

## RECHERCHES SUR LA DÉNATURATION DES ACIDES DESOXYRIBONUCLÉIQUES

par

R. THOMAS\*

*Laboratoire de Morphologie animale, Université libre de Bruxelles (Belgique)*

### I. INTRODUCTION

La notion de "structure macromoléculaire" des acides désoxyribonucléiques (ADN) a été introduite par GULLAND et ses collaborateurs (GULLAND, JORDAN ET TAYLOR<sup>1</sup>) pour expliquer l'irréversibilité de la courbe d'électrotitration et la chute de viscosité des solutions en dehors de certaines limites de pH. Comme l'ont montré ZAMENHOF ET CHARGAFF<sup>2</sup> la réversibilité de ce dernier phénomène n'est qu'apparente, puisque la viscosité restaurée après neutralisation présente un haut degré de thixotropie. Outre l'hypothèse de Gulland, selon laquelle des ponts d'hydrogène unissent les fonctions amine et énol de bases azotées voisines, plusieurs auteurs ont été conduits à admettre, après passage en milieu acide ou alcalin, l'apparition de fonctions acides phosphoriques primaires et secondaires (CAVALIERI ET ANGELOS<sup>3</sup>; LEE ET PEACOCKE<sup>4</sup>) et aussi de rares liens phosphoesters labiles sur C<sub>1</sub> (LI, OVEREND ET STACEY<sup>5</sup>; OVEREND, STACEY ET WEBB<sup>6</sup>). Ajoutons qu'il semble y avoir plus d'un type de telles liaisons labiles, les unes plus sensibles aux acides, les autres plus sensibles aux bases: les courbes d'électrotitration en retour sont différentes selon que l'on vient de pH 2 ou 12 (LEE ET PEACOCKE<sup>4</sup>).

D'importantes anomalies du spectre ultraviolet des acides nucléiques fournissent, dans ce domaine, un autre moyen d'investigation. On sait que l'absorption U.V. des acides ribonucléiques (ARN) et désoxyribonucléiques en solution saline neutre est, de loin, inférieure à celle que l'on peut calculer par la sommation des spectres des constituants (MAGAZANIK ET CHARGAFF<sup>7</sup>; THOMAS<sup>8,9</sup>; CAVALIERI<sup>10</sup>). L'hydrolyse enzymatique (ARN et ADN: TSUBOI<sup>11</sup>; ADN: KUNITZ<sup>12</sup>; LITTLE ET BUTLER<sup>13</sup>; ARN: MAGAZANIK ET CHARGAFF<sup>7</sup>), alcaline (ARN et ARN: TSUBOI<sup>11</sup>; ARN: MAGAZANIK ET CHARGAFF<sup>7</sup>) ou acide (ARN et ADN: TSUBOI<sup>11</sup>; ADN: THOMAS<sup>9</sup>) donne lieu à un accroissement de l'absorption, qui peut atteindre la valeur calculée (hydrolyse alcaline de l'ARN: MAGAZANIK ET CHARGAFF<sup>7</sup>; hydrolyse acide ménagée des ADN: THOMAS<sup>9</sup>). Cet accroissement, dans le cas des ADN du moins, n'est cependant pas lié étroitement à la dépolymérisation des chaînes polynucléotidiques. En effet, on peut — sans cependant atteindre quantitativement la valeur calculée — obtenir des accroissements massifs et irréversibles de l'absorption U.V. des ADN par des traitements qui sont certainement sans action sur la liaison phosphoester principale entre nucléotides: élévation de la température (KURNICK<sup>14</sup>; THOMAS<sup>8,9,15</sup>), abaissement (THOMAS<sup>8,9,15</sup>; CAVALIERI<sup>10</sup>) ou

\* Aspirant du Fonds National de la Recherche Scientifique.

élévation (FRICK<sup>16</sup>; SHACK ET THOMPSETT<sup>17</sup>) du pH, abaissement de la concentration en sels (THOMAS<sup>15</sup>).

