

DONNÉES BIOCHIMIQUES RÉCENTES SUR LA RELATION ENTRE ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE ET PROTÉINES BASIQUES DANS LE NOYAU

R. VENDRELY*, A. KNOBLOCH-MAZEN et C. VENDRELY*

Centre de Recherches sur les Macromolécules, Strasbourg

Abstract—The exact part played by histones and protamines in the activity of the nucleus is not determined, but the fact that these substances are always closely associated to the DNA shows that this part is essential.

We tried to get an idea of the initial composition of nucleohistones and nucleo-protamines in the nuclei of erythrocytes and spermatozoa of some fishes. We therefore performed a comparative analytical study of entire nuclei and of isolated nucleohistones and nucleoprotamines and established a balance sheet of the different fractions extracted from these nuclei as well as residual fractions obtained in the course of the preparation. We found that, in all the cases studied, all the phosphate groups of the DNA can be practically saturated by the basic amino acids (arginine, lysine, histidine) which belong to the histone or protamine associated to the DNA. But the respective amounts of the basic amino acids which realize this saturation may vary very much in the case of sperm. We found three types of sperms in this respect. In the first type (carp sperm) the protein is a typical histone as in somatic cells without any change; in a second type (pike sperm) there is a decrease of lysine which is exactly counterbalanced by an increase of arginine, and, in the third case (trout sperm) which is a typical protamine, lysine and histidine have practically disappeared and the saturation is realized only by arginine, the increase of which compensates the loss of lysine and histidine.

It is worth noting that in our results concerning the nucleohistones the relative proportions of the two chief basic amino acids (three molecules arginine for six to seven lysine) seems to reflect the relative proportion of the two fractions which have been demonstrated and separated chemically and electrophoretically in histones: the rich in arginine component and the rich in lysine component.

AU COURS des vingt dernières années, l'idée que l'acide désoxyribonucléique (ADN) pourrait représenter le constituant chimique des gènes s'est imposée définitivement. La découverte du phénomène de "transformation" chez les bactéries et l'étude du processus d'infection par le phage, où l'ADN apparaît incontestablement comme l'unique vecteur des caractères héréditaires, la répartition quantitative de l'ADN dans les noyaux somatiques et sexuels proportionnellement à leur nombre chromosomique ont représenté des arguments de poids. Les beaux travaux de CHARGAFF, de ZAMENHOF, de WYATT et de beaucoup d'autres sont venus apporter la preuve de l'existence de différents types d'acides désoxyribonucléiques et les études des diagrammes de diffraction des rayons X de ces substances ont permis d'élaborer pour la molécule d'ADN un schéma structural tel que son fonctionnement comme unité autoreproductible et vecteur des

* Adresse actuelle: Institut de recherches sur le cancer "Gustave Roussy" Villejuif (France).

caractères héréditaires apparaît fort vraisemblable (DAVIDSON, 1952; VENDRELY et VENDRELY, 1957).

Cependant des substances protéiques toujours de caractère basique apparaissent associées de façon très étroite à cet acide désoxyribonucléique: ce sont les histones. Présentes dans tous les noyaux somatiques, constituants permanents des chromosomes, en quantités toujours proportionnelles à l'ADN, ces protéines représentent à coup sûr un élément important des chromosomes et probablement nécessaire à l'activité du gène. Ce n'est que dans les spermatozoïdes de certaines espèces que l'histone n'est pas représentée, elle est alors remplacée par une protamine et le fait de la présence de cette protéine beaucoup plus simple dans un cas où le gène est inactif n'est pas, peut être, des moins significatifs.

Plusieurs auteurs ont envisagé le rôle possible de ces protéines dans la duplication du gène (HALDANE, 1956), dans son fonctionnement (CRUFT, MAURITZEN et STEDMAN, 1954; DAVISON et BUTLER, 1956), dans le problème de spécificité cellulaire (CRUFT *et al.*, 1954; TOENNIES et BAKAY, 1955; FELIX, 1952; DALY *et al.*, 1950; HARPER et MORRIS, 1953), etc. Il est bien évident que ces substances jouent un rôle important dans l'économie du noyau, mais aucune des hypothèses émises ne peut encore être solidement étayée par des faits positifs.

