

ACQUISITIONS RÉCENTES DANS LA PHYSICO-CHIMIE DES ACIDES DÉSOXYRIBONUCLÉIQUES

E. FREDERICQ, A. OTH et V. DESREUX

Laboratoire de Chimie physique, Université de Liège

Abstract—A survey of major recent developments in the physical chemistry of deoxyribonucleic acids is given. The determinations of chemical composition have confirmed the classical correlations between the bases ratios. The fractionation shows a variation in the composition of a given DNA. Analysis of nucleotide sequences is now undertaken. First results reveal irregular distributions. Structural studies point out the possible importance of bonds other than hydrogen bonds: chelation by divalent cations, Van der Waals forces, etc.

The determination of molecular weights and configurations is discussed. The influence of denaturation in the measurements at low concentrations is stressed. It is concluded that native DNA is a molecule with low flexibility and a molecular weight in the neighbourhood of 8,000,000.

Analysis of homogeneity seems to show more heterogeneity in configurations than in sizes. This emphasizes the great importance of considering the occurrence of partly denatured states in fractionation procedures, particularly chromatography.

Deoxyribonucleoproteins (DNP), as they are now prepared, are probably very close to their native state. The nucleohistones are constituted by one molecule of DNA, surrounded by an α -polypeptidic chain of histone more or less loosely bound. Small quantities of other proteins and lipids are perhaps present and the original DNP may be part of a complex structure in the cell. The conditions of extraction and fractionation are discussed. Nucleoprotamins have a more regular structure and tighter bonding between protein and DNA.

The isolation and purification of several types of deoxyribonucleases II are reviewed. Differences in the mechanisms of action, the specificities and the metal-activation of DNases I, II and III are evidenced. Finally the importance of the enzymatic synthesis of DNA for the study of its duplication is stressed.

Si les biologistes ne peuvent exiger que leurs confrères, chimistes et physiciens, leur fournissent le modèle complet et détaillé d'une molécule aussi gigantesque que celle de l'acide désoxyribonucléique (ADN), ils sont en droit de demander par contre, qu'on leur apporte une réponse à une série de problèmes beaucoup plus simples: composition chimique et différenciation des ADN de divers tissus et espèces animales, forme et dimensions moléculaires, voies de synthèse ou de dégradation, etc.

Au fur et à mesure de l'accumulation des données expérimentales, il semble qu'aucune réponse à ces questions n'ait pu se dégager clairement. En fait, certaines notions, telles que celle de la masse moléculaire, sont beaucoup plus douteuses aujourd'hui qu'elles ne le paraissaient il y a quelques années. Ceci ne signifie pas que nous nous éloignons du but, mais simplement que nous devons revoir nombre

des hypothèses, parfois trop simples, émises à l'origine et nous faire une conception plus neuve et plus subtile de ces molécules aux propriétés déroutantes.

Nous ne voulons pas ajouter ici une revue de plus à toutes celles qui, mieux que nous ne pourrions le faire, ont traité ce vaste sujet au cours des dernières années (CHARGAFF, 1955; CROOK, 1957; SHOOTER, 1957; McELROY et GLASS, 1957; SADRON et POUYET, 1959; *Onzième Conseil de Chimie Solvay*, 1959). Nous voulons simplement essayer de dégager, à la lueur des données expérimentales récentes, ce qu'il faut abandonner de nos anciens concepts et les tendances nouvelles des hypothèses qui vont leur succéder.

Composition chimique

L'analyse chimique des bases puriques et pyrimidiques faite sur de nombreux échantillons d'ADN d'origines très diverses a confirmé les corrélations devenues classiques entre les proportions molaires de ces bases. On a presque toujours (A pour adénine, T pour thymine, G pour guanine et C pour cytosine):

$$A = T \text{ et } G = C \quad (1)$$

$$A + G = C + T \quad (2)$$

$$A + C = G + T \quad (3)$$

La relation (2) exprime l'égalité entre la somme des purines et celle des pyrimidines. La relation (3) montre que le nombre de groupes 6-amino est égal au nombre de 6-hydroxy, ainsi que le postule le couplage des bases de la structure CRICK et WATSON (CHARGAFF, 1955). Ces corrélations sont maintenues pour des rapports A/G variant de 2,5 à 0,5. Ces derniers rapports sont caractéristiques des différentes espèces vivantes et parmi celles-ci, les micro-organismes présentent les plus grandes variations; A/G varie de 2,5 pour *Clostridium perfringens* à 0,4 pour *Micromonospora coerula* (CHARGAFF, 1955) tandis que chez les animaux supérieurs le rapport varie beaucoup moins et se situe aux environs de $1,4 \pm 0,2$. Notons en passant que pour l'ARN existe aussi l'identité (U pour uracile):

$$A + C = G + U$$

Il est intéressant de faire remarquer avec BELOZERSKY (1959) que si la composition en bases puriques et pyrimidiques des ARN extraits de bactéries ne varie qu'entre des limites assez étroites, il semble cependant exister une relation entre les valeurs des rapports $((G + C)/(A + T))$ de l'ADN et $((G + C)/(A + U))$ de l'ARN; à un ADN d'une bactérie riche en guanine et cytosine correspond un ARN riche en les mêmes bases.

On admet actuellement qu'au sein d'un organisme vivant supérieur, on doit avoir une distribution du rapport A/G autour de la composition moyenne caractéristique de l'espèce. A ce sujet, l'étude du fractionnement de l'ADN du point de vue composition en bases est donc très importante. Il y a encore peu de données expérimentales (CRAMPTON *et al.*, 1954; LIPSHITZ et CHARGAFF, 1956; BUTLER, 1959) mais il est certain que cette voie permettra d'obtenir des renseignements de plus en plus précis sur la relation éventuelle entre les caractères héréditaires et la composition en bases. L'analyse des séquences suivant lesquelles les bases sont disposées représente un travail énorme qui a été à peine entamé. L'étude de l'acide apurinique révèle l'existence de portions de chaînes entièrement substituées par

de la thymine; SHUGAR a isolé jusqu'à des pentanucléotides de thymine (ADAMIEC et SHUGAR, 1959). Les premiers résultats indiquent donc que des séquences contenant plusieurs purines ou pyrimidines seraient plus fréquentes qu'une alternance régulière Pu-Py (SHAPIRO et CHARGAFF, 1957).

Structure

La structure en double hélice de CRICK et WATSON, formée de deux chaînes polynucléotidiques complémentaires maintenues par des liaisons hydrogène, permet d'expliquer raisonnablement l'ensemble des principaux résultats expérimentaux. Cependant, certains à l'heure actuelle, mettent en doute l'intervention unique de liaisons hydrogène pour la stabilisation de l'édifice moléculaire. En particulier, l'étude de la dénaturation thermique (STURTEVANT *et al.*, 1958) ou acide de l'ADN, indique qu'une petite partie seulement de ces liaisons entre paires de bases est nécessaire. Il ne faut pas perdre de vue que d'autres types de liaisons pourraient jouer un rôle important: interactions de van der Waals, intervention de cations bivalents, etc. Des travaux récents montrent que les cations alcalino-terreux sont fortement liés par les acides nucléiques (WIBERG et NEUMANN, 1957; ZUBAY et DOTY, 1958); ils influencent certainement la stabilité et l'état d'agrégation de ces molécules. Rappelons aussi que RICH a montré que les ions Mn^{2+} et Mg^{2+} accélèrent considérablement la formation de la double hélice à partir de chaînes isolées de polyribonucléotides (FELSENFELD et RICH, 1957).