KURNICK a, d'autre part, observé des variations massives de l'affinité des ADN pour certains colorants basiques (chute de l'affinité pour le vert de méthyle, accroissement de la pyroninophilie) après chauffage de la solution d'acide nucléique. La dialyse, en présence de mélange d'Unna, (vert de méthyle — pyronine) de solutions d'ADN diversement traitées préalablement, permet de constater que ces variations s'observent dans des conditions analogues à celles de l'absorption U.V. (THOMAS<sup>18</sup>).

Nous désignerons ici par *dénaturation* les modifications de la molécule d'ADN responsables des variations irréversibles de propriétés physiques et chimiques qui se produisent dans des conditions où les chaînes polynucléotidiques sont considérées comme stables.

## II. PARTIE EXPÉRIMENTALE

### A. Matériel et techniques

ADN (*nucléate de sodium*) isolé à partir de diverses sources (thymus de veau; testicules de grenouille rousse, *Rana Temporaria*; testicules d'étoile de mer, *Asterias Glacialis*), selon les techniques de MIRSKY ET POLLISTER<sup>19</sup> et de SEVAG<sup>20</sup>. Le produit final est simplement séché à l'air après lavage à l'alcool et à l'éther. Il contient ainsi jusqu'à 30% d'eau.

*Solutions-stock d'ADN.* Des fibres d'ADN sont additionnées de la quantité d'eau bidistillée (A) ou de NaCl  $10^{-2} M$  (B) nécessaire pour obtenir une solution à 1 mg/ml. L'ADN, n'ayant pas été dialysé, contient suffisamment de NaCl pour que la teneur en NaCl de la solution concentrée (A) dans l'eau bidistillée soit voisine de  $10^{-3} M$ . Les solutions A et B, après égale dilution par une solution de NaCl  $10^{-2} M$ , donnent le même spectre; elles se conservent au moins 15 jours à la glacière sans que l'on observe de variation de ce spectre.

*Mesures spectrophotométriques;* spectrophotomètre Beckman, modèle DU, cuves de silice de 1 cm.

*Mesures de pH:* pHmètre Beckman.

### Effet de la concentration saline sur le spectre U.V.

Des aliquotes de solution-stock d'ADN sont prélevés à la micropipette à constriction (volume en général de l'ordre de 200  $\mu l$ ; précision:  $\pm 0.2 \mu l$ ) et ajoutés à des prises de 5 ml de solutions salines de concentration décroissante. La solution-stock A étant  $10^{-3} M$  en NaCl, la concentration minimum en NaCl, obtenue en diluant 200  $\mu l$  de solution A dans 5 ml d'eau bidistillée, sera  $10^{-4.4} M$ . Ces essais donnent la courbe de la variation des densités optiques au cours de la dilution des sels. La courbe en retour s'obtient par l'addition (microseringue "Agla") lente, avec agitation, de solutions salines suffisamment concentrées (NaCl 1 M; MgSO<sub>4</sub>  $10^{-2} M$ , par exemple) pour que la correction de volume, qui a du reste toujours été opérée, soit généralement inférieure à 2%.

### Effet de l'abaissement du pH sur le spectre U.V.

Aux solutions diluées d'ADN, préparées comme précédemment, on ajoute lentement, à la microseringue "Agla", avec agitation, une solution d'acide chlorhydrique de la concentration voulue. La neutralisation éventuelle est obtenue par l'addition de NaOH. Les densités optiques et le pH sont suivis sur des portions distinctes des solutions d'ADN.

### Effet de la température sur le spectre U.V.

Des solutions diluées d'ADN sont préparées comme précédemment dans des tubes à essais. Les tubes sont coiffés d'une bille de verre (chauffée préalablement pour éviter la condensation) et mis au thermostat à la température voulue. Il a été vérifié par spectrophotométrie qu'un chauffage, même prolongé, n'entraîne dans ces conditions aucune variation de volume du contenu des tubes.