Depuis quelques années nous nous sommes attachés à l'étude analytique des nucléohistones et des nucléoprotamines, et plusieurs points ont retenu notre attention: (1) La détermination de la composition des nucléohistones ou nucléoprotamines telles qu'elles se trouvent dans la noyau intact, non dégradées par l'isolement et la purification, et le mode de liaison entre ADN et histone ou protamine. (2) L'étude analytique de la transformation des nucléohistones en nucléoprotamines. (3) La recherche des différences chimiques pouvant exister entre les histones provenant d'espèces animales différentes.

LA DÉTERMINATION DE LA COMPOSITION DES NUCLÉOHISTONES ET NUCLÉOPROTAMINES TELLES QU'ELLES SE TROUVENT DANS LE NOYAU INTACT

Ce premier point nous paraissait en effet indispensable à une étude comparative valable des histones et des protamines. En effet, s'il est possible de trouver dans la littérature un nombre considérable de données analytiques concernant les histones et les protamines, il est absolument impossible de les comparer entre elles; la plupart, en effet, ont été obtenues sur des histones et des protamines isolées et séparées de l'acide nucléique par un traitement à l'acide qui les a manifestement dénaturées. C'est ainsi que KOSSEL (1928) a séparé et caractérisé dans le sperme de carpe deux types de protamines, alors que, comme nous l'avons montré (KNOBLOCH *et al.*, 1958) le sperme de carpe ne contient qu'une histone typique. KOSSEL, en traitant la laitance de carpe par un acide, avait fractionné cette histone et recueilli deux fractions particulièrement basiques.

Tous les résultats anciens doivent donc être contrôlés sur des produits isolés par des méthodes respectant le plus possible l'intégrité du produit à étudier. Il est ainsi préférable d'étudier le complexe entier nucléohistone ou nucléoprotamine plutôt que la protéine seule, la séparation de cette protéine entraînant une certaine

dégradation de ce produit. Enfin, il importe au premier chef de savoir si la substance obtenue est bien identique à la nucléohistone ou à la nucléoprotamine du noyau intact. Pour ce faire nous avons entrepris une étude analytique comparée de noyaux entiers de cellules somatiques et sexuelles de plusieurs espèces animales (noyaux d'érythrocytes de poissons et spermatozoïdes des mêmes espèces) et nous avons établi un bilan des différentes fractions extraites à partir des noyaux ou demeurées *in situ* au cours de l'extraction des nucléoprotéines. Cette façon de procéder devait, en effet, nous permettre de déceler, s'il y avait lieu, une fraction labile des nucléohistones ou nucléoprotamines susceptible d'être perdue au cours de la préparation et d'en apprécier l'importance par différence. On pouvait ainsi espérer serrer d'autant près que possible le problème de la composition exacte des nucléoprotéines du noyau entier dans leur état natif.

Le choix des érythrocytes comme cellules somatiques s'imposait dans un pareil travail. En effet, la nucléohistone représente ici environ les trois-quarts ou les quatre-cinquièmes de la masse totale du noyau délipidé et lavé au sérum physiologique; ce matériel représente le cas limite d'une cellule qui ne travaille pratiquement plus et dont le noyau se compose presque uniquement de la chromatine, de même que les noyaux des spermatozoïdes. Nous avons utilisé des érythrocytes et des spermatozoïdes de truite (*Salmo irideus*) de brochet (*Esox lucius*) et de carpe (*Cyprinus carpio*).

