (solution) divisé par le rapport  $\frac{A}{B}$  (solide) est toujours égal à  $\frac{1}{c}$ .
- d) la solubilité totale S (somme des moles de A et B dissoutes)

initialement égale à  $S = a \frac{C(1+F)}{C+F}$  tend asymptotiquement vers

$$S = a \frac{1 + Fc}{1 + F};$$

a étant la solubilité du corps pur le moins soluble A exprimée en mols.

e) si  $c = 1$ , la solution solide se comporte comme une substance pure.

### Conclusions.

- a) La courbe totale de solubilité ressemble donc à celle d'un mélange, mais il n'y aura qu'une seule cassure correspondant à l'apparition de la phase solide. A partir de ce moment, la pente diminue au fur et à mesure que la quantité de phase solide augmente et approche asymptotiquement de zéro.
- b) on peut constater que les solubilités du point d'apparition de la phase solide et de celui où la pente de la courbe est pratiquement égale à zéro, sont -pour une valeur donnée de  $c$ - fonction de  $F$ . Quand donc- au cours d'un fractionnement - le mélange solide s'enrichit en molécules peu solubles, les solubilités de ces deux points diminuent et tendent l'un et l'autre vers la valeur de  $a$ . La courbe est donc comprise entre celle des deux substances pures A et B, et se rapproche de l'une ou de l'autre suivant que  $F$  varie de 0 à l'infini.

Il est également à remarquer que le point d'apparition de la phase solide ne représente pas la solubilité du solide initial, mais la solubilité d'un solide en équilibre avec la solution ayant la même composition que le solide original.

c) La rentabilité d'un fractionnement est fonction de  $C$ .

En effet, la phase solide en son point d'apparition est  $C$  fois plus riche en molécules les moins solubles que le matériel original. Lorsque la quantité de phase solide est énorme, la solution est  $C$  fois plus riche en molécules les plus solubles que le matériel original. Par conséquent la séparation maximum possible sera  $C$  fois la composition du matériel original pour un premier traitement et  $C^2$  fois par un second traitement de la première fraction obtenue etc....

Le rendement d'un seul tour de fractionnement en fonction de  $C$  peut se représenter graphiquement de la façon suivante (Butler<sup>(27)</sup>). On peut en effet écrire que  $\frac{A}{B}$  (solide) =  $C \frac{A}{B}$  (solution). Si l'on porte dans un graphique  $\frac{A}{B}$  (solide) en fonction de  $\frac{A}{B}$  (solution) la droite obtenue représente donc la relation entre la composition du solide et celle de la solution en équilibre avec lui (Fig. 5). Supposons que  $X$  représente  $\frac{A}{B}$  dans le matériel original. Dès l'apparition de la phase solide, on peut dire que  $\frac{A}{B}$  (solution) est très proche de  $X$  et sera représentée par  $Y$ . Par contre,  $\frac{A}{B}$  (solide) sera

donc représenté par  $X'$ . Au contraire, lorsque la phase solide est très grande par rapport à la quantité dissoute,  $\frac{A}{B}$  (solide) est très proche de  $X \cdot \frac{A}{B}$  (solution) sera donc représenté par  $Y'$ . L'amplitude des variations  $X' \rightarrow X$  et  $Y \rightarrow Y'$  représente le rendement du fractionnement.

#### D. Ecart à la loi de Raoult - Application aux polymères.

Dans les considérations théoriques précédentes, nous avons montré la prudence avec laquelle on doit tirer les conclusions des résultats de courbes de solubilité, même lorsque celles-ci sont établies pour des systèmes idéaux. En résumé, un solide cristallin homogène peut présenter une solubilité variable en fonction de la quantité de la phase solide si celle-ci présente un phénomène de gonflement ou si les cristallites sont de dimensions différentes. Inversement un solide hétérogène peut présenter une homogénéité apparente si les constituants sont présents dans des quantités proportionnelles à leur solubilité (mélange indépendant), ou si les constituants présentent la même solubilité (solution solide).

De plus, l'ensemble des raisonnements de Kunitz-Northrop n'est strictement valable que pour autant que la loi de Raoult soit applicable aux solutions en équilibre avec une ou plusieurs

phases solides. Or cette loi n'est vérifiée que par de rares mélanges de liquide ( éthanol-méthanol ; benzène-toluène ).

De même, il est rare que la dissolution d'un solide cristallin se réalise suivant le cas idéal exposé au paragraphe A. Ceci est particulièrement vrai lorsque les molécules du corps dissous présentent vis-à-vis de celles du solvant une dimension beaucoup plus grande, et se caractérisent par une modification aisée de forme, comme c'est le cas des polymères à haut degré de polymérisation.

#### 1°) Polymère cristallisé.

Dans ce cas, même si la chaleur de mixtion peut être négligée par rapport à la chaleur de fusion, la variation entropique positive est considérablement supérieure à la variation idéale :

$\Delta S \text{ réel} = \Delta S \text{ idéal} + \Delta S' = -R \ln N + \Delta S'$  où  $\Delta S'$  représente cet excès d'entropie positive. Dans ces conditions, la solubilité sera donnée par

$$N = e^{\frac{-(\Delta H_f - T \Delta S')}{RT}}$$

$\Delta H_f$  augmente généralement avec le degré de polymérisation.

$T \Delta S'$  d'autre part reste normalement très petit devant  $\Delta H_f$ .

On voit que la solubilité des hauts polymères cristallisés doit être très faible. Inversement, une solubilité très élevée d'un tel solide dans un solvant déterminé doit être la conséquence d'une affinité spéciale telle que la chaleur de mixtion peut

compenser la chaleur de fusion. Un cas semblable témoigne des interactions solvant-polymère considérables, et on s'écarte encore davantage des conditions d'application de la loi de Raoult. Il y aurait donc avantage -du moins théoriquement- de tracer les courbes de solubilité dans un domaine de très faible solubilité. Si l'on suppose que les écarts à la loi de Raoult présentés par les solutions de hauts polymères sont uniquement un effet du volume moléculaire du dissous, la loi de Raoult serait respectée pour des dilutions de l'ordre de  $n_1 \geq 100 n_2$

$n_1$  et  $n_2$  = nombre de molécules du solvant et du polymère

$$n = \frac{\text{volume d'une molécule de polymère}}{\text{volume d'une molécule de solvant}}$$

On voit que pour  $n = 1000$ , la condition de dilution serait

$$n_1 \geq 100.000 n_2 .$$

Il est évident que des déterminations précises de solubilité aussi faible sont pratiquement illusoire.

## 2°) Polymères amorphes. (31)

La solubilité des polymères amorphes est régie uniquement par l'entropie et la chaleur de mixtion. On peut montrer que l'énergie libre de Gibbs (température et pression constantes) qui en découle est donnée pour des solutions diluées par

$$\Delta F = - \left[ RTV + RT \left( \frac{1}{2} - \gamma \right) v^2 \right]$$

où  $V$  = fraction de volume du polymère

$\mathcal{J} = \beta + \frac{\alpha}{RT}$  où  $\beta$  et  $\alpha$  sont deux termes provenant respectivement de l'entropie ( $\beta = \frac{1-\sigma}{2}$  ;  $\sigma$  = facteur d'écran) et de l'énergie totale de mixtion qui dépend de l'énergie de cohésion des substances pures, et des interactions polymère\_solvant.

Lorsque la courbe  $\Delta F$  en fonction de la concentration présente un minimum<sup>m</sup>, le système, primitivement homogène, se sépare en deux phases contenant des concentrations différentes en polymère et en solvant. Le partage du polymère entre les deux phases (gel et solution) est donné en première approximation par :

$$\ln \frac{V'_x}{V_x} = Ax \quad \text{avec} \quad A = 2 \mathcal{J} (V_1 - V'_1) - \ln \left( \frac{V_1}{V'_1} \right)$$

$V'_x$  et  $V_x$  = fraction de volume du polymère dans la phase gel et dans la phase solution

$V'_1$  et  $V_1$  = fraction de volume du solvant dans la phase gel et dans la phase solution

$A$  = constante pour <sup>un</sup> système donné.

$x$  = degré de polymérisation du polymère.

On peut voir que si la loi des phases de Gibbs reste valable, l'application de la technique des courbes de solubilité est impossible.

Lorsque le solide est un mélange de plusieurs polymères amorphes, le fractionnement est généralement réalisé en modifiant les

caractéristiques du solvant (abaissement de température-addition d'un non solvant) de façon à atteindre progressivement les valeurs critiques de  $\zeta$  de chaque polymère pour lesquelles celui-ci précipite. (Voir pages 83-84)

Remarque : Exemples d'application.

Malgré les difficultés théoriques que nous venons d'exposer Kunitz et Northrop ont discuté les courbes de solubilité obtenues à partir de substances macromoléculaires cristallines (protéines et enzymes) sur la base des lois des solutions idéales.

Les résultats obtenus par ces auteurs sont devenus classiques ; et il est bien établi que, dans un grand nombre de cas, la loi de Raoult peut donner une interprétation au moins qualitative des phénomènes. C'est ce qu'ont observé par exemple Landsteiner et Heidelberger à partir de deux hémoglobines d'animaux voisins (32) ; Herriott Desreux et Northrop à partir de la pepsine (33) ; Kunitz à partir d'un mélange de  $\alpha$  et  $\gamma$  chymotrypsine (34) (x)

(x) Remarquons que ce mélange se comporte comme une solution solide à pH 4 (10°G ;  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  0,4 saturé), tandis qu'à pH 5,5 la courbe correspond à la courbe théorique d'un mélange de deux phases solides indépendantes.

## II. Courbes de solubilité dans les solutions salines concentrées.

### A. L'effet de Salting Out.

1°) Il est d'application générale en chimie organique que l'addition à deux composants liquides d'une substance soluble seulement dans l'un des deux diminue la solubilité mutuelle, et par conséquent augmente la température critique de dissolution.

C'est en particulier le cas de l'addition d'un électrolyte à un mélange d'eau et de liquide organique. C'est sur cette intéressante propriété que se basent certains critères de pureté, de même que le séchage de liquide organique.

2°) On sait également que les gaz sont moins solubles dans des solutions aqueuses d'électrolytes que dans l'eau pure. Cet effet est pratiquement indépendant de la nature du gaz, mais est d'autant plus intense que la dimension de l'ion est petite et sa charge élevée.

En règle générale, ces deux phénomènes sont régis par la même loi selon laquelle le log. du rapport de la solubilité, dans la solution d'électrolyte, du gaz ou de la substance organique, à la solubilité dans l'eau pure est proportionnel à la concentration de l'électrolyte

$$\log \frac{s}{s_0} = kc [1]$$

$k$  étant une constante dépendant de la nature de l'électrolyte. Cet effet dénommé "effet de Salting Out" est expliqué en supposant que les dipôles de l'eau se concentrent autour des ions ajoutés. La cause du Salting Out est analogue à celle des déviations positives à la loi de Raoult. C'est un véritable effet de déshydratation. Le Salting Out apparaît donc comme une mesure de l'hydratation des ions. Il est intéressant de constater que les résultats ainsi obtenus sont en accord avec ceux obtenus par d'autres procédés comme le nombre de transport.

3°) Rappelons aussi que cette concentration des dipôles  $H_2O$  autour des ions, est responsable du terme  $-C\mu$  dans l'équation corrigée de Debye-Hückel

$$-\log f_{\pm} = \frac{Az_+z_-\sqrt{\mu}}{1+Ka} - C\mu$$

$\mu$  = force ionique

$A$  = constante égale à 0,51 pour l'eau à 25°C

$z_+$   $z_-$  = valence.

$(1 + K a)$  = facteur de correction tenant compte du diamètre moyen effectif des ions.

En effet -en l'absence du terme correctif  $-C\mu$  - cette formule ne peut justifier le minimum que l'on constate dans la variation de  $-\log f_{\pm}$  en fonction de  $\mu$ . Ceci signifie que pour une certaine valeur de  $\mu$ , le Salting Out -qui a pour effet d'enrichir l'atmosphère ionique d'un ion déterminé par des dipôles  $H_2O$

aux dépens d'autres ions de signe opposé à l'ion central -ne peut être négligé. La correction -selon Hückel- peut être faite en supposant un changement dans la constante diélectrique proportionnel à la concentration ionique. On arrive ainsi à la relation complète.

#### B. Application du Salting Out comme critère de pureté (35)

La précipitation des colloïdes hydrophiles et en particulier des protéines par addition d'une grande quantité d'électrolytes est également une manifestation du phénomène de Salting Out et est régie par la même relation que [1]. Cette relation est toutefois souvent mise sous la forme :

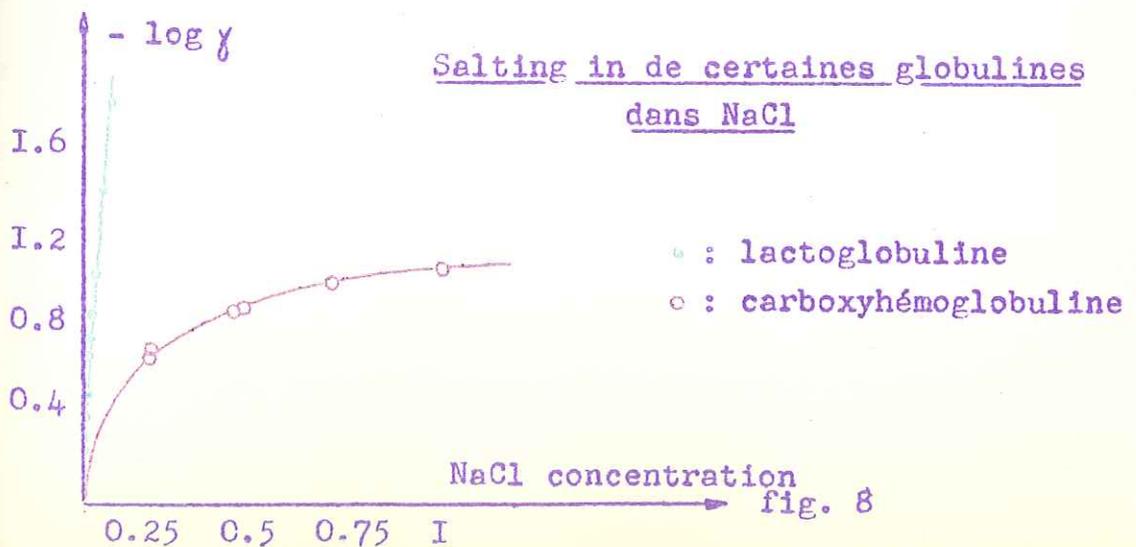
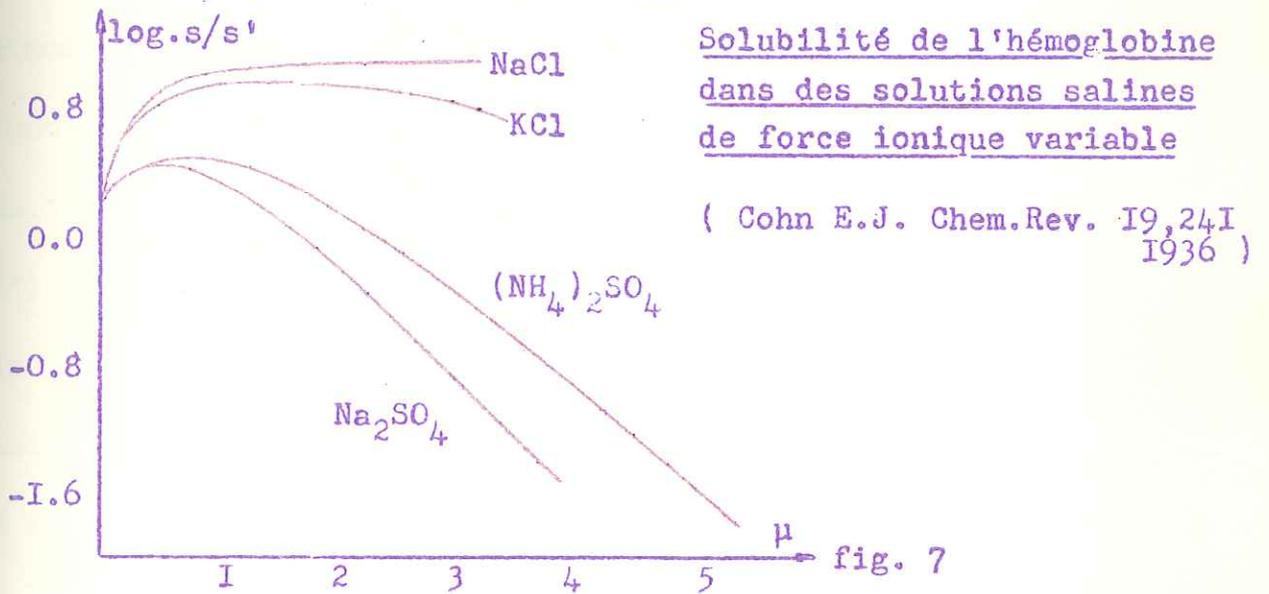
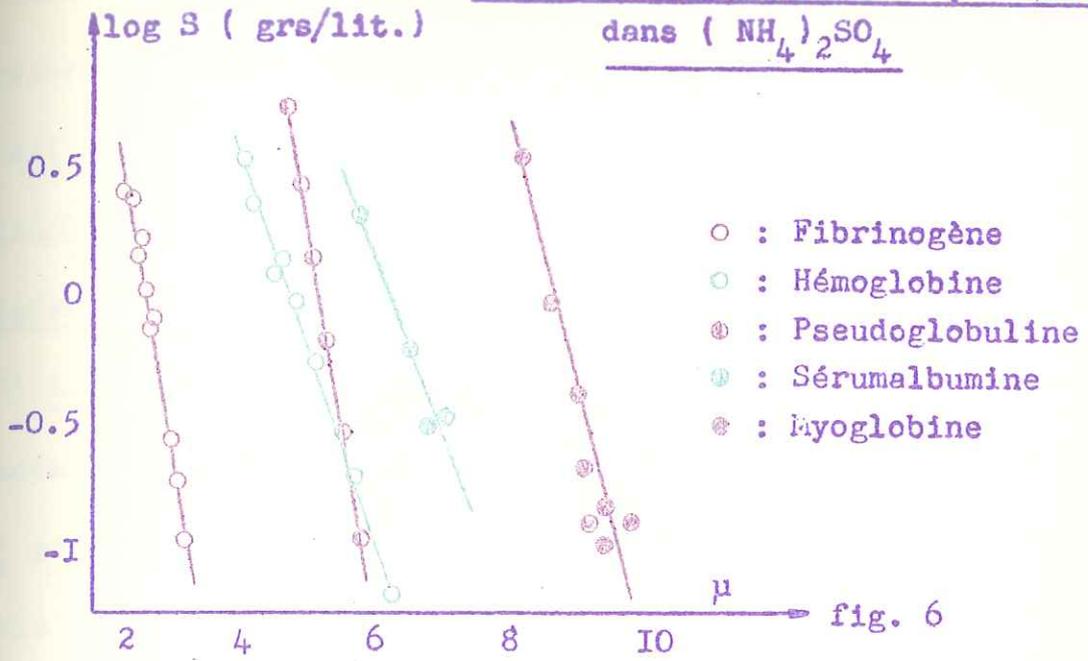
$$\log S = \beta - K'_S \mu$$

S (solubilité) et  $\mu$  (force ionique) étant exprimés en gramme par mille grammes d'eau.

Les variations du  $\log S$  d'un colloïde en fonction de  $\mu$  est donc une droite dont l'intercepte avec l'ordonnée,  $\beta$ , est le logarithme de la solubilité hypothétique à force ionique nulle, et dont la pente donne la valeur de  $K'_S$  appelée constante de Salting Out (figure 6).

Cette équation n'est toutefois valable que dans un domaine de force ionique suffisamment élevée pour lequel la solubilité est petite. En effet, aux faibles concentrations salines, les

Salting out de certaines protéines



interactions entre les dipôles du colloïde et les ions de l'électrolyte, ont un effet de solubilisation. Il faut donc que l'effet de Salting Out soit grand en comparaison de l'action dissolvante des sels neutres.  $K'_s$  est en réalité une constante apparente et représente la somme de ces deux effets.

1°) La constante  $K'_s$  est -pour une protéine et un sel donné- indépendante à la fois du  $p^H$  et de la température. Les valeurs de  $K'_s$  pour différentes protéines et le même sel, ou, pour différents sels et la même protéine, diffèrent seulement d'un facteur maximum de 2. Il est toutefois possible de classer les sels en fonction de leur pouvoir de Salting Out. Par ordre croissant, on trouve généralement :  $\text{NaCl} - \text{MgSO}_4 - (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 - \text{Na}_2\text{SO}_4$  - phosphates.

2°) La constante  $\beta$  au contraire est, pour une protéine et un sel donné, fonction à la fois du  $p^H$  et de la température. Il s'en suit que pour une protéine unique, le  $\log S$  en fonction de  $\mu$  à différents  $p^H$  ou à différentes températures, est représenté par une série de droites parallèles. On voit l'importance que présentent ces variations de  $\beta$  pour le fractionnement d'un mélange de plusieurs protéines. En effet, leur solubilité éventuellement très semblable à un  $p^H$  et à une température déterminés, pourrait être affectée très différemment par la variation de l'un ou l'autre de ces deux facteurs.

## Conclusions.

a) Cette technique donne des résultats remarquables dans la séparation, la purification et la caractérisation des protéines. De plus, Falconer et Taylor (36) ont fait une étude complète des courbes présentant des zones de copréciptation. Leur étude avait pour objet la mesure du chevauchement et l'élimination quantitative des impuretés, et comme application l'obtention d'estérase à un haut degré de pureté.

b) Il n'en reste pas moins vrai que la faible variation signalée plus haut de  $K'_s$  en fonction de la nature de la protéine ou du sel, est la traduction du peu de spécificité du Salting Out, celui-ci dépendant en ordre principal du volume d'eau déplacé ; ce qui a pour effet de masquer les forces hautement spécifiques qui déterminent les interactions entre protéines et électrolytes aux faibles forces ioniques.

### III. Courbes de solubilité aux faibles forces ioniques (Cohn)

Le principe consiste à utiliser les interactions spécifiques protéine-ion particulièrement élevées aux faibles valeurs de  $\mu$ , la solubilité des protéines étant réduite par addition d'un solvant organique miscible à l'eau.

#### A. Les interactions protéine-ion (35)

Les sels neutres ont une action profonde sur les protéines en général et particulièrement sur les globulines. Cette action se manifeste par une diminution importante du coefficient d'activité  $\gamma$ . D'après la formule  $\gamma_{\pm}(\text{temp. et pression constantes}) = \frac{c_{\pm}^{\text{act}}}{C_{\pm}}$  thermodynamiquement applicable à une solution saturée en équilibre avec la phase solide (x), cette diminution de  $\gamma_{\pm}$  se traduit par une augmentation de la solubilité : c'est l'effet de Salting in. On voit dès lors que la combinaison des deux effets : Salting in aux faibles valeurs de  $\mu$  et Salting Out aux valeurs élevées de  $\mu$ , explique parfaitement le maximum présenté par la courbe complète  $\log S$  en fonction de  $\mu$  (figure 7). De plus la figure 8, relative au Salting in de la lactoglobuline et de la carboxyhémoglobine, comparée à la figure 6 montre clairement la différence de spécificité des deux phénomènes.

(x)  $C_{\pm}$  = concentration ionique moyenne

## 1°) Nature des interactions protéine-ion.

L'interprétation quantitative de ces interactions -basée évidemment sur la théorie de Debye-Hückel-est mathématiquement difficile à établir. Signalons l'essai de Kirkwood (37).

En assimilant l'ion protéinique à une sphère dont la localisation des charges -correspond<sup>ant</sup> aux groupes ionisés basiques et acides des résidus amino-acides- est spécifiée par des coordonnées sphériques, il calcule l'énergie électrostatique mutuelle entre ce dipole complexe et les électrolytes dans un milieu de constante diélectrique donné. A partir de quoi, il obtient le coefficient d'activité.

L'application pratique de la formule ainsi proposée se heurte évidemment à de nombreuses difficultés et nécessite un certain nombre d'approximations :

- a) Le manque de précision concernant l'édifice moléculaire de la protéine. En général on l'assimile à une sphère compatible avec son poids moléculaire, et on localise aux deux pôles opposés un nombre de charges élémentaires tel que combiné avec la distance qui les séparent, le moment dipolaire résultant se rapproche le plus possible de la valeur expérimentale.
- b) Le calcul théorique de Kirkwood ne considère parmi les interactions protéine-ion que les seules interactions coulombiennes du type protéine "dipole complexe"-ion. La formule doit,

par conséquent être corrigée en tenant compte d'autres phénomènes concomitants : le Salting Out et les interactions protéine "ion" - ion.

On peut tenir compte du Salting Out d'après la loi  $\log \gamma_{\pm} = K_s \mu$ , la constante  $K_s$  (constante "réelle" de Salting Out) étant elle-même calculée à partir d'une autre équation de Kirkwood, suivant laquelle  $K_s$  -pour une température déterminée- est directement proportionnel au produit  $\frac{b^3}{a} \cdot \frac{D-1}{2D+1}$

b étant le rayon de l'ion dipolaire, a; la somme des rayons dipolaire + ions et D la constante diélectrique.

Les interactions protéine-ion-ion dont la nature a été étudiée particulièrement par Linderström-Lang ont à leur tour pour effet d'augmenter ou de diminuer le moment dipolaire de la protéine. Si bien que à ce seul point de vue, les mesures simultanées du coefficient d'activité et des combinaisons protéine-acide ou base, sont seules susceptibles de donner une estimation satisfaisante du rôle des forces dipole-ion et ion-ion dans la solubilité des protéines aux faibles forces ioniques.

## 2°) Conclusions.

Malgré la complexité du problème, la formule de Kirkwood -moyennant la simplification concernant la forme de la molécule et la configuration des charges- est souvent applicable en première approximation. Elle montre que l'effet de solubilisation

a) augmente avec la force ionique de la solution b) augmente avec le moment dipolaire de la protéine c) diminue que la constante diélectrique du milieu augmente.

On voit par conséquent qu'une méthode de caractérisation et de séparation éventuelle basée sur l'utilisation des interactions protéine "dipole"-ion est hautement spécifique de la nature de la protéine. De plus, cette spécificité peut encore être augmentée par un choix adéquat du pH et de la constante diélectrique du milieu. En effet, nous avons signalé que le pH peut avoir une répercussion importante sur le moment dipolaire de la protéine ; tandis que une variation de la constante diélectrique du milieu a un effet opposé sur les deux phénomènes : Salting in et Salting out ; une diminution de  $D$  diminuant la valeur de la constante réelle de Salting out  $K_s$  et augmentant les interactions dipole-ion .

#### B. Application au fractionnement des protéines (38-39)

La méthode de Cohn consiste donc à différencier les protéines par addition de faible concentration d'électrolytes. La solubilité est ensuite réduite, généralement par addition d'un solvant organique. Le choix de ce solvant ( méthanol-éthanol-dioxane )

revêt une importance considérable étant donné son influence sur la constante diélectrique du milieu. Dans un tel système, on peut contrôler cinq variables indépendantes : le pH, la température, la concentration en protéine, la force ionique, et la concentration en liquide organique.

Généralement, trois de ces variables sont maintenues constantes, et les deux autres sont choisies telles que l'une augmente, et l'autre diminue la solubilité. On choisit souvent comme variables, la concentration en électrolyte et la concentration en liquide organique. Si la protéine est unique, il y a toute une variété de concentrations en électrolyte et en liquide organique pour lesquelles la solubilité de la protéine reste constante. On peut ainsi déterminer les conditions pour lesquelles la constance de solubilité de n'importe quelle protéine est vérifiée et d'en construire les courbes correspondantes.

D'autres systèmes plus complexes peuvent être choisis avec, par exemple, trois variables comme paramètre ( électrolyte, liquide organique, pH ). Dans ces conditions, les conditions de solubilité constante seront définies par des surfaces.

Enfin, les interactions protéine-ion peuvent être modifiées par l'addition d'autres substances en concentration variable :

addition d'ions dipolaires comme la glycine en vue d'augmenter la constante diélectrique, ou, de substances formant des complexes très peu dissociés comme le chloroforme, le benzène et les alcools aliphatiques à longue chaîne.

Ce résumé sur les interactions protéine-ion montrent l'importance et la sensibilité d'un tel système d'investigation, compte tenu à la fois de la spécificité de ces interactions et du grand nombre de variables dont le chercheur peut disposer.

L'application de Cohn à la cristallisation des serum-protéines en est une belle application.

CHAPITRE III. (40)

ETUDE DE LA SOLUBILITE DU RIBONUCLEATE DE

SOUDE DE LA LEVURE.

## I. INTRODUCTION.

Comme nous l'avons rappelé dans l'introduction, H.Chantrenne a entrepris la purification de l'acide ribonucléique de levure; et le produit obtenu fut soumis à l'analyse par la technique des courbes de 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 égale de la solution de nucléate à analyser était additionné à ce mélange. Le diagramme ainsi obtenu était représenté par une droite dont l'extrapolation sur l'ordonnée représentait une quantité de produits solubles extrêmement faible. D'autre part, aucune modification dans la pente de la droite n'était mise en évidence jusqu'à des concentrations totales de l'ordre de 30 grs. par litre.

Il était possible à H.Chantrenne d'interpréter ce diagramme en supposant que l'échantillon examiné était en fait un mélange de deux substances de solubilité extrêmement différente. C'est ainsi qu'il fut amené à distinguer deux fractions appelées respectivement A de très faible solubilité ( $\approx$  30 mgrs. d'acide nucléique par litre) et B de solubilité supérieure à 30 grs 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

ependant difficile l'étude de la première partie du graphique de  
Lunitz-Northrop. On ne pouvait donc affirmer avec certitude que cette  
substance était constituée d'une seule espèce moléculaire.

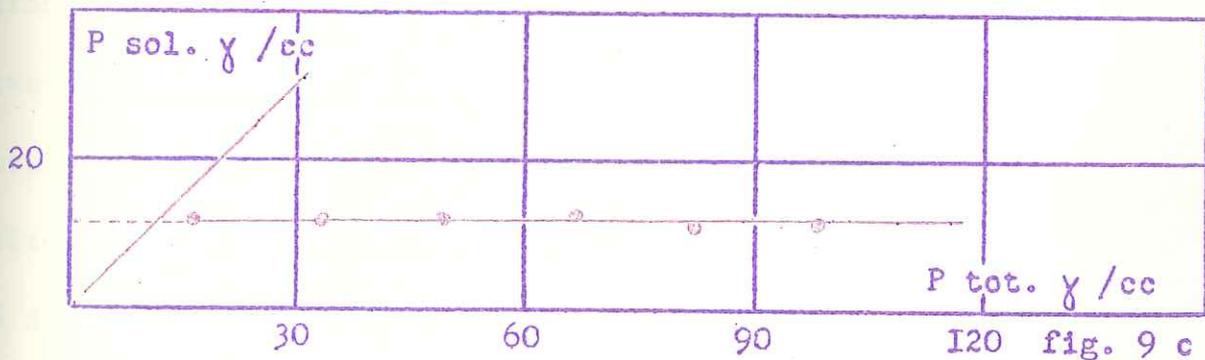
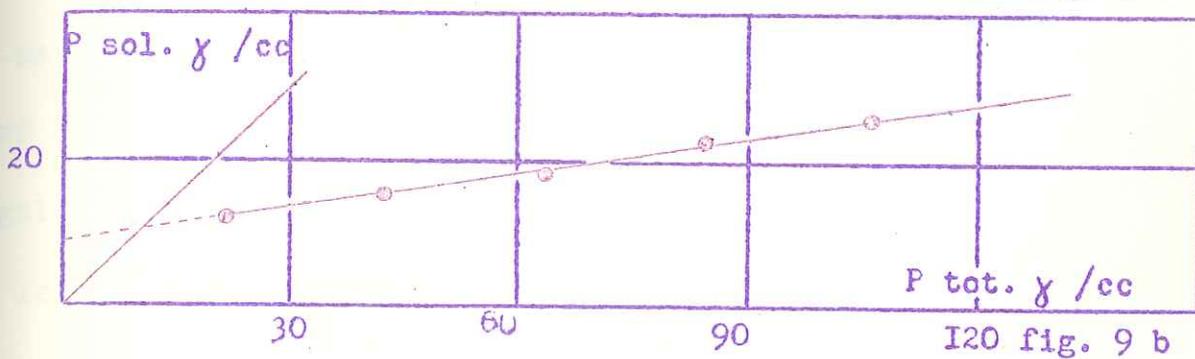
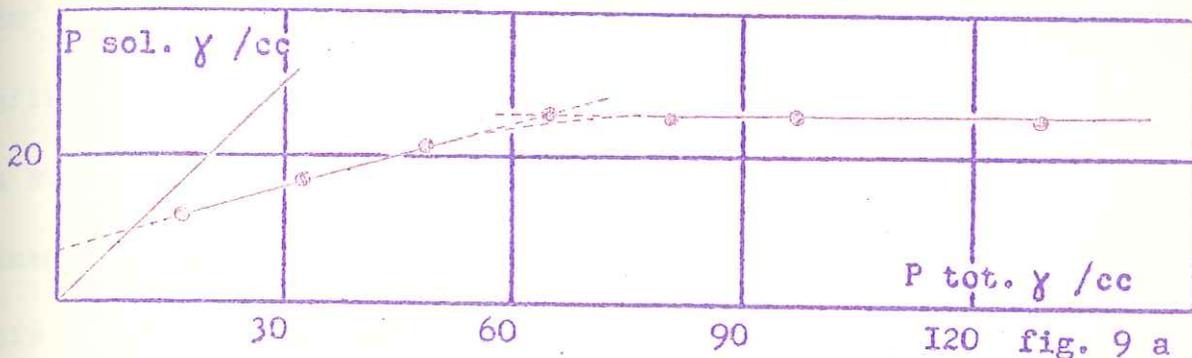
## II. ETUDE DU SYSTEME SOLVANT-PRECIPITANT DE CHANTRENNE.

