

**À propos du microdosage du ribose des acides nucléiques par la
méthode de Mejbaum,**

par MIRKO BELJANSKI et MICHEL MACHEBŒUF.

La méthode de microdosage employée par de nombreux auteurs pour l'étude du ribose utilise la réaction bien connue de Bial, suivant les prescriptions de Mejbaum (1*), puis de Albaum et Umbreit (2*). Le ribose, sous l'action d'acide chlorhydrique chaud forme des composés furfuriques qui réagissent avec de l'orcinol en présence d'un sel ferrique pour donner une teinte verte. La transformation du ribose en dérivés furfuriques, sous l'influence de l'acide chlorhydrique concentré et chaud, avait été largement utilisé lors des recherches anciennes sur la structure des acides nucléiques et déjà Hoffman (3*), en 1927, avait remarqué que les nucléotides pyrimidiques donnaient un rendement très mauvais en furfural tandis que les nucléotides puriques donnaient un bon rendement. Ce fait a été négligé par Mejbaum qui, pour mettre au point sa microméthode, n'étudia que des dérivés puriques. Albaum et Umbreit négligèrent également l'influence possible de la nature des bases des nucléotides.

On trouve cependant dans la littérature une brève observation de Grégoire (4*) qui signale, sans insister, que l'acide ribonucléique qu'il étudie fournit par la méthode de Mejbaum un résultat qui ne correspond qu'à 50 p. 100 du chiffre théorique du ribose qu'il contient.

Au cours de recherches sur le métabolisme nucléaire des bactéries et sur l'action des antibiotiques sur ce métabolisme, nous avons essayé

(1*) Mejbaum, *Zeit. Phys. Chem.*, 1939, t. 258, p. 117.

(2*) Albaum et Umbreit, *Journ. Biol. Chem.*, 1947, t. 167, p. 370.

(3*) Hoffman, *Journ. Biol. Chem.*, 1927, t. 73, p. 15.

(4*) Grégoire, *Actualités Scient. et Industr.*, 1945, t. 997, p. 60.

d'employer la microméthode de Mejbaum-Albaum et Umbreit ; nos résultats ne furent pas satisfaisants. Nous avons donc repris l'étude de cette méthode. En opérant sur des acides nucléiques aussi purifiés que possible, nous retrouvions un peu moins de 50 p. 100 du ribose théorique. Pour chercher l'origine de cette considérable erreur, nous avons étudié séparément des mononucléotides et des nucléosides isolés et purifiés. Certains étaient puriques, d'autres pyrimidiques. Une conclusion très nette est apparue : lorsque l'on a affaire à un dérivé uniquement purique, la méthode de Mejbaum donne un résultat acceptable. Au contraire, lorsqu'il s'agit d'un dérivé pyrimidique le résultat est totalement erroné : la teinte obtenue correspond seulement à une infime proportion du ribose théorique.

Enfin, si l'on s'adresse à un acide ribonucléique, le résultat fourni par la méthode de Mejbaum correspond seulement à 50 p. 100 environ de la théorie, comme si les nucléotides puriques étaient seuls capables de donner la réaction.

Technique. — Le dérivé nucléique étudié est mis en solution aqueuse de concentration connue (à pH 7,5). A 3 ml. de cette solution on ajoute 3 ml. d'HCl concentré contenant 0,1 p. 100 de FeCl₃, puis 0,3 ml. d'une solution alcoolique d'orcinol à 10 p. 100. On porte au bain-marie bouillant pendant 45 minutes puis on refroidit dans un courant d'eau. La lecture photoabsorbsiométrique est effectuée avec l'appareil de Meunier (écran orangé). On déduit le chiffre obtenu pour un témoin à blanc, et l'on compare avec les résultats obtenus pour du ribose pur.

Les quantités de dérivés nucléiques mises en œuvre étaient comprises entre 30 et 900 microgrammes. Tous ces dérivés avaient été soigneusement purifiés avant leur emploi.