Nous avons éliminé le cytoplasme des érythrocytes par action de la saponine et les têtes des spermatozoïdes furent séparées par agitation dans l'eau distillée en présence de billes de verre. Pour l'extraction des nucléoprotéines la méthode

TABLEAU 1
(PAR NOYAU)

	(A)	(B)	(C)	(D)	(E)
	Poids sec du noyau délipidé et lavé avec une solution de ClNa 0,14 M	ADN	Poids histone ou de protamine associée à l'ADN dans la nucléohistone ou nucléoprotamine recueillie par précipitation	Poids de la fraction résiduelle laissée après extraction répétée du noyau avec la solution de ClNa 1 M	Poids de la fraction nucléaire extraite avec la solution de ClNa 1 M
	($\times 10^{-9}$ mg)	($\times 10^{-9}$ mg)	($\times 10^{-9}$ mg)	($\times 10^{-9}$ mg)	($\times 10^{-9}$ mg)
Carpe					
Érythrocyte (noyau)	9,00	3,20	3,40	1,42	4,38
Spermatozoïde	4,20	1,60	1,60	0,63	1,97
Brochet					
Érythrocyte (noyau)	5,10	1,70	1,85	0,90	2,50
Spermatozoïde	2,18	0,85	0,57	0,44	0,89
Truite					
Érythrocyte (noyau)	12,88	4,90	4,90	1,82	6,16
Spermatozoïde	5,10	2,45	1,31	0,97	1,68

saline à force ionique élevée, que nous avons utilisée, convient aussi bien pour les noyaux d'érythrocytes que pour les spermatozoïdes.

Nous avons tout d'abord déterminé l'importance relative et la composition du résidu obtenu après traitement des noyaux par le chlorure de sodium en solution 1 M. (Tableau 1). Ce résidu représente environ 15 à 20% de la masse totale du noyau et contient entre 4 et 6% de chaque acide aminé basique, arginine et lysine; il s'agit donc bien ici de protéines banales.

D'autre part, comme on peut le constater dans le tableau, le poids de la fraction nucléoprotéique recueillie par précipitation est nettement inférieur au poids de la fraction extraite par la solution molaire de chlorure de sodium.

Comme l'ADN du noyau est retrouvé intégralement dans la nucléohistone ou la nucléoprotamine recueillie finalement (VENDRELY *et al.*, 1957), il faut admettre qu'une fraction protéique a été perdue au cours de la précipitation.

Connaissant la composition en acides aminés basiques du noyau entier, celle du résidu et celle de la protéine basique précipitée et recueillie (Tableau 2), nous

TABLEAU 2

	ADN Par noyau ($\times 10^{-9}$ mg)	(1)			(2)			(3)		
		Par noyau ($\times 10^{-9}$ mg)			Dans la fraction nucléaire soluble dans du ClNa 1 M ($\times 10^{-9}$ mg)			Dans la nucléo- histone ou nucléo- protamine extraite avec du ClNa 1 M, précipitée et purifiée ($\times 10^{-9}$ mg)		
		Argi- nine	Lysine	Histi- dine	Argi- nine	Lysine	Histi- dine	Argi- nine	Lysine	Histi- dine
Carpe	3,20	0,670	1,030	0,06 à 0,09	0,599	0,959	0,07	0,459	0,527	0,078
	1,60	0,309	0,470	0,05 à 0,08	0,278	0,439	0,03 à 0,04	0,218	0,264	0,032
Brochet	1,70	0,360	0,590	0,02 à 0,03	0,315	0,545	0,03 à 0,04	0,211	0,250	0,035
	0,85	0,347	0,127	0,02 à 0,03	0,325	0,105	0,01	0,234	0,056	0,008
Truite	4,90	1,010	1,530	0,10 à 0,15	0,919	1,439	0,10	0,662	0,745	0,123
	2,45	1,450	0,050	0,01 à 0,02	1,402	0,002	0,00	1,020	0,000	0,000

pouvons calculer la teneur en arginine et lysine de cette fraction perdue. Or, cette teneur se trouve être fort élevée, et, en fait, la composition de la fraction perdue est similaire à celle d'une histone dans le cas des érythrocytes et d'une protamine dans le cas des spermatozoïdes. Nous sommes donc autorisés à admettre l'hypothèse selon laquelle une fraction soluble en chlorure de sodium 1 M et perdue au cours de la précipitation pourrait être constituée principalement par une fraction labile de