La généralisation de la double hélice comme structure universelle de l'ADN semble avoir été un peu prématurée car récemment, SINSHEIMER (1959) a isolé à partir d'un bactériophage ($\phi \times 174$) un ADN qui serait constitué d'une chaîne simple avec toutes les caractéristiques physico-chimiques d'un polyélectrolyte flexible. Sa composition chimique ne vérifie plus les relations générales $A = T$ et $G = C$ et son poids moléculaire serait de l'ordre de $1,6 \times 10^6$. Quant aux études de rayons X, les plus récentes ont porté principalement sur les nucléoprotéines dont nous parlerons plus loin.

Poids moléculaire et dimensions de l'ADN

Les méthodes classiques de détermination de la masse moléculaire de hauts polymères sont applicables à l'ADN. Cependant, du fait des grandes dimensions et de l'incertitude quant au degré de flexibilité de cette particule, les résultats obtenus par les méthodes de diffusion lumineuse, ultracentrifugation et viscosité doivent être interprétés avec circonspection (SADRON, 1959; BUTLER *et al.*, 1959).

Il y a quelques années en effet, à partir de la méthode de diffusion moléculaire de la lumière, DOTY et RICE (1957) avaient proposé un poids moléculaire de l'ordre de 6 à 7×10^6 pour l'ADN natif. Depuis lors, en examinant d'une manière plus critique les possibilités et les limites d'utilisation de cette méthode dans le cas de dimensions moléculaires qui sont grandes par rapport à la longueur d'onde de la lumière, on a constaté que l'extrapolation des mesures expérimentales était peu justifiable et qu'en fait on ne pouvait déterminer que le rapport masse moléculaire/longueur qui serait pour l'ADN de $200\text{--}250/\text{\AA}$. Cette dernière valeur est en bon accord avec la valeur théorique calculée d'après le modèle de CRICK et WATSON, qui est de $204/\text{\AA}$ (SADRON, 1959).

D'autre part, si on veut combiner les mesures de vitesse de sédimentation et de viscosité, on est conduit à utiliser arbitrairement des modèles, bâtonnet ou pelote gaussienne, d'après lesquels les valeurs de poids moléculaire varient du simple au double: 6×10^6 (bâtonnet) 12×10^6 (pelote). Pour trancher entre ces possibilités, il faut établir avec certitude la configuration exacte de l'ADN en solution. Or la mesure qui est la plus sensible à cet effet est la viscosité. Les résultats expérimentaux assez nombreux indiquent à première vue une absence totale de corrélation entre masse moléculaire et viscosité (SADRON et POUYET, 1959; SADRON, 1959). En fait, de nombreux facteurs tels que le mode de préparation, l'histoire de l'échantillon, la force ionique, la concentration, le pH, etc., peuvent influencer la stabilité de la molécule et fausser l'interprétation des résultats. Nous allons examiner ce changement de structure auquel on a donné le nom de dénaturation.

Dénaturation de l'ADN en solution diluée

La stabilité de la double hélice de CRICK et WATSON est assurée par l'existence d'un grand nombre de liaisons hydrogène entre les bases puriques et pyrimidiques des deux chaînes. De nombreuses expériences démontrent que cette structure doit s'altérer profondément sous l'action d'agents chimiques capables de rompre ces liaisons, par action thermique, ou simplement par des variations relativement faibles dans la composition du milieu, force ionique, pH, concentration en ADN, constante diélectrique, bref tous les facteurs qui influencent le comportement des polyélectrolytes en solution (THOMAS, 1954; CAVALIERI *et al.*, 1956; CAVALIERI et ROSENBERG, 1957; COX et PEACOCKE, 1957a; EHRLICH et DOTY, 1958; OTH, 1959a; DUGGAN *et al.*, 1957; SHACK, 1958).

La dénaturation par diminution de concentration en ADN est rendue manifeste par l'augmentation du coefficient d'extinction à $260 \text{ m}\mu$, que l'on observe sur des solutions d'ADN à $0,00001 \text{ g/ml}$, augmentation qui résulterait de la destruction des liaisons hydrogène de la double hélice. L'effet est d'autant plus fort que la force ionique est plus faible. On doit donc s'attendre à ce que cette disparition de la rigidité de la structure aux faibles concentrations et forces ioniques se marque dans les mesures de viscosité. En effet, l'allure des courbes de viscosité réduite en fonction de la concentration en ADN aux faibles forces ioniques semble bien indiquer qu'il y a une concentration en ADN à partir de laquelle une importante modification structurale s'est produite (OTH, 1959b).

D'autre part, par abaissement progressif du pH, on observe une chute importante de la viscosité qui se produit pour des pH d'autant plus près de 7 que la solution est plus diluée en ADN et que la force ionique est faible. Les mesures de sédimentation d'A. OTH (1959a) révèlent, dans certains cas (force ionique $0,005$ à $0,0005$) l'apparition de deux composants distincts qui représenteraient les deux formes d'ADN, native et dénaturée. On observe également que le pH pour lequel il y a 50% de chaque forme est d'autant plus près de 7 que la force ionique est basse et que la concentration en ADN est faible.

Remarquons que ces phénomènes de dénaturation ne sont que partiellement réversibles, c'est à dire que l'on ne parvient jamais à retrouver les propriétés physicochimiques des solutions de départ, en restaurant les conditions initiales.

La réversibilité est d'autant plus poussée que la dénaturation a été effectuée moins loin, ainsi que le montrent notamment les courbes d'électrotitration (COX et PEACOCKE, 1957b). Mais il est logique d'admettre que la reconstitution des liaisons hydrogène s'effectue, en partie tout au moins, au hasard et ne restaure pas la molécule native; on ne peut donc parler de réelle réversibilité.

Réexaminons à présent les déterminations des grandeurs moléculaires et surtout les viscosités à la lumière de ces données.

La viscosité de l'ADN, en raison de la forte asymétrie moléculaire, varie fortement avec le gradient de vitesse. Aussi a-t-on étudié la viscosité à différentes forces ioniques en vue d'établir la flexibilité de la molécule, par analogie avec les propriétés connues des polyélectrolytes de synthèse. Lorsque les viscosités à gradient nul, sont tracées en fonction de la concentration en ADN, les courbes à différentes forces ioniques semblent converger vers un même point. On en avait conclu à la rigidité des particules (SADRON, 1959; CONWAY et BUTLER, 1954; EISENBERG, 1957). Or d'après la discussion précédente, la configuration change complètement dans le domaine des très faibles concentrations et l'on ne peut évidemment par extrapolation tirer de conclusions quant à la forme des molécules à l'état natif.