No us avons repris l'étude de la solubilité de la fraction A, particulièrement aux très faibles concentrations, en opérant dans des conditions plus précises: la température de 0°C était strictement constante au cours de toutes les manipulations et le dosage colorimétrique du phosphore minéralisable était plus exact.

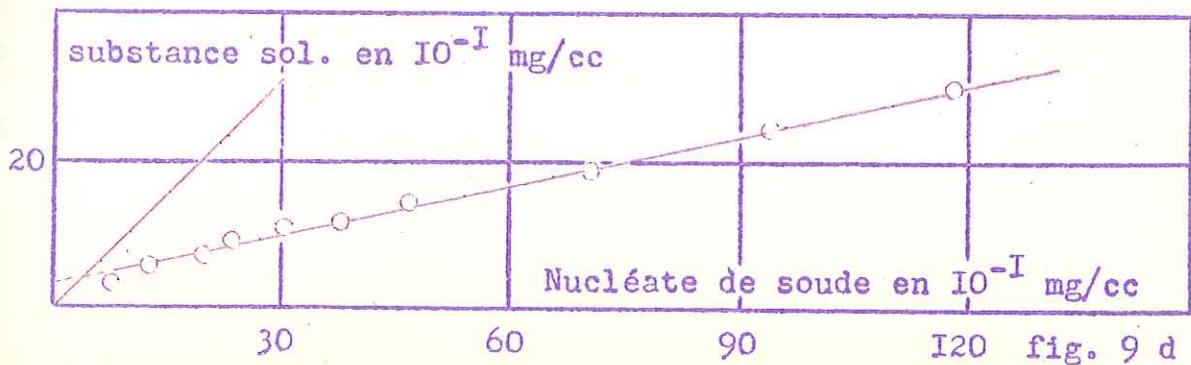
### A. Résultats expérimentaux.

- 1° La courbe de solubilité ainsi obtenue (figure 9a) révèle que la solubilité de la fraction A n'est constante en fonction de la quantité de phase solide qu'à partir d'une certaine valeur d'abscisse. Quelle que soit la signification de graphique semblable, l'allure de la courbe aux faibles quantités de phase solide montre clairement l'hétérogénéité de la fraction A.
- 2° Par deux fractionnements répétés à l'aide du même milieu, et en travaillant à des concentrations très faibles ( $\approx 40 \gamma \text{ P. total/cm}^3$ ), nous avons pu obtenir un enrichissement progressif en substance la moins soluble et isoler finalement une fraction (fraction A<sub>1</sub>) de solubilité très faible et apparemment constante dans tout le domaine de concentration étudié (figures 9b-c).
- 3° Signalons que la "solubilité extrapolée" peut varier considérablement

Hétérogénéité de A - Obtention de A<sub>I</sub>  
( précipitant : Chantrenne )



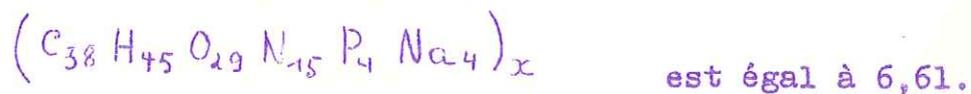
Confirmation gravimétrique  
de l'homogénéité de A<sub>I</sub>



d'une fraction  $A_1$  à une autre: 4 et 12  $\gamma$  de phosphore minéralisable par  $\text{cm}^3$  par exemple.

4° Enfin, la détermination de la quantité d'acide en solution étant 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  $\gamma\text{P./cm}^3$ , nous avons, dans le premier cas, trouvé que la solubilité exprimée en  $\gamma$  d'azote par  $\text{cm}^3$  était constante et égale à 6,5  $\gamma/\text{cm}^3$ .

Dans le second cas, on obtient une droite dont l'inclinaison représente environs 24% de produits solubles. 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 produits solubles 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



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

## B. Conclusions.

La seule conclusion rigoureuse que l'on puisse tirer de ces graphiques est l'hétérogénéité manifeste de la fraction A de Chantrenne.

Mais il n'est pas possible de garantir l'homogénéité de la fraction  $A_1$ , ni d'établir avec certitude le nombre de composants présents dans le ribonucléate. En effet:

1° Supposons que les différents composants du nucléate brut forment réellement des phases solides indépendantes. Les courbes précédentes sont interprétables en admettant la présence de 3 fractions:  $A_1$  et  $A_2$  de solubilité très faible et très voisine, et B de solubilité énorme (cas 1). La présence de  $A_1$  et  $A_2$  dans le produit brut ne peut cependant être mise en évidence par suite de leur solubilité minime et de la difficulté qu'il y a d'obtenir des points aux très faibles quantités de phase solide (voir plus loin).

Supposons au contraire que les différents composants forment une solution solide; les points expérimentaux peuvent être interprétés en supposant la présence de deux substances ou de deux ensembles de substances A et B pour lesquelles le rapport

$c = \frac{\text{solubilité de B}}{\text{solubilité de A}}$  est énorme (cas 2).

En effet, si le pourcentage de fractions  $A = [A_1 + A_2]$  et B est très semblable dans le ribonucléate brut, la courbe de solubilité dans le cas 1 - est une droite, après que  $A_1$  et  $A_2$  auront atteint

leur saturation, sur une très grande distance. Dans le cas 2, la pente de la courbe varie insensiblement en fonction de la quantité de phase solide et la courbe peut, dans un certain domaine de concentration, être confondue avec une droite.

L'enrichissement par fractionnement en molécules peu solubles est excellent dans les deux cas. La pente de la courbe de solubilité tracée à partir de la phase solide ainsi enrichie sera donc pratiquement nulle pour une valeur d'ordonnée très peu différente de celle correspondant à l'apparition de la phase solide.

Il s'en suit que -avant ou après fractionnement- il est très difficile de savoir si les points expérimentaux se placent sur des segments de droite ou sur une courbe. Et il est pratiquement impossible de décider si l'hétérogénéité de A est due soit à la présence de deux ou plusieurs substances de solubilité très faible formant ou ne formant pas de solution solide, ou, soit à la présence de très faibles quantités de B formant une solution solide avec une substance ou un ensemble de substances de solubilité très faible.

2° La solubilité de la fraction  $A_1$  est extrêmement faible. Il est donc impossible de tracer une courbe complète de solubilité. Or cette condition est essentielle à la caractérisation d'une substance homogène. Rappelons ici que les différentes fractions  $A_1$  de solubilité strictement constante à partir de quantités de phase solide très

faibles (10 à 20  $\gamma$  P./cm<sup>3</sup>) donnent des "solubilités extrapolées" différentes. Ceci pourrait évidemment s'expliquer en imaginant que la nature chimique de ces fractions supposées homogènes varierait d'un échantillon à l'autre. Il est toutefois plus logique de supposer que ces différentes fractions sont hétérogènes à des degrés légèrement différents et que les divers composants, tous de solubilité très faible, (X)forment des solutions solides. Dans ces conditions, une légère différence du rapport des concentrations molaires des composants se marquera par une légère différence dans la solubilité de la partie de la courbe parallèle à l'abscisse. (XX). Tandis que la partie de la courbe de pente variable ne peut être mise en évidence, celle-ci s'étendant dans un domaine de concentrations trop petites en phase solide.

(X) Nous verrons plus loin, (page 65) que l'hétérogénéité de la fraction A<sub>1</sub> est réellement due à la présence de substances de très faible solubilité.

(XX) En toute rigueur, on pourrait également imaginer que ces différents composants ne forment pas de solution solide. Dans cette hypothèse, l'extrapolation à l'ordonnée nous renseigne sur les solubilités des composants à l'état pur. Il faudrait donc conclure à nouveau que la nature chimique de ces différents composant varie d'une fraction à une autre.

### C. Inconvénients du précipitant de Chantrenne.

Le graphique 10a montre que ce milieu a une action légèrement dégradante sur la fraction A. Après 26 heures de contact à 0°C on retrouve pour cette substance un tracé de solubilité similaire à celui de la figure 9a. Après 120 heures de contact, la formation de produits solubles B est évidente (figure 10b). Cette action dégradante, signalée également par Stanley-Kerr et Seraidarian (9) 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. Nous avons essayé d'augmenter la vitesse de floculation par adjonction de sulfate de magnésium au précipitant de Chantrenne. 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 du mélange correspondant dans le graphique 10b, au point:  $21 \gamma \text{ P.sol./cm}^3$  pour  $88 \gamma \text{ P.tot./cm}^3$  s'abaisse à  $4 \gamma \text{ P.sol./cm}^3$  par addition de  $1.000 \gamma$  de sulfate de magnésium par  $\text{cm}^3$  (graphique 11).

On comprend dès lors qu'il est impossible d'obtenir des points de solubilité significatifs aux faibles quantités de phase solide.

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

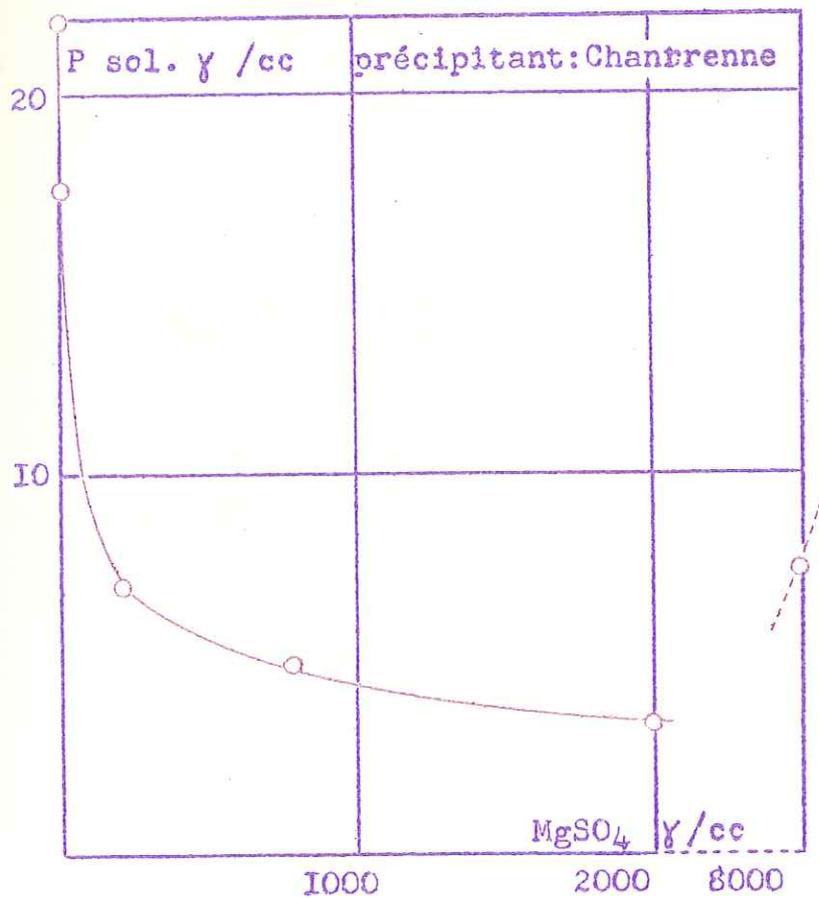


fig. II

Et, étant donné la très faible solubilité  $A_1$ , son homogénéité ne saurait par conséquent être garantie.

D. Remarque.

La superposition des <sup>trois</sup> figures 9a-b-c et des <sup>deux</sup> figures 10a-b montre qu'aux faibles quantités de phase solide, les courbes se rejoignent et montrent une tendance au recouplement. C'est ainsi que les points correspondants à  $P. tot. = 16 \gamma / cm^3$  dans les figures 9a-c relatives à deux fractions d'homogénéité nettement différente, donnent la même solubilité  $12 \gamma P_{sol.} / cm^3$ . Il faut donc en conclure qu'aux faibles quantités de phase solide la solubilité diminue lorsque le pourcentage de produits solubles augmente. Cette anomalie montre que -quelle que soit la nature de la phase solide- la loi de Raoult n'est pas respectée.

Afin de vérifier l'influence de la variation de la concentration réciproque de deux fractions sur le tracé d'une courbe de solubilité, nous avons ajouté à une certaine quantité ( $10 \gamma P. / cm^3$ ) de  $A_1$ , des quantités croissantes de produits solubles "B" obtenus par chauffage de  $A_1$  à  $100^\circ C$  pendant 3 heures à pH 9. La fraction  $A_1$  utilisée donnait une solubilité apparemment indépendante de la quantité de phase solide et égal à  $4 \gamma P. / cm^3$ .

Les résultats expérimentaux sont consignés dans le tableau suivant:

Quantité de $A_1$	Quantité de "B" ajoutée	Quantité totale soluble	Quantité totale soluble moins quantité de "B" ajoutée	$\frac{\text{Quantité de "B"}}{\text{Quantité de } A_1}$
$10 \text{ g/cm}^3$	$0 \text{ g/cm}^3$	$4 \text{ g/cm}^3$	$4 \text{ g/cm}^3$	0
"	1,5	3,8	2,3	0,15
"	3	3,8	0,8	0,30
"	4,5	5,2	0,7	0,45
"	6	6,8	0,8	0,60
"	7,5	9,8	2,3	0,75

A partir de ces résultats, nous avons tracé les deux graphiques 12a-b en portant en abscisse le rapport  $\frac{\text{"B"}}{A_1}$  et en ordonnée soit la solubilité totale, soit la différence entre la solubilité totale et la quantité de "B" ajoutée.

1° Si  $A_1$  et B ne forment pas de solution solide, la phase solide est à chaque instant constituée uniquement de  $A_1$ . Le graphique 12b donne donc la variation de la solubilité de  $A_1$ . Le coefficient d'activité de  $A_1$  serait maximum pour un certain rapport  $\frac{\text{"B}}{A_1}$ .

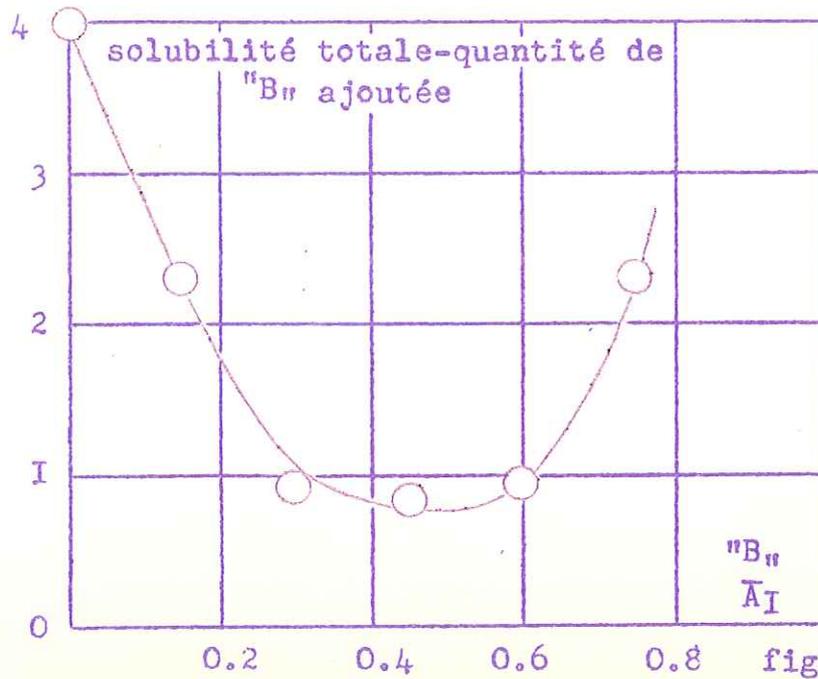
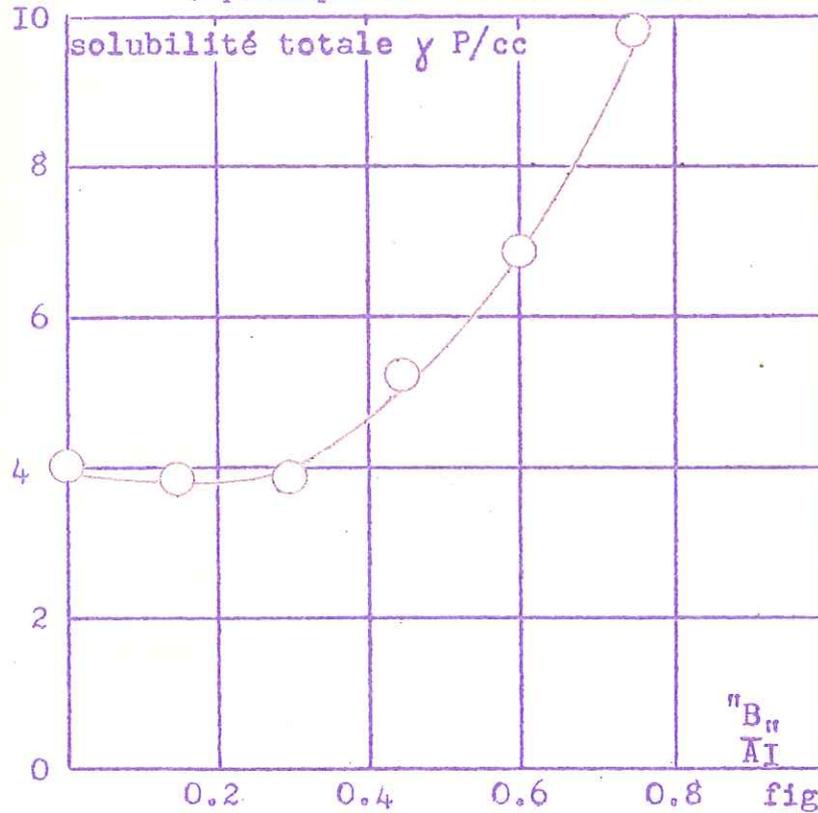
2° Si au contraire,  $A_1$  et "B" forment une solution solide, l'interprétation du graphique 12b demande un traitement plus poussé.

En effet, la phase solide dans ce cas, renferme en tous points une

Influence du rapport  $\frac{B_{II}}{A_I}$  sur la solubilité totale

(  $A_I = \text{constante}$  )

( précipitant de Chantrenne )



proportion variable de  $A_1$  et "B". Et on peut seulement poser

$[A_1 + \text{"B"}]$  en solution - "B" ajouté < solubilité de  $A_1$  en l'absence de "B".

Nous verrons cependant (page 70) que le résultat est identique: à savoir que la solubilité de  $A_1$  passe par un minimum pour une certaine quantité de  $\frac{\text{"B"}}{A_1}$ .

#### E. Conclusion.

Nous nous sommes donc efforcés de trouver d'autres systèmes solvant-précipitant ne présentant pas les inconvénients du précipitant de Chantrenne: action dégradante et solubilité trop faible de  $A_1$ .

### III. RECHERCHE DE NOUVEAUX SYSTEMES SOLVANT-PRECIPIANT.

Nous nous sommes inspirés des méthodes expérimentales utilisées par Cohn et ses collaborateurs dans le cas des protéines. Nous avons vu que le nombre de variables caractérisant un système précipitant du type Cohn est élevé. 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 de méthanol et d'un tampon acide-acétique-acétate de sodium de force ionique 0,10, le complément de force ionique étant apporté par NaCl; la température est toujours de 0°C.

#### A. Résultats expérimentaux.

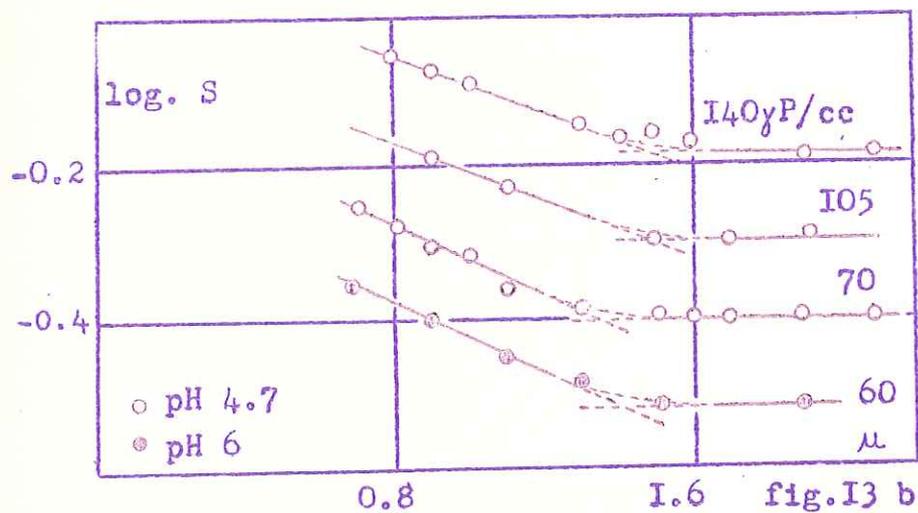
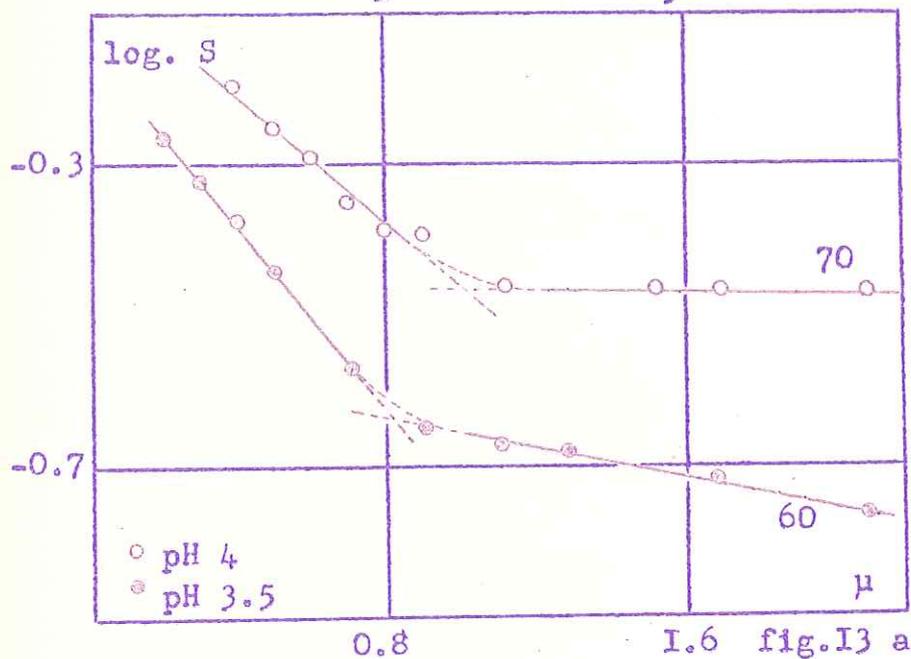
Nous avons tout d'abord étudié l'influence de la force ionique apparente, du pH et de la concentration en acide ribonucléique, le pourcentage en méthanol dans le milieu précipitant étant de 20% en volume.

Les résultats obtenus sont consignés dans les figures 13a-b et interprétés en fonction de la relation  $\log S = \beta - K_s \mu$  où S désigne la solubilité en grammes de P. soluble x 10 par litre.

HETEROGENEITE DE  $A_I$

Variation de la solubilité de  $A_I$   
en fonction de  $\mu$

pH & conc. en  $A_I$  variables.  $CH_3OH$  : 20 %



La figure 13a représente la variation du logarithme de la solubilité de la fraction  $A_1$  en fonction de  $\mu$  au pH 3,5 et 4, la quantité totale de substance dans chaque essai étant approximativement la même (70 et 60  $\gamma$  P./ $\text{cm}^3$ ). La figure 13b représente la même variation au pH 4,7 (140-105-70  $\gamma$  P./ $\text{cm}^3$ ) et au pH 6 (60  $\gamma$  P./ $\text{cm}^3$ ).

1° Par application stricte de la relation précédente, on pourrait supposer que dans ces milieux,  $A_1$  se comporte comme un mélange d'au moins deux composants. Aux pH <sup>4</sup>4,7 et 6 ce deuxième composant éventuel ne précipiterait qu'à des concentrations ioniques élevées que nous ne pouvons atteindre par suite de la présence de méthanol. A pH 3,5 au contraire, ce composant hypothétique précipiterait à une force ionique apparente de 0,80 environ .

2° La figure 13b montre de plus que la solubilité à pH 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  $A_1$ .

3° Le pH influence anormalement la valeur de  $K'_S = \frac{\log S_1 - \log S_2}{\mu_1 - \mu_2}$  .

pH	$K'_S$
6	0,21
4,7	0,21
4	0,39
3,5	0,60

4° Il semblait à première vue qu'une séparation sur la base de ces figures devait être aisée. Si l'hypothèse énoncée ci-haut est exacte, un fractionnement opéré dans un domaine de force ionique pour lequel la constance de solubilité semble être obtenue, doit être hautement rentable. C'est pourquoi nous avons précipité  $A_1$  dans les conditions suivantes: pH 6;  $\mu$  1,9;  $\text{CH}_3\text{OH}$  20%; concentration en ribonucléate  $60 \gamma \text{ P./cm}^3$ . Le précipité obtenu dans ces conditions, de même que le produit obtenu à partir de la solution surnageante par précipitation à l'éthanol, sont remis en solution dans de l'eau, dialysés 24 heures contre de l'eau distillée et réajustés à une concentration telle que les nouvelles courbes  $\log S$  en fonction de  $\mu$  tracées à partir de ces deux fractions sont à nouveau réalisées pour une concentration de  $60 \gamma \text{ P./cm}^3$ . La figure 14 donne les courbes de  $A_{\text{in}}$  non fractionné, du précipité et du surnageant. Il apparaît immédiatement que l'hypothèse précédente n'est pas fondée. En effet, les courbes montrent que dans les conditions du fractionnement, la proportion relative des divers constituants est pratiquement la même dans la solution surnageante que dans le matériel original, tandis que le pourcentage en produits peu solubles est nettement plus élevé dans la phase solide que dans le matériel original. Cette propriété caractéristique d'une solution solide lorsque la quantité de phase solide est faible.

### B. Conclusions.

- 1° Les fractions  $A_1$  sont, de toute évidence, hétérogènes.
- 2° Les constituants de  $A_1$  forment des solutions solides à tous les pH examinés. Dans ces conditions, les courbes log S en fonction de  $\mu$  ne donnent pas les zones de précipitation des divers constituants de  $A_1$ . Elles montrent simplement qu'à un pH donné l'influence de la force ionique sur les solubilités à l'état pur des divers constituants est telle que le nombre total de molécules dans la phase solution diminue lorsque  $\mu$  augmente jusqu'à une certaine valeur de  $\mu$  à partir de laquelle cette diminution devient très faible. Une augmentation du pH - pour une force ionique donnée - a, de son côté, comme effet un enrichissement de la phase solution. A partir de pH 4,7, cet effet semble devenir nul. La variation de la constante apparente de Salting ou  $K'_S$ , en fonction du pH est le résultat de ces deux effets combinés. Ces nouvelles hypothèses sont confirmées par la figure 15 qui représente les courbes du type Kunitz-Northrop d'une fraction  $A_1$  aux pH 3,5 et 4,7 et à force ionique variable. Les courbes sont en effet caractéristiques des solutions solides. De plus, le pH est la force ionique agissent bien dans le sens indiqué ci-haut.
- 3° La même figure montre clairement que les deux fractions  $A_1$ , qui dans le précipitant de Chantrenne donnent des solubilités apparemment constantes mais dont la valeur extrapolée variait de 12 à 4  $\gamma$  P./cm<sup>3</sup>,

donnent deux courbes de solubilité nettement différentes dans les conditions expérimentales: pH 3,5,  $\mu$  1,7, CH<sub>3</sub>OH 20%. Ceci nous permet de certifier que la différence observée dans la "solubilité extrapolée" des deux fractions A<sub>1</sub> dans le précipitant de Chantrenne, est la manifestation d'une légère différence dans le degré d'hétérogénéité.

4° Nous avons vu que le précipitant de Chantrenne sélectionnait les différents composants du ribonucléate brut en deux groupes de substances: substances extrêmement solubles et substances très peu solubles. Dans le cas des précipitants CH<sub>3</sub>OH-NaCl, la différence de solubilité entre ces deux classes de substances est nettement amoindrie particulièrement au pH 3,5 ainsi que les figures 16a-b relatives aux différents nucléates bruts en témoignent. Par contre, ces différents systèmes montrent une sélectivité meilleure en ce qui concerne les substances de solubilité très faible. C'est ce qui nous a permis de mettre en évidence l'hétérogénéité de la fraction A<sub>1</sub>. Signalons à ce sujet que cette hétérogénéité ne peut être due à la présence d'une certaine quantité de la fraction B de Chantrenne à l'état d'impureté, car il ne serait évidemment pas possible de mettre cette impureté en évidence dans un milieu moins sélectif à son égard que le premier.