la nucléoprotéine originelle. Il est évidemment très important pour la validité de cette hypothèse de retrouver et d'isoler pour l'étudier directement cette fraction perdue. Cette étude est en cours et nous avons réussi à isoler du liquide de précipitation d'une nucléohistone une fraction protéique non dialysable, qui est incontestablement du type histone. Ainsi, tout au moins dans les cas que nous avons envisagés, la quantité totale de nucléohistone ou de nucléoprotamine du noyau serait représentée par la fraction soluble en chlorure de sodium 1 M. On peut alors calculer les teneurs en arginine, lysine et histidine de cette nucléoprotéine originelle (Tableau 2).

Si ces résultats sont exprimés en molécules d'arginine de lysine, et d'histidine pour 100 atomes de phosphore nucléique (Tableau 3), on constate que tous les groupe-

TABLEAU 3. MOLÉCULES D'ARGININE, DE LYSINE ET D'HISTIDINE POUR
100 ATOMES DE PHOSPHORE NUCLÉIQUE

	Fraction désoxyribonucléoprotéique originelle calculée du noyau d'érythrocyte et du spermatozoïde				Désoxyribonucléoprotéine isolée du même matériel			
	Argi- nine	Lysine	Histi- dine	Total	Argi- nine	Lysine	Histi- dine	Total
Carpe								
Érythrocyte (noyau)	33,2	64,2	5,0	102,4	25,8	35,2	5,0	66,0
Spermatozoïde	31,2	58,8	5,0	95,0	24,5	35,4	5,0	64,9
Brochet								
Érythrocyte (noyau)	33,2	68,7	5,0	106,9	23,4	31,5	5,0	59,9
Spermatozoïde	68,7	26,2	2,5	97,4	49,6	14,1	2,5	66,2
Truite								
Érythrocyte (noyau)	33,9	63,0	5,0	101,9	24,3	32,6	5,0	61,9
Spermatozoïde	103,0	0,0	0,0	103,0	74,9	0,0	0,0	74,9

ments phosphates de l'ADN peuvent pratiquement être saturés par les acides aminés basiques (arginine, lysine et histidine) qui appartiennent à la fraction protéique extraite par la solution 1 M de chlorure de sodium. Il est donc fort probable que dans le noyau intact l'histone ou la protamine réalise la saturation complète des groupements phosphates de l'ADN qui lui est associé, alors que dans le complexe ADN-protéine isolé, cette saturation n'est jamais complète, une fraction protéique étant perdue au cours de la préparation. Cette conclusion n'est pas pour nous surprendre, car il est facile de constater que plus la préparation de la nucléohistone ou de la nucléoprotamine est soigneuse, plus la proportion molaire d'acides aminés basiques en est élevée. DAVISON et BUTLER (1956) ont montré que, lorsque l'on prépare la nucléohistone de thymus de veau avec certaines précautions, la proportion molaire des acides aminés basiques est très élevée, ces amino-acides peuvent saturer 87% du phosphore total de l'ADN. Ces auteurs admettent d'autre part, qu'une fraction riche en lysine de l'histone tend à s'en séparer et est perdue au cours de la préparation.

Dans le domaine des nucléoprotamines, FELIX (1952) a montré que, si l'on dissout dans le chlorure de sodium molaire des têtes de spermatozoïdes de truite, on obtient un gel de nucléoprotamine dans lequel les groupements phosphates de l'acide nucléique sont totalement saturés par l'arginine.

Cette saturation des groupements phosphates semble donc bien être réalisée dans les noyaux que nous avons étudiés et qui sont des noyaux de cellules au repos métabolique. En serait-il de même dans des noyaux de cellules très actives, cellules de foie par exemple ? Il n'est pas possible de répondre à cette question pour l'instant : en effet, dans de tels noyaux, la proportion de protéine non histone est telle que le bilan que nous avons établi sur les noyaux d'érythrocytes ne saurait être réalisé de façon correcte. Il serait cependant important de préciser ce point : la composition *in situ* de la nucléohistone de noyaux de cellules hautement métaboliques pourrait, en effet, donner d'utiles indications sur le rôle de l'histone dans l'activité du gène.