En conclusion, on ne peut donc affirmer le caractère totalement rigide des molécules d'ADN natif. L'interprétation la plus raisonnable des données de diffusion lumineuse et viscosité, suggère une flexibilité limitée et une forme un peu pelotonnée avec des dimensions moyennes entre les extrémités de la chaîne de l'ordre de 6 à 7000 Å dans des solutions de force ionique physiologique, et un poids moléculaire voisin de 6 à 8 000 000. Pour l'ADN totalement dénaturé, la configuration est établie de façon plus certaine: c'est une pelote statistique qui, dans l'eau pure, tend à affecter une forme étendue de 40 000 Å de long et à force ionique plus élevée, a la forme d'une sphère de 2 à 3000 Å de diamètre, imperméable du point de vue hydrodynamique. Son poids moléculaire est de 6 000 000 (DOTY et RICE, 1957; OTH, 1959a) Si l'on admet que la dénaturation n'entraîne pas de variation du poids moléculaire, ceci établit alors sans ambiguïté le poids moléculaire de l'ADN natif.

Homogénéité des préparations d'ADN

D'après les diagrammes de sédimentation de BUTLER (BUTLER *et al.*, 1959; SHOOTER et BUTLER, 1956) il semble que l'ADN soit fortement polydispersé. Cependant, il est difficile de différencier les effets de forme moléculaire des effets de masse, d'autant plus que, suivant le mode de préparation et l'histoire de l'échantillon, on peut avoir un certain pourcentage de dénaturation. Ceci vient encore compliquer l'analyse de la polydispersité. Il est raisonnable de penser que le mode de préparation introduit un certain degré de polydispersité de masse, dépendant des conditions d'extraction (turmix, action enzymatique, etc.). Notre propre expérience peut être résumée de la manière suivante: le fractionnement de la nucléoprotéine par précipitation graduelle en fonction de la concentration saline entre NaCl 1 M et 0,1 M, suivi de la transformation en ADN par traitement au détergent, fournit, aux erreurs expérimentales près, des ADN de même viscosité intrinsèque. Par conséquent, ils ont très probablement les mêmes poids moléculaires. De même, par chromatographie de l'ADN sur poudre de cellulose, on isole un

grand nombre de fractions qui, mesurées dans les mêmes conditions, donnent sensiblement les mêmes viscosités intrinsèques.

A moins que ces deux méthodes ne soient absolument insensibles aux dimensions moléculaires, on doit en conclure que l'ADN serait beaucoup moins polydispersé que ne le suggère l'analyse par ultracentrifugation. Par contre, les possibilités de dénaturation à différents degrés doivent être prises en considération lors de fractionnements. La méthode chromatographique est de plus en plus utilisée et il faut sans doute accueillir avec réserves les résultats (BENDICH, *et al.*, 1959). D'après notre expérience, il est possible d'isoler avec une bonne reproductibilité différents composants par l'emploi de poudre de cellulose, mais l'existence de formes dénaturées vient vraisemblablement compliquer la séparation.

Préparation de l'ADN

De nombreux auteurs insistent de plus en plus à l'heure actuelle sur la nécessité de contrôler rigoureusement les détails pratiques de préparation et d'éviter tout traitement susceptible de provoquer des dénaturations partielles (SADRON et POUYET, 1959; BUTLER, 1959; DUGGAN *et al.*, 1957), par exemple précipitation à l'alcool ou au détergent; en outre, il faut éliminer toute trace de protéine.

Dans notre laboratoire (OTH *et* DESREUX, 1957) nous avons utilisé avec succès une technique basée sur la dissociation de la nucléohistone en solution saline 2 M ou 1 M. Cette solution, centrifugée pendant 10 hr à 40 000 tours/min fournit un sédiment d'ADN, l'histone restant en presque totalité dans le surnageant. Un second traitement du sédiment produit de l'ADN dépourvu d'histone.

DÉSOXYRIBONUCLÉOPROTÉINES (DNP)

Les DNP restent fort mal connues, aussi bien du point de vue de leur composition que de celui de leur structure moléculaire. En fait, on a naguère mis en doute leur existence en tant qu'unités biologiques et certains ont supposé qu'elles pourraient résulter d'une combinaison accidentelle formée entre protéines basiques des noyaux cellulaires et acides nucléiques, lors de l'extraction de ces derniers. Il semble bien établi à présent que l'acide nucléique est en général uni à des composants protéiques dans les cellules et que les DNP telles que nous les extrayons ne sont pas des créations artificielles. Les DNP reconstituées à partir d'acides nucléiques et de protéines ont des propriétés analogues aux DNP préparées par extraction directe mais n'y sont jamais identiques. Elles perdent, par exemple, la capacité de former des gels rigides en l'absence de sels. Les diagrammes de rayons X obtenus à partir de noyaux entiers sont analogues à ceux des DNP et s'interprètent le plus aisément en supposant qu'il existe une combinaison plus ou moins lâche entre ADN et protéines (WILKINS, 1957, 1959).

Par chromatographie, CRAMPTON (1957) a mis en évidence des différences incontestables dans la composition chimique des histones que l'on extrait de DNP natives ou réassociées. Ceci indique qu'au moins une partie des composants des nucléohistones sont *in vivo* combinés originellement suivant une structure qui n'est pas rétablie par une réassociation effectuée au hasard.

Composition

Le classement des DNP est fort ancien et n'a pas beaucoup progressé depuis qu'on y a reconnu la présence de deux sortes de protéines basiques: histones et protamines. La transformation de nucléohistone en nucléoprotamine lors de la formation du sperme a été suivie en particulier par VENDRELY *et al.* (1958): dans certains cas, la composition chimique de la nucléohistone subsiste, dans d'autres, elle est considérablement simplifiée avec production de "nucléoarginine". Les DNP extraites d'*Escherichia coli* semblent représenter un type encore différent de nucléoprotéines (PALMADE *et al.*, 1958; ZUBAY et WATSON, 1959). Une grande partie de l'ADN existerait à l'état libre dans ces bactéries (WILKINS et ZUBAY, 1959). Ce fait confirme que le rôle joué par la protéine dans les fonctions génétiques de la DNP doit être tout à fait secondaire.

Il est bien possible que dans les noyaux de la plupart des organismes, l'ADN soit attaché à d'autres constituants et notamment à des protéines non-histoniques. MONTY et DOUNCE (1958) ont isolé une DNP de noyaux de foie de rat, contenant une protéine de nature non-histonique à laquelle il est fixé par des liaisons covalentes. La plupart des préparations de DNP contiennent probablement un peu de lipides, ainsi qu'il a été établi notamment par les diagrammes de rayons X (WILKINS, 1957, 1959).