## B. RÉSULTATS

### Effets irréversibles de l'abaissement de la concentration saline sur le spectre U.V.

Si l'on dilue des aliquotes d'une solution concentrée d'ADN dans des volumes égaux

de solutions salines de concentration décroissante, l'absorption U.V., très stable au dessus d'une certaine concentration saline, s'accroît irréversiblement en dessous de cette concentration (Figs. 1, 2 et 3). Les valeurs de la densité optique paraissent indépendantes du temps et sont atteintes dès la première lecture, soit moins de 1 minute après la dilution. Aux très faibles forces ioniques, la densité optique est souvent peu reproductible.

L'addition de sels aux solutions qui ont subi un tel accroissement d'absorption déprime la densité optique, mais sans jamais lui rendre sa valeur initiale.

Nous appellerons ici ces phénomènes irréversibles "dénaturation partielle par dilution". Une série d'ions métalliques ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Ba}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+2}$ , etc.) ont été utilisés pour ces essais. La comparaison des Figs. 2 et 3, concernant respectivement les ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Mg}^{+2}$ , illustre le fait que les cations bivalents sont actifs à des concentrations beaucoup plus basses que ne le sont les ions  $\text{Na}^+$ . Un effet des ions métalliques sur le spectre U.V. des ADN a été étudié antérieurement (CAVALIERI<sup>10</sup>; SHACK, JENKINS ET THOMPSETT<sup>21</sup>) mais l'irréversibilité n'a pas été observée à notre connaissance.

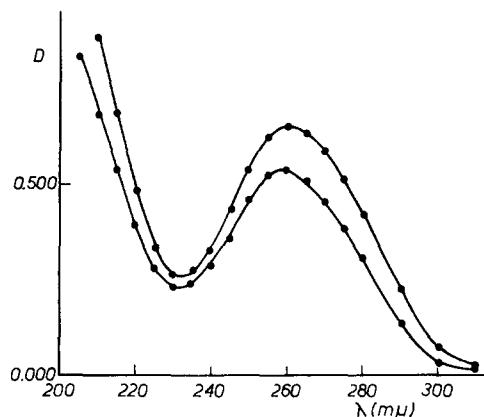


Fig. 1. ADN de testicules d'étoile de mer. Accroissement de l'absorption UV par diminution de la concentration en sels: (a)  $\text{NaCl } 10^{-2} \text{ M}$ ; (B)  $\text{NaCl } 10^{-4.4} \text{ M}$ .

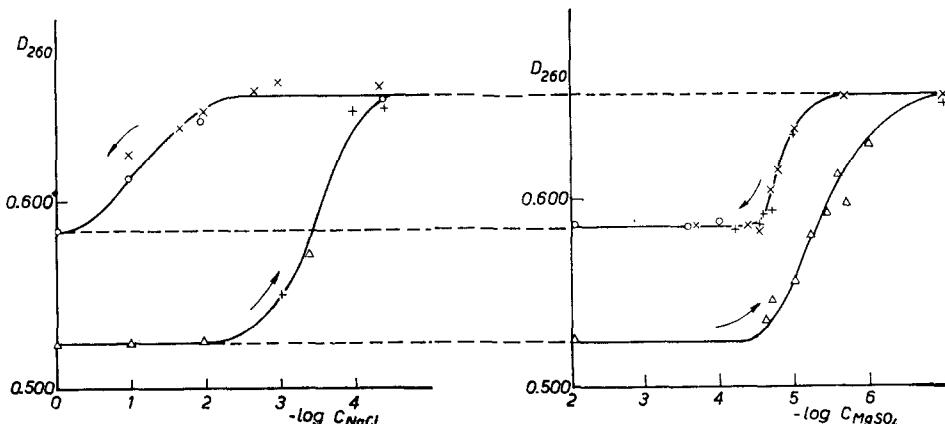


Fig. 2 et 3. ADN de testicules d'étoile de mer. Variation irréversible de  $D_{260}$  par abaissement, suivi d'accroissement, de la concentration en sels.

Comme nous le verrons plus loin, les ions métalliques exercent un effet protecteur vis-à-vis de la dénaturation acide, ce qui suggère une compétition entre ces ions et les ions  $\text{H}^+$  pour certains sites négatifs de la molécule d'ADN. Il n'est pas exclu que la dénaturation partielle par dilution ne soit qu'un cas particulier de cette compétition et ne soit donc due, en dernier ressort, aux ions  $\text{H}^+$ .