ÉTUDE DE LA TRANSFORMATION DES NUCLÉOHISTONES EN NUCLÉOPROTAMINES

Les résultats des Tableaux 2 et 3, en donnant une idée de la composition des nucléoprotamines et nucléohistones *in situ* représentent également un apport au deuxième problème que nous avons défini au début de cet exposé, à savoir celui de la transformation des nucléohistones en nucléoprotamines. En effet, si, dans tous les cas, qu'il s'agisse d'un noyau somatique à nucléohistone ou d'un spermatozoïde contenant une nucléohistone (spermatozoïde de carpe) une nucléoprotamine simple comme chez la truite ou une nucléoprotamine plus complexe comme chez le brochet, la saturation des groupements phosphates de l'ADN est réalisée par les acides aminés basiques de la protéine, les teneurs respectives de ces divers acides aminés basiques peuvent varier dans de larges proportions. Au cours de la formation du sperme, lorsque la proportion molaire de lysine diminue dans la nucléoprotamine, la proportion molaire d'arginine augmente dans les mêmes proportions compensant très exactement la perte de lysine (cas du brochet). Le cas extrême de ce processus est représenté par la nucléoprotamine du sperme de truite dans laquelle la lysine et l'histidine ont totalement disparu et sont remplacées par l'arginine qui réalise à elle seule la saturation totale des groupements phosphates.

Il est peut-être utile de remarquer ici que, selon nos résultats, les proportions relatives des deux principaux acides aminés basiques, arginine, lysine, dans les histones sont les suivantes : trois molécules d'arginine pour six à sept de lysine. Cette proportion semble refléter assez fidèlement les proportions relatives des deux fractions qui ont été démontrées et séparées chimiquement et par électrophorèse (DAVISON *et al.*, 1954; DAVISON et BUTLER, 1954; DALY et MIRSKY, 1955; GREGOIRE et LIMOZIN, 1954; CRAMPTON *et al.*, 1955; STEDMAN et STEDMAN, 1951) dans les histones, la fraction riche en arginine et la fraction riche en lysine. Dans la nucléoprotamine de sperme de brochet qui semble représenter une étape intermédiaire entre la nucléohistone et la nucléoprotamine typique, nous avons au contraire sept molécules d'arginine pour trois de lysine, ces données sembleraient indiquer un renversement de l'importance relative des deux fractions, le composant riche en arginine serait ici le plus important. Un fractionnement de la nucléoprotamine de

sperme de brochet donnerait probablement des indications supplémentaires sur le comportement des deux fractions de l'histone au cours de la transformation de l'histone en protamine.

HISTONES ET PROTAMINES PROVENANT D'ESPÈCES ANIMALES DIFFÉRENTES

Le troisième aspect de notre étude concernait la comparaison d'histones et de protamines de provenances très diverses. Dans une série de travaux antérieurs (VENDRELY, 1957; VENDRELY *et al.*, 1958) portant sur un grand nombre de nucléohistones isolées, nous avons constaté une homogénéité très frappante de composition entre des produits provenant d'espèces très diverses. Les résultats plus récents et plus précis que nous venons de rapporter concernant les noyaux entiers viennent confirmer cette notion; donc, dans les cas étudiés ici, tout au moins, la composition de la nucléohistone des noyaux est sensiblement la même chez la carpe, la truite et le brochet comme le faisait soupçonner l'étude des produits isolés. Il est vraisemblable qu'il en serait de même chez les autres espèces animales.