En prenant certaines précautions, DOTY et ZUBAY (1956, 1959) ont récemment obtenu une DNP complètement dispersée, non gélifiable et apparemment homogène. Ils en ont conclu que ces particules pourraient bien représenter l'unité fondamentale des chromosomes. Cette affirmation semble reposer sur des bases expérimentales insuffisantes (DOUNCE et O'CONNELL, 1958). Jusqu'à preuve du contraire, la formation de gels rigides est une propriété inhérente aux DNP natives et qui disparaît immédiatement dès que celles-ci sont soumises à des traitements légèrement dégradants (actions enzymatiques très modérées) ou dénaturants. La rigidité est un indice de l'existence d'interactions considérables entre particules allongées de DNP: elle se manifeste à des concentrations de l'ordre du 0,01% et est bien plus marquée que dans l'ADN. Dans ces conditions, on ne peut attribuer qu'une valeur très relative aux critères habituels d'homogénéité, même à de faibles concentrations.

Tout ce que nous pouvons dire c'est que la DNP telle que nous la préparons par des méthodes relativement douces et en évitant autant que possible toute dégradation, est structurellement assez proche du complexe macromoléculaire ou d'une partie du complexe, qui dans les chromosomes contient l'ADN et au sein duquel il peut exercer ses fonctions génétiques.

Extraction-fractionnement

Il est certain que l'utilisation du versène dans le solvant d'extraction, préconisée par DOTY et ZUBAY (1956, 1959) conduit à l'obtention d'une DNP beaucoup plus stable que la préparation au citrate par exemple. Dans cette dernière, il y a en effet apparition très rapide de composants dégradés, solubles dans NaCl 0,01 M et dépourvus de rigidité (SHOOTER et BUTLER, 1957). La désoxyribonucléase (DNase) I semble être la principale responsable de la transformation qui se produit lors de l'extraction de la DNP et la rend inapte à former des gels. Il s'agit initialement

d'une séparation de la protéine et de l'ADN (DOUNCE *et al.*, 1957). Cette action est inhibée par le versène. Mais il se produit certainement d'autres dégradations et en particulier des protéolyses qui ont un effet plus lent mais qui provoquent à plus ou moins longue échéance, même à froid, la dégradation de la DNP. En fait, il est plus facile de préserver la portion ADN de l'action des DNases par des inhibiteurs que la portion histonique.

En extrayant des thymus en présence de versène et en réduisant au minimum l'homogénéisation au turmix, nous avons obtenu une DNP qui reste stable plusieurs mois en chambre froide. Par centrifugation fractionnée, on peut y séparer deux composants, stables tous deux, dont l'un est dépourvu de rigidité dans l'eau pure, l'autre étant totalement responsable de la formation des gels rigides. Ces deux constituants ont des viscosités intrinsèques très voisines, ce qui indique que leurs particules doivent être analogues du point de vue dimensions. Par précipitation fractionnée, on a déjà mis en évidence, dans notre laboratoire, l'existence de deux fractions dans la DNP, soit en procédant à faible force ionique (OTH et DESREUX, 1957) soit à force ionique comprise entre 0, 15 et 2.

La sensibilité des histones aux actions enzymatiques rend leur étude délicate (CRAMPTON *et al.*, 1957). Moyennant certaines précautions, on a pu dans différents laboratoires isoler et fractionner ces protéines et on a trouvé qu'elles se résolvaient en deux fractions principales, dont l'une contient beaucoup de lysine et l'autre beaucoup d'arginine (MOORE, 1959). La première a un poids moléculaire de 10 000, la seconde de 16 000 (TRAUTMAN et CRAMPTON, 1959). Il est possible que ces deux fractions soient elles-mêmes hétérogènes. Il est intéressant de constater que, dans la mesure du pouvoir de résolution limité des méthodes actuelles, on trouve des compositions très semblables pour les histones extraites de différents tissus (MOORE, 1959) foie, rein et thymus de veau. D'après VENDRELY *et al.* (1958) même d'une espèce animale à l'autre, la composition en acides aminés resterait très semblable.

Structure moléculaire

En ce qui concerne la structure de la DNP, seuls quelques progrès sont à signaler dans l'étude des diagrammes de rayons X. Il est bien établi à présent que l'ADN conserve dans la DNP la configuration qu'il possède à l'état isolé. Il faut distinguer les structures de nucléoprotamine et celles de nucléohistone. Dans les nucléoprotamines, la partie protéique, sous forme de chaîne polypeptidique à configuration- β est enroulée autour de la double hélice de l'ADN dans la petite gorge séparant deux chaînes polynucléotidiques. Les molécules d'ADN sont parallèles entre elles ce qui confère à l'ensemble une structure ordonnée, présentant de la biréfringence (WILKINS, 1957, 1959). Par contre, la nucléohistone ne présente pas l'aspect régulier de fibrilles parallèles. Les chromosomes n'ont pas de biréfringence. On en a conclu que l'ADN y est enroulé en pelote par suite de sa combinaison avec l'histone. Cette dernière serait elle-même, en grande partie sous forme d'hélice- α avec une quantité notable de liaisons hydrogène (DE LOZÉ, 1958). WILKINS (1957, 1959) suppose que l'histone aurait une association assez lâche avec l'ADN. Elle se trouverait dans la grande gorge de la double hélice et servirait en quelque sorte de pont entre les molécules d'ADN. Les azotes basiques de l'ADN

ne seraient pas recouverts et resteraient libres d'entrer en réaction chimique. Ainsi le rôle de l'histone serait essentiellement de joindre les molécules d'ADN dans les chromosomes des organismes supérieurs, dans un groupe cohérent, transportable en bloc durant la mitose. Dans la nucléoprotamine, caractéristique du sperme, le remplacement de l'histone par la protamine provoquerait un déroulement de l'ADN.

La nature des liaisons chimiques entre ADN et autres constituants des DNP n'a jamais été directement établie. Si l'existence de liaisons salines entre groupes phosphates et groupes basiques protéiques est de plus en plus évidente, certains n'écartent pas d'autres possibilités: liaisons covalentes (MONTY et DOUNCE, 1958), chélation par des cations bivalents (KIRBY, 1957). On sait en tous cas que les nucléohistones contiennent du sodium équivalent à 20% des groupes phosphates, ce qui fait supposer que 80% d'entre eux forment les liaisons salines, le reste étant libre pour d'autres interactions.

Toutefois d'après VENDRELY *et al.* (1959), dans les noyaux eux-mêmes, la proportion histone/ADN serait plus élevée et tous les groupes phosphates seraient neutralisés par des groupes histoniques. Cette façon de voir est confirmée par des résultats inédits de notre laboratoire: la précipitation fractionnée de nucléohistone à force ionique variant de 1 à 0,1 indique que la DNP précipitée garde toujours une composition voisine de 55% d'histone et de 45% d'ADN, mais que par contre de l'histone pure reste soluble à force ionique 0,15. Par conséquent, lors de l'extraction des tissus, on appauvrirait la nucléoprotéine native en histone et l'on isolerait toujours une nucléoprotéine ayant un excès d'ADN.