Hétérogénéité de produits non fractionnés vis à vis  
du précipitant (CH<sub>3</sub>OH 20 % - μ 1,7 - pH 3.5 )

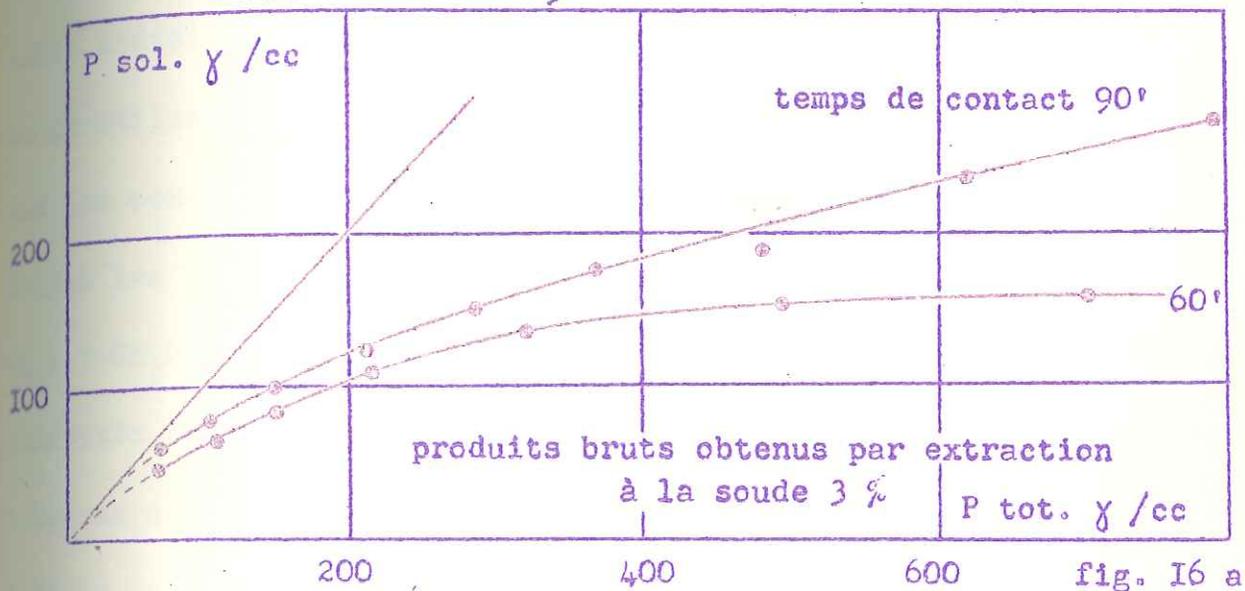


fig. 16 a

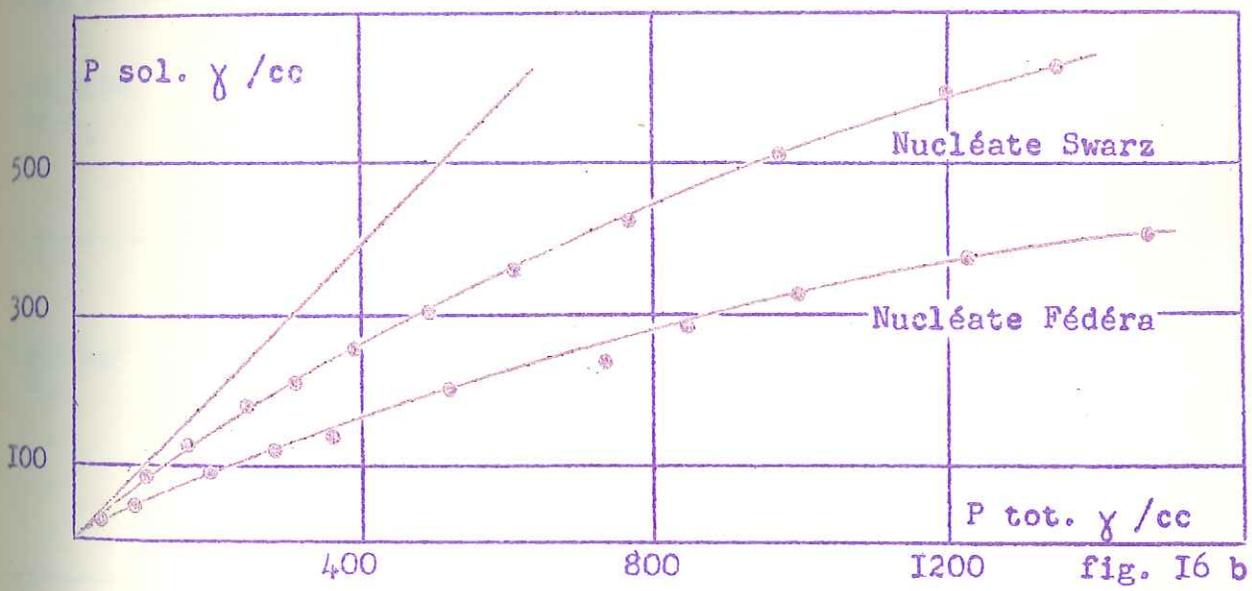


fig. 16 b

C. Influence du pH sur les conditions de fractionnement.

Dans les systèmes  $\text{CH}_3\text{OH}-\text{NaCl}$ , les solubilités des différents composants s'étalent sur une gamme dont l'étendue dépend très fortement du pH utilisé. Nous allons essayer de voir l'influence de cet effet sur les conditions de fractionnement. C'est pourquoi nous avons étudié les variations de solubilité observées aux pH 3,5 et 4,7 ( $\mu$  1,7- $\text{CH}_3\text{OH}$  20%) quand, à une quantité fixe  $A_1$ , on ajoute des quantités croissantes de "B" (obtenu par chauffage de  $A_1$  pendant 3 heures à  $100^\circ\text{C}$  à pH 9). Les résultats expérimentaux sont consignés dans le tableau suivant:

Quantité de $A_1$	Quantité de "B" ajoutée	Quantité totale soluble	Quantité totale soluble - [quantité de "B" ajoutée]	Quantité de "B" Quantité de " $A_1$ "
pH 3,5				
68 P/cm <sup>3</sup>	0 P/cm <sup>3</sup>	28 P/cm <sup>3</sup>	28 P/cm <sup>3</sup>	0
"	12,15	39,50	27,35	0,18
"	24,3	51,50	27,20	0,35
"	51,15	80	28,25	0,75
"	69	97,2	28,20	1,02
32	0	18	18	0
"	12,15	30,4	18,25	0,4
"	24,3	42,8	18,50	0,76
"	36,50	55	18,50	1,14
"	51,75	70,30	18,50	1,61
"	69	89	20	2,16

Quantité de A <sub>1</sub>	Quantité de "B" ajoutée	Quantité totale soluble	Quantité totale soluble moins quantité de "B" ajoutée	Quantité de "B" / Quantité de A <sub>1</sub>
----------------------------	-------------------------	-------------------------	---	--

pH 4,7

122 g P/cm <sup>3</sup>	0 g B/cm <sup>3</sup>	56 g P/cm <sup>3</sup>	56 g P/cm <sup>3</sup>	0
"	11,1	72,5	61,4	0,091
"	50	125	75	0,41
"	70	137,5	77,5	0,57
"	100	180	80	0,80
"	140	225	85	1,15
87,1	0	44	44	0
"	11,1	61,25	50,1	0,127
"	50	109	58,75	0,57
"	70	137,5	67,5	0,804
"	100	165	65	1,15
"	140	205	65	1,60
58,1	0	33	33	0
"	11,1	48,75	37,65	0,20
"	50	95	45	0,86
"	70	116,25	46,25	1,20
"	100	145	45	1,72
"	140	186,25	46,25	2,4

Nous avons tout d'abord examiné quelle était la représentation graphique la plus significative.

1°) S (solubilité totale) en fonction de  $F = \frac{B}{A}$  (x)

Nous savons que la solubilité  $S_d$  du point d'apparition de la phase solide, et la solubilité  $S_f$  de la partie de la courbe correspondant à une quantité de phase solide infinie augmentent lorsque  $F = \frac{B}{A}$  augmente.

On peut montrer que, lorsque F varie de zéro à l'infini,  $S_d$  et  $S_f$  initialement égales à a tendent asymptotiquement ( $S_d$  étant à chaque instant plus petit que  $S_f$ ) vers a.c (solubilité de B).

Les valeurs de S (quantité totale soluble) en fonction de  $\frac{"B"}{A_1}$  renseignées dans le tableau précédent montrent un comportement similaire.

2°) S-B en fonction de F.

Nous avons vu également que le rapport  $\frac{A}{B}$  dans la phase solide est inversement proportionnel à F. Il s'en suit que par application de la loi de Raoult (page 30), le nombre de moles de A contenues dans la phase solution va en diminuant lorsque F augmente.

Si donc, pour chaque valeur de "B" ajoutée à une quantité constante de  $A_1$ , on soustrait de la quantité soluble totale S (quantité de  $A_1$

(x). Pour les notations, voir pages 26-31  
- 68 -

soluble + quantité de "B" restant en solution) la quantité de "B" ajoutée, la valeur ainsi obtenue ( $S - \text{"B"}_{\text{ajouté}}$ ) ira en diminuant lorsque  $\frac{\text{"B"}}{A_1}$  augmente.

La figure 20 montre un comportement totalement différent. L'interprétation n'est possible qu'en admettant un effet de solubilisation des molécules de  $A_1$  par des molécules "B". L'intensité de cet effet dépend du  $p^H$  et diminue lorsque le  $p^H$  diminue.

Le graphique 20 a été obtenu en dosant les produits solubles en quantités pondérables alors que, dans le raisonnement théorique, A, B, a, c, et S sont exprimés en moles.

On peut toutefois montrer que la signification des résultats expérimentaux n'en est pas affectée. En effet : (x)

La relation entre  $[S - \text{"B"}]_{\text{expérimental}}$  et  $[S - \text{"B"}]_{\text{théorique}}$  est :

$$[S - \text{"B"}]_{\text{exper.}} = \text{P.M. "B"} \left[ k N A_1 \text{sol.} + N \text{"B"} \text{sol.} - N \text{"B"}_{\text{tot}} \right]$$

$$\text{avec } k = \frac{\text{P.M. } A_1}{\text{P.M. "B"}} > 1$$

$$\text{et } N A_1 \text{sol.} + N \text{"B"} \text{sol.} - N \text{"B"}_{\text{tot.}} = [S - \text{"B"}]_{\text{théorique}}$$

De même, la relation entre  $\frac{\text{"B"}}{A_1}_{\text{exper.}}$  et  $\frac{\text{"B}}{A_1}_{\text{théor.}}$  est :

$$\frac{\text{"B}}{A_1}_{\text{exper.}} = \frac{\text{"B}}{A_1}_{\text{théor.}} \times \frac{\text{P.M. "B"}}{\text{P.M. } A_1}$$

(x)  $N A_1$  et  $N \text{"B"}$  = nombre de moles de  $A_1$  et "B"

Variation expérimentale de  $S - "B_{II}"$   
 en fonction de  $"B_{II}"$

précipitant :  $CH_3OH$  20% -  $\mu$ : 1.7

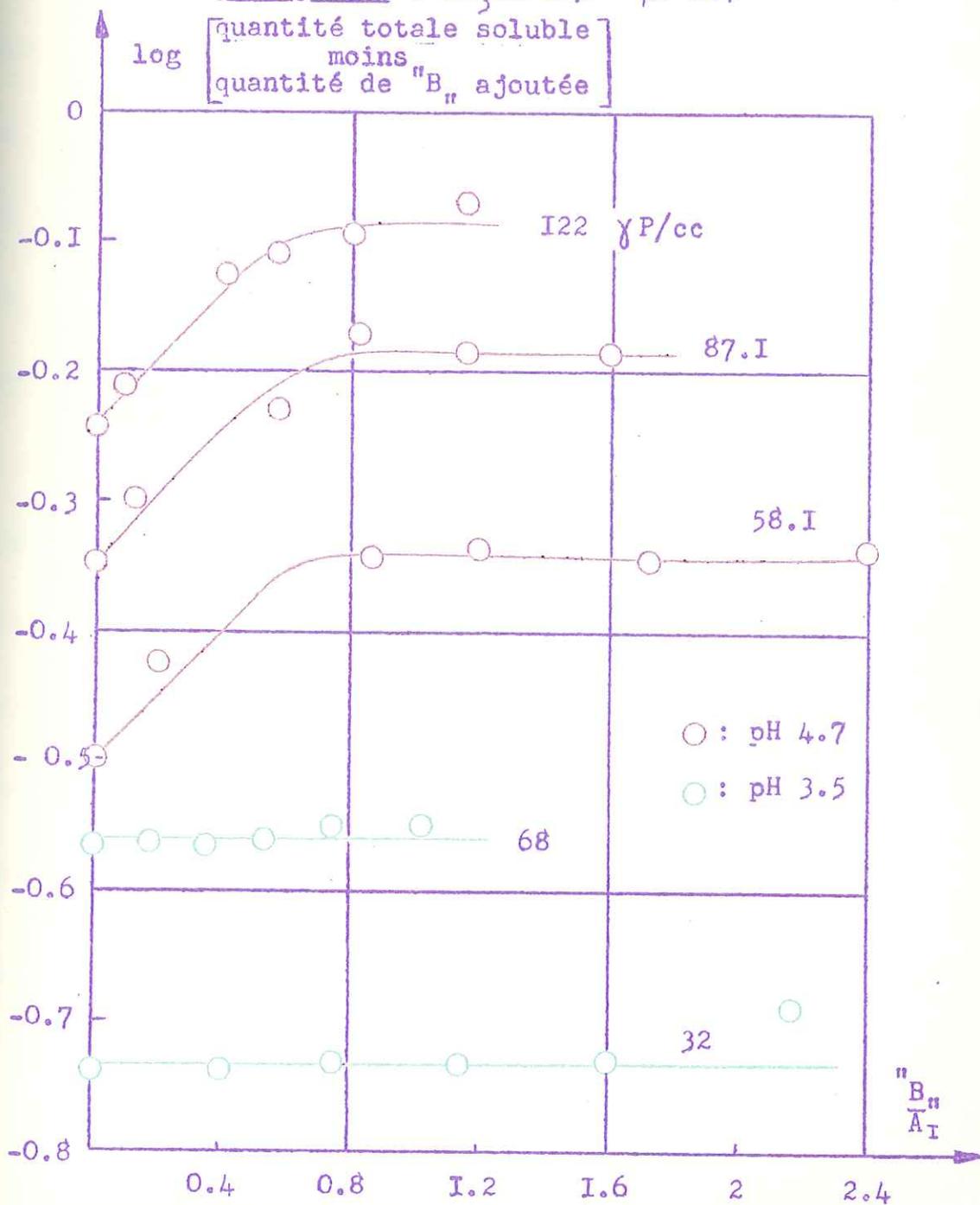


fig. 20

Les constantes P.M. "B" et  $\frac{\text{P.M. "B"}}{\text{P.M. } A_1}$  modifient uniquement les échelles des coordonnées. On voit que pour un choix particulier d'échelles, les points expérimentaux sont supérieurs aux points théoriques de  $\left[ NA_1 \text{ sol.} \times (k - 1) \right]$ . Or comme nous venons de le voir, la valeur de  $NA_1 \text{ sol.}$  diminue lorsque F augmente. La diminution de  $\left[ S - \text{"B"} \right]$  en fonction de  $\frac{\text{"B"}}{A_1}$  est donc accentuée lorsque S, "B", et  $A_1$  sont exprimés en quantités pondérables.

Remarque.

Les graphiques 12 a-b sont relatifs à l'influence de "B" sur la solubilité de  $A_1$  dans le milieu de Chantrenne.

La figure 12a montre que pour les faibles valeurs de  $\frac{\text{"B"}}{A_1}$ , la solubilité totale exprimée en quantités pondérables reste constante.

Il serait toutefois hasardeux de conclure à une diminution de la solubilité de  $A_1$  par "B". En effet, on peut montrer que :

$$S_{\text{exper.}} = \text{P.M. "B"} \times \left[ k NA_1 \text{ sol.} + N \text{"B"} \text{ sol.} \right]$$

$$\text{avec } k = \frac{\text{P.M. } A_1}{\text{P.M. "B"}} > 1 \text{ et } \left[ NA_1 \text{ sol.} + N \text{"B"} \text{ sol.} \right] = S \text{ theor.}$$

$$\text{De même : } \frac{\text{"B"}}{A_1} \text{ exper.} = \frac{\text{"B"}}{A_1} \text{ theor.} \times \frac{\text{P.M. "B"}}{\text{P.M. } A_1}$$

On voit que, pour un choix déterminé des échelles <sup>des</sup> coordonnées, les points expérimentaux sont également supérieurs aux points

théoriques d'une valeur égale à  $\left[ NA_1 \text{ sol. } \times (k - 1) \right]$ . Or,  $NA_1 \text{ sol.}$  diminue lorsque  $\frac{''B''}{A_1}$  augmente. Il pourrait donc se faire que  $\left[ NA_1 \text{ sol. } \times (k - 1) \right]$  pour  $\frac{''B''}{A_1} = 0$ , moins  $\left[ NA_1 \text{ sol. } \times (k - 1) \right]$  pour  $\frac{''B''}{A_1} = 0,30$  compense l'augmentation correspondante de S théorique. Au contraire, la figure 12d montre clairement que la solubilité de  $A_1$  augmente lorsque  $\frac{''B''}{A_1}$  est supérieur à 0,50.

#### D. Fractionnement de la fraction $A_1$ .

D'après la discussion qui précède, il semble qu'en principe, il est préférable de travailler à pH 3,5. En effet, l'action solubilisante de "B" est moins intense à ce pH qu'à des pH plus élevés. De plus, le système "CH<sub>3</sub>OH 20%, NaCl 1,7 pH 3,5" semble ne pas exercer d'action dégradante, car nous n'avons pas constaté d'augmentation de solubilité même après 72 heures de contact. (x)

Par fractionnements répétés à l'aide de ce milieu, effectués dans des conditions expérimentales identiques à celles adoptées pour le tracé des courbes de solubilité, nous avons obtenu une fraction

(x) Cette stabilité a été vérifiée à partir de la fraction  $A_1'$  (voir plus loin)

$A'_1$  de solubilité constante à partir d'une concentration totale d'environ  $10 \gamma P/cm^3$  et de "solubilité extrapolée" égale à  $5 \gamma P./cm^3$  environ (figures 21a-b-c) (x)

Toutefois, cette faible solubilité ne permet pas à nouveau de tracer une courbe complète de solubilité. Ce nouveau précipitant présente, à ce point de vue, le même inconvénient que celui de Chantrenne.

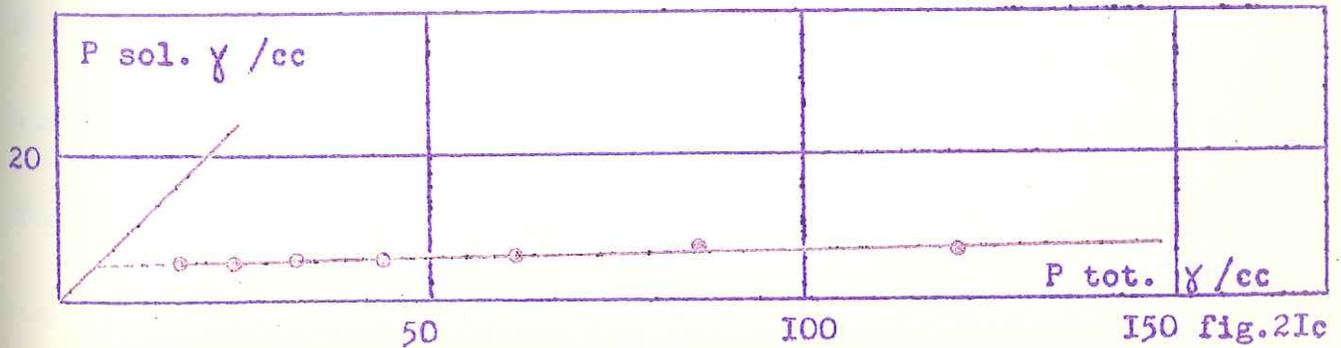
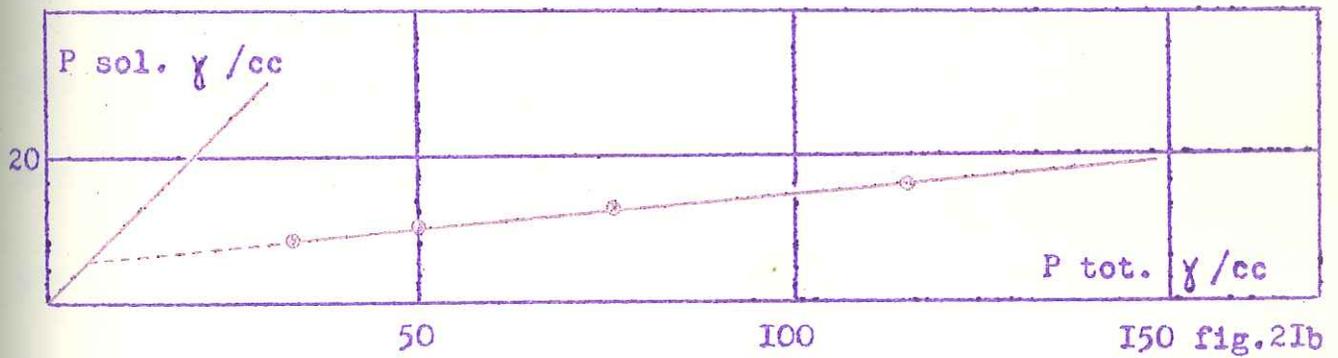
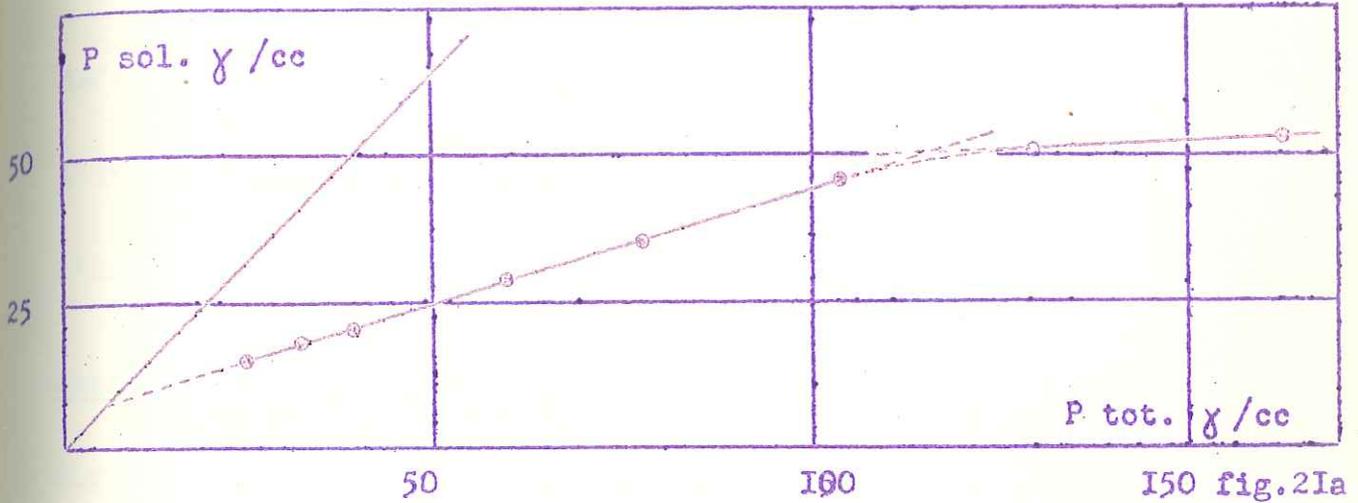
Or, nous disposons avec ce milieu, de la possibilité de modifier deux facteurs :  $\mu$  et le pourcentage en méthanol. Nous avons donc cherché à modifier ces variables de façon à augmenter la solubilité de  $A'_1$ . Il résulte de ces essais qu'il est impossible d'isoler une fraction de solubilité constante dans tous les milieux étudiés.

En effet, si nous analysons cette fraction  $A'_1$  en traçant les courbes de solubilité à force ionique constante (1,7) mais en modifiant pour chaque courbe la concentration en méthanol (20 à 0%),

(X) L'obtention de cette fraction  $A'_1$  à un haut degré de pureté apparent est pénible. Mais nous avons pu simplifier le procédé en introduisant le précipitant graduellement dans la solution de nucléate par dialyse (voir partie expérimentale) .

Fractionnement de  $A_I$  - Obtention de  $A'_I$

précipitant :  $CH_3OH$  20 % -  $\mu$  1.7 - pH 3.5



Nous obtenons la série de courbes de la figure 22a. De même, en conservant cette fois la concentration en méthanol 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  $A'_1$  ( figure 22b ). De plus, on observera l'insolubilité presque totale dans ces différents milieux lorsque l'on descend aux très faibles quantités de phase solide.

Remarque.

Signalons pour terminer que nous avons essayé encore d'autres systèmes solvant-précipitant. Le seul examen des courbes de solubilité obtenues ou une étude plus poussée des conditions de fractionnement offertes par chacun de ces systèmes, sont chaque fois caractéristiques d'une solution solide. C'est ainsi que nous avons examiné l'effet de Salting Out par  $MgSO_4$  saturé ou demi-saturé sur la fraction  $A'_1$  à différents pH (pH 3,1 ; tampon glycine- $H_2SO_4$  ; pH 3,5 : tampon acétate ; pH 4,7 : tampon acétate ; pH 7,3 : tampon phosphate ).

Nous donnons dans le graphique 22c les courbes relatives au tampon acétate pH 3,5. Les autres courbes sont tout à fait similaires et nous avons remarqué que l'influence du pH sur la solubilité de la

### Hétérogénéité de A'<sub>I</sub>

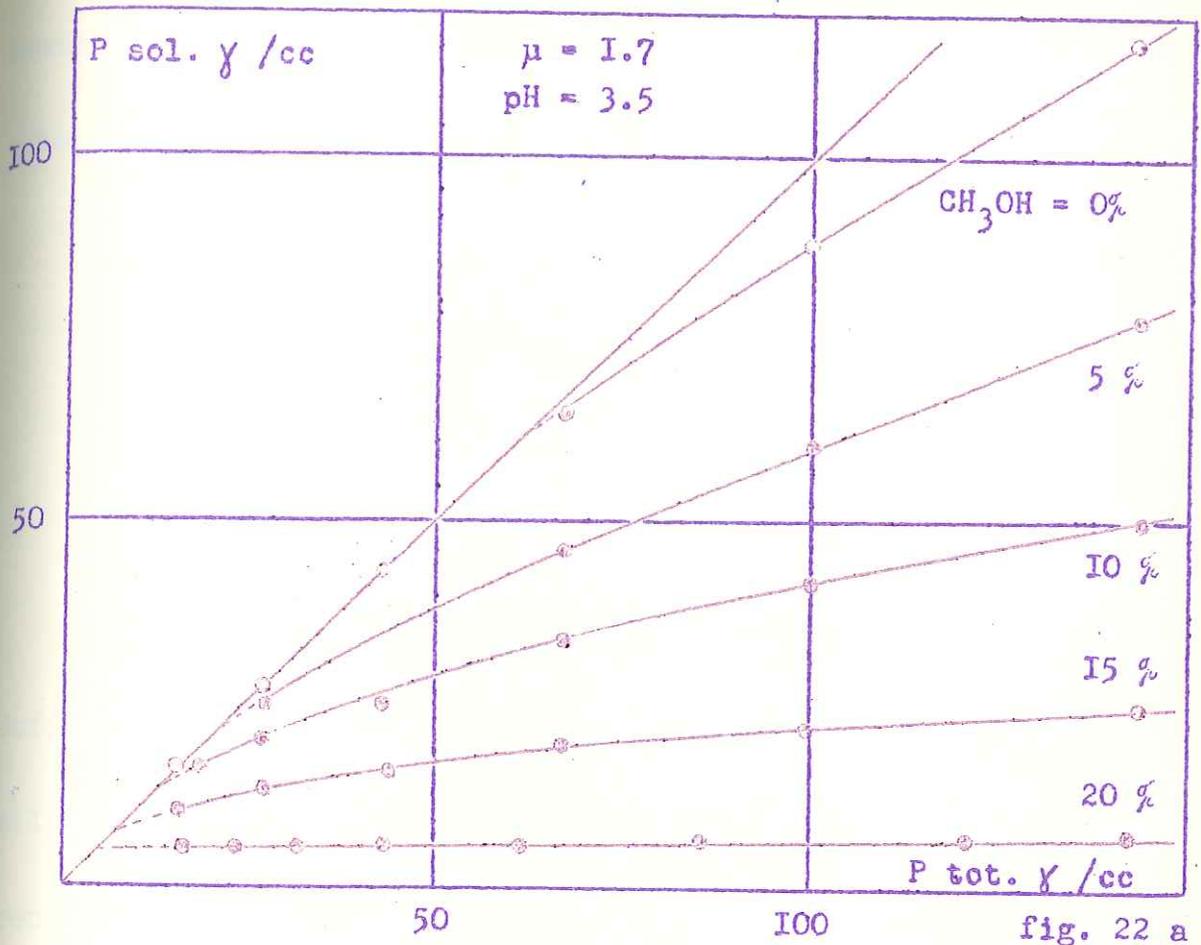


fig. 22 a

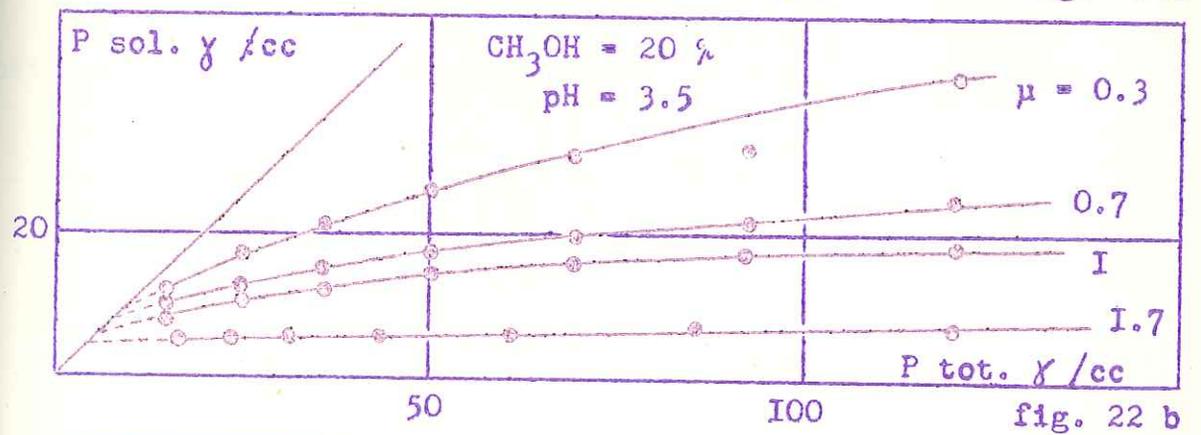
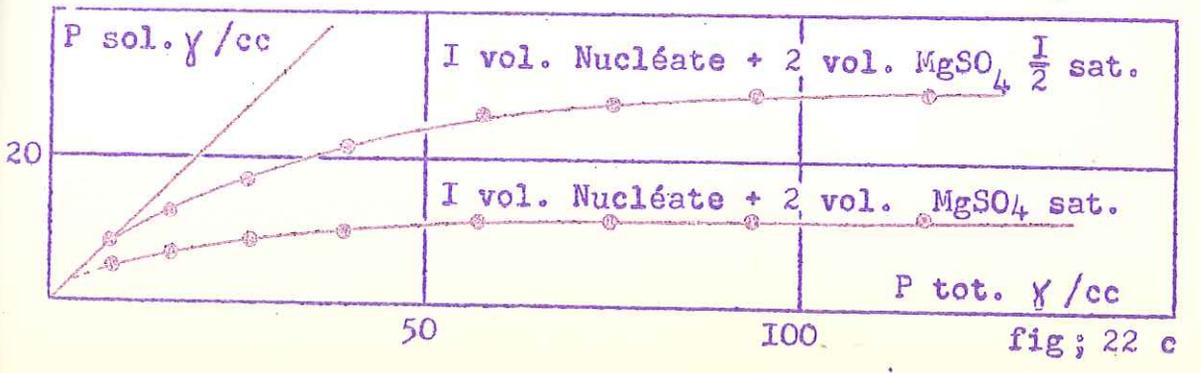


fig. 22 b



fig; 22 c

fraction  $A'_1$  est cette fois très minime. C'est ainsi que pour une concentration totale de  $130 \mu\text{P./cm}^3$  nous obtenons, en employant comme précipitant le  $\text{M}_g\text{SO}_4$  demi-saturé, les solubilités suivantes :

pH	tampon	$\mu$	P.sol.en $\gamma/\text{cm}^3$
3,1	glycine- $\text{H}_2\text{SO}_4$	0,05	17
3,5	acétate	0,05	29
4,7	acétate	0,05	29
7	phosphate	0,05	25

Enfin, le comportement de  $A'_1$  est également identique dans d'autres milieux : " Electrolytes - solvants organiques " de natures différentes ( Electrolytes :  $\text{NaCl-M}_g\text{SO}_4$ -phosphate ; solvants organiques : méthanol-éthanol-dioxane ).