Si des différences existent entre ces histones, elles ne doivent pas être décelables par les moyens analytiques dont nous disposons. Si ces différences sont le reflet des différences présentées par l'ADN en ce qui concerne la séquence des bases puriques et pyrimidiques, il n'est pas suprenant qu'elles n'apparaissent pas dans nos résultats. En effet, d'après les analyses effectuées par CHARGAFF (1955) et ses collaborateurs les proportions d'adénine, de guanine, de cytosine et de thymine dans les ADN d'animaux supérieurs ne diffèrent pas de façon très marquée. Ce n'est que dans le monde des micro-organismes qu'apparaissent des types d'ADN, chez qui ces proportions s'écartent nettement du type général. C'est donc vers les nucléoprotéines bactériennes que doivent se porter nos investigations. Un premier progrès dans ce sens a été réalisé dans notre laboratoire où Madame PALMADE (PALMADE *et al.*, 1958) a réussi, en effet, à isoler en petite quantité, à partir de protoplastes de colibacilles, une nucléohistone un peu particulière. Jusqu'alors, l'existence de nucléohistone chez les bactéries n'avait pas été démontrée de façon certaine et certains auteurs, encore tout récemment (WILKINS et ZUBAY, 1959; ZUBAY et WATKINS, 1959) affirment même l'absence de nucléohistone précisément chez le colibacille. Leur méthode de préparation portant sur les germes normaux, pourvus de leur enveloppe complète est nécessairement plus longue et laborieuse que la nôtre et peut laisser aux enzymes bactériens le temps de se manifester. L'extraction à partir de protoplastes plus perméables et proportionnellement plus riches en nucléohistone permet une obtention plus sûre et plus rapide d'un complexe nucléoprotéique et c'est probablement ce qui explique la divergence actuelle des résultats.

Quoiqu'il en soit, l'analyse précise des nucléohistones bactériennes aura un intérêt considérable car elle permettra de savoir si à des ADN de compositions différentes correspondent des histones différentes.

En ce qui concerne les nucléoprotéines du sperme, l'étude analytique comparée de ces produits chez différentes espèces animales présente également un certain intérêt. Nous avons mis en évidence trois types de nucléoprotéine dans le sperme des espèces que nous avons étudiées, mais il serait intéressant d'étendre ces

investigations à un plus grand nombre d'espèces pour savoir si la fréquence de ces types dans tel ou tel groupe animal peut être mise en rapport avec la classification zoologique.

Au cours de cet exposé nous avons pu apporter quelques notions nouvelles sur la composition des nucléohistones et nucléoprotamines. Ces notions bien loin de résoudre les problèmes que nous nous étions proposés nous ont cependant permis de les mieux poser et d'établir de nouvelles possibilités de recherches. Puisse notre modeste apport contribuer au progrès des connaissances sur ces substances nobles que sont les nucléohistones et nucléoprotamines.

RÉSUMÉ

Nous avons essayé de déterminer la composition de nucléoprotamines et de nucléohistones telles qu'elles doivent se trouver dans le noyau cellulaire, les histones et les protamines isolées étant le plus souvent manifestement dégradées. Nous avons donc procédé à une étude analytique comparative de noyaux entiers d'une part et de nucléohistones et nucléoprotamines isolées d'autre part, en établissant un bilan de toutes les fractions extraites des noyaux au cours de la préparation ainsi que des fractions résiduelles. Nous avons alors constaté que tous les groupements phosphates de l'ADN peuvent être saturés par les acides aminés basiques (arginine, lysine et histidine) de la protamine ou de l'histone qui lui est associée, la proportion relative de ces trois acides aminés pouvant varier de façon considérable dans les différents types de sperme: le type carpe contient une histone typique, le type brochet a une proportion de lysine fortement diminuée, alors que la proportion d'arginine a augmenté, compensant exactement la perte de lysine; enfin le type truite contient une nucléoprotamine parfaite ne contenant plus de lysine et d'histidine, la saturation des groupements phosphates étant réalisée uniquement par l'arginine dont l'augmentation compense la perte de lysine et d'arginine.