Propriétés physico-chimiques en solution

En raison des difficultés d'interprétation des mesures effectuées sur des solutions de particules à haut degré d'interactions, on a peu de données précises sur les propriétés physico-chimiques des DNP. Elles sont pratiquement limitées à la nucléohistone de thymus. On doit l'étudier dans l'eau pure, milieu où elle forme des gels ou dans des solutions salines quelques dixièmes molaires, où elle commence à se dissocier partiellement. Elle est extrêmement sensible à de faibles variations de force ionique ou de pH et est agrégée et précipitée par des concentrations de Ca ou Mg à partir de 10^{-4} M (FRICK, 1958).

DOTY et ZUBAY (1959) ont fait une série de déterminations physico-chimiques sur la nucléohistone de thymus. Même si l'on ne peut admettre sans réserves le caractère tout à fait natif de ces solutions dépourvues de rigidité, elles ont été préparées dans des conditions telles que du point de vue structural, elles doivent être très proches de la DNP originale. Un poids moléculaire de 18 000 000 a été trouvé pour ces particules. Comme elles contiennent environ 47% d'ADN et 53% d'histone, il est bien établi qu'elles représentent une molécule unique d'ADN (poids moléculaire environ 8 000 000). Leur asymétrie est moins élevée que celle de l'ADN. Tout indique que la nucléohistone, tout en étant encore très loin de la pelote statistique, serait dans une certaine mesure, plus repliée sur elle-même que l'ADN, sa longueur atteignant 4000 Å, soit la moitié de celle des molécules d'ADN. Au microscope électronique, la DNP apparaît sous forme de longs filaments d'environ 30 Å de diamètre.

En résumé, la nucléohistone est composée, à quelques pour-cent près, d'une molécule intacte d'ADN autour de laquelle est régulièrement enroulée la chaîne polypeptidique de l'histone. Le problème immédiat sera d'établir comment ces longs filaments sont disposés dans le chromosome: y forment-ils des entités bien distinctes plus ou moins indépendantes où seraient localisées les propriétés génétiques, ou sont-ils associés en un réseau complexe, comprenant d'autres composés chimiques, protéines ou lipides, intimement fondus dans la structure chromosomique?

Les désoxyribonucléases

L'attention des biologistes s'est surtout portée au cours des dernières années sur les DNases dites du type II, c'est-à-dire celles qui ont leur optimum d'activité en milieu acide et sont actives en l'absence de cations divalents. Le nombre de DNases de ce type augmente régulièrement et il ne fait pas de doute qu'on ait affaire à toute une série d'enzymes différents.

Les DNases II intracellulaires, que l'on extrait de divers organes surtout thymus et rate, sont extrêmement voisines sinon identiques (FREDERICQ et OTH, 1958). Divers procédés ont été utilisés pour les purifier (KOERNER et SINSHEIMER, 1957a; KOSZALKA *et al.*, 1959; SHIMOMURA et LASKOWSKI, 1957). Dans notre laboratoire, nous avons obtenu un très haut degré de purification des DNases de rate et de thymus par chromatographie sur hydroxylapatite (FREDERICQ et OTH, 1958). Les DNases II à propriétés nettement différentes ont été extraites de tissus de cyclostomes, de cultures de protozoaires, de venin de serpent et de lait (HAESSLER et CUNNINGHAM, 1957) ainsi que de tissus prostatiques (BOMAN, 1958). Il existerait donc des DNases II extracellulaires.

Enfin un troisième type de DNase a été isolé de cultures bactériennes et notamment de *Micrococcus pyogenes* (CUNNINGHAM *et al.*, 1956) et purifié (PRIVAT DE GARILHE *et al.*, 1958). Son optimum d'action se situe à pH 8,6, en présence de CaCl_2 0,01 M.

L'étude physico-chimique de la dégradation enzymatique n'en est qu'à ses débuts. Une des acquisitions récentes en ce domaine est la découverte que la DNase I attaque la liaison phosphoester près du 3'-C du sucre (PRIVAT DE GARILHE *et al.*, 1957), la DNase II ainsi que la DNase bactérienne, attaquant cette liaison près du 5'-C (PRIVAT DE GARILHE, 1957; KOERNER et SINSHEIMER, 1957b); les oligonucléotides produits portent respectivement leur groupe phosphorique terminal en 5' et 3'.

Peu de données existent quant à la spécificité des DNases. La DNase bactérienne a la spécificité la plus faible: elle attaque 60 à 70% des liaisons phosphoesters. Après elle se situe la DNase I qui attaque 30 à 35% de ces liaisons. La vitesse de dégradation diminue énormément quand le poids moléculaire des substrats décroît (FREDERICQ, 1958a, 1959). Il n'est donc pas certain qu'il y ait une spécificité dans la position des liaisons attaquées; il se pourrait que la DNase I nécessitât pour être active la structure organisée de molécules d'ADN relativement grandes. On a toutefois démontré l'absence de certaines séquences (adénine-cytosine) dans les hydrolysats (PRIVAT DE GARILHE *et al.*, 1957) et l'hydrolyse préférentielle de la séquence purine-pyrimidine (POTTER *et al.*, 1958).

Enfin, l'existence d'une spécificité de la DNase II est rendue très probable de façon indirecte (FREDERICQ, 1958, 1959a). Son action s'arrête à un stade relativement peu avancé (10 à 15% des liaisons) et produit peu de petits nucléotides. Elle se montre incapable d'attaquer les hydrolysats partiels obtenus à partir de l'action de DNase I. Directement, on a montré que la séquence pyrimidine-purine était absente dans les trinuécléotides des hydrolysats (LAURILA et LASKOWSKI, 1957).

L'activation des DNases par les ions métalliques soulève une série de problèmes intéressants. La DNase I est fortement activée par les ions Mn, un peu moins par Mg et Co, très peu par Ca et Ni. Il y a corrélation entre la combinaison de Mn et Mg avec l'ADN et leur effet activant. Mais les ions Ca ont un pouvoir synergique puissant en présence de Mg (WIBERG, 1958). Par contre, la DNase I est peu activée par Mg lors de l'hydrolyse d'oligonucléotides mais beaucoup plus par Ca (FREDERICQ, 1958a, 1959). Elle est inhibée par les agents complexants, citrate ou versène. La DNase II est activée par Mn et Mg surtout, un peu moins par Ca et Zn; il existe un rapport stoechiométrique entre la quantité d'ADN et celle des ions métalliques donnant le maximum d'activité, ce qui indique la formation d'un métallosubstrat (OTH *et al.*, 1958). La DNase II est également activée par le citrate et le versène, ce qui semble indiquer que des métaux lourds à effet inhibiteur accompagnent les préparations d'ADN ou de DNase.

La présence d'histone dans les DNP exerce un effet inhibiteur sur l'action de la DNase qui se trouve retardée en fonction de la quantité d'histone liée à l'ADN. Ceci est vrai aussi pour les DNP reconstituées (DE LOZÉ, 1958; KLAMERTH, 1957). Il faut remarquer que seules les DNP dégradées ou artificiellement appauvries en protéine peuvent être étudiées à l'état soluble dans des conditions de force ionique moyenne. Toute étude enzymatique de DNP proches de l'état natif, devra se faire en milieu hétérogène.