### Effets irréversibles de l'abaissement du pH sur le spectre U.V.

Comme il a été signalé antérieurement (THOMAS<sup>8,9,15</sup>), l'abaissement du pH d'une solution d'ADN sous une certaine valeur entraîne un accroissement massif et irréversible de l'absorption U.V. (Figs. 4 et 5). Les valeurs de la densité optique correspondant à un pH donné sont identiques au moment de la première lecture (moins de 1 minute après l'addition de l'acide) et 24 heures après; il en est de même de la valeur obtenue après neutralisation.

La concentration saline influence fortement la sensibilité des ADN vis-à-vis de l'abaissement du pH. Les courbes a, b, c, d de la Fig. 5 montrent l'accroissement de la densité optique à 260 m $\mu$  ( $D_{260}$ ) au cours de l'abaissement du pH d'une solution d'ADN de thymus de veau pour 4 concentrations de NaCl ( $10^{-4.4} M$ ;  $10^{-2} M$ ;  $10^{-1.3} M$ ;  $1 M$ ). Il faut remarquer que la courbe a, avant tout abaissement du pH, part d'une densité optique plus élevée: ceci est dû à la dénaturation partielle par dilution (voir plus

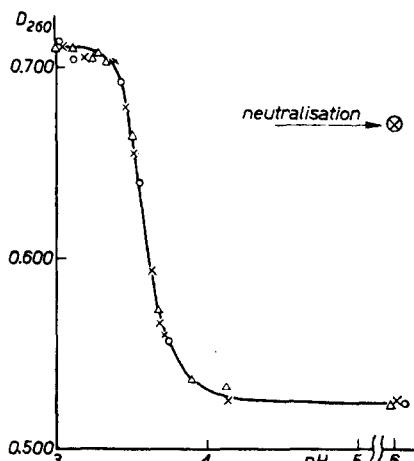


Fig. 4. ADN de testicules de grenoble dans NaCl  $10^{-2} M$ . Accroissement de  $D_{260}$  au cours de l'abaissement du pH.

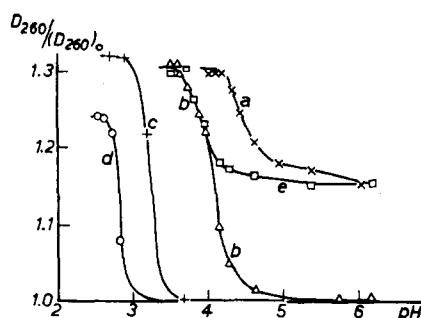


Fig. 5. ADN de thymus de veau. Variation de  $D_{260}$  au cours de l'abaissement du pH: a. dans NaCl  $10^{-4.4} M$ ; b. dans NaCl  $10^{-2} M$ ; c. dans NaCl  $10^{-1.3} M$ ; d. dans NaCl  $1 M$ ; e. ADN partiellement dénaturné par dilution (NaCl  $10^{-4.4} M$ ), puis rendu  $10^{-2} M$  en NaCl avant d'être acidifié. ( $D_{260}^0 = D_{260}$  d'une solution saline non dénaturnée).

haut:  $C_{\text{NaCl}} = 10^{-4.4} M$ ). On pourrait supposer que le décalage entre les courbes a et b (pH de demi-variation du spectre, respectivement de 4.5 et de 4.1) résulte d'une sensibilisation de la molécule, due à la dénaturation partielle par dilution. En fait c'est la concentration saline au moment de l'action acide qui intervient: si après dénaturation partielle par dilution on rajuste la concentration en NaCl à  $10^{-2} M$ , la variation de  $D_{260}$  en fonction du pH suit la courbe e de la Fig. 5 au lieu de la courbe a. Les ions bivalents ( $Mg^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ) produisent le même effet protecteur à des concentrations beaucoup plus faibles\*.

L'effet protecteur des sels suggère une compétition entre les ions métalliques et les ions  $H^+$  pour les sites électronégatifs de la molécule d'ADN.