BIBLIOGRAPHIE

- CHARGAFF E. (1955) Dans *The Nucleic Acids* (Publié par CHARGAFF E. and DAVIDSON J. N.) Vol. 1, p. 336. Academic Press, New York.
- CRAMPTON Ch. F., MOORE S. et STEIN W. H. (1955) *J. Biol. Chem.* **215**, 787.
- CRUFT H. J., MAURITZEN C. M. et STEDMAN H. (1954) *Nature, Lond.* **174**, 580.
- DALY M. M., MIRSKY A. E. et RIS H. (1950) *J. Gen. Physiol.* **34**, 439.
- DALY M. M. et MIRSKY A. E. (1955) *J. Gen. Physiol.* **38**, 405.
- DAVIDSON J. N. (1952) *The Nucleic Acids*. Methuen, London and John Wiley, New York.
- DAVISON P. F. et BUTLER J. A. V. (1954) *Biochim. Biophys. Acta* **15**, 439.
- DAVISON P. F. et BUTLER J. A. V. (1956) *Biochim. Biophys. Acta* **21**, 568.
- DAVISON P. F., et al., (1954) *Biochim. Biophys. Acta* **15**, 415.
- FELIX, K. (1952) *Experientia* **8**, 312.
- GREGOIRE J. et LIMOZIN M. (1954) *Bull. Soc. Chim. Biol.*, Paris **36**, 15.
- HALDANE J. B. S. (1956) *Biochimie et Génétique*. Presses Université de France, Paris.
- HARPER H. A. et MORRIS M. D. (1953) *Arch. Biochem.* **42**, 61.
- KNOBLOCH A., MATSUDAIRA H. et VENDRELY R. (1958) *C.R. Acad. Sci., Paris* **246**, 2679.
- KOSSEL A. (1928) *The Protamines and Histones*. Longmans, London.
- PALMADE C., CHEVALLIER M. R., KNOBLOCH A. et VENDRELY R. (1958) *C.R. Acad. Sci., Paris* **246**, 2534.
- STEDMAN E. et STEDMAN E. (1951) *Philos. Trans. B* **235**, 565.
- TOENNIES, G. et BAKAY B. (1955) *Nature, Lond.* **176**, 696.
- VENDRELY R. (1957) *Arch. Klaus-Stift. Vererborsch.* **32**, 538.

- VENDRELY R., KNOBLOCH A. et VENDRELY C. (1957) *Exp. Cell Res. Suppl.* **4**, 279.
 VENDRELY R., KNOBLOCH A., et MATSUDAIRA H. (1958) *Nature, Lond.* **181**, 343.
 VENDRELY R. et VENDRELY C. (1957) *L'Acide Désoxyribonucléique, Substance Fondamentale de la Cellule Vivante*. Amédée Legrand, Paris.
 WILKINS M. H. F. et ZUBAY G. (1959) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **5**, 55.
 ZUBAY G. et WATSON M. R. (1959) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **5**, 51.

DISCUSSION

J. DANIELLI:

- (1) Are erythrocytes, which are highly specialized cells of limited metabolism, an adequate basis for comparison with sperm?
 (2) Is it known whether, in sperm in which histone is not replaced by protamine, there is nevertheless a replacement of one histone by another, with, e.g., a different sequence of basic amino acids?
 (3) Is it correct to speak of transformation of histone into protamine, or should one speak of replacement?

R. VENDRELY:

(1) Les érythrocytes nous ont paru être un matériel très valable parce que susceptibles de nous fournir d'une part des noyaux très purs sans avoir recours à des méthodes chimiques nocives et d'autre part des nucléohistones aussi peu dégradées que possible puisqu'une simple dissolution en milieu ClNa 1 M est susceptible de nous les fournir. Nous soulignons dans notre communication beaucoup d'autres raisons qui ont guidé notre choix, tout en précisant par ailleurs l'intérêt que pourrait présenter l'étude d'autres types cellulaires présentant une activité métabolique accentuée. Nous espérons que nos recherches évolueront favorablement dans ce sens.

(2) Les données de la littérature n'apportent pas de réponse à la question du Professeur Danielli; cependant, l'histone que nous avons isolée du sperme de carpe ne semble aucunement différer de l'histone provenant des érythrocytes, de telle sorte que rien n'indique l'idée d'un remplacement.

(3) Nos résultats semblent suggérer un processus de transformation qui serait plus ou moins total (voir les trois cas choisis), mais n'excluent pas la possibilité d'un remplacement. Une expérience bien menée avec des isotopes pourrait peut être permettre de choisir entre ces deux possibilités.