Résultats :

	Ribose théorique p. 100	Ribose trouvé, moyenne	Ecart type	Ribose trouvé p. 100 de théorie
Acide ribonucléique	54,0	25,4	1	47
Mélange de tétranucléotides obtenus par dépolymérisa- tion de l'acide ribonucléi- que	54,0	25,6	1	47
Mélange de mononucléotides obtenu par hydrolyse par- tielle de l'acide ribonucléi- que	54,0	25,4	1	47
Guanosine purifiée	46,0	47,0	2	100
Acide cytidylique	33,0	1,5	0,2	4

Conclusions. — Lorsque l'on applique la méthode de Mejbaum-Albaum et Umbreit au microdosage du ribose dans un acide ribonucléique, le résultat est entaché d'une erreur considérable, de l'ordre de 50 p. 100, car les nucléotides et les nucléosides pyrimidiques ne donnent pas la réaction furfurique de Bial dans ces conditions. Le ribose que l'on trouve correspond grossièrement à celui des nucléotides puriques.

(Institut Pasteur).

1 (b)

EXTRAIT DES
ANNALES
DE
L'INSTITUT PASTEUR

(Mai 1949. — Tome 76.)

A PROPOS DU MICRODOSAGE DU RIBOSE
DANS LES ACIDES NUCLÉIQUES ET LEURS DÉRIVÉS

PAR

Mirko BELJANSKI



MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS
Libraires de l'Académie de Médecine
120, Boulevard Saint-Germain
PARIS

A PROPOS DU MICRODOSAGE DU RIBOSE DANS LES ACIDES NUCLÉIQUES ET LEURS DÉRIVÉS

par MIRKO BELJANSKI.

(Travail du Laboratoire de Chimie biologique. Prof. MACHEBOEUF.)

La méthode de microdosage employée par de nombreux auteurs pour l'étude du ribose utilise la réaction bien connue de Bial, suivant les prescriptions de Mejbaum [1], puis de Albaum et Umbreit [2].

Le ribose, sous l'action d'acide chlorhydrique concentré et chaud, donne des composés furfuriques qui réagissent avec de l'orcinol en présence d'un sel ferrique pour donner une teinte verte. On effectue ensuite une lecture photo-absorptiométrique.

La transformation du ribose en dérivés furfuriques sous l'influence de l'acide chlorhydrique concentré et chaud avait été largement utilisée lors des recherches anciennes sur la structure des acides nucléiques et déjà Hoffmann [3], en 1947, avait remarqué que les nucléotides pyrimidiques donnaient un rendement très mauvais en furfural tandis que les nucléotides puriques donnaient un bon rendement (HCl à 20 p. 100). Ce fait a été négligé par Mejbaum qui, pour mettre au point sa microméthode quantitative n'étudia que des dérivés puriques. Albaum et Umbreit négligèrent également l'influence possible de la nature des bases des nucléotides.

On trouve cependant dans la littérature une brève observation de Grégoire [4] qui signale, sans insister, que l'acide ribonucléique qu'il étudie fournit par la méthode de Mejbaum un résultat qui ne correspond qu'à 50 p. 100 du chiffre théorique du ribose qu'il contient.

Au cours de recherches sur le métabolisme nucléaire des bactéries et sur l'action des antibiotiques sur ce métabolisme, nous avons essayé d'employer la microméthode de Mejbaum-Albaum et Umbreit et nos résultats ne furent pas satisfaisants. Nous avons donc repris l'étude de cette méthode.

En opérant sur des acides nucléiques aussi purifiés que possible, les résultats furent décevants ; on ne retrouvait que 50 p. 100 environ de ribose théorique. Pour chercher l'origine de cette considérable erreur, nous avons étudié séparément des mononu-

cléotides et des nucléotides préalablement isolés et purifiés. Certains étaient puriques, d'autres pyrimidiques.

Une conclusion très nette est apparue : lorsque l'on a affaire à un dérivé uniquement purique, la méthode de Mejbaum donne pour le ribose un résultat acceptable. Au contraire, lorsqu'il s'agit d'un dérivé pyrimidique, le résultat est totalement erroné : la teinte obtenue correspond seulement à une infime proportion du ribose théorique.