Une intéressante observation de MONTY et DOUNCE (1958) est l'apparition de complexes de polynucléotides et d'acides aminés dans les produits de dégradation de DNP de foie par la DNase I. La confirmation de telles expériences serait une indication précieuse sur le mode de dégradation et peut-être de synthèse des DNP: polymérisation d'unités monomères complètes, acide aminé et nucléotide, ou synthèse de protéines sur une molécule d'ADN préalablement constituée.

En conclusion, les DNases n'ont en commun que la propriété d'hydrolyser les liaisons phosphoesters des ADN. Certaines nécessitent un substrat à poids moléculaire élevé, d'autres sont actives jusqu'au stade de nucléotides à faible degré de polymérisation. Elles sont activées par les cations bivalents, analogues à ceux qui jouent un rôle dans la plupart des réactions d'hydrolyse et de transfert des groupes phosphoriques, c'est-à-dire les ions alcalino-terreux et le Mn, mais l'intensité et les modalités de l'activation diffèrent considérablement d'un enzyme à l'autre.

L'hypothèse suivant laquelle la DNase II jouerait un rôle particulier dans la synthèse de l'ADN dans le cytoplasme a reçu un appui des expériences de CHÈVREMONT *et al.* (1957, 1959 *a* et *b* et 1960) montrant l'apparition d'ADN dans les mitochondries de fibroblastes de poulet sous l'action de cette DNase. Il est à souhaiter que l'on arrive à étendre de telles expériences qui constituent

à l'heure actuelle le seul fil conducteur dans le domaine particulièrement obscur de l'intervention des DNases dans le métabolisme des ADN.

De nouvelles perspectives s'ouvrent dans le domaine de la synthèse enzymatique de l'ADN grâce aux brillants résultats de l'école de KORNBERG (LEHMAN *et al.*, 1958a, b). Les derniers travaux ont montré que la composition en bases d'ADN synthétisé par l'action de polymérases sur des désoxyribonucléotides triphosphates, était indépendante des proportions molaires mises en oeuvre, mais était la plupart du temps déterminée par la composition de l'ADN "primaire" que l'on doit nécessairement ajouter au milieu pour réaliser la réaction (BESSMAN *et al.*, 1958). Ceci reste vrai, même lorsque le "primaire" est constitué de polydésoxyribonucléotides synthétiques, contenant uniquement de l'adénine et de la thymine: le produit de la nouvelle synthèse ne contient que ces bases. Il semble aussi que le poids moléculaire de l'ADN synthétisé soit identique à celui de l'ADN primaire. Tout ceci indique que l'addition successive des nucléotides doit s'effectuer sur l'acide primaire agissant comme un moule, ce qui implique peut-être, une dissociation préalable de celui-ci. L'extension de ces expériences grâce à l'obtention de polymérases purifiées, de haute activité spécifique, permettra sans doute d'éclaircir bon nombre de problèmes intimement liés et d'importance fondamentale pour le biologiste: synthèse des ADN, dissociation et duplication des doubles chaînes, etc.

RÉSUMÉ

On décrit les développements les plus importants, survenus récemment dans la physico-chimie des acides désoxyribonucléiques. Les déterminations de composition chimique ont confirmé les corrélations classiques entre les rapports des bases. Le fractionnement révèle des variations dans la composition d'un ADN donné. L'analyse de la séquence des nucléotides a été entreprise. Les premiers résultats montrent des distributions irrégulières. Des études structurales soulignent l'importance possible de liaisons autres que les liaisons hydrogène: chélation par des cations bivalents, forces de Van der Waals, etc.

On discute la détermination des poids moléculaires et des configurations. On met en évidence l'influence de la dénaturation dans les mesures à faible concentration. On en conclut que l'ADN natif est une molécule à basse flexibilité dont le poids moléculaire se situe aux environs de 8 000 000.

L'analyse de l'homogénéité semble indiquer plus d'hétérogénéité dans les configurations que dans les tailles. Ceci montre combien il est important de prendre en considération les états de dénaturation partielle lors de fractionnements, et notamment dans la chromatographie.

Les désoxyribonucléoprotéines, telles qu'on les prépare à présent, sont probablement très proches de leur état natif. Les nucléohistones sont constituées d'une molécule d'ADN, entourée d'une chaîne α -polypeptidique d'histone, plus ou moins lâchement liée. De petites quantités d'autres protéines et de lipides sont peut-être présentes et la nucléoprotéine originale pourrait bien faire partie d'une structure complexe dans la cellule. On discute les conditions d'extraction et de fractionnement. Les nucléoprotamines ont une structure plus régulière et les liaisons entre protéine et ADN y sont plus fortes.

On passe en revue l'isolement et la purification de différents types de désoxy-ribonucléases. On met en évidence les différences entre les mécanismes d'action, les spécificités et l'activation par les métaux des DNases I, II et III. Enfin on souligne l'importance de la synthèse enzymatique de l'ADN pour l'étude de sa duplication.