P. MANDEL: Il me paraît difficile d'admettre la transformation d'une protéine contenant de l'arginine et de lysine en molécule ne contenant que de l'arginine. Il me semble plus conforme de considérer qu'une molécule disparaît et qu'une autre est formée.

R. VENDRELY: La question du Dr. MANDEL est identique à la question (3) que nous a posée le Prof. DANIELLI. Nous lui fournirons donc la même réponse.

W. PLAUT:

- (1) Did I understand you correctly in assuming that you now have evidence which indicates the presence of proper histones in bacterial cells?
 (2) Is there any information on the nucleoprotein composition of the egg?

R. VENDRELY:

(1) Ma collaboratrice, Madame PALMADE, a pu isoler, à partir de protoplastes de colibacilles, une fraction présentant les caractères généraux d'une nucléohistone (voir référence dans notre communication). Malheureusement, une analyse complète du produit n'a pu être encore effectuée.

(2) Il n'existe pas dans la littérature, à notre connaissance, d'informations concernant la composition chimique de la nucléoprotéine de l'oeuf. L'abondance du vitellus est toujours un obstacle grave à toute étude chimique valable.

R. THOMAS: Certaines propriétés physiques, étudiées notamment par MM. LUZZATTI et WILKINS, permettent de différencier les nucléoprotamines des nucléohistones. Quelle est, du point de vue de ces propriétés, la situation des nucléoprotéines présentes dans le sperme de certains poissons et dont la composition chimique n'est pas typique d'une nucléoprotamine.

R. VENDRELY: Le Dr. WILKINS n'a pas encore abordé ce problème. Quant au Dr. LUZZATTI, notre collègue de Centre de Recherches sur les Macromolécules de Strasbourg, ce dernier n'a pu par la méthode qui lui est propre (étude aux petits angles) faire de distinction entre la nucléoprotamine de brochet et celle de truite. Résultat un peu décevant quant à la sensibilité de cette technique nouvelle.

A. DELAUNEY: Nous avons vu, au laboratoire, que des solutions de polypeptides basiques (polypeptides extraits du thymus de veau par des méthodes classiques ou des techniques nouvelles mises au point par nous-mêmes) ont le pouvoir d'agglutiner très nettement des noyaux isolés d'hématies de poulet. Nous avons vu aussi que leur action est non moins nette sur des bactéries vivantes ou tuées, Gram+ ou Gram-. Ce qu'on note alors, c'est une modification profonde du comportement des germes. En présence des polypeptides, ceux-ci s'agglutinent, ne se multiplient plus dans le milieu de culture et leur métabolisme respiratoire devient nul. Une fois traités par les mêmes corps, ils deviennent particulièrement sensibles (la phagocytose). Il est évident que tous ces phénomènes—ceux observés avec les noyaux aussi bien que ceux rencontrés avec les germes—relèvent d'une combinaison chimique entre polypeptides et corps figurés. Mais de quelle nature? Sans doute, les biochimistes—et en particulier, le Dr. VENDRELY—pourraient donner ici une réponse satisfaisante.

R. VENDRELY: Je ne puis fournir de réponse immédiate à la question posée par le Dr. DELAUNEY. J'avoue être davantage intéressé par cet effet toxique si marqué sur les germes, présente par les solutions de polypeptides basiques. Une étude en fonction des concentrations a-t-elle été poursuivie?

J. BRACHET: A-t-on jamais essayé de suivre le sort de la protamine (au moyen des réactions cytochimiques de l'arginine, par exemple après la pénétration du spermatozoïde dans l'oeuf?

R. VENDRELY: Nous ne connaissons pas de travaux concernant la question qui nous est posée. Nous saissons parfaitement l'intérêt d'un tel problème, mais en tant que biochimistes, nous ne possédons pas de moyens pour le résoudre. Nous estimons que des données valables sur cette question pourront être fournies par l'emploi de méthodes cytochimiques bien adaptées.