#### IV. CONCLUSIONS.

- 1°) L'hétérogénéité du ribonucléate brut et des différentes fractions obtenues se manifeste par des courbes de solubilité caractéristiques des solutions solides, dans un grand nombre de systèmes solvant-précipitant de nature et de pH très variables.
- 2°) Nous avons montré la nature des écarts à la loi de Raoult que l'une de ces fractions présentait dans quelques uns de ces systèmes. Les interactions entre les différentes espèces moléculaires auxquelles ces écarts sont dus, sont d'autant moins importantes que le pH est faible.
- 3°) Nous avons pratiqué différents fractionnements en opérant toujours aux faibles quantités de phase solide. 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, on met en évidence l'hétérogénéité de la fraction. Il est donc vraisemblable que l'acide ribonucléique de levure est polydispersé

tout au moins lorsque cette substance a été isolée à partir de ce microorganisme par la soude.

Nous avons maintenant à vérifier cette hypothèse :

- 1) en élaborant tout d'abord une méthode pratique de fractionnement qui permette d'obtenir des fractions différentes en quantités suffisantes et
- 2) en déterminant ensuite la nature de cette polydispersité éventuelle.

## V. TECHNIQUES EXPERIMENTALES.

=====

### A. Courbes de solubilité.

1°) 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 3000 tours/minute. Les tubes d'une capacité de 10 cm<sup>3</sup> sont fixés dans les larges godets (500 cm<sup>3</sup>) 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 sulfobolybdique (41) sur une prise d'essai contenant de 5 à 50  $\gamma$  P. A la prise d'essai on ajoute 1 cm<sup>3</sup> de réactif sulfomolybdique, 2 cm<sup>2</sup> de réactif de sulfite-hydroquinone et on complète à 10 cm<sup>3</sup>.

Après 30 minutes de contact, on évalue la coloration bleue au spectrophotomètre de Beckman (640 m $\mu$ ) (x)

- (x) Composition des réactifs : 1) réactif sulfomolybdique : 25 grs de molybdate sodique sont dissous dans 300 cm<sup>3</sup> d'eau. On ajoute 75 cm<sup>3</sup> d'acide sulfurique pour analyse. On complète à 500 cm<sup>3</sup> avec de l'eau. Ce réactif peut<sup>se</sup> conserver plusieurs mois en glacière ;  
2) réactif sulfite-hydroquinone : On dissout 10 grs de sulfite de soude et 0,5 grs d'hydroquinone dans de l'eau, et on complète à 100 cm<sup>3</sup>. Ce réactif doit être préparé extemporanément.

2°) Les caractéristiques des précipitants à force ionique et pourcentage en méthanol variables, se rapportent au volume final : quatre volumes du précipitant + 1 volume de la solution de nucléate à précipiter. La force ionique est donc apparente puisque nous ne tenons pas compte de l'influence du méthanol sur l'ionisation des sels.

Les teneurs en P. total et soluble sont également exprimées en  $\gamma$  par  $\text{cm}^3$  de volume final. Dans ce système, les pH renseignés sont ceux que donnerait un tampon acide acétique-acétate de sodium  $\mu$  0,10 établi d'après le monogramme de Boyd (42) pour un volume d'eau égal à la somme des volumes : précipitant + solution de nucléate.

C'est ainsi que le précipitant "pH 3,5,  $\mu$  1,7,  $\text{CH}_3\text{OH}$  20%" est préparé de la façon suivante : dans un flacon jaugé de 500  $\text{cm}^3$ , on introduit 125  $\text{cm}^3$  de méthanol, 58,45 grs de NaCl, 15,6  $\text{cm}^3$  d'acétate sodique 4 M, 81,25  $\text{cm}^3$  d'acide acétique 10 M et on complète à 500  $\text{cm}^3$ .

La courbe de solubilité est établie de la manière suivante : dans une série de tubes contenant tous 2  $\text{cm}^3$  de précipitant refroidi à 0°C, on ajoute 0,5  $\text{cm}^3$  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 $\mu\text{m}$ ) (43) (x)

Signalons que pour éviter les erreurs de dilution, nous déterminons également analytiquement le P. total pour chacun des points de la courbe de solubilité.

(x) 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.

Nous avons en effet vérifié que le nucléate Swartz, une fraction  $A_1$  et une fraction "B" présentaient tous un maximum d'absorption à 258  $m\mu$ , mais un coefficient d'absorption légèrement différent (figure 23a). Les courbes d'étalonnage ont été établies à l'aide de ces échantillons (figure 23b) ; mais les résultats analytiques sont donnés en fonction de la courbe relative à la fraction  $A_1$ . Les courbes de solubilité du graphique 16b ont toutefois été établies en se rapportant à la courbe d'étalonnage donnée par le nucléate Swartz.

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 pH apparent de 3,5 par addition d'un peu d'acide sulfurique dilué. A 2 volumes de ce précipitant éventuellement dilué une fois par un égal volume d'eau (pH 3,5), on ajoute un volume de solution de nucléate tamponnée à pH 3,5 par le mélange HAc-Na Ac de force ionique 0,05. La température est toujours de 0°C. Les essais renseignés aux autres pH ont été réalisés de façon semblable. Le précipitant et la solution de nucléate à précipiter sont tamponnés chacun de leur côté au pH désiré.

#### B. 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 (obtention de  $A_1$ ) soit avec le nouveau précipitant (méthanol, HAc-Na Ac- NaCl).

Dans le dernier cas, on ajoute un volume de solution de la fraction

Courbe d'absorption  
( épaisseur:10 mm)

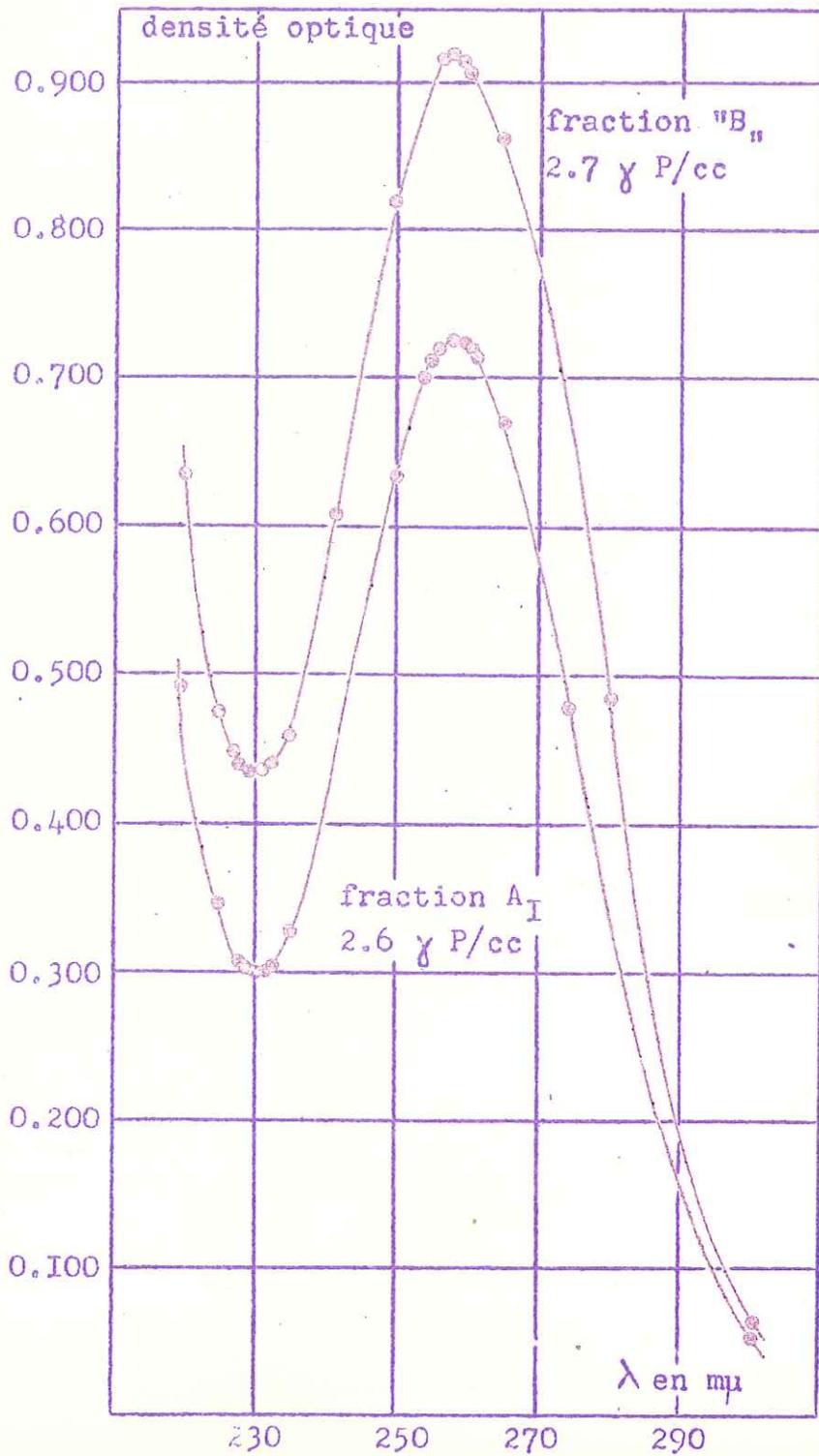


fig. 23 a

Densité optique à 258 m $\mu$   
en fonction du P minéralisable

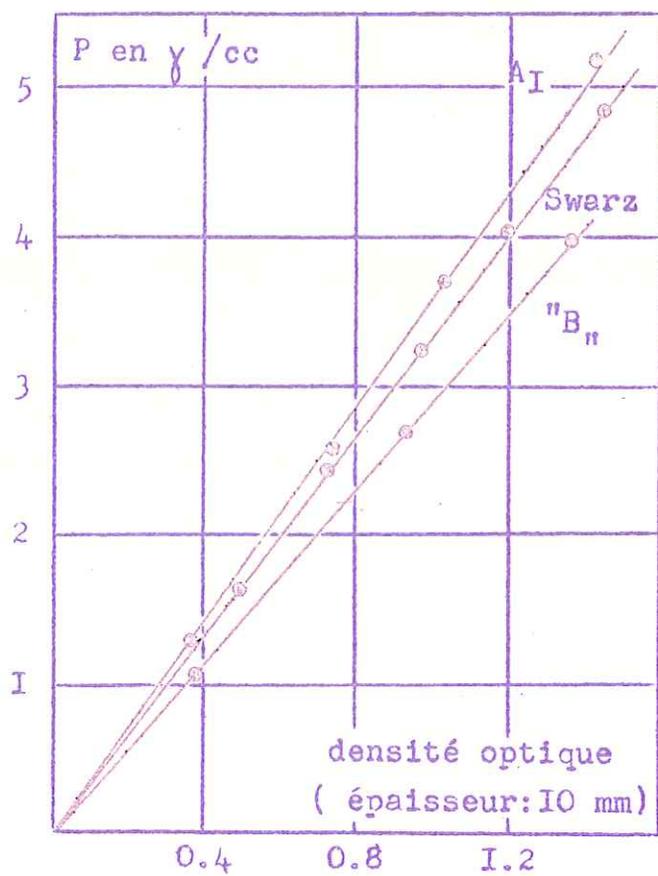


fig. 23 b

A<sub>1</sub> ou de nucléate brut déprotéinéisé en concentration convenable, à quatre volumes de précipitant refroidi à 0°C.

Dans le cas du nucléate brut, on choisit arbitrairement une concentration de 300 à 200 γP./cm<sup>3</sup> pour la première et la deuxième précipitations. Pour les précipitations ultérieures et dans le cas du fractionnement du produit A<sub>1</sub> la concentration correspond à une concentration en phosphore par cm<sup>3</sup> inférieure aux concentrations pour lesquelles la variation de la solubilité, dans la courbe de solubilité correspondante, est faible.

C'est ainsi que la fraction A'<sub>1</sub> a été obtenue par quatre précipitations successives, utilisant chaque fois un volume de nucléate et quatre volumes de mélange méthanol 20%, pH 3,5, 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 (x), le produit obtenu, après la deuxième précipitation, donne une courbe <sup>de solubilité</sup> notablement plus aplatie.

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 précipitation par mélange.

L'équilibrage est toujours réalisé à 0°C.

La floculation s'amorce rapidement et l'équilibre est généralement

(x) Ce mélange est interprétable par les courbes 22 a-b. Le faible pourcentage de méthanol et d'électrolytes dont le précipité est imprégné donne un milieu solvant-précipitant où la solubilité n'est pas totale.

atteint après 5 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.

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

Le produit ainsi obtenu donne une courbe identique ou très semblable à celle représentée dans la figure 21c.

A partir de 97000  $\gamma$  de phosphore d'une fraction  $A_1$ , on obtient après deux précipitations 52.000  $\gamma$  de phosphore; et après les deux équilibrages, on obtient finalement 35.000  $\gamma$  de phosphore de la fraction  $A'_1$ . 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  $A'_1$  de solubilité pratiquement constante, on ajoute un égal volume d'éthanol, le produit obtenu après lavage à l'alcool et séchage sous vide présente une solubilité légèrement supérieure. 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 pH acide de 3,5-4. Si l'on désire un échantillon donnant à l'eau un pH moins acide, on met le dernier culot en solution dans un tampon phosphate pH 7,  $\mu$  0,05. On dialyse, congèle, et sèche. Le produit ainsi obtenu est extrêmement léger, parfaitement blanc, d'aspect floconneux et nacré et donne des solutions aqueuses de pH  $\geq$  6.

CHAPITRE IV.  
=====

FRACTIONNEMENT DE L'ACIDE RIBONUCLEIQUE.

(EXTRACTION FRACTIONNEE).

## I. PRINCIPE.

Le fractionnement d'une substance polydisperse dont les divers constituants forment des solutions solides présentant des écarts importants à la loi de Raoult est un problème très complexe.

La théorie du fractionnement des polymères amorphes (voir thèse de A. Oth) (44) a été établie thermodynamiquement par Schulz (45) d'abord et élargie ensuite par Huggins (46), Flory (47) et Scott (48).

Le principe de la méthode est le suivant: si à une solution d'un polymère constitué d'espèces macromoléculaires de degré de polymérisation différent, on ajoute un non solvant, il existe une valeur critique du rapport  $\gamma = \frac{\text{volume du précipitant}}{\text{volume total}}$  pour lequel le système se sépare en deux phases: une phase solution et une phase solide qui dans ce cas est une phase gel typique.

Or nous avons vu page 36 que la répartition du polymère dans les deux phases est fonction du poids moléculaire; le coefficient de partage est tel que le précipité est plus riche en espèces de haut poids moléculaire (espèces peu soluble). Après séparation de cette phase solide, on ajoute à nouveau une certaine quantité de non solvant de façon à atteindre le  $\gamma$  critique correspondant à la nouvelle

distribution.

Il est à remarquer que la valeur du  $\gamma$  critique ne correspond pas au  $\gamma$  critique de l'espèce moléculaire de poids moléculaire le plus élevé. Rappelons que le  $\gamma$  critique relatif à une espèce moléculaire déterminée est la valeur de  $\gamma$  pour laquelle la valeur correspondante de  $\int$  dans la formule:

$$\Delta F = - [RTV + RT \left( \frac{1}{2} - \int \right) V^2] \quad (\text{voir page 35})$$

produit l'apparition d'un  $\Delta F$  minimum (x).

Au contraire, le  $\gamma$  critique pour un système polydisperse dépend de la courbe de distribution de ce système,  $\int$  critique étant proportionnel à une grandeur légèrement supérieur à la moyenne en poids du poids moléculaire (49). Les espèces de faible poids moléculaire augmentent donc légèrement la solubilité des espèces de poids moléculaire élevé.

On voit que les fractions obtenues par cette méthode doivent présenter des courbes de distribution se chevauchant considérablement.

Il est évident que cet effet sera beaucoup plus intense si la valeur de  $\gamma$  critique augmente anormalement par suite d'interactions moléculaires intenses semblables à celles que nous avons mis en évidence dans le cas de l'acide ribonucléique.

(x)  $\int$  crit. et  $\gamma$  crit. sont d'autant plus élevés que le P.M. est faible.

C'est pourquoi nous avons utilisé la méthode d'extraction fractionnée imaginée par V. Desreux (50-51-52).

Le polymère est dispersé sur une substance inerte et équilibré par une série de systèmes solvant-précipitant dont le pouvoir solvant initialement très faible va en augmentant (le  $\gamma$  des liquides extracteurs varie de 1 à 0). Le coefficient de partage entre les deux phases s'établit donc en faveur d'un enrichissement de la phase solution en molécules d'abord très solubles ( $\gamma \leq 1$ ) puis progressivement de moins en moins solubles.

Ce procédé présente l'avantage d'éliminer les molécules solubles et par conséquent, tend à supprimer les causes de perturbation.

Remarquons de plus que lors de l'écoulement des liquides extracteurs sur la phase solide on obtient vraisemblablement pas l'équilibre entre les deux phases. La vitesse de diffusion joue ainsi un rôle important dans le fractionnement. La vitesse de diffusion étant plus grande pour les molécules de faible poids moléculaire, il s'en suit un enrichissement meilleur en molécules solubles dans la phase solution.

## II. TECHNIQUES EXPERIMENTALES.

La substance inerte que nous avons utilisée est du sable lavé et calciné, moulu et tamisé à 100 meshs. Après ce traitement, nous le relevons à l'eau additionnée de détergent, puis abondamment à l'eau distillée, et enfin à l'alcool. Pour disperser le nucléate, on dissout une certaine quantité de celui-ci dans un minimum d'eau. La solution obtenue est versée sur la quantité voulue de sable sec. On homogénéise au mortier. Enfin le sable est étendu en mince couche et séché dans un courant d'air froid. On vérifie l'homogénéité de la dispersion en prélevant des parties adéquates de sable que l'on met en suspension dans un volume d'eau connu. On mesure l'absorption à  $258 \text{ m}\mu$ . Le sable ainsi préparé est versé par petites portions dans une colonne en verre thermostatisée, à la partie inférieure de laquelle on a soudé un fil<sup>tre</sup> en verre poreux. Après chaque addition de sable on ajoute quelques  $\text{cm}^3$  de précipitant refroidi à la température de l'extraction, et on chasse les bulles d'air.

### A. Système discontinu.

Lorsque toute la quantité de sable est ajoutée, on relie la partie supérieure de la colonne, au moyen d'un robinet à trois voies, à une ampoule à décanter servant à contenir les différents liquides extracteurs. On laisse couler chacun de ceux-ci à une vitesse suffisamment faible que l'on règle au moyen d'un robinet à fuite soudé à la base de la colonne.

On recueille la phase solution correspondant à un  $\gamma$  donné et on suit

au spectrophotomètre la variation de la solubilité en fonction du volume écoulé. Lorsque la solubilité est devenue très faible, on purge l'ampoule à décanter et on la remplit à nouveau du système de  $\gamma$  inférieur.

Le tracé des courbes d'extraction est réalisé en portant la somme des pourcentages extraits en fonction du  $\gamma$ , celui-ci variant de 1 (précipitant pur) à 0 (solvant pur).

### B. Système continu.

Dans l'appareil d'extraction fractionnée analytique imaginé par V. Desreux, l'ampoule à décanter de l'appareil précédemment décrit sert à homogénéiser des volumes continuellement décroissants de précipitant et continuellement croissants de solvant. Cette ampoule est en effet reliée à un système d'alimentation constitué de deux cylindres à l'intérieur desquels est suspendu un cône dont la base est fixée à la partie supérieure du cylindre contenant le solvant, et à la partie inférieure du cylindre contenant le précipitant.

La variation du  $\gamma$  en fonction du niveau des liquides dans les cylindres, ou en fonction du volume total écoulé est représentée dans la figure 24. La nature du précipitant utilisé pour cet étalonnage est:  $\text{CH}_3\text{OH}$  40% -  $\mu$  1,4 (NaCl); pH 3,5 (acétate  $\mu$  0,10). Le solvant est un tampon pH 3,5  $\mu$  0,10.

L'emploi de cette méthode pose toutefois un problème d'application très délicat. Il faut en effet, que malgré la variation continue des  $\gamma$  extracteurs, l'élimination des espèces moléculaires de solubilité élevée puisse être assurée. Nous verrons que cette condition n'est pas réalisée. La méthode d'extraction en système continu, ne doit être considérée que comme un essai d'orientation. A ce point de vue elle donne des renseignements très précieux.

Variation du  $\gamma$  dans le procédé  
d'extraction fractionnée continue

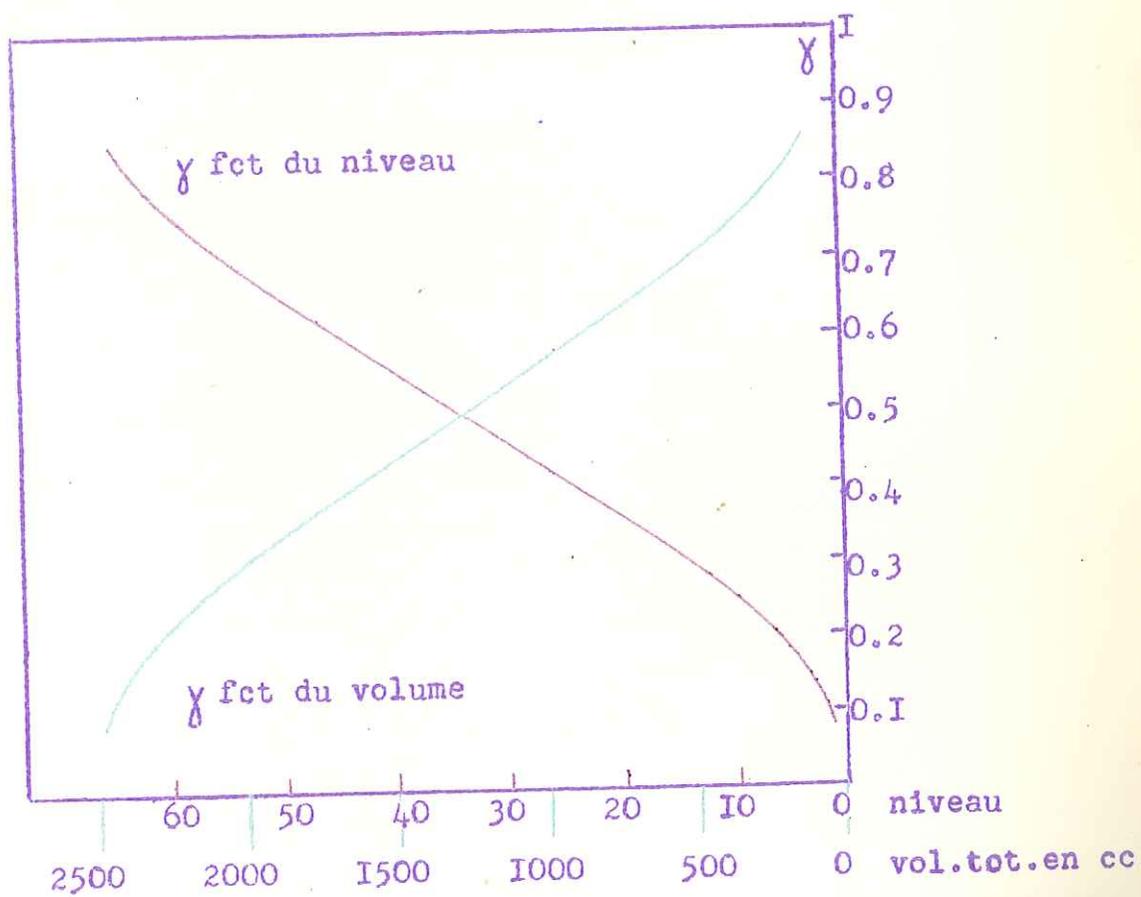


fig. 24

### III. RESULTATS EXPERIMENTAUX.

#### A. Extraction en système continu à pH 3,5.

1° Nous nous sommes tout d'abord placés dans les conditions de pH pour lesquelles les écarts à la loi de Raoult paraissent être faibles.

Le graphique 25 donne l'allure de la courbe d'extraction lorsque celle-ci est réalisée dans les conditions suivantes:

taux de dispersion du nucléate: 0,5 grs. pour 100 grs. de sable.

précipitant:  $\text{CH}_3\text{OH}$  40%,  $\mu$  (NaCl) 1,4; tampon acétate pH 3,5  $\mu$  0,10.

solvant: tampon acétate pH 3,5  $\mu$  0,10.

Température: 10°C.

vitesse d'écoulement: 100  $\text{cm}^3$  en 130 minutes.

100  $\text{cm}^3$  en 50 minutes.

fin d'extraction en système continu:  $\gamma$  0,15 (voir courbe d'étalonnage).

Après extraction, on fait passer du solvant sur la colonne jusqu'à

ce que la solubilité soit devenue suffisamment faible. Le résidu

de l'extraction est enfin retiré de la colonne et mis en suspension

dans 100  $\text{cm}^3$  du tampon pH 3,5. Après 12 heures de contact en chambre

froide, la solubilité est de 2 à 3  $\gamma$  P./ $\text{cm}^3$ . Nous constatons donc

un déficit en nucléate extrait de l'ordre de 40%. Ce résultat est

compatible avec une courbe de solubilité du chapitre IV. Il est en

effet logique d'admettre que la fraction  $A_1$  fractionnée jusqu'à homogénéité apparente dans le système  $\text{CH}_3\text{OH}$  0%  $\mu$  1,7 pH 3,5 (figure 22a) manifeste à nouveau son hétérogénéité dans le même système où la force ionique serait réduite à celle du tampon acétate.

Imaginons un dernier fractionnement dans ce système  $\text{CH}_3\text{OH}$  0% pH 3,5  $\mu$  0,10. On arrive ainsi à concevoir l'existence d'une fraction insoluble dans l'eau à pH 3,5.

Le rendement en fraction insoluble à pH 3,5 dépend de la vitesse d'écoulement lors de l'extraction. Or la figure 25 montre qu'à  $\gamma$  0,15, la  $\Sigma$  % extrait est pratiquement la même (25%) et il est évident que les phases solides après extraction - en quantité pondérale ~~est~~ <sup>est</sup> presque identique - doivent présenter une composition assez semblable. Il faut donc en conclure qu'une faible variation dans la composition a une profonde répercussion sur la solubilité.

Nous avons vérifié cette hypothèse par d'autres faits expérimentaux:

a) Après extraction continue de  $\gamma$  1 à  $\gamma$  0,5 et vérification de l'insolubilité du résidu dans le système  $\gamma$  0,5, le pourcentage de produit extrait s'élève à 12 environ. Si par contre, on extrait directement le nucléate brut à ce  $\gamma$  0,5 jusqu'à ce que la solubilité

Extraction continue à pH 3.5

précipitant :  $\text{CH}_3\text{OH}$  : 40% -  $\mu$  : 1.5 - pH : 3.5

solvant :  $\text{CH}_3\text{OH}$  : 0% -  $\mu$  : 0.1 - pH : 3.5

taux de dispersion : 0.5gr/100grs de sable

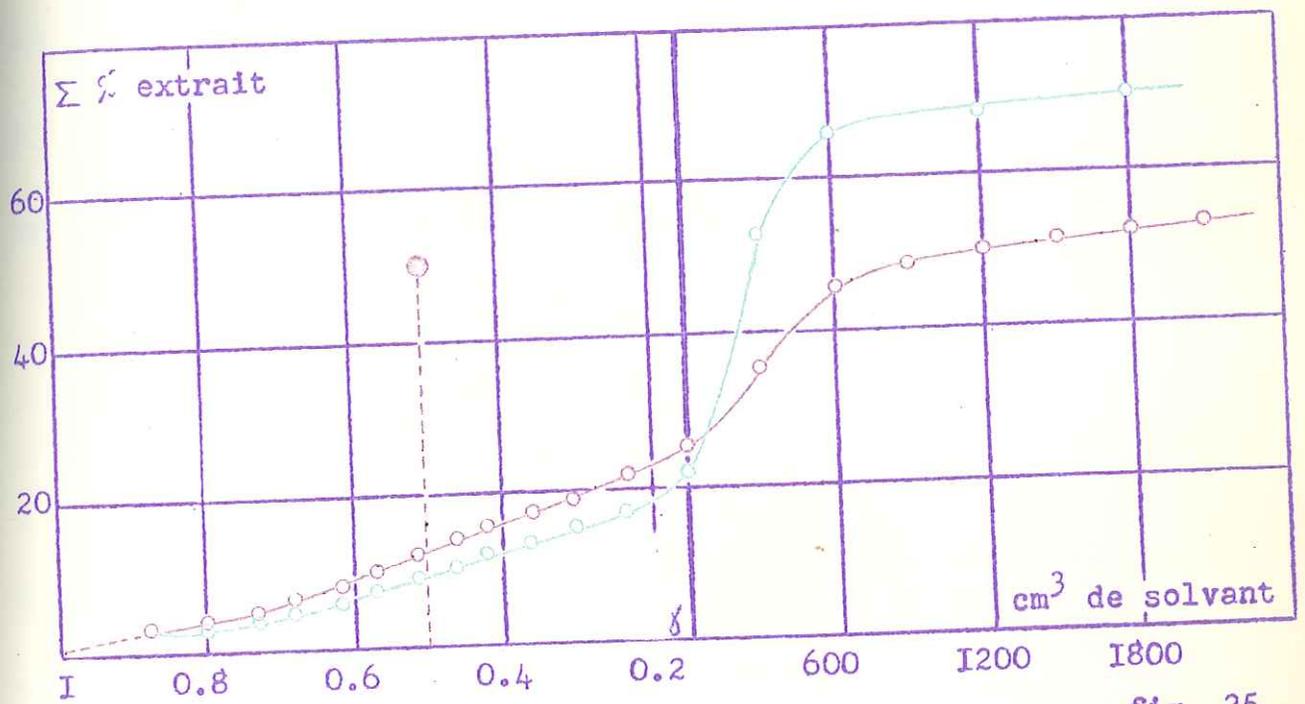


fig. 25

- : 100 cc en 50 minutes
- : 100 cc en 130 minutes
- : extraction directe à  $\gamma 0.5$

de la phase solution soit très faible, on extrait environs 50% du nucléate mis en oeuvre. (figure 25)

b) La courbe ○ de la figure 26 est relative à l'extraction continue à 15°C au moyen d'un système solvant-précipitant de nature suivante;  
 précipitant: CH<sub>3</sub>OH 40%; μ 1, 4(NaCl); pH 3,5 μ 0,10  
 solvant: μ 1, 4(NaCl); pH 3,5 μ 0,10.

La courbe ⊙ de la même figure est relative à l'extraction continue dans des conditions identiques, excepté que la température est de 4°C. On constate donc:

γ	Σ% extrait	
	4°C	15°C
0,30	1	7
0,15	4	10

Or, si après extraction continue à 4°C jusqu'à γ 0,30, on élève ensuite la température à 15°C, on constate qu'en fin d'extraction (γ 0,15) 37% du nucléate sont extraits.

De même, si on commence l'extraction à 15°C au γ 0,32, on constate qu'au γ 0,15, 47% du nucléate sont extraits.