Enfin, si l'on s'adresse à un acide ribonucléique purifié ou bien à des tétranucléotides, le résultat fourni par la méthode de Mejbaum correspond seulement à 50 p. 100 environ de la théorie — comme si les nucléotides puriques étaient seuls capables de donner la réaction.

PROTOCOLE DE NOS EXPÉRIENCES.

TECHNIQUE DE LA RÉACTION. — Le dérivé nucléique étudié est mis en solution aqueuse de concentration connue (grâce à la petite quantité de soude nécessaire pour amener le pH au voisinage de 7,5).

3 millilitres de cette solution sont placés dans un tube à essai étroit dans lequel on ajoute :

1° 3 millilitres d'acide chlorhydrique concentré contenant 0,1 p. 100 de FeCl_3 .

2° 3/10 de millilitre d'une solution alcoolique d'orcinol à 10 p. 100.

On mélange, puis on porte au bain-marie bouillant pendant quarante-cinq minutes (dans chaque cas, un tube témoin contenait seulement les réactifs et de l'eau, sans ribose).

Les tubes étaient ensuite refroidis par un courant d'eau, puis leur contenu était examiné au moyen du photoabsorptiomètre de Meunier avec l'écran orangé. Des témoins étaient effectués avec du ribose.

Voici quelques résultats de nos essais. Dans tous les tableaux ci-joints, les résultats sont exprimés en microgrammes par millilitre. Dans chaque cas, les chiffres trouvés pour les essais à blanc étaient déduits.

Acide ribonucléique de levure purifiée par la méthode de Leifert Kurokawa [8].

	10	20	30	40	50	60
Microgrammes d'acide ribonucléique.	10	20	30	40	50	60
Lectures photométriques . . .	9	16	24	33	44	53
Microgrammes de ribose trouvés. . .	2,65	5,0	7,10	9,9	13,1	15,9
Ribose trouvé p. 100.	26,5	25,0	23,5	25,0	26,0	26,5

Or la teneur théorique en ribose de notre acide ribonucléique

était 54 p. 100 et nous n'en retrouvons en moyenne que 25,4 p. 100, soit moins de la moitié (47 p. 100).

MÉLANGE DE TÉTRANUCLÉOTIDES. — Un premier mélange de tétranucléotides fut préparé par hydrolyse alcaline partielle de l'acide ribonucléique étudié ci-dessus suivant la technique de Bredereck et Jochmann [5]. Les résultats furent remarquablement superposables à ceux obtenus pour l'acide ribonucléique non dépolymérisé. Nous pouvons donc conclure que l'erreur de la méthode de Mejbaum n'est pas le fait de l'état de polymérisation.

Microgrammes tétranucléotides . . .	10	20	30	40	50	60
Lectures photométriques	9	16	25	35	43	51
Microgrammes de ribose trouvés . . .	2,65	5,0	7,0	10,4	12,9	15,0
Ribose trouvé p. 100	26,5	25,0	23,5	26	25,5	25,0

Un autre mélange de tétranucléotides obtenu en faisant agir de la ribonucléodépolymérase cristallisée sur de l'acide ribonucléique nous a donné des résultats superposables :

MONONUCLÉOTIDES. — Un mélange de mononucléotides dérivant du même acide ribonucléique fut préparé par hydrolyse partielle à froid au moyen d'ammoniaque concentrée suivant la technique de Calvery [6]. Les résultats furent encore remarquablement superposables à ceux obtenus pour l'acide ribonucléique lui-même :

Moyenne du ribose trouvé p. 100 de :

Acide ribonucléique	25,4	} L'écart quadratique moyen était dans chaque cas de 1,0.
Tétranucléotides	25,2	
Mononucléotides	25,4	

L'erreur de la méthode de Mejbaum ne provient donc en aucune façon de l'état de polymérisation des nucléotides.