\* Il semble que la courbe a de la Fig. 5 (ADN partiellement dénaturné par dilution) puisse être rapprochée de la courbe A (Fig. 1) de CAVALIERI<sup>10</sup> tandis que la courbe B de cet auteur, obtenue en présence de  $Mg^{2+}$ , serait celle que nous aurions en suivant l'effet du pH sur une solution préalablement soumise au traitement de la Fig. 3 (dénaturation partielle par dilution suivie de réversion maximum du spectre par addition d'ions  $Mg^{2+}$ ).

*Effets irréversibles de la température sur le spectre U.V.*

La dénaturation thermique des ADN se caractérise essentiellement :

1. par des coefficients thermiques très élevés.

Aucune étude cinétique systématique n'a été réalisée; la Fig. 6, permet cependant de constater la variation rapide, en fonction de la température, de la vitesse de dénaturation thermique.

2. par l'existence de deux stades distincts.

L'effet d'une durée constante (1 heure, par exemple: Figs. 7, 8, et 9) de chauffage à des températures croissantes se traduit, dans la représentation graphique de la densité optique en fonction de la température, par l'existence de zones horizontales. La première correspond à l'ADN non dénaturé, la seconde, à un premier stade, la troisième, à un second stade de la dénaturation. Ces zones horizontales sont séparées par deux sauts brusques de la densité optique, correspondant aux

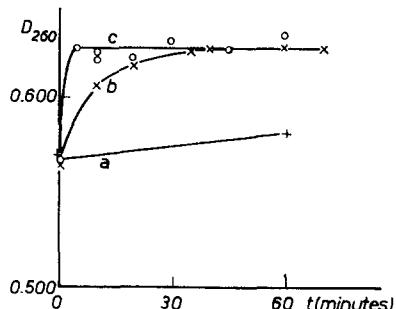


Fig. 6. ADN de testicules de grenouille dans  $\text{NaCl } 10^{-2} M$ . Accroissement de  $D_{260}$  en fonction de la durée de chauffage: (a) à  $70^\circ$ ; (b) à  $75^\circ$ ; (c) à  $77.5^\circ$ .

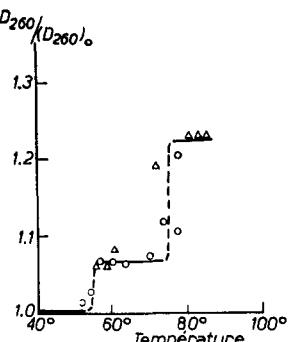
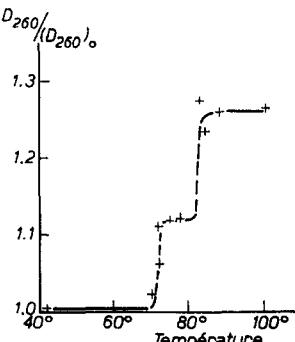
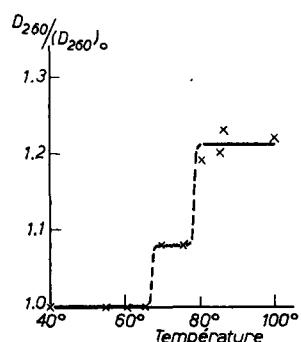


Fig. 7, 8 et 9. ADN de thymus de veau (Fig. 7), de testicules de grenouille (Fig. 8) et de testicules d'étoile de mer (Fig. 9) dans  $\text{NaCl } 10^{-2} M$ . Effet d'un chauffage d'une heure sur  $D_{260}$ ;  $(D_{260})_0 = D_{260}$  d'une solution saline non dénaturée.

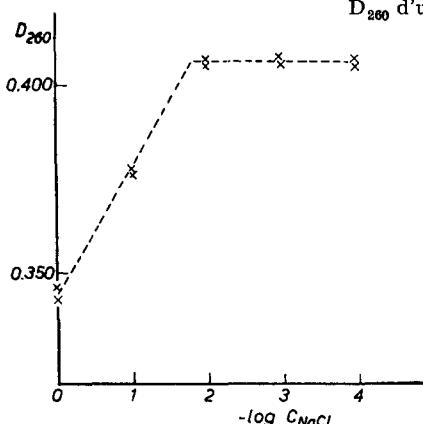


Fig. 10. ADN de thymus de veau.  $D_{260}$  après chauffage d'une heure à  $100^\circ$ , en fonction de la concentration en  $\text{NaCl}$ .