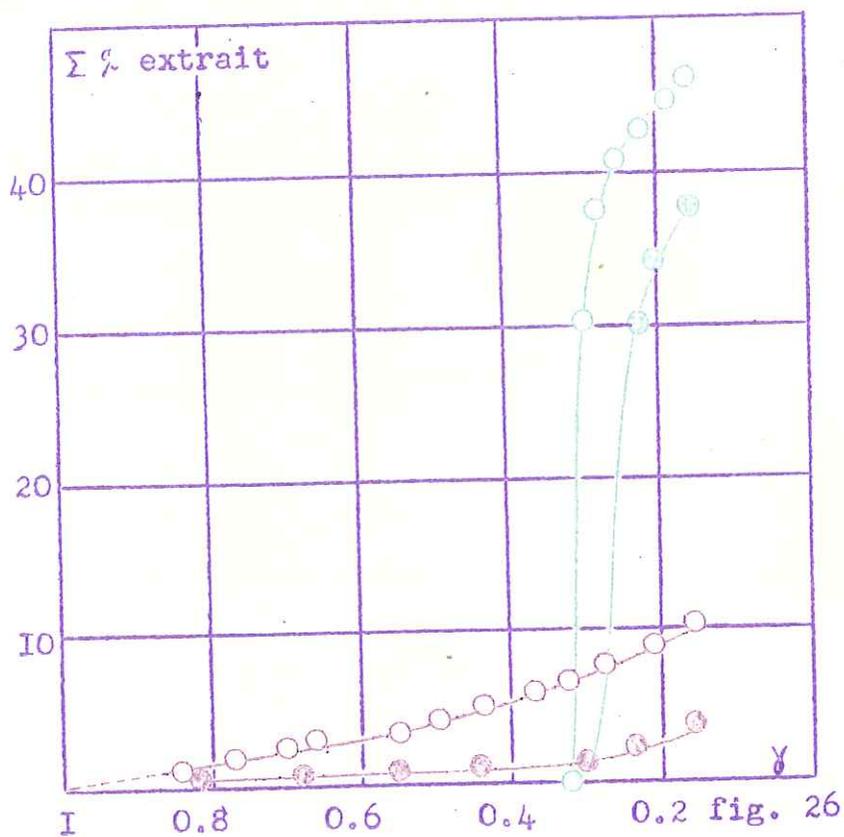
2° Nous avons essayé de solubiliser par extraction à pH 7 (tampon phosphate μ 0,10) les résidus des différentes extractions terminées à des γ divers. (0,5-0,2-0,0).

Influence de la composition de la phase solide  
sur la solubilité

précipitant :  $\text{CH}_3\text{OH}$  : 40% -  $\mu$  : 1.5 - pH : 3.5

solvant :  $\text{CH}_3\text{OH}$  : 0% -  $\mu$  : 1.5 - pH : 3.5

taux de dispersion : 0.5 gr/100 grs de sable



○ : 15° C

⊙ : 4° C

⊗ : 15° C de  $\gamma$  0.3 à  $\gamma$  0.15

⊙ : 15° C - début de l'extraction à  $\gamma$  0.32

L'extraction est conduite de la façon habituelle à 10°C en utilisant d'abord un système solvant-précipitant où le précipitant a la composition habituelle et où le solvant correspond au  $\gamma$  choisi de fin d'extraction (0,5 ou 0,2). On recommence ensuite une seconde extraction en utilisant un système solvant-précipitant, tel que, pour un niveau de 20 cm dans le système d'alimentation en milieu extracteur, le  $\gamma$  du mélange résultant soit le  $\gamma$  choisi (0,5 ou 0,2). Pour l'obtention d'un bon rendement en nucléate insoluble dans l'eau à pH 3,5, nous avons effectué successivement 3 extractions continues avec comme précipitant respectivement  $\gamma 1$  -  $\gamma 0,5$  et  $\gamma 0,2$ , le solvant étant chaque fois de l'eau à pH 3,5.

Après extraction, on retire le contenu de la colonne et on le lave en chambre froide plusieurs fois par 100cm<sup>3</sup> du  $\gamma$  choisi jusqu'à ce que la solubilité devienne minimum. On extrait ensuite à plusieurs reprises par un tampon phosphate pH 7,  $\mu 0,10$ .

Les résultats sont consignés dans le graphique 27. Le pourcentage insoluble à pH 7 est obtenu en soustrayant de 100 la somme du pourcentage extrait au  $\gamma$  choisi et du pourcentage supplémentaire extrait par action ultérieure du pH 7.

L'obtention d'un résidu insoluble à pH 7 est prévisible grâce au

Obtention de résidus insolubles à pH 7

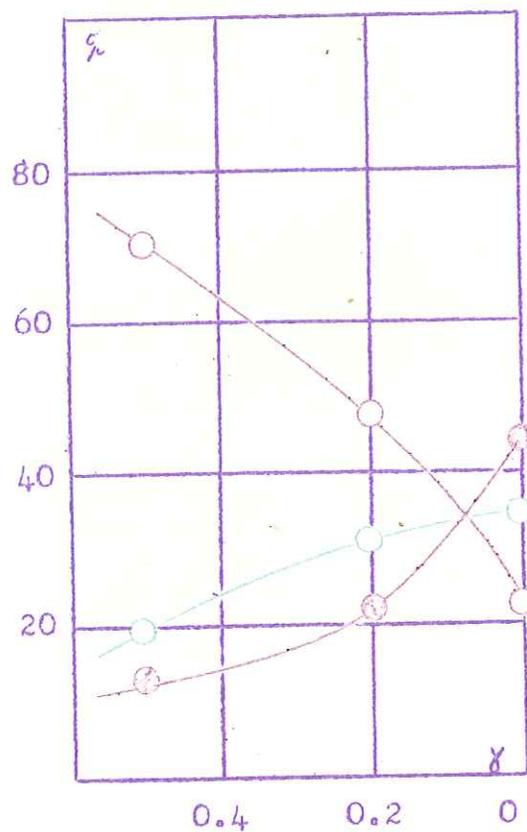


fig. 27

- ⊙ :  $\xi$  extrait à un  $\gamma$  déterminé
- :  $\xi$  supplémentaire extrait par tampon pH 7
- :  $\xi$  insoluble à pH 7

comportement de la fraction A<sub>1</sub><sup>i</sup> obtenue par précipitation fractionnée également à pH 3,5. Nous avons signalé page 43 que la solubilité de cette fraction en présence de MgSO<sub>4</sub> concentré variait très peu en fonction du pH. Il n'en reste pas moins vrai que cette insolubilité à pH 7 est très peu compatible avec la structure chimique généralement admise des acides nucléiques. Ceux-ci renferment en effet un grand nombre de fonctions ionisables et de groupes hydrophiles. C'est pourquoi nous craignons qu'à ce pH 3,5, le fractionnement s'accompagne de transformations irréversibles dans la structure chimique. Nous verrons plus loin comment l'analyse chromatographique nous a permis de vérifier cette hypothèse.

## B. Extractions à pH 5,5.

### 1° Extraction <sup>par</sup> système discontinu.

L'influence énorme qu'une légère différence de composition exerce sur la solubilité doit encore être augmentée à ce pH. Les essais d'extrac-tion en système continu représentés dans la figure 28

et sur lesuq<sup>els</sup> nous reviendrons, nous <sup>ont</sup> ~~a~~ confirmé cette

hypothèse.

Extraction à pH 5.5

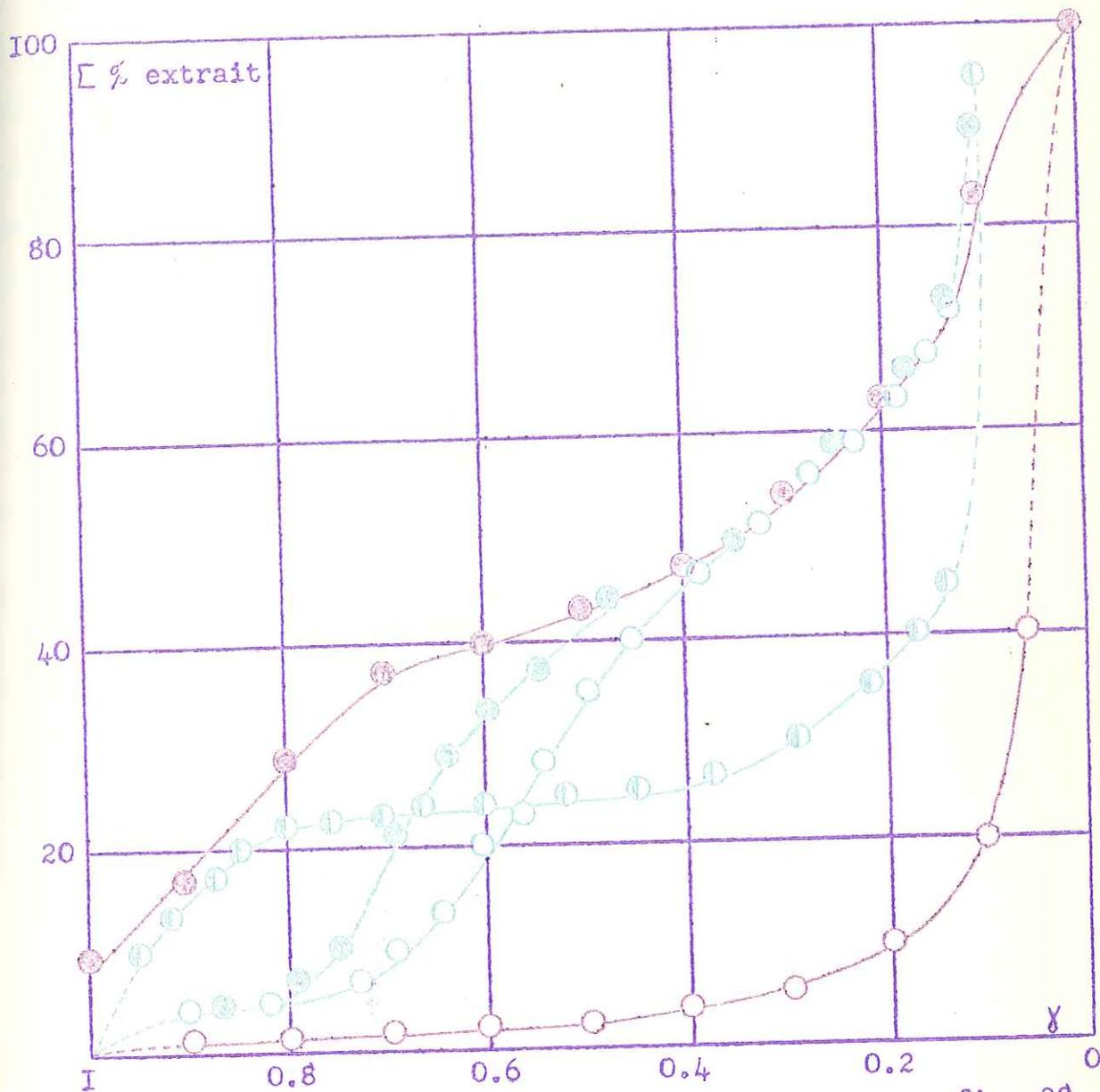


fig. 28

- : système discontinu
- : système continu : 40 gouttes/min.
- ⊗ : système continu : 20 gouttes/min.
- ⊙ : système continu volume triple de liquide extracteur de  $\gamma$  I à  $\gamma$  0.66 : 40 gouttes/min.
- : système discontinu : second tour de fractionnement réalisé sur la fraction  $\gamma$  0.0

Nous avons donc réalisé une extraction en système discontinu -qui est la seule méthode susceptible d'opérer un fractionnement rentable- dans les conditions expérimentales suivantes:

taux de dispersion du nucléate: 15 grs. pour 1000grs. de sable.

précipitant:  $\text{CH}_3\text{OH}$  40%,  $\mu$  (NaCl) 1,4, tampon acétate pH 5,5  $\mu$  0,10.

solvant; tampon acétate pH 5,5,  $\mu$  0,10.

température 4°C.

vitesse d'écoulement 10 à 20 gouttes par minute.

intervalle de  $\gamma$  utilisé: 0,10.

La quantité de nucléate brut et l'intervalle entre 2  $\gamma$  successifs

ont été choisis de façon à obtenir une dizaine de fractions en quanti-

té suffisante pour permettre des déterminations physico-chimiques.

Le rendement <sup>de l'extraction</sup> est donné page .

La concentration en nucléate soluble dans chaque système extracteur

est de 100 à 150  $\gamma$  P./cm<sup>3</sup> au début de chaque extraction, puis diminue

lentement en fonction du volume écoulé et tend asymptotiquement vers 0.

Lorsque', après passage au travers de la colonne, le liquide extrac-

teur ne renferme plus que 20  $\gamma$  P./cm<sup>3</sup> environ, on arrête l'extrac-

tion à ce  $\gamma$  et on passe à la suivante. On obtient ainsi 2,5 à 3 l.

dont la concentration en nucléate est suffisante pour assurer une bon-

ne précipitation par l'alcool. Les fractions ainsi obtenues sont désignées

par le  $\gamma$  auquel elles ont été extraites. Pour obtenir la fraction  $\gamma$  0,0 (solvant pur) on retire le contenu de la colonne après extraction par le  $\gamma$  0,1; on lave le sable à plusieurs reprises par de petites quantités d'eau. L'extraction ainsi réalisée dure un total de 30 jours environ et la somme des liquides extracteurs de  $\gamma$  différents est d'une trentaine de litres. La courbe d'extraction est représentée dans la figure 28 par la courbe .

Nous donnons dans les chapitres V et VI l'analyse des fractions obtenues. La détermination du poids moléculaire de chaque fraction est réalisée par diffusion brownienne et vitesse de sédimentation.

Comme nous le verrons, la fraction  $\gamma$  0,0 donne dans un tampon acétate p H 5,5  $\mu$  0,10

$$D_{20}^0 A, H_m = 5,05; \quad s_{20}^0 = 4,10.$$

Signalons que la constante de diffusion est déterminée par la méthode "surface-ordonnée maximum". On obtient une moyenne se rapprochant de la moyenne en nombre. Par contre,  $s_{20}^0$  est une moyenne en poids.

2° Extraction en système continu.

## 2° Extraction en système continu.

a) Les courbes  et  de la figure 28 obtenues par extraction continue (toute autre condition étant identique) montrent une fois de plus qu'une faible variation dans la composition de la phase solide influence énormément la solubilité totale. C'est ainsi que de  $\gamma 1$  à  $\gamma 0,8$  l'enrichissement de la phase solide en molécules insolubles étant considérablement moindre que par extraction <sup>dis</sup> continue, la différence de composition devient telle que pour les  $\gamma$  suivants, la  $\Sigma \%$  extrait augmente très rapidement. La coïncidence des courbes d'extraction dans un certain domaine de  $\gamma$  ne signifie nullement une identité de composition de phases. C'est ainsi que les fractions  $\gamma 0,0$  correspondant à la courbe  donne  $D_{20}^{0 A, H_m} = 9,2$  et  $s_{20}^0 = 4,05$ , et à la courbe , donne " " = 7,5 et " = 4,30.

Nous pouvons voir que si les constantes  $s_{20}^0$  (moyennant poids) des trois fractions  $\gamma 0,0$  se retrouvent à 5% près, les constantes de diffusion au contraire (moyenne  $\bar{v}$  en nombre) sont notablement plus élevées dans les deux derniers cas.

b) Enfin la courbe  $\textcircled{1}$  montre que la brusque variation de  $\Sigma\%$  extrait à partir de  $\gamma 0,8$  dans les courbes  $\textcircled{0}$  et  $\textcircled{2}$  est réellement due à la présence dans la phase solide d'espèces moléculaires de solubilité élevée qui en système d'extraction discontinue, sont extraites de  $\gamma 1$  à  $\gamma 0,8$ . En effet, si l'on recommence une nouvelle extraction en système continu en utilisant d'abord comme précipitant le précipitant habituel et un solvant de  $\gamma 0,5$ , l'extraction jusque  $\gamma 0,7$  nécessite le passage d'un volume triple de liquide extracteur. L'extraction aux  $\gamma$  inférieurs à  $0,7$  a été continuée par la méthode habituelle. Dans ces conditions, on voit que les courbes  $\textcircled{2}$  et  $\textcircled{3}$  sont très voisines de  $\gamma 1$  à  $\gamma 0,8$ . Il y a donc lieu de penser que les phases solides correspondantes sont très semblables. Aussi, en l'absence de l'action solubilisante des fractions de solubilité élevée, la courbe  $\textcircled{1}$  reste, à partir de  $\gamma 0,8$ , presque parallèle à l'abscisse dans le domaine de  $\gamma$  où précisément les courbes  $\textcircled{0}$  et  $\textcircled{2}$  témoignent d'une brusque augmentation de la solubilité totale.

### 3° Remarques.

a) La fraction  $\gamma 0,0$  a été refractionnée en système discontinu à

l'aide des mêmes milieux solvant-précipitant et avec un taux de dispersion de 0,5 grs. pour 100 grs. de sable (courbe 0 de la figure 28). On obtient ainsi une fraction dénommée  $\gamma$  0,0'. Elle donne pour s et D les valeurs suivantes:

$$s_{20}^0 = 4,70 \quad D_{20}^{0A, H_m} = 4,90.$$

b) les fractions  $\gamma$  0,0 (système continu et discontinu) et particulièrement la fraction  $\gamma$  0,0' présentent une action dispersante intense. Le sable utilisé est soigneusement lavé. Durant le cours de l'extraction, plusieurs litres de liquides extracteurs sortent de la colonne parfaitement clairs. Toutefois, si après extraction jusque  $\gamma$  0,1, on fait passer de l'eau ou du tampon pH 5,5 sur la colonne, ces solvants en ressortent complètement troubles. Ces solutions aqueuses ne se clarifient qu'imparfaitement sur filtre Seitz, et une centrifugation à 12.000 tours minute pendant une heure ne donne pas de clarification complète. Après précipitation à l'alcool, la fraction obtenue peut être purifiée par redissolution dans l'eau (solution à 1%) et centrifugation 1/4 heure à 30.000 tours minute.

#### IV. CONCLUSIONS.

Nous montrons que dans le cas de l'acide ribonucléique: 1° la méthode de fractionnement la mieux adaptée est la méthode par extraction fractionnée appliquée en système discontinu uniquement.

2° Le

rendement du fractionnement dépend du choix judicieux des différents

$\gamma$  d'extraction.

Nous montrons qu'en pratique: 1° l'emploi du pH 3,5-quoique meilleur en principe- est très sujet à caution.

2° Aux deux pH examinés (3,5 et 5,5),

les anomalies apparentes observées dans les extractions au système continu, sont au moins qualitativement interprétables.

3° L'extraction à pH 5,5 en système discontinu doit assurer le meilleur fractionnement.

Les déterminations physico-chimiques que nous allons déterminer à partir des fractions obtenues par cette méthode, vont nous permettre de vérifier ce dernier point au même temps qu'elles nous renseigneront sur la nature de la polydispersité de l'acide ribonucléique.

CHAPITRE V.

POLYDISPERSITE DE L'ACIDE RIBONUCLEIQUE

LERE PARTIE : POIS MOLEULAIRE.

(DIFFUSION BROWNIENNE ET VITESSE DE SEDIMENTATION).

## I. PRINCIPES.

### A) Diffusion brownienne libre.

Imaginons une solution de concentration  $C_0$  mise en contact avec son solvant. En supposant qu'aucune autre force que la pression osmotique n' agit sur les molécules du corps dissous, on montre que

le gradient de concentration  $\frac{dc}{dx}$  est donné par

$$\frac{dc}{dx} = \frac{C_0}{2\sqrt{\pi Dt}} e^{-\frac{x^2}{4Dt}}$$

où  $D$  est la constante de diffusion.  $D$  a comme dimensions  $l^2 \cdot t^{-1}$  ( $cm^2/sec$ ).

Les courbes  $\frac{dc}{dx}$  en fonction de  $x$  ont la forme des courbes de distribution de Gauss. Des courbes expérimentales de ce type sont obtenues

par les méthodes réfractométriques basées sur la courbure de la lumière par passage à travers un milieu d'indice de réfraction variable. (53-54-55-56). En admettant une proportionnalité constante entre

l'indice de réfraction  $n$  et la concentration  $c$ , la relation précédente

devient

$$H = \frac{dn}{dx} = \frac{n - n_0}{2\sqrt{\pi Dt}} e^{-\frac{x^2}{4Dt}} \quad [1]$$

#### 1° Méthodes de calcul.

Ces méthodes sont basées sur les propriétés des courbes de distribution

de Gauss.

a) Méthode surface - ordonnée maximum.

Pour  $x = 0$  l'exponentiel de [1] est égal à 1.  $H$  a sa valeur maximum

$H_m = \frac{n - n_0}{2\sqrt{\pi Dt}}$ . Par réarrangement, on trouvera:

$$D = \frac{A^2}{4\pi t (H_m)^2} \quad [2.]$$

b) Méthode du point d'inflexion.

Les points d'inflexion ( $\mu$ ) de la courbe de Gauss sont donnés par les valeurs de  $x$  qui annulent la différentielle seconde. On trouve

$$x_\mu^2 = 2 Dt. \quad [3.] \text{ En substituant dans [1] on aura } H_m = \frac{H_m}{\sqrt{e}} [4.]$$

En pratique les points d'inflexion sont localisés par l'équation [4] et les valeurs correspondantes de  $x_\mu$  servent à obtenir  $D$  moyennant [3].

c) Méthode des analyses successives.

En écrivant [1] sous forme logarithmique on a  $\ln H = \ln H_m - \frac{x^2}{4Dt}$ .

Si  $H_1$  et  $H_2$  sont les valeurs de  $\frac{dn}{dx}$  correspondant à  $x_1$  et  $x_2$ , on trouve

$$D = \frac{x_2^2 - x_1^2}{4.t. \ln \left( \frac{H_1}{H_2} \right)} \quad [5.]$$

En pratique, on divise la courbe par une série d'ordonnées en nombre égal, et également distantes, et on calcule  $D$  pour chaque intervalle.

c) Méthode statistique.

L'équation [1] peut s'écrire conformément à l'usage du calcul statis-

$$\text{tique } \frac{dn}{dx} = \frac{n - n_0}{\sigma \sqrt{2\eta}} e^{-\frac{x^2}{2\sigma^2}}$$

$$\text{moyennant } \sigma^2 = 2 D t \text{ ou } D = \frac{\sigma^2}{2 t} \quad [6.]$$

$\sigma$  désigne la déviation standard et est reliée au moment second vrai

$$\text{de la courbe } \mu_2^0 \text{ par } \sigma = \sqrt{\mu_2^0} \quad [7.]$$

En pratique, on divise la ligne de base de la courbe de diffusion par

une série de verticales, également distantes, de hauteur  $S_1, S_2, \dots$

$S_1 \dots$ , et numérotées  $s_1, s_2, \dots, s_i, \dots$ , respectivement de part

et d'autre d'une origine choisie près du centre de la ligne de base.

Le moment  $\mu_2^0$  est obtenu par

$$\mu_2^0 = \left\{ \frac{\sum (s_i^2 S_i)}{\sum (S_i)} - \left[ \frac{\sum (s_i S_i)}{\sum (S_i)} \right]^2 \right\} W^2$$

où  $W$  = distance en centimètres entre les ordonnées verticales

successives.

2° Ecartis expérimentaux au cours de distribution de Gauss.

Les courbes de diffusion expérimentales présentent les caractéristi-

ques des courbes de Gauss si le corps dissous est monodisperse et,

s'il n'y a pas d'interactions moléculaires.

Dans ce cas, D est indépendant de la méthode de calcul et de la concentration.

a. Système polydisperse.

La courbe expérimentale est la somme des courbes idéales des divers constituants, et n'est plus une courbe de Gauss quoique, en l'absence d'interactions, elle puisse être parfaitement symétrique.

La courbe est nécessairement un type de moyenne; Gralen a montré que le type de moyenne dépend de la méthode de calcul employée. Par

la méthode " surface-ordonnée maximum" D est <sup>un</sup> type de moyenne repré-

sentée par 
$$D_o^{A, H_m} = \left( \frac{\sum c_i}{\sum \sqrt{D_i}} \right)^2 \quad (x)$$

et par la méthode statistique 
$$D_o^\sigma = \frac{\sum c_i D_i}{\sum c_i} \quad \left( \begin{array}{l} \text{moyenne} \\ \text{en poids.} \end{array} \right)$$

i = nombre de composants différents

c et D = leur concentration et constante de diffusion respective.

Le rapport  $\frac{D_o^{A, H_m}}{D_o^\sigma}$  est considéré comme une mesure du degré d'hétérogénéité.

b. Interactions moléculaires.

Ces interactions sont mises en évidence par la variation de D en fonction de la concentration, de même que par la forme de la courbe

(x) La moyenne en nombre est  $\frac{\sum c_i}{\sum \frac{c_i}{D_i}}$

de diffusion obtenue. Celle-ci est oblique, et la position de l'ordonnée maximum se déplace en fonction du temps vers les régions de plus faible concentration. Dans ce cas, on détermine D à plusieurs concentrations et on extrapole à concentration *zéro*.

### Effets de charge.

Nous avons vu qu'aucune force autre que la pression osmotique ne doit intervenir dans le phénomène de diffusion. Or, le déplacement, dans un milieu ionisant, de particules colloïdales présentant une certaine charge électrique ou des propriétés dipolaires intenses, affecte la distribution des petits ions de charges opposées qui à l'équilibre sont distribués symétriquement autour de l'ion colloïdal central de façon à ce que la force résultante soit égale à 0.

La force qui apparaît lors du déplacement de l'ion central est appelé potentiel de diffusion. On supprime ces effets perturbateurs par l'addition de sels en concentration suffisante. Dans ces conditions, il faut que la diffusion des particules colloïdales -principalement lorsque la diffusion est observée par une méthode réfractométrique - ne se complique pas d'une diffusion des sels mis en présence. C'est pourquoi il est nécessaire de dialyser la solution contre le tampon

à la température à laquelle la diffusion sera réalisée.

3) La constante de diffusion en fonction des propriétés moléculaires.

En supposant la loi de Van't Hoff ( $d\pi = RTdc$ ) <sup>applicab.</sup> Einstein montre

que  $D = \frac{RT}{Nf} = \frac{RT}{F} [9]$   $f =$  coefficient de friction moléculaire  
 $F =$  coefficient de friction molaire.

a) Molécule sphérique. Par application de la loi de Stokes ( $f_0 = 6\pi\eta r$ )

$\eta =$  viscosité du milieu;  $r =$  rayon de la sphère.

l'équation 9 devient  $D_0 = \frac{RT}{6\pi\eta rN}$ , et, en exprimant  $r$  en

terme de volume moléculaire, on obtient

$$D_0 = \frac{RT}{6\pi\eta N \left(\frac{3VM}{4\pi N}\right)^{\frac{1}{3}}} [10]$$

Dans cette équation (équation de Sutherland-Einstein),  $M$  représente

le poids moléculaire et  $V$  le volume spécifique partiel. On voit que

dans le cas particulier des molécules sphériques, la détermination

de  $D$  permet le calcul du poids moléculaire et du rayon de la molécule.

b) Cas général. Lorsque la molécule n'est pas sphérique, où

lorsqu'on ignore la forme de la molécule, le poids moléculaire doit

être déterminé par une méthode indépendante de la forme. On peut

arriver au résultat par une combinaison de la constante de diffusion et de la vitesse de sédimentation. Les valeurs ainsi obtenues correspondent au poids moléculaire de la particule non solvatée.

En introduisant cette valeur de  $M$  dans la formule de Stokes exprimée en terme de volume moléculaire, on trouvera le coefficient de friction molaire  $F_0$  d'une particule hypothétique sphérique, non solvatée, et

de même poids moléculaire  $F_0 = 6\pi\eta N \left( \frac{3MV}{4\pi N} \right)^{\frac{1}{3}}$  [11]

D'autre part la relation générale [9] nous permet d'obtenir le

coefficient molaire de fraction réel  $F = \frac{RT}{D}$ .

Les rapports  $\frac{F}{F_0} = \frac{f}{f_0}$  (et moyennant  $D = \frac{RT}{6\pi\eta N \left( \frac{3VM}{4\pi N} \right)^{\frac{1}{3}} \frac{f}{f_0}}$ ) =  $\frac{D_0}{D}$  [12].

sont appelés rapport de friction.

Oncley suggéra de séparer le rapport de friction en facteur de

solvatation  $\frac{f}{f_0}$  et facteur d'assymétrie  $\frac{f_e}{f_0}$ .

$$\frac{f}{f_0} = \left( \frac{f}{f_e} \right) \left( \frac{f_e}{f_0} \right) \quad (13).$$

#### 4° Conclusions.

La détermination de la constante de diffusion permet:

- a) la détermination qualitative du degré de polydispersité
- b) le calcul du poids moléculaire si la molécule est sphérique

c) Si le poids moléculaire est connu, la détermination du rapport de friction.

Enfin, nous allons voir que la combinaison de la constante de diffusion et de la vitesse de sédimentation permet d'obtenir le poids moléculaire indépendamment de l'état de solvatation et d'assymétrie de la molécule.

## B) Diffusion Brownienne et vitesse de sédimentation.

### 1° Principe.

Si la diffusion et la sédimentation sont réalisées dans le même milieu et en admettant que la sédimentation ne provoque pas d'orientation des molécules, on peut écrire, en posant  $s = \frac{1}{\omega^2 r} \frac{dx}{dt}$  [14]

$$\text{que } M = \frac{RTs}{D(1-V\rho)} \quad [15]$$

$\omega^2 r$  = accélération produite par la rotation ( $\omega$  = vitesse angulaire).

$s$  est appelée constante de sédimentation; c'est la vitesse de sédimentation pour une accélération centrifuge unitaire.  $s$  a le temps comme dimension et est souvent exprimée en unités Swedberg ( $10^{-13}$  sec).

2° Remarques.

- a) La relation  $[\eta]$  n'est valable que si les phénomènes de diffusion et de centrifugation sont additifs. On suppose donc un déplacement libre de la part des macromolécules individuelles.
- b) l'établissement de la relation 15 ne nécessite aucune supposition concernant la forme et la solvataion de la molécule.
- c) quoique l'entité cinétique soumise à la diffusion et à l'ultra-centrifugation est réellement la molécule + son enveloppe de solvataion, la valeur de  $M$  obtenue se rapporte à la macromolécule non solvatée. Ce curieux résultat provient du terme de volume spécifique partiel  $V$  utilisé dans l'équation [15] (Alexander and Johnson : Colloid Science 1949 p. 291).
- d) Système polydisperse; dans ce cas, l'applatissage dû à la polydispersité ~~à~~ ajoutera à l'applatiss<sup>mt</sup> normal dû à la diffusion.
- e) Il est évident qu'il faut également tenir compte des effets de charge (supprimés en travaillant au poi<sup>nt</sup>s isoélectrique ou à concentration saline suffisamment élevée) et des effets de concentration (particulièrement intenses pour les molécules filiformes) (extrapoler à concentration *zéro.*).

f) enfin, les valeurs de  $s$  et  $D$  de la formule [15] doivent être ramenées au même état standard. Celui-ci a été choisi comme étant l'eau distillée à 20°C. En supposant qu'une variation de température n'affecte que les propriétés du solvant, on peut écrire:

$$D_{20}^{\circ} = D_{\text{experimental}} \cdot \frac{T_{20}}{T} \cdot \frac{\eta}{\eta_{20}^{\circ}} \quad [16]$$

$T_{20} = 20^{\circ}\text{C}$  ;  $T$  = température à laquelle la diffusion a été réalisée;  $\eta$  = viscosité du solvant à  $T$  ;  $\eta_{20}^{\circ}$  = viscosité de l'eau à 20°C.

$$\text{De même } S_{20}^{\circ} = S_{\text{experimental}} \cdot \frac{\eta}{\eta_{20}^{\circ}} \cdot \frac{1 - V_{20}^{\circ} \rho_{20}^{\circ}}{1 - V \rho} \quad [17]$$

$\rho$  et  $\eta$  = densité et viscosité du solvant à  $T$

$\rho_{20}^{\circ}$  et  $\eta_{20}^{\circ}$  = densité et viscosité de l'eau à 20°C

$V$  et  $V_{20}^{\circ}$  = volume spécifique partiel dans le solvant à  $T$  et dans l'eau à 20°C.

La détermination du poids moléculaire des différentes fractions

obtenues par extraction fractionnée nécessite donc suivant la

formule [15] la connaissance de  $s_{20}^0$ ,  $D_{20}^0$  et  $V$ .