MONONUCLÉOTIDES PURIQUES ET PYRIMIDIQUES SÉPARÉS. — Nous avons préparé des mononucléotides et des nucléosides isolés, certains puriques, d'autres pyrimidiques ; les résultats obtenus en appliquant la méthode de Mejbaum à ces corps furent profondément dissemblables. Voici quelques exemples :

Guanosine (commerciale purifiée).

Microgrammes de guanosine	5	10	15	20	25	30
Lectures photométriques	8	17	23	33	39	49
Microgrammes de ribose trouvés . . .	2,3	5,0	6,8	9,9	11,5	14,5
Ribose trouvé p. 100	46	50,0	45,5	49,0	46	48,5

La teneur théorique de la guanosine en ribose est 46,0 p. 100, or nous trouvons 47 avec un écart type de 2. Notre résultat est parfaitement acceptable.

**Acide cytidylique (préparé par la méthode de Brederéck [5]
en le séparant au moyen de pyridine).**

Microgrammes d'acide cytidylique . .	100	150	200	250	300
Lectures photométriques	6	7	11	12	14
Microgrammes de ribose trouvés . . .	1,8	2,0	3,2	3,9	4,3
Ribose trouvé p. 100.	1,8	1,3	1,5	1,5	1,4

Au-dessous de 100 microgrammes par millilitre la lecture photométrique n'est pas significative, et pour les quantités plus grandes d'acide cytidylique les résultats sont absolument incompatibles avec le chiffre théorique de la teneur en ribose qui est 33 p. 100. Nous ne retrouvons donc par la méthode de Mejbaum, pour un nucléotide pyrimidique, qu'une fraction infime du ribose théorique (4,5 p. 100 environ). En se reportant à l'ancien travail de Hoffmann [3] on peut penser que ceci résulte de l'extrême lenteur de l'hydrolyse acide des nucléotides pyrimidiques. Mais une inconnue importante subsiste encore ici.

REMARQUE.

Pour extraire les acides nucléiques et les nucléotides des tissus étudiés, on utilise habituellement des épuisements à températures convenables par des solutions d'acide trichloracétique. Nous avons incidemment vérifié que, dans les conditions où l'on opère selon la technique de Schneider [7], l'acide trichloracétique ne modifie pas de façon appréciable les résultats obtenus par la méthode de dosage de Mejbaum. En effet, les résultats obtenus pour des solutions d'acide ribonucléique purifié en présence d'acide trichloracétique sont pratiquement les mêmes qu'en l'absence de cet acide.

RÉSUMÉ.

La méthode de microdosage colorimétrique du ribose dans les dérivés nucléiques qui fut proposée par Mejbaum et adaptée par Albaum et Umbreit ne donne pas des résultats exacts. Si on l'applique à un acide ribonucléique, on trouve une teneur en ribose qui n'est que la moitié environ du chiffre théorique.

Pour les mononucléotides et les nucléosides dont la base est purique, le résultat est bon, mais pour les composés dont la base est pyrimidique, on obtient un résultat qui ne correspond qu'à une très petite partie du ribose théorique. Ceci explique que dans

les acides nucléiques ainsi que dans les tétranucléotides ou dans les mélanges de mononucléotides qui en dérivent, on ne retrouve que 50 p. 100 environ du ribose.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MEJBAUM. *Zeitschr. Phys. Chem.*, 1939, 258, 117.
- [2] ALBAUM et UMBREIT. *J. biol. Chem.*, 1947, 167, 370.
- [3] HOFFMANN. *J. biol. Chem.*, 1927, 73, 15.
- [4] GREGOIRE. *Actualités scient. et indust.*, 1945, 997, 60.
- [5] BREDERECK et JOCHMANN. *Ber. Chem. Gesell.*, 1942, 75, 395.
- [6] CALVERY (H. O.). *J. biol. Chem.*, 1927, 73, 73.
- [7] SCHNEIDER. *J. biol. Chem.*, 1945, 161, 293.
- [8] LEIFERT-KUROKAWA. *Bioch. Zeitschr.*, 1932, 246, 1.