BIBLIOGRAPHIE

- ADAMIEC A. et SHUGAR D. (1959) *Naturwissenschaften* **46**, 356.
- BELOZERSKY A. N. (1959) Les nucléoprotéines, dans *Onzième Conseil de Chimie Solvay*. Interscience Inc., New York, R. Stoops, Bruxelles.
- BENDICH A., PAHL H. B., KORNGOLD G. C., ROSENKRANZ H. S. et FRESCO J. R. (1959) *J. Amer. Chem. Soc.* **80**, 3949.
- BESSMAN M. J., LEHMAN I. R., SIMMS E. S. et KORNBERG A. (1958) *J. Biol. Chem.* **233**, 171.
- BOMAN H. G. (1958) *Ark. Kemi* **12**, 38.
- BUTLER J. A. V. (1959) Les nucléoprotéines, dans *Onzième Conseil de Chimie Solvay*. Interscience Inc., New York, R. Stoops, Bruxelles.
- BUTLER J. A. V., LAURENCE D. J. R., ROBINS A. B. et SHOOTER K. V. (1959) *Proc. Roy. Soc. A* **250**, 1.
- CAVALIERI L. F. et ROSENBERG B. H. (1957) *J. Amer. Chem. Soc.* **79**, 5352.
- CAVALIERI L. F., ROSOFF M. et ROSENBERG B. H. (1956) *J. Amer. Chem. Soc.* **78**, 5239.
- CHARGAFF E. (1955) Dans *The Nucleic Acids* (Publié par CHARGAFF E. et DAVIDSON J. N.) p. 307. Academic Press, New York.
- CHÈVREMONT M., BAECKELAND E. et CHÈVREMONT-COMHAIRE S. (1960) ce colloque p. 67.
- CHÈVREMONT M. et CHÈVREMONT-COMHAIRE S. (1957) *Quad. Anat. Prat. Napoli* **12**, 81.
- CHÈVREMONT M., CHÈVREMONT-COMHAIRE S. et BAECKELAND E. (1959 a et b) *Arch. Biol.* **70**, 811 et 833.
- CONWAY B. E. et BUTLER J. A. V. (1954) *J. Polymer Sci.* **12**, 199.
- COX R. A. et PEACOCKE A. R. (1957a) *J. Polymer Sci.* **23**, 765.
- COX R. A. et PEACOCKE A. R. (1957b) *J. Chem. Soc.* 4724.
- CRAMPTON C. F. (1957) *J. Biol. Chem.* **227**, 495.
- CRAMPTON C. F., LIPSHITZ R. et CHARGAFF E. (1954) *J. Biol. Chem.* **211**, 125.
- CRAMPTON C. F., STEIN W. H. et MOORE S. (1957) *J. Biol. Chem.* **225**, 363.
- CROOK E. M. (1957) *Biochemical Society Symposia* No. 14. At the University Press, Cambridge.
- CUNNINGHAM L., CATLIN B. W. et PRIVAT DE GARILHE M. (1956) *J. Amer. Chem. Soc.* **78**, 4642.
- DE LOZÉ C. (1958) *Ann. Chim. (Phys.)* **3**, (13), 145.
- DOTY P. et RICE S. (1957) *J. Amer. Chem. Soc.* **79**, 3937.
- DOTY P. et ZUBAY G. (1956) *J. Amer. Chem. Soc.* **78**, 6207.
- DOTY P. et ZUBAY G. (1959) *J. Mol. Biol.* **1**, 1.
- DOUNCE A. L. et O'CONNELL M. P. (1958) *J. Amer. Chem. Soc.* **80**, 2013.
- DOUNCE A. L., O'CONNELL M. P. et MONTY K. J. (1957) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **3**, 649.
- DUGGAN E. L., STEVENS V. L. et GRUNBAUM B. W. (1957) *J. Amer. Chem. Soc.* **79**, 4859.
- EHRLICH P. et DOTY P. (1958) *J. Amer. Chem. Soc.* **80**, 4251.
- EISENBERG H. (1957) *J. Polymer Sci.* **25**, 257.
- FELSENFIELD G. et RICH A. (1957) *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 457.
- FREDERICQ E. (1958a) International Abstracts of Biological Sciences, *Proceedings of the Fourth International Congress of Biochemistry*. Suppl. p. 33. Pergamon Press, London.
- FREDERICQ E. (1958b) *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **66**, 435.
- FREDERICQ E. (1959) *Arch. Int. Physiol. Biochim.* **67**, 511.
- FREDERICQ E. et OTH A. (1958) *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 281.
- FRICK G. (1968) *Exp. Cell Res.* **15**, 191.
- HAESSLER H. A. et CUNNINGHAM L. (1957) *Exp. Cell Res.* **13**, 304.
- KIRBY K. S. (1957) *Biochem. J.* **66**, 495.
- KLAMERTH O. (1957) *Biochem. Z.* **328**, 443.

- KOERNER J. F. et SINSHEIMER R. (1957a) *J. Biol. Chem.* **228**, 1039.
- KOERNER J. F. et SINSHEIMER R. (1957b) *J. Biol. Chem.* **228**, 1049.
- KOSZALKA T. R., FALKENHEIM R. et ALTMAN K. I. (1957) *Biochim. Biophys. Acta* **23**, 647.
- LAURILA U. R. et LASKOWSKI M. (1957) *J. Biol. Chem.* **228**, 49.
- LEHMAN I. R., BESSMAN M. J., SIMMS E. S. et KORNBERG A. (1958a) *J. Biol. Chem.* **233**, 163.
- LEHMAN I. R., ZIMMERMAN S. B., ADLER J., BESSMAN M. J., SIMMS E. S. et KORNBERG A. (1958b) *Proc. Nat. Acad. Sci., Wash.* **44**, 1191.
- LIPSHITZ R. et CHARGAFF E. (1956) *Biochim. Biophys. Acta* **19**, 256.
- McELROY W. D. et GLASS B. (Ed.) (1957) *The Chemical Basis of Heredity*. Johns Hopkins, Baltimore.
- MONTY K. J. et DOUNCE A. L. (1958) *J. Gen. Physiol.* **41**, 595.
- MOORE S. (1959) Les nucléoprotéines, dans *Onzième Conseil de Chimie Solvay*. Interscience Inc., New York, R. Stoops, Bruxelles.
- Onzième Conseil de Chimie Solvay* (1959) Les nucléoprotéines. Interscience Inc., New York, R. Stoops Bruxelles.
- OTH A. (1959a) *Biochim. Biophys. Acta* **35**, 216.
- OTH A. (1959b) Inédit.
- OTH A. et DESREUX V. (1957) *J. Polymer Sci.* **23**, 713.
- OTH A., FREDERICQ E. et HACHA R. (1958) *Biochim. Biophys. Acta* **29**, 287.
- PALMADE C., CHEVALIER M. R., KNOBLOCH A. et VENDRELY R. (1958) *C.R. Acad. Sci., Paris* **246**, 2679.
- POTTER J. L., LAURILA U. R. et LASKOWSKI M. (1958) *J. Biol. Chem.* **233**, 915.
- PRIVAT DE GARILHE M., CUNNINGHAM L., LAURILA U. R. et LASKOWSKI M. (1957) *J. Biol. Chem.* **224**, 751.
- PRIVAT DE GARILHE M., FASSINA G., POCHON F. et PILLET J. (1958) *Bull. Soc. Chim. Biol.* **40**, 1905.
- SADRON C. (1959) Les nucléoprotéines, dans *Onzième Conseil de Chimie Solvay*. Interscience Inc., New York, R. Stoops, Bruxelles.
- SADRON C. et POUYET J. (1959) Physical chemistry of high polymers of biological interest (Publié par KRATKY O.) dans *Proceedings of the Fourth International Congress of Biochemistry, Vienna 1958* Vol. IX. Pergamon Press, London.
- SHACK J. (1958) *J. Biol. Chem.* **233**, 677.
- SHAPIRO H. S. et CHARGAFF E. (1957) *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 608.
- SHIMOMURA M. et LASKOWSKI M. (1957) *Biochim. Biophys. Acta* **26**, 198.
- SHOOTER K. V. (1957) *Progr. Biophys.* **8**, 310.
- SHOOTER K. V. et BUTLER J. A. V. (1956) *Trans. Faraday So.* **52**, 734.
- SHOOTER K. V. et BUTLER J. A. V. (1957) *J. Polymer Sci.* **23**, 702.
- SINSHEIMER R. L. (1959) *J. Mol. Biol.* **1**, 43.
- STURTEVANT J. M., RICE S. A. et GEIDUSHEK P. (1958) *Disc. Faraday Soc.* **25**, 138.
- THOMAS R. (1954) *Biochim. Biophys. Acta* **14**, 131.
- TRAUTMAN R. et CRAMPTON C. F. (1959) *J. Amer. Chem. Soc.* **81**, 4036.
- VENDRELY R., KNOBLOCH A. et VENDRELY C. (1958) International Abstracts of Biological Sciences *Proceedings of the Fourth International Congress of Biochemistry*. Suppl. p. 34. Pergamon Press, London.
- VENDRELY, R., KNOBLOCH-MAZEN A. et VENDRELY C. (1960) Ce colloque, p. 19.
- WIBERG J. S. (1958) *Arch. Biochem. Biophys.* **73**, 337.
- WIBERG J. S. et NEUMANN W. F. (1957) *Arch. Biochem. Biophys.* **72**, 66.
- WILKINS M. H. F. (1957) Dans *Biochemical Society Symposia* (Publié par CROOK E. M.) No. 14, p. 13. At the University Press, Cambridge.
- WILKINS M. H. F. (1959) Les nucléoprotéines, dans *Onzième Conseil de Chimie Solvay*, Interscience Inc., New York, R. Stoops, Bruxelles.
- WILKINS M. H. F. et ZUBAY G. (1959) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **5**, 55.
- ZUBAY G. et DOTY P. (1958) *Biochem. Biophys. Acta* **29**, 47.
- ZUBAY G. et WATSON M. R. (1959) *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **5**, 51.