A) Constante de diffusion.

La détermination de la courbe  $\frac{dn}{dx}$  a été réalisé dans l'appareil à électrophorèse par la méthode de Tisélius-Longworth (54-55). La figure 30 montre les courbes de diffusion relatives au nucléate brut. Les conditions expérimentales sont: température  $0^{\circ}4$ ; tampon acétate  $\text{pH } 5,5$   $\mu$   $0,10$ ; dialyse en chambre froide: 24 heures; concentration en nucléate: de 0,3 à 0,8%.

La constante D est calculée par la méthode "surface-ordonnée maximum"

En pratique, la méthode consiste à porter dans un diagramme  $\frac{1}{(H_m)^2}$  en fonction du temps.  $H_m$  est exprimé en cm et le temps en secondes.

On obtient une droite qui pour  $\frac{1}{(H_m)^2} = 0$ , donne une valeur de temps négative. Cette erreur de temps 0 trouve son origine dans la perturbation initiale du ménisque provoquée par la mise en contact solution-solvant, et est de l'ordre de 10 à 20 minutes. Enfin, on mesure la surface A en  $\text{cms}^2$  au planimètre.

Si par G, on représente le facteur d'agrandissement existant entre le "pic" réel dans la cellule à diffusion, et l'image obtenue de celui-ci, à partir de laquelle on mesure A et  $H_m$ , D est donné par

$$D = \frac{A^2}{4 \cdot \pi \cdot t_{\text{corrigé}} \cdot H_m^2 \cdot G^2}$$

$t_{\text{corrigé}}$  = temps de diffusion + erreur de temps zéro.

Diffusion de Nucleate brut: pH 5,5

Taux d'agrandissement: 1,68.

Surface: 3,5 cm<sup>2</sup>

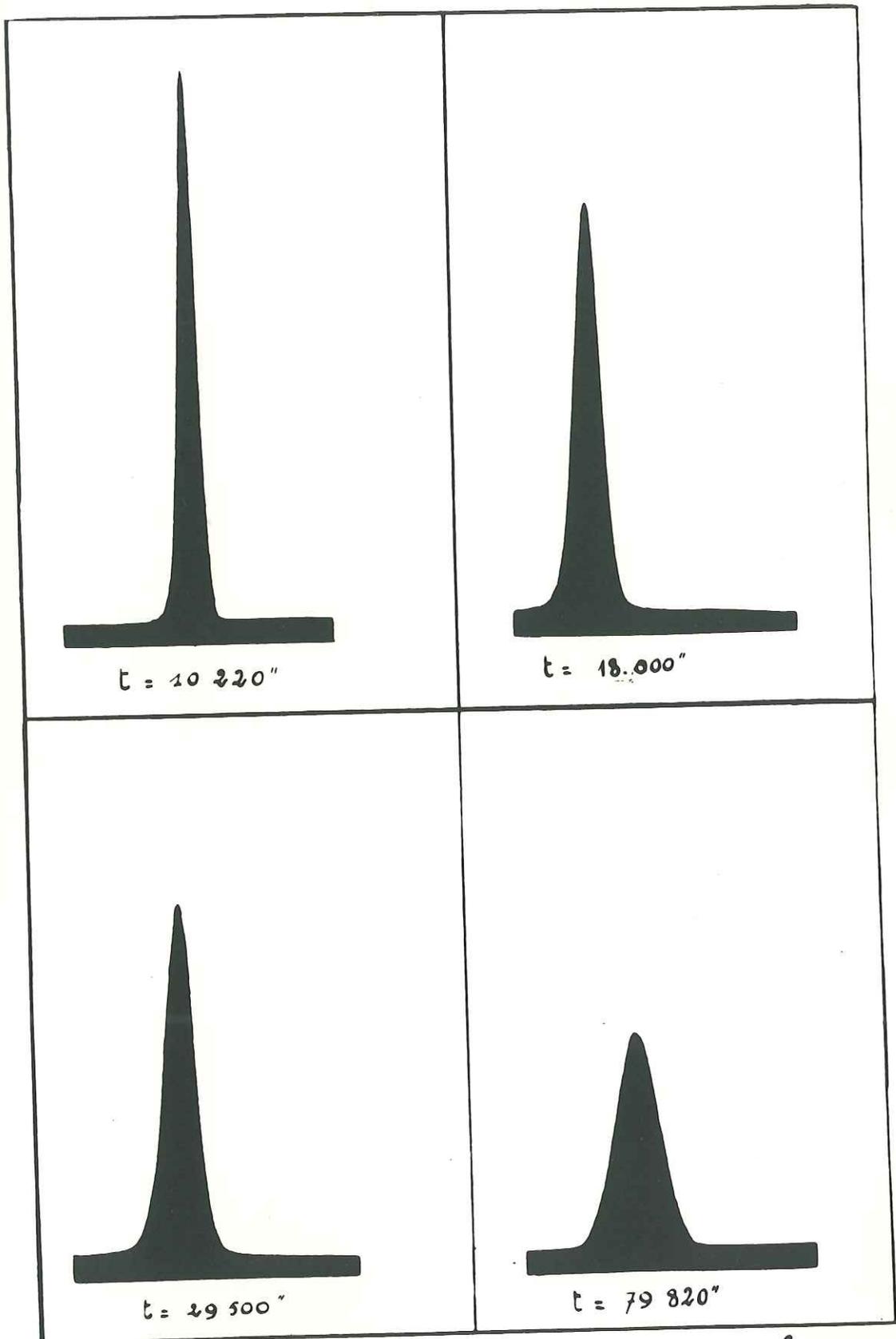


fig 30

La conversion de D expérimental en  $D_{20}^0$  est réalisée par la formule

[16] que nous utilisons sous une forme approchée:

$$D_{20}^0 = D \cdot \frac{T_{20}}{T} \cdot \frac{\eta_{20}}{\eta_{20}^0} \cdot \frac{\eta_{20}}{\eta_{20}^0} \approx D \cdot \frac{T_{20}}{T} \cdot \frac{\eta_{20}}{\eta_{20}^0} \cdot \frac{\eta_{20}}{\eta_{20}^0} \approx D \cdot \frac{293}{273,4} \cdot 1,176 \cdot 1,036 \approx D \cdot 1,554$$

$\eta_{20}$  = viscosité du tampon à 20°C.

$\eta_{20}^0$  = viscosité de l'eau à 0,4°C.

Ainsi qu'en témoigne la figure 30, les pics obtenus sont légèrement assymétriques. Nous avons de plus vérifié à partir du nucléate brut et de deux fractions  $\gamma$  0,8 et  $\gamma$  0,0, que pour une variation de concentration de 0,3 à 0,9% les valeurs de  $D_{20}^0$  étaient identiques à 5%.

#### B. Constante de sédimentation.

La détermination de la vitesse de déplacement de l'ordonnée maximum  $H_m$  de la courbe  $\frac{dn}{dx}$  pour un champs gravitationnel donné, a été réalisée par observation directe grâce au système optique de Swensson dont l'ultracentrifuge Spinco utilisée était équipée. La figure 3 montre les courbes de sédimentation relatives au nucléate brut.

Les conditions expérimentales sont: température: 22° à 26°C;

tampon acétate pH 5,5;  $\mu$  0,10; concentration en nucléate; 0,8%:

vitesse de rotation: 59.400 tours minute environs.

Les écarts maxima de température au cours d'une centrifugation sont de 2° C environ. On ramène la valeur de s à l'état standard en

choisissant comme température expérimentale la température moyenne.

Enfin la vitesse de rotation est contrôlée avec précision pendant tout le cours de la centrifugation.

Le calcul de s est basé sur la formule [14]:

$$s = \frac{1}{\omega^2 x} \cdot \frac{dx}{dt} = \frac{1}{\omega^2} \cdot \frac{d \ln x}{dt} = \frac{2,3}{\omega^2} \cdot \frac{d \log x}{dt} \quad [14] \quad (18)$$

Pour une vitesse de 59.400 tours minute,  $\omega$ , exprimé en radian/s/seconde est égal à  $\frac{59.400 \times 360}{60 \times 57}$

$$\text{d'où } \frac{2,3}{\omega^2} = \frac{2,1 \times 10^{-4}}{(59,4)^2}$$

Pour obtenir  $\frac{d \log x}{dt}$  on mesure la distance de sédimentation sur un agrandissement des photos de sédimentation. On y ajoute la distance au centre de rotation et on prend le logarithme de la somme. On trace la courbe  $\log x$  en fonction de  $t$ . La pente de la courbe est multipliée par un facteur de correction dépendant de l'agrandissement et de l'échelle du graphique  $\log x$  en fonction de  $t$ .

On obtient  $\frac{d \log x}{dt}$ .

La valeur de  $s$  ainsi obtenue est ramenée à 20°C pour l'eau pure au moyen de la formule 17 que nous utilisons sous une forme simplifiée

$$s_{20}^{\circ} \approx s_{\text{expérimental}} \cdot \frac{\eta}{\eta_t^{\circ}} \cdot \frac{\eta_t^{\circ}}{\eta_{20}^{\circ}}$$

$\eta_t^{\circ}$  = viscosité de l'eau à la température de l'expérience.

Nous négligeons le terme :  $\frac{1 - V_{20}^{\circ} \rho_{20}^{\circ}}{1 - V \rho}$ .

### C) Volume spécifique partiel apparent $V$ .

Le volume spécifique partiel apparent est défini comme étant l'accroissement de volume résultant de l'addition de 1 gramme de substance à un très grand volume de solution.

La détermination pratique a été réalisée par application de la formule volume du picnomètre - volume occupé dans le picnomètre par le tampon / poids du nucléate sec contenu dans le picnomètre.

La détermination a été réalisée en pratique à partir d'une solution de nucléate à 2% dans le tampon acétate pH 5,5  $\mu$ 0,10 à la température de 25°C. Le volume du picnomètre est de 37,8787 cm<sup>3</sup>. Les mesures ont été faites à partir du nucléate brut et des fractions  $\gamma$  0,7 et

$\gamma$  0,1.

Les poids sont corrigés par un facteur de correction

$$k = 1 - \frac{0,012}{d} + \frac{0,0012}{8,5} \quad \begin{array}{l} (0,0012 = \text{masse de } 1 \text{ cm}^3 \text{ d'air,} \\ 8,5 = \text{densité des poids;} \\ d = \text{densité de la substance} \\ \text{étudiée } \approx 1). \end{array}$$

La difficulté réside dans la détermination exacte du taux d'humidité.

Pour le nucléate brut, nous avons mesuré le volume spécifique à partir d'un produit non séché mais en tenant compte dans nos calculs d'un taux moyen d'humidité obtenu par séchage sous vide jusqu'à poids constant de 2 prises d'essai séparées à 105°C (produit resté parfaitement blanc; 11,33% d'humidité) et de deux autres à 140°C (produit jauni; 13,03 % d'humidité).

Par ailleurs, les volumes spécifiques des fractions  $\gamma$  0,7 et  $\gamma$  0,1 ont été mesurés à partir d'échantillon séché jusqu'à constance de poids à 115°C sous vide.

Les valeurs obtenues sont les suivantes:

ribonucléate: 0,48 cm<sup>3</sup> par gramme.

$\gamma$  0,7 : 0,50 " " "

$\gamma$  0,1 : 0,50 " " "

Les valeurs renseignées dans la littérature sont variables.

Signalons la valeur de 0,578 obtenue par Cohen et Stanley (57) à partir de l'acide ribonucléique du virus de la mosaïque du tabac.

Backer et Worthington (58) renseignent pour l'acide ribonucléique de levure un volume spécifique de 0,48 également.

Les résultats expérimentaux renseignés plus loin ont été calculés à partir de la valeur: 0,48 cm<sup>3</sup> par gramme.

### III. RESULTATS EXPERIMENTAUX.

Nous avons déterminé le poids moléculaire de chacune des fractions obtenues par extraction à pH 5,5 en système discontinu. Les valeurs ainsi obtenues sont des moyennes. Nous les avons toutefois introduit dans l'équation [11]. Le rapport  $\frac{F_d}{F_0}$  nous donne ainsi une idée approximative du rapport de friction présenté par ces différentes fractions dans le milieu pH 5,5 (acétate  $\mu$  0,10).

Afin de pouvoir <sup>p</sup>comparer les fractions obtenues par extraction, et les fractions obtenues par précipitation dans différents milieux, nous avons pratiqué à partir du même échantillon brut 2 précipitations successives par le précipitant de Chantrenne (obtention de A et B) et - sans passer par le stade A de chantrenne - 6 précipitations successives par le milieu  $\text{CH}_3\text{OH}$  20%  $\mu$  1,7 pH 3,5. (obtention de  $A_1'$ ). Les résultats sont consignés dans le tableau suivant et dans la fig.

31.

#### Conclusions.

1<sup>a</sup> La polydispersité de l'acide ribonucléique est certainement une fonction de masse.

Fraction	Rendement en %	$D_{20}^{0A; H_{0m}}$ en $cm^2 \cdot 10^{-7} / sec$	$\Delta_{20}^*$ en unité Svedberg	P.M.	$f_d/f_0$
----------	-------------------	--	--------------------------------------	------	-----------

Brut		
8,3	2,79	15.700

Extraction fractionnée ( pH 5.5 - système discontinu )

premier tour de fractionnement

$\gamma$ I	9,7	12,8	2,09	7.700	I,42
0,9	7,1	12,1	2,02	7.800	I,49
0,8	12,4	11,5	2,37	9.700	I,46
0,7	6,6	12	1,72	6.700	I,58
0,6	2,1	—	—	—	—
0,5	3,5	10,7	2,26	9.900	I,56
0,4	4,3	10	2,56	12.100	I,57
0,3	6,6	7,5	2,77	17.300	I,85
0,2	9,7	7,8	2,69	16.200	I,82
0,1	19,1	7,3	3,35	21.400	I,76
0,0	16,3	5,05	4,10	38.100	2,11

Extraction fractionnée ( pH 5.5 - système discontinu )

second tour de fractionnement opéré sur la fraction  $\gamma$  0,0

$\gamma$ 0,0'	40	4,70	4,66	46.600	2,12
---------------	----	------	------	--------	------

Précipitation fractionnée : précipitant de Chantrenne

2 tours de fractionnement

A	35	10,2	2,9	13.200	I,5
B	40	19,1	1,6	3.800	I,2

Précipitation fractionnée : précipitant  $CH_3OH$  20% u I,7 pH 3,5

6 tours de fractionnement

$A'_I$	10	7,3	2,9	18.400	I,86
--------	----	-----	-----	--------	------

Tableau I

Poids moléculaire des fractions obtenues  
par extraction à pH 5.5 en système discontinu

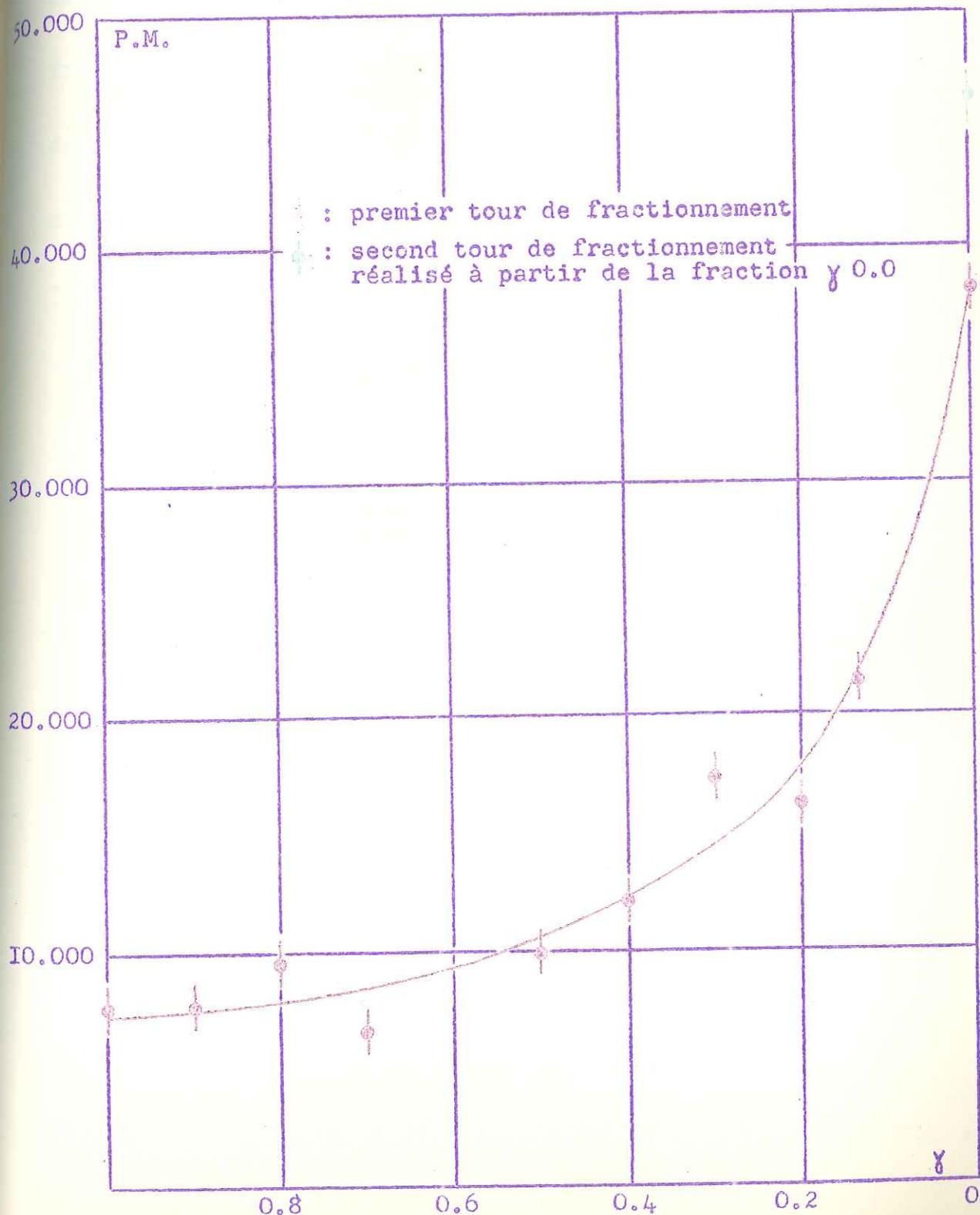


fig. 3I

2° La fraction  $\gamma$  0,0' donne un poids moléculaire de 46.660 environ.  
Signalons des valeurs de 59.000 à 70.000 que Cohen et Stanley (57) calculent à partir d'un volume spécifique de 0,578 pour différentes fractions de ribonucléate du virus de la mosaïque du tabac obtenues dans des conditions d'extraction rapide, de pH neutre, et en l'absence de dégradation enzymatique (x).

3° La fraction  $\gamma$  0,0' conservée sous vide, sur  $P_2O_5$  et à basse température, est très stable. Après 6 mois de conservation, nous n'avons pas observé de variation de s et de D.

4° Les rapports  $\frac{F_d}{F_0}$  renseignés ne sont que des ordres de grandeur. Ils montrent toutefois que, en supposant le facteur d'hydratation constant, l'asymétrie croît avec le poids moléculaire.

5° L'obtention de fractions dont les poids moléculaires varient de 8.000 à 46.660 témoigne de l'efficacité de la méthode de fractionnement utilisée.

(x) de nucléate fraîchement préparé donne un P.M de 200.000 environ.  
Ce produit est instable et se décompose spontanément en un produit stable de P.M  $\approx$  60.000.

CHAPITRE VI.

POLYDISPERSITE DE L'ACIDE RIBONUCLEIQUE.

2ème Partie : COMPOSITION CHIMIQUE.

( CHROMATOGRAPHIE ET ELECTROTITRATION )

## I. RESUME BIBLIOGRAPHIQUE.

Jusqu'en 1948, les méthodes d'analyse quantitative renseignées dans la littérature étaient très sommaires. Elles consistaient généralement à un dosage d'azote et de phosphore totaux sur l'échantillon préalablement séché. D'autres auteurs proposèrent de doser le rapport Npurique/N pyrimidique. L'acide nucléique était hydrolysé et les bases pures étaient précipitées de l'hydrolysate sous forme de complexes argentiques et cuivriques, tandis que les nucléotides pyrimidiques restaient en solution. Ces méthodes étaient basées sur des précipitations quantitativement incertaines et délicates et donnaient des renseignements imprécis et incomplets.

### A.- Chromatographie sur papier.

1°) Chargaff et ses collaborateurs réaximèrent le problème de l'analyse quantitative des composants des acides nucléiques en général. Ils analysèrent d'une façon systématique les différentes conditions d'hydrolyse, et appliquèrent la méthode chromatographique à la séparation des produits d'hydrolyse (59). A partir de mélanges synthétiques des différentes bases pures et pyrimidiques, suscep-

tibles d'être rencontrées dans les acides nucléiques, ils mirent au point toute une série de solvants capables d'en assurer la séparation.

Cette première méthode nécessite malheureusement l'hydrolyse de l'acide nucléique jusqu'au stade : bases puriques et bases pyrimidiques. Or l'obtention des bases pyrimidiques nécessitent un traitement très énergique qui généralement oxyde la cytosine en uracile. Après une étude systématique, Vischer et Chargaff proposèrent l'hydrolyse par l'acide formique concentré à 175°C pendant 2 heures.

Malheureusement, cette méthode est <sup>in</sup>capable d'hydrolyser quantitativement l'acide uridylique, et n'est pas conséquent pas applicable à l'analyse des acides ribonucléiques.

Chargaff et ses collaborateurs (60-61-62) proposèrent ensuite l'hydrolyse des acides ribonucléiques jusqu'au stade nucléotides par action des alcalis à pH 13,5 à 30°C, et développement du chromatogramme au moyen d'une solution aqueuse acide isobutyrique-isobutyrate d'ammonium. Dans ce cas cependant, les acides guanylique et uridylique présentent la même valeur de  $R_F$  (rapport entre la distance parcourue sur le papier par la substance et la distance

procourue par le front de la phase liquide mobile ) et leur dosage doit se faire par l'application des équations simultanées basées sur l'absorption photométrique des nucléotides purs.

En vue d'éviter cet inconvénient, ces mêmes auteurs donnent enfin une méthode d'hydrolyse permettant la séparation, sur le même chromatogramme, des bases : adénine et guanine et des acides : cytidylique uridylique.

Les résultats obtenus relatifs à la composition des acide ribonucléiques, varient légèrement d'une expérience à l'autre et suivant la méthode d'analyse utilisée.

En exprimant les résultats en moles de base par môle de phosphore, ils obtiennent pour l'acide ribonucléique de la levure :

	môles de base par môle de P.
adénine	0,29 à 0,23
guanine	0,29 à 0,25
cytosine	0,21 à 0,17
uracile	0,25 à 0,18

C'est-à-dire  $\text{guanine} \geq \text{adénine} > \text{uracile} \geq \text{cytosine}$

Il semble toutefois que l'acide ribonucléique de levure se caractérise par une composition très différente de celle des autres acides ribonucléiques d'origine animale. Pour ceux-ci, l'ordre des concen-

trations molaires des différentes bases est manifestement :

guanine > cytosine > adenine >> uracile.

2°) Markham et Smith (63-64-65) trouvent que les méthodes proposées par Chargaff ne sont pas rigoureusement quantitatives, et proposent à leur tour une nouvelle technique. L'hydrolyse est réalisée par HCl N dans des conditions assurant un rendement quantitatif en bases puriques et en nucléotides pyrimidiques. Les constituants de l'hydrolysate sont séparés sur papier en employant comme système éluant une solution chlorhydrique de butanol tertiaire. Si le chromatogramme est développé sur une distance de 25 cms, les quatre constituants présentent les valeurs de  $R_f$  suivantes : guanine : 0,21 ; adenine : 0,32 ; acide cytidilique : 0,48 ; acide uridylique : 0,79.

La quantité d'azote calculée à partir des concentrations molaires de chacune des bases, représente les 98,3 % de l'azote total.

Les résultats concernant l'acide ribonucléique de levure et exprimés en moles de base par tetranucléotide statistique sont :

guanine	1,25 ± 0,01
adénine	1,04 ± 0,01
cytosine	0,80 ± 0,02
uracile	0,92 ± 0,04

C'est-à-dire guanine > adénine > uracile > cytosine.

Signalons enfin que les résultats obtenus à partir des acides ribonucléiques de différents virus du groupe: virus de la mosaïque du tabac donnent : adénine > guanine > uracile > cytosine.

3°) Carter (66) propose un système éluant capable de séparer les ribonucléotides obtenus par hydrolyse alcaline. Cet éluant est composé d'un tampon aqueux citraté ou phosphaté auquel il ajoute de l'alcool isoamylique de façon à obtenir deux phases liquides superposées à travers lesquelles il introduit l'extrémité du papier à chromatographie. Il met ainsi en évidence la présence de deux isomères a-b de l'acide adénylique. Ces deux isomères ont été séparés, sont chimiquement et enzymatiquement dégradés en adénosine et adénine, et se différencient probablement l'un de l'autre par la localisation de la liaison adénine-acide phosphorique (position 2 et 3)

#### B. Chromatographie sur échangeur d'ions.

Cette technique est appliquée par Cohn (67) à la séparation des ribonucléotides. Ceux-ci présentent en effet un degré d'affinité différent vis-à-vis de l'échangeur (Dowex-1) et variable suivant le pH utilisé. Par une étude expérimentale précise des conditions de pH, concentrations salines, dimensions de la colonne, etc., Cohn

parvient à séparer les divers nucléotides de façon très satisfaisante. Il confirme également les résultats de Carter concernant la présence des deux isomères a-b de l'acide adénylique et montre de plus un comportement semblable de l'acide guanylique.

Remarque. Soulignons pour terminer que Loring, Luthy, Bortner et Levy (68) ont montré à leur tour que l'acide cytidilique obtenu par hydrolyse de l'acide ribonucléique de levure était également constitué de deux isomères a et b, d'activité optique différente  $[\alpha]_D = + 20^{\circ}6$  et  $+ 49^{\circ}$  et se différenciant probablement également par la position de la liaison cytosine-acide phosphorique (position 2 et 3).

## II. TECHNIQUE EXPERIMENTALE UTILISEE.

=====

Parmi les différentes méthodes que nous venons de résumer, nous avons choisi celle de Markham et Smith comme nous paraissant être

à la fois la plus simple, la plus rapide et la plus précise. L'hydrolyse et le développement du chromatogramme ont été exécutés suivant les indications de l'article original. Toutefois certains détails concernant principalement le séchage du chromatogramme et l'extraction des bases puriques et des nucléotides pyrimidiques ont été légèrement modifiés (x).

On pèse une certaine quantité d'acide nucléique auquel on ajoute un volume de HCl N tel que après hydrolyse, 1 cm<sup>3</sup> renferme les produits d'hydrolyse correspondant à 10 à 20 mgrs d'acide nucléique. L'hydrolyse est réalisée en tube scellé à 100°C pendant une heure. Le tube est ensuite refroidi et ouvert.

Le papier utilisé est constitué d'une bande de papier filtre Whatmann N° 1 (2 jours de développement) ou N° 4 (12 heures de développement) de 9 cms de large et 40 cms de long. Ces bandes de papier sont préalablement lavées en réalisant une chromatographie à blanc sur toute la distance de 40 cms et séchées comme nous l'indiquerons plus loin. La bande de papier ainsi préparée est divisée en trois colonnes. La colonne centrale servira à déterminer les blancs ; les deux autres permettront de réaliser deux développements simultanés.

Au milieu de chacune de ces deux dernières colonnes et à quelques centimètres du sommet, on dépose 1 à 1,5  $\mu$ l de l'hydrolysate. La tache qui doit présenter un diamètre maximum de 5 mm est séchée dans un courant d'air froid. On recommence de cette façon plusieurs dépôts jusqu'à ce que le volume total déposé corresponde à 100 à 200  $\gamma$  d'acide nucléique.

(x) Nous remercions vivement le Dr H. Chantrenne qui a bien voulu nous communiquer ces modifications mises au point au laboratoire de Mr le Professeur Brachet de l'Université de Bruxelles.

Le développement du chromatogramme est réalisé par un mélange constitué de 700 cm<sup>3</sup> (26°C) de butanol tertiaire, 132 cm<sup>3</sup> du mélange azéotropique eau-HCl, et d'une quantité d'eau suffisante pour obtenir un volume final de 1 L.

Ce solvant est versé dans un petit bac en verre soudé au sommet d'une tige en verre de 50 cms de haut environ, et dans lequel on fait plonger la partie supérieure du papier. Le tout est placé dans une enceinte en verre de 60 cms de haut et contenant également une certaine quantité de solvant. (1 cm d'épaisseur environ).

Le papier est développé sur une distance de 25 cms, mesurée à partir de l'endroit où les taches ont été déposées.

Le papier est ensuite retiré et séché pendant une heure dans un courant d'air froid. On le suspend ensuite 10 minutes dans une atmosphère d'ammoniaque et l'on le remet 10 minutes dans un courant d'air froid.

La localisation des bases puriques et des nucléotides pyrimidiques est réalisée en illuminant le papier par de la lumière de 240 à 260 m $\mu$ . Ces substances apparaissent comme des taches sombres sur un fond fluorescent. On peut utiliser à cet effet la lampe commerciale S-L-2537. Ultraviolet Lamp-Minera Light munie du filtre "Short Wave U.V. Filter Model SL. 2537". Nous avons utilisé la lumière émise par une lampe à vapeur de mercure ordinaire dont l'enveloppe de verre a été enlevée. La lumière est filtrée par une solution composée de 235 grs NiSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O et 67,1 grs Co SO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O par litre, sous une épaisseur de 7 cms (Bowen : 69-70)

La bande de papier est ensuite découpée en petits rectangles contenant chacun une tache. Au niveau de chaque tache, on découpe un rectangle identique dans la colonne médiane, qui servira à déterminer la valeur du blanc. Chaque rectangle de papier est découpé et introduit dans un tube à réaction. On ajoute 5 cm<sup>3</sup> de HCl 0,1 N. Le tube est pesé. On plonge les tubes 30 minutes dans un bain marie bouillant. Après refroidissement, on ramène au poids par addition d'eau. On centrifuge.

On trace à partir de chaque solution surnageante, l'entièreté du spectre au spectrophotomètre Beckman de 210 à 320 m $\mu$ . Les blancs présentent une densité optique de 0,02 à 0,07 suivant la longueur

d'onde et le niveau auquel ils se situent sur le chromatogramme. Après soustraction de chaque blanc, on compare le spectre résultant avec celui de la substance pure. La concentration de chacune des substances isolées est obtenue à partir de la densité optique au maximum d'absorption et en se basant sur les valeurs suivantes, renseignées par Markham et Smith.

	$\lambda$ (au maximum)	densité optique pour une concentration $10^{-3}M.$ et une épaisseur de 10 mm.
guanine	250	10,6
adénine	260	13,0
ac. cydidilique	280	12,95
ac. urydilique	260	9,89

Exemple : Supposons que les 5 cm<sup>3</sup> de solution de guanine donnent - soustraction faite de la densité optique du blanc correspondant - une densité de 0,361.

$\frac{361 \times 5}{10,6}$  donne le nombre de môles en  $10^{-9}$  de guanine contenu dans le volume d'hydrolysât déposé sur le papier.