DISCUSSION

R. WEGMANN: En fait, le problème de dénaturation partielle est extrêmement intéressant puisqu'on peut l'observer par la position des bandes spectrales des fonctions —CO—NH— de la liaison peptidique, au niveau de laquelle se produit la dénaturation partielle ou totale. Lors de la dénaturation totale apparaît un doublet au niveau de la bande —CO— de cette liaison (1660 cm^{-1} et 1630 cm^{-1}) associé à un décalage vers une plus haute fréquence de la fonction —NH— (1540 cm^{-1}). Lors de la dénaturation partielle, aucun dédoublement ne se produit. Tout au plus observe-t-on une modification légère et discrète des bandes non dénaturées, ce qui produirait une tension axiale plus grande au niveau de cette fonction —CO—NH— , qui l'est d'autant plus que le nombre de groupes carboxyles ionisés —COO— voisins de la liaison est plus grand. Il faut appliquer des températures assez élevées pour obtenir une dénaturation définitive. On ne peut dans ces conditions parler de dénaturation en utilisant le terme de dénaturation partielle; il s'agit plutôt de phénomènes physico-chimiques de tensions intramoléculaires, sans réarrangement structural ou spatial. Ce qu'on appelle dénaturation partielle ne serait autre chose qu'un aplatissement du double pas de la spirale, avec formation d'une section elliptique à la place d'une section arrondie. Ce n'est qu'en cas d'aplatissement extrême, d'écrasement de cette ellipse que la rupture se produit avec ouverture de la chaîne et formation d'une structure allongée, rectiligne, qui reste irréversible. Cette dénaturation "partielle" qu'on peut aussi observer par les spectres infrarouges démontrerait simplement l'élasticité du système biologique.

V. DESREUX: La plupart des spectres infrarouges d'acides nucléiques n'ont-ils pas été pris avec des films? Est-il possible, dans ces conditions, de transposer les conclusions aux solutions très diluées d'autant plus que l'obtention de films très minces peut entraîner une certaine dénaturation.

R. WEGMANN: En effet, ces analyses infrarouges ont été faites sur des films mais non toutes. Toute une série d'entre elles l'ont été sur des ADN en solution, tant dans solutions d' H_2O que de D_2O car malgré l'opacité de l'eau vis-à-vis des i.r., certaines régions du spectre i.r. peuvent être étudiées en milieu aqueux normal et d'autres, très voisines des premières par un milieu aqueux deutérié.

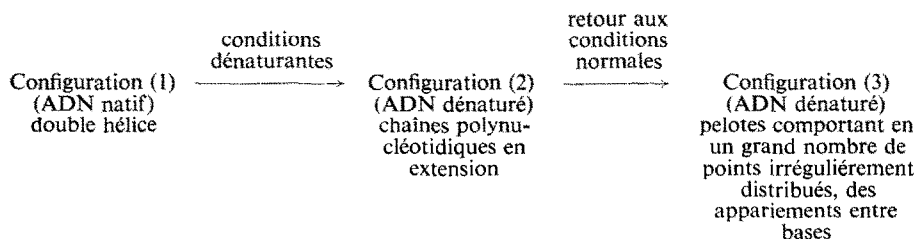
R. THOMAS: Le terme de réversibilité, dans le domaine de la dénaturation des polynucléotides, couvre une série de situations qu'il peut être utile de distinguer.

Dans certaines conditions, les forces de valence secondaires, qui donnaient à la molécule d'ADN natif sa configuration régulière (configuration (1)), disparaissent (configuration (2)). Lorsque ces conditions dénaturantes cessent d'agir, un nombre appréciable de liaisons secondaires se reforment (configuration (3)), et certaines caractéristiques physiques (telles que l'absorption ultraviolette) prennent une valeur intermédiaire entre celle de l'ADN natif et celle que l'on observe dans les conditions dénaturantes. Vue sous cet angle, la dénaturation peut être qualifiée de "partiellement réversible". Cependant, si les liaisons reformées sont probablement de même type que les liaisons primitives, la configuration nouvelle (3) de la molécule a perdu sa régularité: il est extrêmement improbable que de longues séquences de nucléotides puissent retrouver, en l'absence d'un mécanisme *ad hoc*, la séquence complémentaire, et reformer un long segment de

double hélice. On peut donc parler de réversibilité à l'échelle des interactions individuelles entre bases, mais non à l'échelle de la molécule d'ADN.

Au contraire, la dénaturation de molécules telles que celles qui résultent de l'association (acide polyadénylique + acide polyuridylique) semble parfaitement réversible (1)→(2)→(3); ceci peut être attribué à l'uniformité des chaînes, qui simplifie au maximum le problème de l'appariement spécifique des bases.

En ce qui concerne l'ARN, la situation est moins claire. On a cependant des raisons de penser qu'au moins certains types d'ARN sont extraits dans une configuration comparable à la configuration (3) de l'ADN. La transformation (3)→(2)→(3) peut, à la rigueur, être considérée comme une dénaturation réversible (voir schéma):



P. MANDEL: Je pense qu'il convient d'être prudent dans l'affirmation que l'on ne peut obtenir que des ADN du type *primer* quelle que soit la répartition de nucléotide dans le milieu. En effet, KORNBERG a obtenu une fixation d'acide thymidylique en bout de chaîne et les valeurs obtenues dans divers essais de synthèse *in vitro* ne peuvent pas exclure formellement la possibilité de production d'un ADN légèrement différent du *primer*.

C. VENDRELY: Nous sommes aussi d'accord avec Messieurs DESREUX, FREDERICQ et OTH quand ils estiment qu'ils ont utilisé pour fractionner leur désoxyribonucléohistone la seule méthode chimique actuellement valable, méthode que nous avons nous-même essayée et qui donne des résultats parfaitement reproductibles quant aux proportions et à la composition chimique du matériel isolé à chaque temps. En faisant varier la force ionique du solvant, ils ont pu insolubiliser successivement diverses fractions du complexe nucléohistone, à partir desquelles, en un second temps, ils ont séparé des ADN présentant une composition différente en bases azotées. Le but proposé était atteint.