### III. RESULTATS EXPERIMENTAUX.

A. Chaque fraction est séchée à  $110^{\circ}$  pendant 12 heures. On en détermine le P et l'N. totaux. On minéralise une prise d'essai devant contenir de 50 à 500  $\gamma$  de P. et de 100 à 1200  $\gamma$  d'N., avec un  $\text{cm}^3$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentré et un gramme de  $\text{K}_2\text{SO}_4$ . Le résidu de la minéralisation est dissous dans de l'eau. On amène à  $50 \text{ cm}^3$ . On pipette  $5 \text{ cm}^3$ .

a) Dosage du P. A ces  $5 \text{ cm}^3$ , on ajoute  $2 \text{ cm}^3$  d'eau,  $1 \text{ cm}^3$  de la solution de molybdate et  $2 \text{ cm}^3$  de réactif sulfite-hydroquinone. (voir page 77). On attend 30 minutes et on mesure l'absorption à  $640 \text{ m}\mu$ .

b) Dosage de l'N. Les  $5 \text{ cm}^3$  sont introduits dans un jaugé de  $50 \text{ cm}^3$ ; on ajoute  $30 \text{ cm}^3$  d'eau +  $3 \text{ cm}^3$  de réactif de Nessler (x) et on porte à  $50 \text{ cm}^3$ . On agite immédiatement. On attend 10 minutes, et on mesure l'absorption à  $385 \text{ m}\mu$ .

Ces dosages sont pratiqués sur deux prises d'essai de la même fraction à partir desquelles on effectue 4 déterminations séparées de P. et d'N totaux.

B. Chaque fraction -séchée dans les mêmes conditions - est analysée par la méthode chromatographique décrite. A partir du nombre de moles de base dosées, on calcule le pourcentage N total. Ce celui-ci vérifie à 4% près le pourcentage N. total obtenu par

(x) voir au bas de la page suivante. - 126 -

minéralisation directe de la fraction, on calcule le nombre de moles de base par mole de P. en utilisant le rapport  $\frac{P}{N}$  obtenu par minéralisation. Si au contraire, le pourcentage N. calculé à partir des bases dosées diffère de plus de 4% du pourcentage N. obtenu par minéralisation, on calcule le nombre de moles de base par mole de P. en dosant le P total minéralisable contenu dans une partie aliquote de l'hydrolysat.

Résultats. Ces différentes déterminations ont été réalisées sur le nucléate, brut, les fractions obtenues par extraction discontinue à pH 5,5 et les fractions obtenues par précipitation fractionnée (A, B, A<sub>1</sub>). A<sub>1</sub> a été obtenu par fractionnement du brut directement par le système "CH<sub>3</sub>OH 20%  $\mu$  1,7 pH 3,5" sans passer par le stade de la fraction A.

Les résultats sont consignés dans le tableau suivant. Les % de P. et d'N. , de même que les rapports  $\frac{P}{N}$  renseignés représentent les valeurs moyennes obtenues par minéralisation directe de chacune des fractions. On constatera que le brut, et les fractions  $\gamma$  0,9-0,7-0,5-0,4-0,2-0,1-0,0-0,0<sup>1</sup> donnent les mêmes valeurs. Enfin, seules les deux fractions  $\gamma$  1 et A présentent une différence entre les pourcentages d'N. obtenus par minéralisation, et calculés à partir du nombre de moles de base par mole de P.

(x) On dissout 5 grs. de KI dans 35 cm<sup>3</sup> d'eau. On ajoute une solution saturée de chlorure mercurique jusqu'à précipitation persistante. On ajoute 400 cm<sup>3</sup> de NaOH 10 N, et on amène à 1 litre. Après 12 heures de repos, on centrifuge.

Fraction	Môles de base par môle de P				S môles de base par môle de P	Base purique Base pyrim.
	adénine	guanine	cytosine	uracile		

I. Brut et fractions  $\gamma$  0,9 - 0,7 - 0,5 - 0,4 - 0,2 - 0,1 - 0,0 - 0,0'  
 $\% P = 8,10$   $\% N = 14,4$   $\frac{P}{N} = 0,562$

$\gamma$ 0,9	0,265	0,299	0,208	0,234	1,01	1,25
0,7	0,283	0,281	0,201	0,255	1,02	1,24
0,5	0,256	0,300	0,212	0,256	1,02	1,19
0,4	0,263	0,302	0,207	0,244	1,01	1,25
0,2	0,270	0,295	0,213	0,235	1,01	1,26
0,1	0,271	0,303	0,203	0,230	1,007	1,33
0,0	0,267	0,307	0,206	0,221	1,001	1,34
0,0'	0,265	0,310	0,200	0,227	1,002	1,35
moyenne	0,267	0,300	0,206	0,239	1,01	1,28
brut	0,269	0,293	0,208	0,242	1,01	1,25

II. Fractions :  $\gamma$  0,8  $\% P = 7,95$   $\% N = 16,16$   $\frac{P}{N} = 0,49$   
 $\gamma$  0,3 " 8,30 " 13,84 " 0,60

$\gamma$ 0,8	0,308	0,330	0,233	0,310	1,18	1,175
0,3	0,248	0,290	0,202	0,208	0,95	1,31

III. Fractions  $\gamma$  I  $\% P = 8,3$   $\% N = 16,2$   $\frac{P}{N} = 0,512$

I	0,276	0,285	0,200	0,259	1,02	1,22
---	-------	-------	-------	-------	------	------

IV. Fractions A :  $\% P = 7,92$   $\% N = 17,6$   $\frac{P}{N} = 0,452$ .  
 B : " 8,16 " 16,1 " 0,505.  
 A<sub>1</sub> : " 8,81 " 18,3 " 0,481.

A	0,325	0,322	0,222	0,244	1,111	1,39
B	0,278	0,294	0,227	0,396	1,195	0,92
A <sub>1</sub>	0,355	0,337	0,204	0,266	1,161	1,47

=====  
 TABLEAU. II  
 =====

	N total	N calculé
$\gamma=1$	16,2	14,74
A	17,6	15,71.

Ces résultats seront discutés ultérieurement grâce aux confirma-  
tion et aux informations supplémentaires que nous avons pu obtenir  
par la technique des courbes d'électrotitration.

#### IV. ETUDE ELECTROTITRIMETRIQUE.

---

##### A. Principe.

Le principe de la méthode consiste à comparer entre elles la courbe d'électrotitration expérimentale de chacune des fractions, et la courbe d'électrotitration théorique calculée par approximations successives du nombre de fonctions OH phosphoriques secondaires éventuels, et en se basant sur les concentrations molaires des bases puriques et pyrimidiques renseignées dans le tableau II.

##### B. Conditions expérimentales.

On dissout environ 200 milligrammes de nucléate (déché à froid sous vide sur  $P_2O_5$ ) dans 40 cm<sup>3</sup> le KCl 0,2N. On ajoute à la solution une solution titrée de HCl N par fraction de cm<sup>3</sup> en mesurant chaque fois le pH (électrode de verre). On descend ainsi jusqu'à pH 3. On ajoute ensuite une solution de KOH N (x) également par fraction de cm<sup>3</sup> jusque pH 11. Enfin on redescend à nouveau jusque pH 3. La solution de nucléate est contenue dans un berlin bouché. Le bouchon présente quatre orifices: deux pour les électrodes reliées par fil blindé à un pH-mètre; un pour le passage du capillaire de la pipette servant à introduire les solutions titrées; enfin un dernier pour un capillaire relié à un bonbonne d'azote par l'intermédiaire de deux flacons laveurs contenant de la soude concentrée et de la baryte. Le courant d'azote, en plus de mettre la solution à l'abri du CO<sub>2</sub>, assure une agitation suffisante.

(x) Une lessive concentrée de potasse est décarbonatée par agitation avec de la baryte. Après repos, la solution est filtrée sous courant d'azote dans un flacon à vide purgé de l'air par un barbotage préliminaire d'azote. Pour faire une solution approximativement normale, on prélève un volume aliquot en travaillant sous azote et en aspirant au moyen d'une pipette munie d'un tube à CaO. Le volume ainsi prélevé est dilué dans un flacon jaugé approprié purgé d'air par de l'eau fraîchement bouillie et refroidie à l'abri de l'air.

Le berlin plonge dans un bain thermostatique réglé à  $25^{\circ}\text{C} \pm 0,01$ . La cuve du thermostat et le pH-mètre sont reliés à la terre. Le pH-mètre utilisé est employé comme millivoltmètre et est étalonné au préalable par plusieurs tampons standard de pH connu. On trace la courbe mV en fonction du pH. On obtient ainsi une droite d'étalonnage à partir de laquelle on calcule le pH après addition des solutions titrées. L'appareil est sensible au  $0,01 \text{ pH}$  et donne des mesures reproductibles au  $0,02 \text{ pH}$ .

### Remarques.

#### 1° Coefficients d'activité.

Afin de pouvoir comparer entre eux le nombre d'équivalents  $\text{H}^+$  ou  $\text{OH}^-$  ajoutés et le nombre d'équivalents  $\text{H}^+$  ou  $\text{OH}^-$  libres dans la solution, il est nécessaire de pouvoir convertir les activités de ces ions, calculés à partir du pH, en concentrations. Nous avons déterminé expérimentalement les valeurs des coefficients d'activité dans des conditions expérimentales décrites par une électrotitration à blanc de la solution de KCl de  $\text{pH } 6 \rightarrow \text{pH } 3 \rightarrow \text{pH } 11 \rightarrow \text{pH } 3$ .

Soit une solution de nucléate à  $\text{pH } 6$ . Amenons la à  $\text{pH } 3,5$ . On sait que  $\text{pH} = \log \frac{1}{[\text{H}^+]}$ . Si l'on représente  $[\text{H}^+]_a$  l'activité des ions  $\text{H}^+$  en équivalent  $10^{-6}$  par litre, on obtient  $[\text{H}^+]_a = 562,3$ . Or pour arriver au  $\text{pH } 3,5$  nous avons introduit  $649,4$  équivalents  $10^{-6}$  par litre d'ions  $\text{H}^+$ . On voit que  $[\text{H}^+]_a$  doit être divisé par un coefficient d'activité égal à  $0,8658$ .

Soit un  $\text{pH}$  de  $11$ . Par un raisonnement identique, nous avons trouvé que le nombre d'équivalents d'ions  $\text{OH}^-$  libres par litre de solution et exprimés en concentration, était donné par la formule  $\text{pOH} = \text{pK}_{\text{eau}} - \text{pH}$  en donnant à  $\text{pK}_{\text{eau}}$  la valeur de  $13,75$ . Ainsi pour un  $\text{pH}$  de  $11$ ,  $\text{pOH} = 2,75$ , soit une concentration en ions  $\text{OH}^-$  de  $1,778$  équivalents par litre.

#### 2° Emploi du KCl $0,2\text{M}$ .

L'emploi du KCl  $0,2\text{M}$  est motivé pour deux raisons.

a) Il est nécessaire de travailler à une concentration saline élevée afin de minimiser les effets de variation de force ionique apparaissant au cours de l'électrotitration sur les coefficients d'activité; (on sait en effet que les courbes  $-\log \gamma$  en fonction de  $\mu$  présentent un maximum relatif aux environs de  $0,2 \mu$ ) et de plus afin de pouvoir négliger l'influence imprévisible du nucléate sur

ces coefficients.

b). Nous avons choisi KCl et non NaCl (comme d'ailleurs KOH et non NaOH) afin de pouvoir maintenir constantes les caractéristiques de l'électrode de verre jusqu'à des pH aussi élevés que 11.

En négligeant ces précautions, les courbes d'électrotitration présenteront des anomalies a) une électrotitration en retour différente de l'électrotitration à l'aller et b) une fixation apparente de soude continuelle. Cette dernière anomalie est due à une réaction d'échange  $\text{Na} \leftrightarrow \text{H}^+$  qui se produit - à partir d'un pH voisin de 9- au sein de la pellicule de verre de l'électrode.

Les décalages des courbes d'électrotitration en retour sont les résultats des deux effets: régénération de l'électrode aux pH de plus en plus bas, et application dans les calculs de coefficients d'activité devenus inexacts.

3° Emploi de solutions de titre élevé.

Il s'agit d'une précaution supplémentaire afin de minimiser les variations de force ionique au cours de l'électrotitration.

Conclusion.

Moyennant ces conditions, les courbes d'électrotitration de toutes les fractions sont identiques à l'aller et au retour à 0,05 pH près.

C) Tracé des courbes expérimentales.

Soit  $q'$  moles  $10^{-6}$  de P. dans les  $40 \text{ cm}^3$  de solution. Cette valeur de  $q'$  est déterminée par dosage du phosphore minéralisable contenu dans la solution. Comme on exprime les résultats par 4 moles de P., on représente par  $q = \frac{q'}{4}$ .

Supposons que la solution est amenée par addition de HCl jusqu'à pH 3. Nous allons donner le principe du calcul appliqué lors de l'électrotitration de pH 3 à pH 11.

Soit  $n =$  le nombre de  $\text{cm}^3$  de NaOH ajouté et de titre connu.

$v =$  volume total de la solution.

$[\text{H}^+]_c$  la concentration des ions  $\text{H}^+$  libres en équivalents  $10^{-6}$ /litre.

$\text{H}^+ = \frac{[\text{H}^+]_c \times v}{1000}$  = la concentration des ions  $\text{H}^+$  libres contenus dans le volume  $v$  de solution, en équivalents  $10^{-6}$ .

$[OH^-]_c$  = la concentration des ions  $OH^-$  libres en équivalents  $10^{-6}$ /litre.  
 $\frac{[OH^-]_c}{1.000} = \frac{[OH^-]_c \times v}{1.000}$  = la concentration des ions  $OH^-$  libres contenus dans le volume  $v$  de solution, en équivalent  $10^{-6}$ .

" $H^+$ " = la concentration des ions  $H^+$  libres contenus à pH 3 dans le volume initial de la solution, en équivalents  $10^{-6}$ .

$b$  = la quantité des ions  $OH^-$  ajoutés en équivalents  $10^{-6}$ .

La quantité d'ions  $OH^-$  fixés par l'acide nucléique sera donnée par  $b' =$

1° pour les pH inférieurs à 7:  $b' = b - (H^+ - "H^+")$

2° pour les pH supérieurs à 7:  $b' = b - (OH^- + "H^+")$ .

Enfin  $b_1 = \frac{b'}{q}$  donnera le nombre d'équivalents de base fixé par l'acide nucléique et ramené à 4 P.

On trace alors  $b_1$  en fonction du pH.

Tous les points expérimentaux des figures 32 à 36 ont été obtenus de cette façon.

Nous avons également tracé à titre de vérification les courbes d'électrotitration du pH 6,5 à pH 3 de même que la courbe en retour pH 11 à pH 3. Le principe de la méthode de calcul reste évidemment le même et on trouvera aisément les modifications à apporter au raisonnement précédent.

Nous insistons sur le fait que même pour les fractions de poids moléculaire élevé, les courbes pH 6,5  $\rightarrow$  pH 3; pH 3  $\rightarrow$  pH 11; pH 11  $\rightarrow$  pH 3 sont identiques.

#### D) Tracé des courbes théoriques.

Les courbes ont été tracées par application de la loi de dilution d'Oswald  $pH = pK + \log \frac{\alpha}{1-\alpha}$   $\alpha =$  degré d'ionisation.

L'utilisation de cette formule nécessite donc la connaissance des pK. Levene calcula les pK des différentes fonctions ionisables de l'acide ribonucléique par électrotitration de molécules plus simples et chimiquement bien connues: nucléotides et nucléosides. Il proposa les valeurs suivantes:

groupes phosphoriques primaires: pK: 1-1-2-2.

groupes  $\text{NH}_2$  aromatiques : guanine: pK 2,3  
: adénine: pK 3,7  
: cytosine: pK 4,2.

groupe OH phosphorique secondaire : pK = 6,0

groupes OH énoliques : guanine: pH 10,1  
: uracile: pK 10,2.

Nous avons adopté ces valeurs après les avoir vérifiées par électrotitration dans les conditions expérimentales décrites à partir des acides guanylique, cytidylique et adénylique. Nous ne disposions pas d'acide uridylique. Nous avons toutefois admis également le pK 10,2.

Les courbes d'électrotitration débutent à pH 3. A ce pH les OH phosphoriques primaires sont ionisés 100%. Les courbes d'électrotitration ne peuvent donc nous donner aucun renseignement à leur sujet. Nous avons ensuite calculé systématiquement les valeurs de  $\alpha$  de toutes les fonctions depuis pH 3 jusque pH 11, à des intervalles de pH de 0,5. (voir tableau III)

L'examen des valeurs de  $\alpha$  montre que l'intervalle pH 3  $\rightarrow$  pH 11 couvre suffisamment le domaine d'ionisation, non pas de toutes les fonctions ionisables ( $\text{NH}_2$  de la guanine donne en effet  $\alpha = 0,834$  à pH 3), mais au moins de l'une fonction de chacune des bases.

Soit  $i$  = une fonction ionisable monovalente.

$\alpha$  = le coefficient d'ionisation d'une fonction  $i$  pour une valeur de pH donnée.

$c$  = la concentration molaire de la base possédant cette fonction  $i$  (tableau II).

Etant donné que toutes les fonctions ionisables sont monovalentes, la courbe de  $\sum \alpha_i (c_i \times 4)$  en fonction du pH donnera la courbe d'électrotitration théorique ramenée par 4 mols de phosphore. (voir page 143)

Exemple: soit la fraction  $\gamma$  0,9. Le tableau II nous montre que le nombre de mols par môle de P., de adénine = 0,265  
guanine = 0,299  
cytosine = 0,208.

Moyennant ces valeurs, on aura à pH 3  $\sum \alpha_i (c_i \times 4) =$

$(0,265 \times 4 \times 0,166) + (0,299 \times 4 \times 0,834) + (0,208 \times 4 \times 0,06) = 1,223$ .

Valeurs de  $\alpha$  en fonction du pH.

pH	NH <sub>2</sub> adénine pK 3,7	NH <sub>2</sub> guanine pK 2,3	NH <sub>2</sub> cytosine pK 4,2	OH phospho- rique secon- daire pK 6,0	OH énoI. guanine pK 10,1	OH énoI. uracile pK 10,2
3	0,166	0 8 34	0,06	0	0	0
3,5	0,386	0,941	0,166	0	0	0
4	0,667	0,980	0,386	0	0	0
4,5	0,863	0,99 4	0,666	0,02 9	0	0
5	0,9 52	1	0,8 63	0,10	0	0
5,5	0,984	1	0,952	0,24	0	0
6	0,995	1	0,984	0,50	0	0
6,5	1	1	0,995	0,76	0	0
7	1	1	1	0,909	0	0
7,5	1	1	1	0,969	0,0025	0,0020
8	1	1	1	0,990	0,0079	0,0060
8,5	1	1	1	1	0,025	0,020
9	1	1	1	1	0,074	0,059
9,5	1	11	1	1	0,20	0,17
10	1	1	1	11	0,443	0,387
10,5	1	1	1	1	0,715	0,667
11	1	1	1	1	0,888	0,863

T A B L E A U III.

Le tracé complet de la courbe nécessitait cependant la connaissance du nombre de OH phosphorique secondaire par 4 mûles de P. L'unique façon de procéder était dans notre cas de tracer la courbe théorique en employant dans le calcul un nombre croissant d'équivalents de cette fonction. On choisit alors le nombre d'équivalents qui donne la meilleure correspondance entre les courbes théoriques et expérimentales.

Pour toutes les fractions, ce procédé nous a conduit à adopter 0,50 équivalents de OH phosphorique secondaire par 4 P. (fig. 32 à 36).<sup>(x)</sup>

(x) Nous donnons en appendice au présent chapitre, les valeurs de

$\sum \alpha_i (c_i \times 4)$  pour toutes les fractions et aux différents pH.

## V. CONCLUSIONS.

### A. Fractions obtenues par extraction fractionnée à pH 5,5.

1° L'examen du tableau II et des courbes d'électrotitration de la figure 32, montrent que toutes les fractions obtenues par extraction fractionnée, excepté  $\gamma$  1-  $\gamma$  0,8-  $\gamma$  0,3, présentent la même composition chimique que le nucléate non fractionné. On peut en conclure que la polydispersité de l'acide nucléique n'est pas de nature chimique.

2° La fraction  $\gamma$  0,8 se caractérise par un déficit en phosphore.

Ce résultat obtenu par chromatographie est confirmé par la courbe d'électrotitration de la figure 33. Rappelons en effet que ces courbes expriment le nombre d'équivalents de NaOH fixés par 4 P. Si on divise le nombre de moles de base par mole de P. (Tableau II) par 1,18, on trouvera le nombre moyen de moles de base par tétranucléotide statistique:

adénine	guanine	cytosine	uracile.
0,26 <sub>1</sub>	0,280	0,198	0,263.

En comparant ces valeurs avec les résultats obtenus à partir des fractions normales, on voit que le nombre de moles d'adénine et de cytosine concorde à 1,5% près, tandis que le nombre de moles

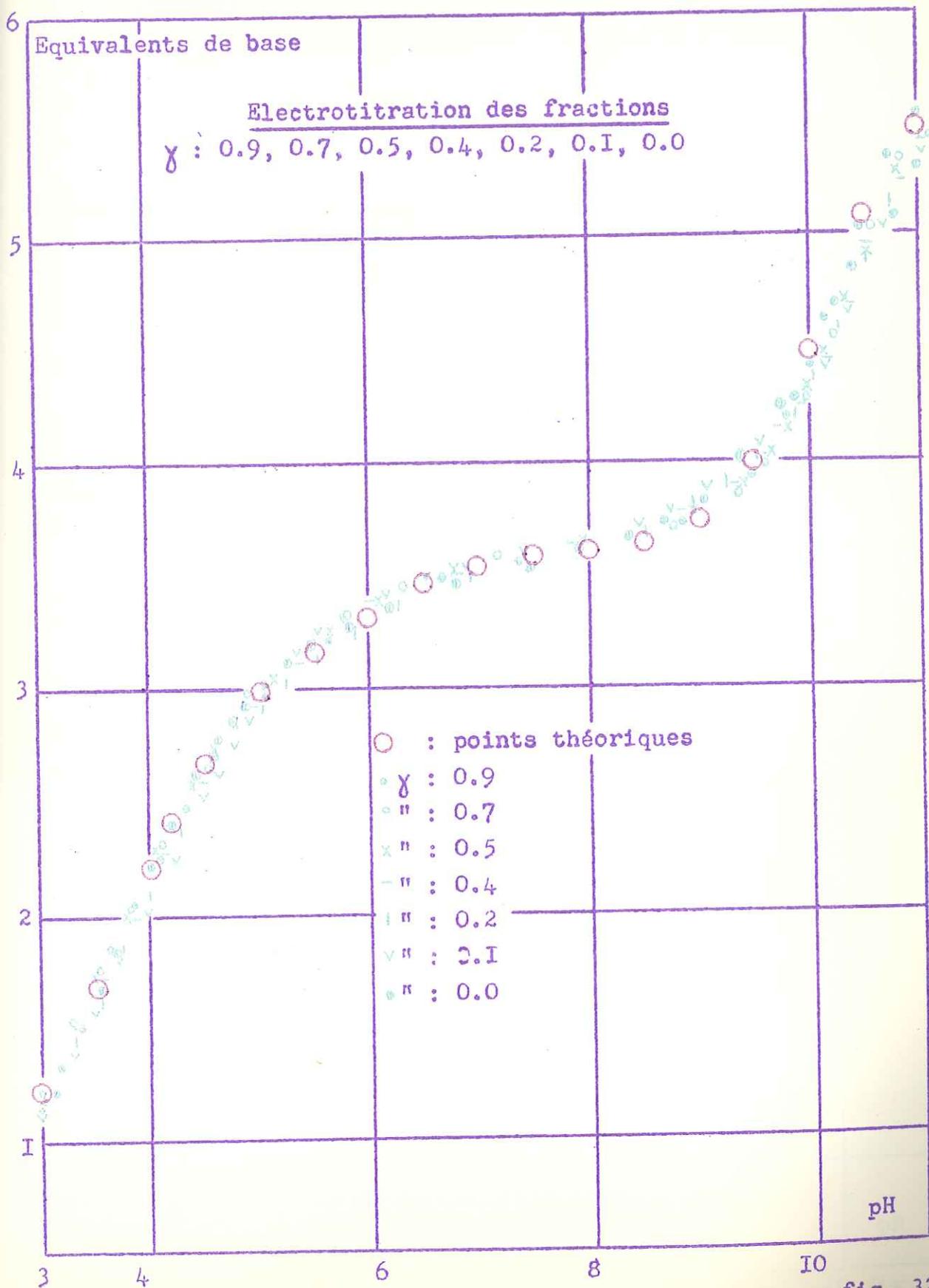
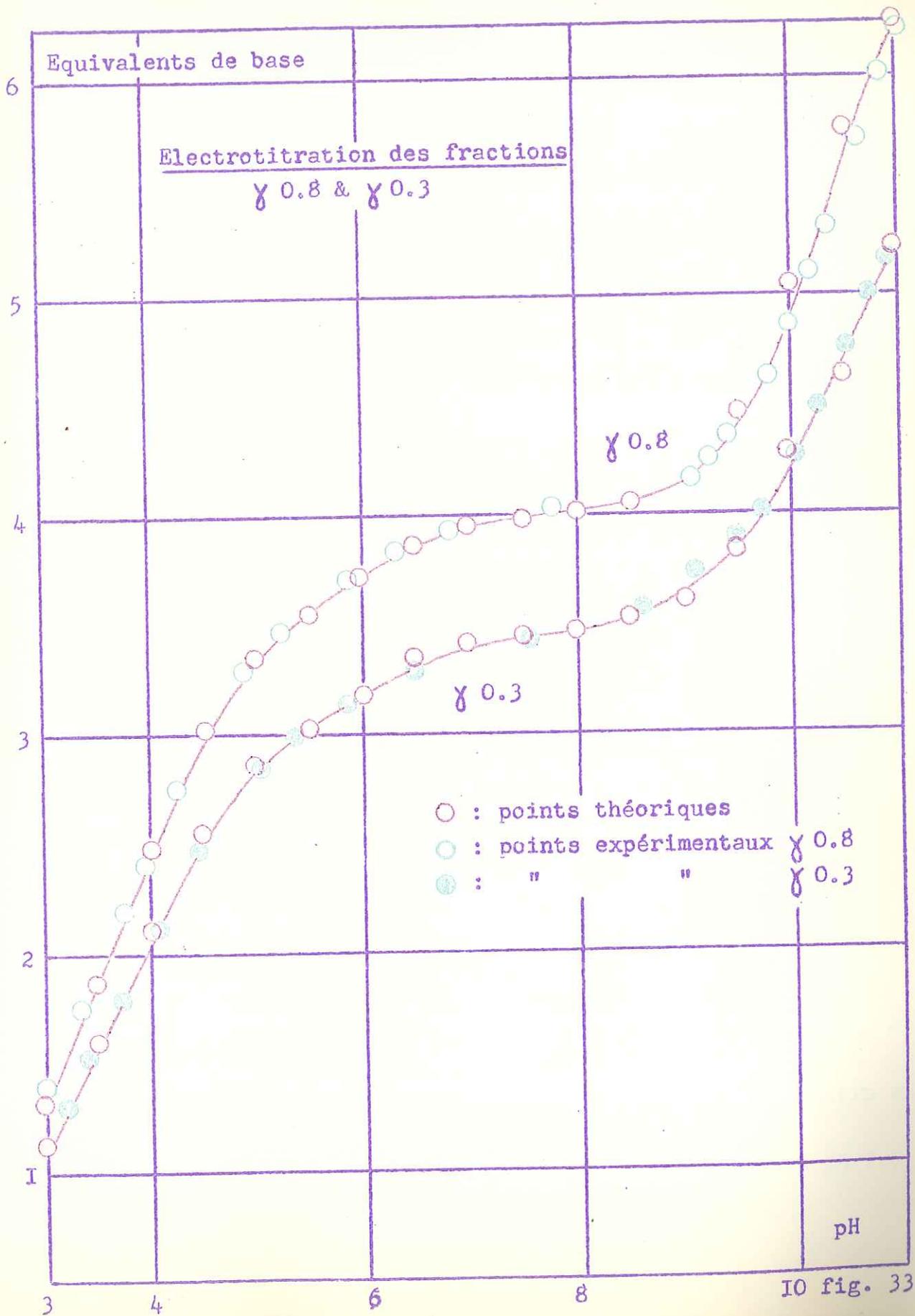


fig. 32



de guanine et d'uracile concorde à 6% près. Cette divergence est toutefois trop faible pour être significative.

3° La fraction  $\gamma$  0,3 au contraire se caractérise par un excès de P. confirmé également par la courbe correspondante de la figure 33.

De même, en divisant le nombre de moles de base par môle de P.

(tableau II) par 0,95, on trouvera:

adénine	guanine	cytosine	uracile
0,261	0,305	0,212	0,220

La concordance avec les valeurs relatives aux fractions normales est excellente.

4° La composition de la fraction  $\gamma$  1 (tableau II) est à son tour très semblable à celle des fractions normales. Or  $N \text{ total} > N \text{ bases}$ , et les points expérimentaux de la figure 34 montrent clairement un écart important vis-à-vis de la courbe théorique I. Le déficit en azote  $N \setminus$  bases provient donc vraisemblablement d'une substance azotée présentant un pK dans la région pH 7,5. En effet, en se basant sur les valeurs renseignées dans le tableau II, en admettant 0,50 équivalent de OH phosphorique secondaire par 4P., et enfin en supposant 0,60 équivalent d'une fonction supplémentaire de pH 7,5,

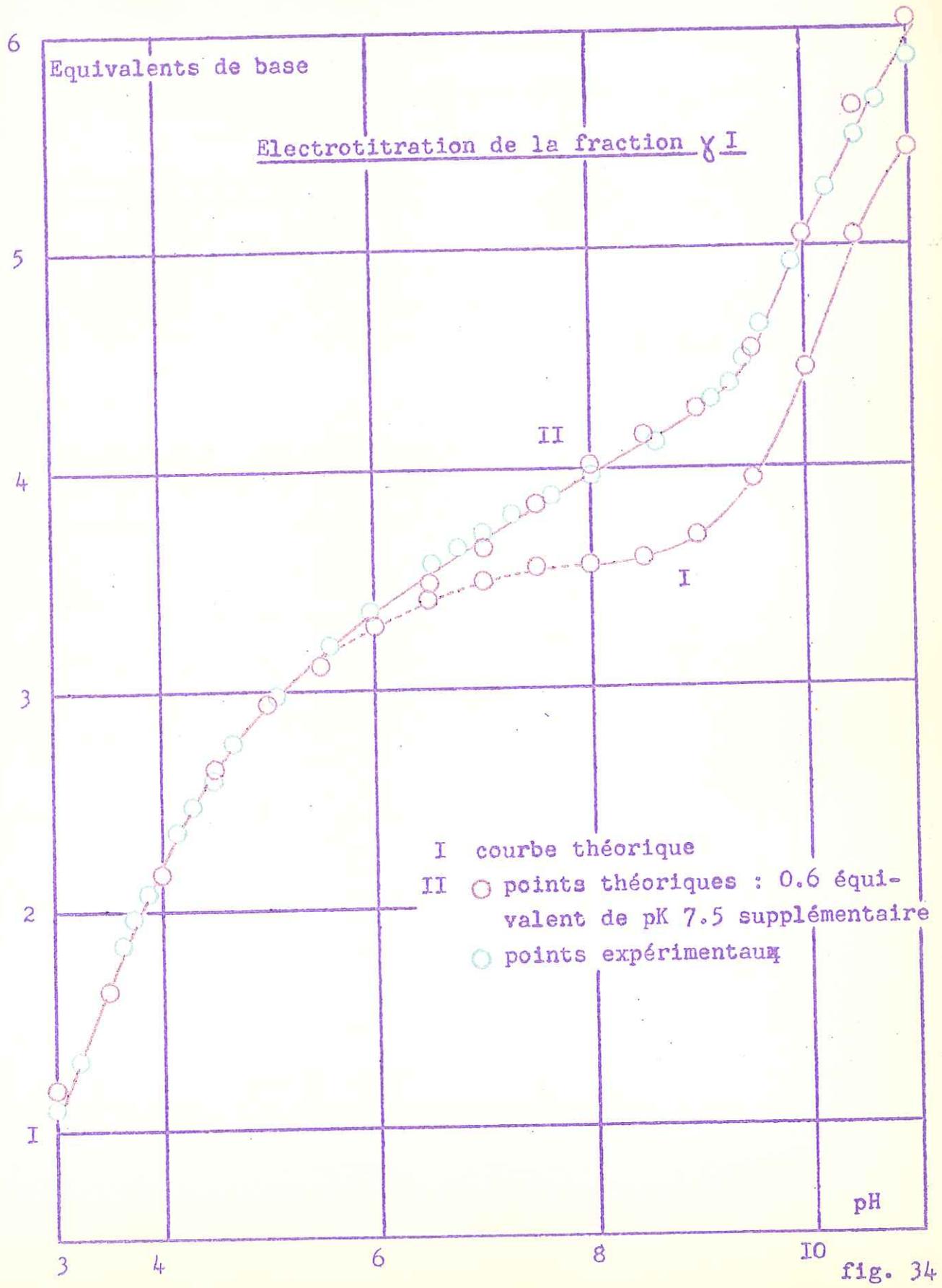


fig. 34

on obtient les points théoriques de la courbe II . La concordance avec les points expérimentaux est très satisfaisante.

Afin de déterminer si cette nouvelle fonction appartient à un constituant particulier de l'acide nucléique, nous avons réalisé une électrophorèse de la fraction  $\gamma$  1 à pH 7 et dans des conditions expérimentales identiques à celles renseignées page 19 et relatives à la figure 3.

La figure 37 montre clairement l'hétérogénéité de la fraction  $\gamma$  1. Nous concluons que la fonction de pK 7,5 est étrangère à l'acide nucléique.

Nous pouvons conclure avec certitude:

a) quelque soit le poids moléculaire de la fraction, la composition moyenne de chaque tétranucléotide statistique est:

adénine: 1,07 môle.

guanine: 1,20 môle.

cytosine: 0,82 môle.

uracile: 0,96 môle.

OH phosphorique secondaire: 0,50 équivalent.

b) Nous ne connaissons évidemment rien quant aux OH phosphoriques, primaires et tertiaires éventuels.

Electrophorèse de la fraction : 81

PH 7.

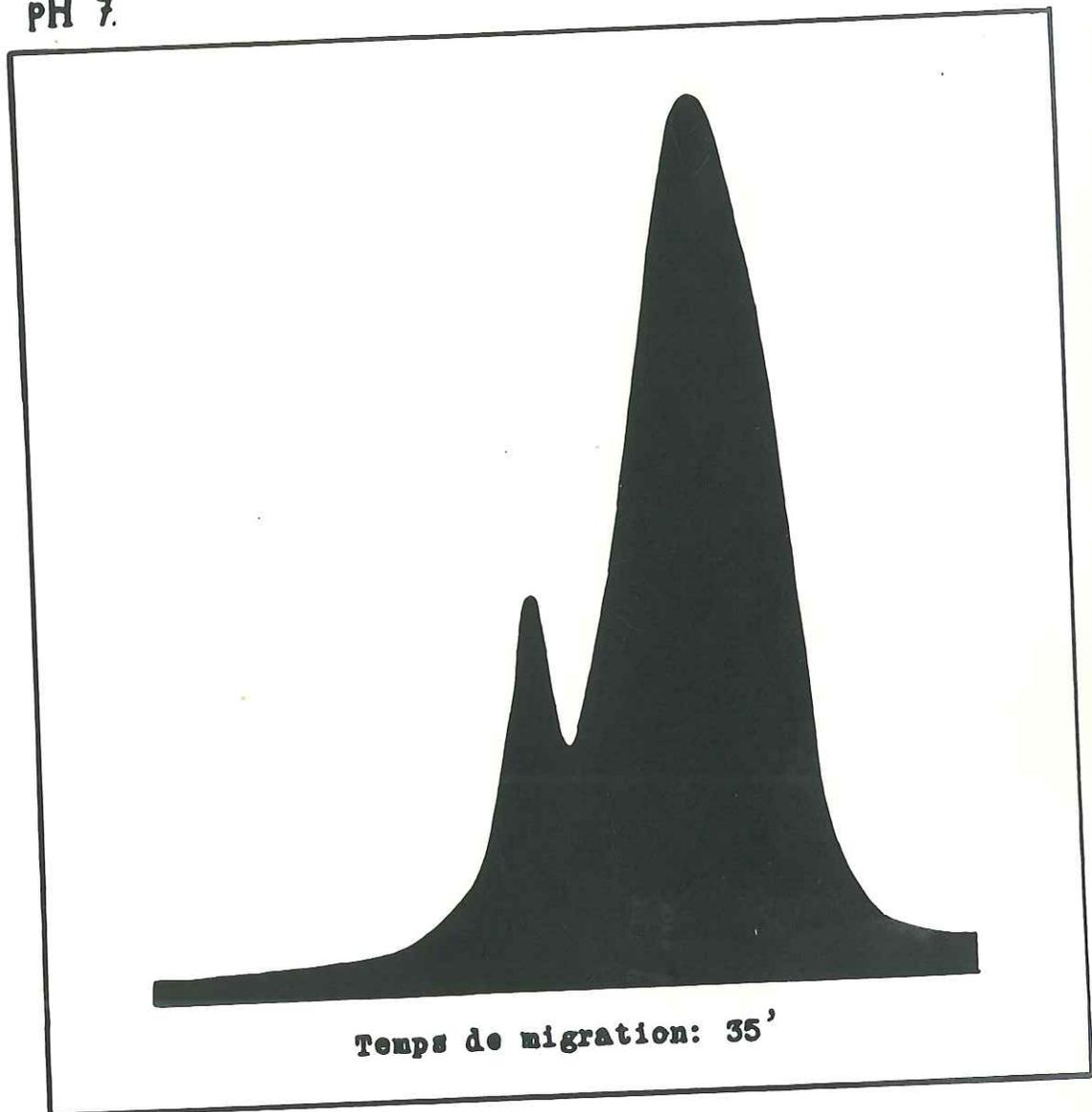


fig 37

c) Dans les fractions  $\gamma$  0,8 et  $\gamma$  0,3, il y a respectivement un déficit et un excès en P. Signalons encore que ces variations n'affectent pas le nombre de fonctions OH secondaire.

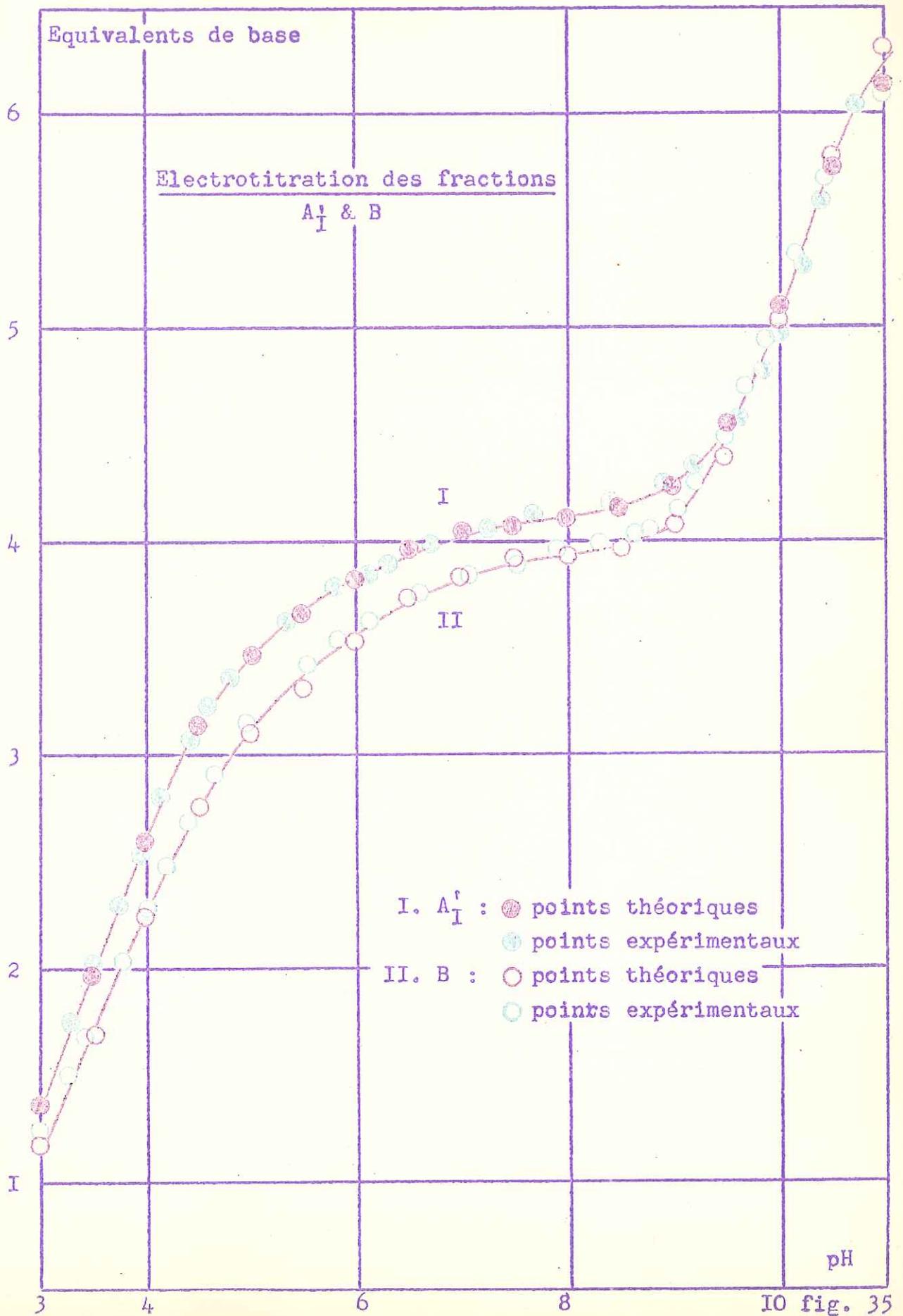
d) Enfin, la fraction  $\gamma$  1 est contaminée par une substance azotée étrangère présentant un pK de 7,5.

#### B) Fractions obtenues par précipitation fractionnée.

Le tableau II montre que le précipitant de Chantrenne, de même que le précipitant " $\text{CH}_3\text{OH}$  20%  $\mu$  1,7 pH 3,5" provoque de profondes transformations dans la composition chimique. Celle-ci se caractérise par une déphosphorisation importante, de même que par une distribution différente des bases.

1° Ces transformations sont particulièrement importantes lorsque la précipitation est réalisée au moyen du précipitant de Chantrenne. En effet, nous avons vu que en ce qui concerne la fraction A, N total > N bases. La figure 36 montre également une discordance entre les courbes d'électrotitration théorique et expérimentale.

Ce comportement particulier signifie que la méthode chromatographique mise au point en vue de la séparation des bases puriques et des



Equivalents de base

Electrotitration de A

5

4

3

2

1

○ : points théoriques  
○ & ● : points expérimentaux

pH

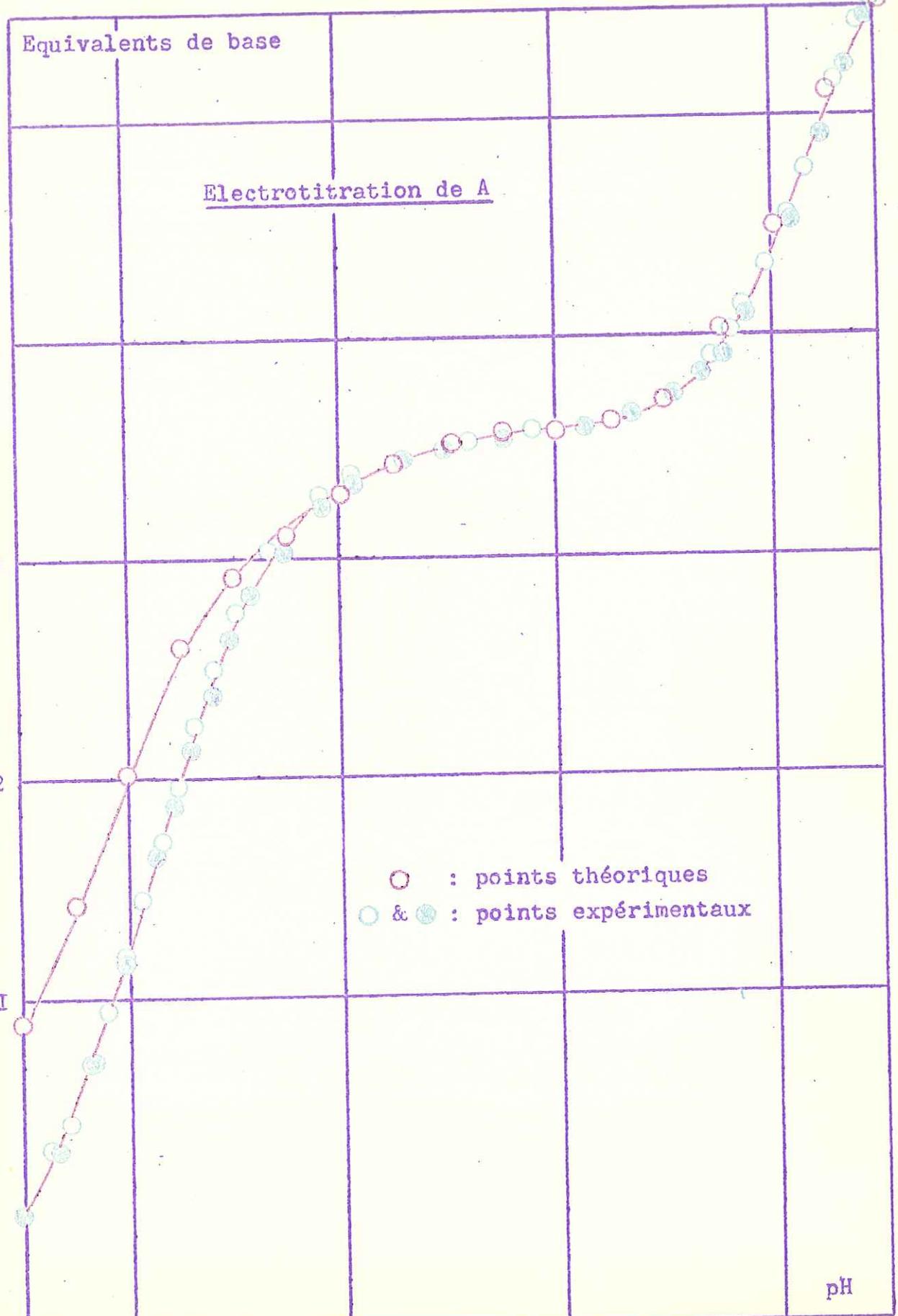
3

4

6

8

10 fig. 36



nucléotides pyrimidiques, n'est plus applicable à la fraction A par suite de modifications chimiques dans la nature même des constituants.

2° Quant aux fractions B et A<sub>1</sub><sup>i</sup>, N total = N bases; ce qui est confirmé par les courbes de la figure 35. En divisant le nombre de moles de base par mole de P. (tableau II) respectivement par 1,195 et 1,165, on trouvera que le nombre moyen de moles de base par tétranucléotide statistique est:

	Fraction B	Fraction A <sub>1</sub> <sup>i</sup>
Adénine :	0,233	0,306
Guanine :	0,246	0,290
Cytosine :	0,190	0,175
Uracile :	0,331	0,230

c'est-à-dire Fraction B: uracile >> guanine > adénine > cytosine.

Fraction A<sub>1</sub><sup>i</sup>: adénine ≥ guanine > uracile > cytosine.

3° La déphosphorylation importante de ces fractions n'affecte pas le nombre de OH phosphorique secondaire (0,50 équivalent par 4 P.).

3° Ces phénomènes de dégradation sont cependant intéressants. Ils montrent en effet que - à moins d'admettre une dépolymérisation complète - suivie d'une réorganisation partielle suivant un type différent du premier - la disposition des bases dans la chaîne polynucléotidique

n'est pas satisfaisante. Au contraire, les segments de celle-ci seraient inégalement riches en chaque type de base.

Signalons que Zamenhof et Chargaff (71) arrivent à la même conclusion par dégradation enzymatique de l'acide désoxyribonucléique.

Ils trouvent en effet, que après action de la désoxyribonucléase, il reste un résidu non dialysable de composition nettement différente de celle du matériel original et de la fraction dialysable.

### C. Liaisons secondaire dans les fractions de haut poids moléculaire.

Après avoir réalisé à partir de la fraction  $\gamma$  0,0 les trois courbes complètes d'électrotitration. pH 8  $\rightarrow$  3.  $\rightarrow$  11  $\rightarrow$  3, ramenons le pH à 5,5. La concentration finale est de 0,35% en nucléate et la force ionique en KCl  $\mu = 0,166$ .

On détermine la constante de sédimentation et on trouve:  $s_{20}^0 = 3,52$ .

D'autre part, on dissout une quantité de la fraction  $\gamma$  0,0 dans une solution de KCl  $\mu$  0,166, de façon à avoir une concentration égale à 0,35%. On amène à pH 3 par addition d'acide chlorhydrique dilué. Enfin on ramène à pH 5,5 par quelques gouttes de soude diluée.

Ces additions se font dans les mêmes conditions de température et d'agitation que lors du tracé des courbes d'électrotitration.

On trouve:  $s_{20}^0 = 3,43$ .

Enfin, refaisons une solution à 0,35% dans KCl 0,166, tamponnée à pH 5,5 par un tampon acétate  $\mu$  0,01. On trouve  $s_{20}^0 = 5,70$ .

On voit que le simple fait d'amener une solution de la fraction  $\gamma$  0,0 à pH 3, provoque une dépolymérisation importante qui ne semble pas affecter la forme de la courbe d'électrotitration.

Il est difficile de supposer que cette dépolymérisation soit le résultat de l'hydrolyse de liaison esther: ribose-acide phosphorique. Nous en arrivons ainsi à postuler dans les fractions de haut poids moléculaire la présence de liaisons secondaires.

Ce comportement est comparable aux observations de Gulland, Jordan et Taylor (72) et de Gulland (73-74) d'une part, et de Zannenhoff et Chargaff (75) d'autre part réalisées à partir des acides désoxyribonucléiques.

A leur tour Chantrenne, Lendeström-Lang et Vandendriessche (76) et Vandendriessche (77) ont montré, par électrotitration et dilatométrie, que la dégradation de l'acide ribonucléique par la ribonucléase se

décomposait en deux phénomènes: phénomène de dénaturation , et phénomène d'hydrolyse des liaisons ester.

Jusqu'à présent la nature de cette superstructure moléculaire de l'acide ribonucléique est inconnue. Faisons simplement remarquer que dans de telles substances, la possibilité de phénomènes de résonance est considérable.

A P P E N D I C E.

Valeurs de  $\sum \alpha_i (c_i \cdot x_i)$  en fonction du pH (x)

I. Fractions  $\gamma$  0,9 - 0,7 - 0,5 - 0,4 - 0,2 - 0,1 - 0,0 - 0,0<sup>1</sup>.

pH	0,9	0,7	0,5	0,4	0,2	0,1	0,0	0,0 <sup>1</sup>
3	1,223	1,173	1,222	1,232	1,214	1,240	1,250	1,258
3,5	1,672	1,628	1,665	1,680	1,668	1,693	1,705	1,709
4	2,200	2,167	2,186	2,206	2,205	2,224	2,233	2,231
4,5	2,673	2,644	2,657	2,675	2,687	2,696	2,707	2,645
5	2,973	2,946	2,957	2,974	2,993	2,995	3,006	2,989
5,5	3,151	3,123	3,135	3,151	3,174	3,172	5,183	3,165
6	3,320	3,291	3,303	3,320	3,343	3,340	3,358	3,476 <sup>332</sup>
6,5	3,464	3,436	3,448	3,464	3,488	3,484	3,496	3,476
7	3,542	3,514	3,526	3,542	3,566	3,562	3,574	3,554
7,5	3,577	3,549	3,561	3,577	3,601	3,597	3,609	3,589
8	3,598	3,570	3,582	3,598	3,622	3,618	3,630	3,610
8,5	3,638	3,610	3,622	3,638	3,662	3,658	3,670	3,650
9	3,735	3,703	3,721	3,735	3,754	3,752	3,763	3,746
9,5	3,992	3,958	3,986	3,996	4,008	4,006	4,016	4,002
10	4,494	4,453	4,500	4,501	4,499	4,501	4,506	4,500
10,5	5,091	5,094 <sup>4</sup>	5,113	5,103	5,083	5,089	5,088	5,093
11	5,489	5,438	5,522	5,503	5,471	5,478	5,473	5,485

(x) Les calculs sont effectués en se basant sur les valeurs du tableau II ( $c_i$ ) et du tableau III ( $\alpha_i$ ), et en admettant 0,50 équivalent de OH phosphorique secondaire pour 4 P.

pH	Fractions $\gamma_{0,0}$ et $\gamma_{0,3}$		Fractions $\gamma_1$		Fractions A - B - $A_1$		
	$\gamma_{0,0}$	$\gamma_{0,3}$	I	II (x)	A	B	$A_1$
3	1,311	1,137	1,182	1,182	1,295	1,171	1,365
3,5	1,873	1,609	1,632	1,632	1,861	1,687	1,951
4	2,476	2,111	2,162	2,162	2, <sup>4</sup> <del>3</del> 72	2,244	2,583
4,5	3,011	2,562	2,633	3,633	3,008	2,754	3,123
5	3,347	2,851	2,931	2,931	3,342	3,089	3,454
5,5	3,539	3,025	3,108	3,108	3,532	3,302	3,642
6	3,713	3,192	3,275	3,294	3,706	3,525	3,814
6,5	3,859	3,336	3,420	3,475	3,852	3,723	3,960
7	3,938	3,414	3,499	3,643	3,930	3,832	4,039
7,5	3,973	3,449	3,534	3,834	3,965	3,902	4,090
8	3,996	3,409	3,554	4,010	3,987	3,914	4,100
8,5	4,042	3,506	3,594	4,139	4,026	3,957	4,138
9	4,155	3,595	3,689	4,270	4,127	4,076	4,247
9,5	4,459	3,833	3,948	4,542	4,400	4,400	4,535
10	5,049	4,296	4,450	5,050	4,925	5,030	5,093
10,5	4,755	4,644	5,050	5,650	5,548	5,793	5,758
11	6,226	5,208	5,450	6,050	5,962	6,307	6,139

(x) 0,60 équivalent supplémentaire de pK 7,5.

CONCLUSIONS GENERALES.

L'acide ribonucléique extrait de la levure par action de la soude, tout en répondant aux tests classiques de pureté (chapitre I), manifeste cependant une polydispersité continue et présente les propriétés caractéristiques des solutions solides avec des écarts à la loi de Raoult d'importance variable en fonction du pH (chapitre III et IV).

Afin de vérifier la nature de cette polydispersité, nous avons réalisé un fractionnement par extraction fractionnée en système discontinu (chapitre IV).

La détermination des constantes de diffusion et de sédimentation de chacune des fractions ainsi obtenues, montre que la polydispersité est une fonction de masse. Les poids moléculaires obtenus varient suivant une courbe continue de 8.000 à 46.600 (chapitre V).

L'analyse chromatographique et électrotitrimétrique de ces mêmes fractions montre que la composition chimique moyenne est indépendante du poids moléculaire et que, par conséquent, la polydispersité n'est pas de nature chimique (chapitre VI).

La composition moyenne d'un tétranucléotide hypothétique est:

adénine : 1,07 môle  
guanine : 1,20 môle  
cytosine : 0,82 môle  
uracile : 0,96 môle.

OH phosphorique secondaire: 0,50 équivalent.

Deux fractions présentent cependant des taux de phosphore anormaux mais ces variations n'affectent pas les OH phosphoriques secondaires.

Nous montrons la nature et l'importance des modifications de structure chimique que provoque l'emploi de systèmes solvant-précipitant de pH inférieur à 5,5 (chapitre VI). Ces mêmes observations militent en faveur d'une distribution non statistique des différents types de base dans la chaîne polynucléotidique.

Nous postulons enfin la présence de liaisons secondaires dans les fractions de haut poids moléculaires.

## B I B L I O G R A P H I E.

### INTRODUCTION.

- (1) Chantrenne H. Bull.Soc.Chim.Belg. 55 - 5 - 1946.
- (2) Grégoire. Thèse. Université de Paris. 1945.
- (3) Loring.H.S. J.B.C. 130-251, 1939.
- (4) Longworth. L.G. and Mac. Innes. D.A. Journ.Gen.Phys. 25 - 507-1942
- (5) Markham and Matthews. REF. Smith K.M. Nautre. 162 - 88 - 1958.
- (6) Schramme G. Ber.Chem.Ges. 74- 532 - 1941.
- (7) Cohen SS. and Stanley SS. J.B.C. 144 - 589 - 1942.
- (8) Sevag, Lackman and Smolens. J.B.C. 124 - 425 - 1938.
- (9) Stanley, Kerr and Serandarian. J.B.C. 180 \_ n°3 oct. 1949.
- (10) Bolomey R.A. and Allen F.W. J.B.C. 144 - 113 - 1942.
- (11) Smolens J. and Sevag M.G. J.Gen.Phys. 26 - 11 - 1942.
- (12) Loring.H.S. Journ.Gen.Phys. 25 - 497 - 1942.
- (13) Mac. Party. Journ.Gen.Phys. 29 - 123 - 1946.
- (14) Mirsky and Pollister. Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A. 28 - 344 - 1942.
- (15) " " " . Biolog.Symposia. 10 - 24 - 1943.
- (16) " " " . Journ.Gen.Phys. 30 - 101 - 1946)
- (17) Stanley, Kerr and Serandarian.J.B.C. 180 - n°3 .Oct. 1949.
- (18) Gulland J.M. Jordan D.O. and Therfell.C.J. Journ.Chem.Soc.  
pp.1129 - 1947.
- (19) Chargaff E. Experientia. Vol VI. Fasc.6 pp. 201 - 15 - VI - 1950.

### CHAPITRE I.

- (21) Johnson T.B. and Harkins.H.H Journ.Am.Chem.Soc. 51 - 1779 - 1929.
- (22) Chantrenne H. Bull.Soc.Chim.Belges. 55 - 5 - 1946;
- (23) Junger G. and Allgin L.G. Acta. Chemica.Scandinavica. 5 -1300-1925
- (24) Delcambe L. Thèse doctorat. Univ.Liège. 1950.

### CHAPITRE II.

- (25) Northrop J.H. and Kunitz M. Journ.Gen.Phys. 13 - 781 - 1940<sup>3</sup>.
- (26) Kunitz M. Northrop J.H. Col.Sprin Harbor Symposia. 6 - 325 - 1938.
- (27) Butler, J.A.V. Journ.gen.Phys. 24 - 189 - 1941.
- (28) Herriot R.M. Chem.Rev. 30 - 413 - 1942.

- (29) Northrop - Kunitz - Herriot. Crystalline Enzymes 1948.  
Columbia Uni. Press, N.Y.
- (30) Meyer K.H. Natural and Synth. High Polymers . 1950. Inter. Publ.
- (31) Mark H. Etat actuel de la chimie et de la physique des  
molécules géantes. 1950 .Science et lettres. Liège.
- (32) Landsteiner K. And Heidelberger M. Journ.Gen.Phys. 6 - 131 + 1923.
- (33) Herriot R.M. Desreux V and Northrop J.H. Journ.Gen.Phys.  
24 - 213 - 1940.
- (34) Kunitz M. Journ.Gen.Phys. 22 - 207 - 1938\_39.
- (35) Cohn E.J. and Edsall J.T. Proteines, Amino Acids and Peptides as  
Ions and Dipolar ions. 1943.
- (36) Falconer J.S. and Taylor. D.B. The Biochem.journ. 40 - 835 - 1946
- (37) Kirkwood J.G. Journ.Chem.Phys. 2 - 351 - 1934.
- (38) Cohn E.J.(to Research Corp.) U.S. 2 - 390 - 074 Déc.4.1945.
- (39) Cohn E.J. and Hughes Weare. J.A.C.S. 69 - 1753 - 1947.

### CHAPITRE III.

=====

- (40) Ghuyssen J.M. Bull.Soc.Chim.Belg. 59 - 490 - 1950.
- (41) Macheboeuf et Delsal. Bull.Soc.Chim.Biolog. 25 - 116 - 1943.
- (42) Boyd. W.C. J.A.C.S. 167 - 1035 - 1945.
- (43) Kunitz. M. J.B.C. 164 - 563 - 1946.

### CHAPITRE IV.

=====

- (44) Oth.A. Thèse Doctorat. Univ .Liège. 1949.
- (45) Schulz. G.V. Zs.Phyc.Chem. A. 179 - 321 - 1937  
A. 184 - 1 - 1939.
- (46) Huggins ~~and~~ L. Journ.Chem.Phys. 46 - 151 - 1942.
- (47) Flory P.J. Journ.Chem.Phys. 12 - 114 - 425 - 1944<sup>4</sup>.
- (48) Scott R.L. Journ.Chem.Phys. 17 - 268 - 279 - 1949.
- (49) Mark H. Etat actuel de la chimie et de la physique des  
molécules géantes. Science et Lettres .Liège. 1950.
- (50) V.Desreux. Rec.Trav.Chim.Pays-Bas. 68 - 799 - 1949 .
- (51) " .Bull.Soc.Chim.Belges. 57 - 146 - 1948.
- (52) " et Spiegels M.C. Bull.Soc.Chim.Belg. 59 - 1950.
- (

### CHAPITRE V.

=====

- (53) Svedberg and Pederson. The Ultracentrifuge. Oxford. 1940 - 54.
- (54) Longworth L.J. Annals of the N.Y. Acad.Sci. 41 - 241 - 1946.

- (55) Longsworth. Optical Methods in Electrophoresis. Industrial and  
Eng.Chemistry.Analytical. Ed. April 1949 - p.219.
- (56) Lamm. O. Nova.Acta.Regiae Soc.Sci. Upsaliensis.(4) 1°, N°6,1937.
- (57) Cohen S.S and Stanley W.M. J.B.C. 144 - 589 - 1942.
- (58) Backer J.E. and Worthington F. Allen. J.B.C.1950.

CHAPITRE VI.

- =====
- (59) Chargaff E. Experientia VI, 6 - 201 - 1950.
- (60) Vischer E. and Chargaff E. J.B.C. 176 - 704 - 1948.
- (61) Chargaff E. and Vischer E. J.B.C. 176 à 715 1948.
- (62) Chargaff E. Magasanik B, Doniger R and Vischer E. J.A.C.S.
- (63) Markham R and Smith J.D. Bioch.Journ. 45<sup>71</sup>-3<sup>1513</sup>294<sup>1949</sup> - 1949.
- (64) " " " . Bioch.Journ. 46 - 5 - 509 ( 1950).
- (65) " " " . Bioch.Journ. 46 - 5 - 513. (1950).
- (66) Carter C.E. .J.A.C.S. 72 - 4 - 1466 - 1950.
- (67) Cohn W.E. J.A.C.S. 72 - 4 - 1471 - 1950.
- (68) Loring H.S. Luthy N.G. Bortner H.W. , Levy L.W. J.A.C.S.  
72 - 2811 - 1950.
- (69) Bowen E.J. Journ.Chem.Soc.London. 2236 - 1932.
- (70) " " " " " . 76 - 1935.
- (71) Zamenhof S. and Chargaff E. J.B.C. 178 - 531 - 1949 .
- (72) Gulland J.M. Jordan D.O. and Taylor H.F.W. Journ.Chem.Soc.  
1131 - 1947.
- (73) Gulland J.M. Cold Symp.Soc.Exp.Biolog. 1, 1, 1947.
- (74) " " . Col.Spring.Harbor.Symp.Quant.Biol. 12 - 95 - 1947.
- (75) Zamenhof S. and Chargaff E. J.B.C. 186 - 207 - 1949.
- (76) Chantrenne H. Lendestrøm Lang K. Vandendriessche L.Nature. 159-877-  
1947.
- (77) Vandendriessche L. C.R. Trav.Lab.Carlsberg. 27 - 15 - 341 - 1951.