étroits domaines de température où la réaction cesse d'être extrêmement lente, mais nécessite une durée supérieure au temps de chauffage utilisé. Au niveau de ces deux températures critiques on observe une certaine dispersion des résultats, due au fait que les vitesses de dénaturation y sont très sensibles aux moindres variations de température.

On remarquera que les températures critiques de dénaturation varient selon l'origine de l'ADN (Figs. 7, 8 et 9). Le premier et le second stade s'observent respectivement, dans  $\text{NaCl } 10^{-2} M$ , pour l'ADN de testicules d'étoile de mer, autour de  $55^\circ$  et de  $75^\circ$ , pour les ADN de thymus de veau et de testicules de grenouille, autour de  $70^\circ$  et de  $80^\circ$ .

Une fois de plus, la concentration saline joue un rôle essentiel dans la sensibilité des ADN à la température. La Fig. 10 montre, en fonction de la concentration en NaCl, l'accroissement de  $D_{260}$  après une heure de chauffage à 100°. D'autre part, aux faibles concentrations salines, ( $\text{NaCl} < 10^{-3} M$ ) on observe des variations du spectre à des températures beaucoup plus basses. C'est ainsi que nous avons signalé (THOMAS<sup>8,9</sup>) un accroissement irréversible, dans le cas de l'ADN de testicules d'étoile de mer, dès 35° à 40° dans  $\text{NaCl } 10^{-4.4} M$ . Ce phénomène pourrait être dû, soit au manque de protection résultant de l'absence de sels, soit à une sensibilisation résultant de la rupture préalable de certaines liaisons au cours de la dénaturation partielle par dilution. Nous avons vu plus haut qu'aux très faibles concentrations salines les valeurs de  $D_{260}$  sont peu reproductibles; il en est de même des variations de  $D_{260}$  à basse température à ces concentrations.

### III. DISCUSSION

#### a. Structure des ADN

Les coefficients d'extinction molaires moyens par nucléotide ont été déterminés, d'une part par mesure directe du coefficient d'extinction par atome-gramme de phosphore

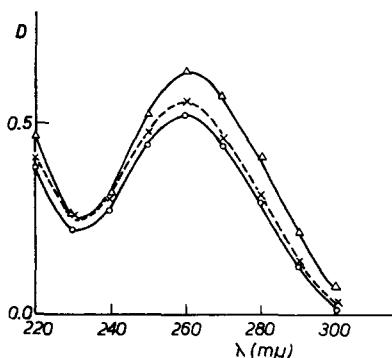


Fig. 11. ADN de thymus de veau:  
 ● ADN intact; △ ADN dénatré par dilution (dans  $\text{NaCl } 10^{-4.4} M$ );  
 × courbe calculée en supposant que  $\Delta D_{230}$  est dû à un accroissement de la diffusion.

( $\epsilon_p$ : CHARGAFF<sup>22</sup>) d'une solution d'ADN dans  $\text{NaCl } 10^{-2} M$ , d'autre part par calcul\* (voir THOMAS<sup>9</sup>, Fig. 1). La différence entre les valeurs expérimentale et calculée est comblée quantitativement par une hydrolyse acide ménagée de 10 minutes à 100° dans  $\text{HCl N}^{**}$  (voir THOMAS<sup>9</sup>, Fig. 2) qui fournit l'adénine et la guanine à l'état de bases libres et les pyrimidines combinées à l'état d'acide thymique. Les accroissements de densité optique produits par simple dénaturation, quoique massifs, ne suffisent pas à reproduire quantitativement les valeurs calculées de l'absorption U.V. Il est possible que l'accroissement final, lors de l'hydrolyse proprement dite, soit lié à la chute de la masse moléculaire. En revanche, l'accroissement d'absorption observé au cours de la dénaturation ne peut résulter de simples variations de la masse des particules (aggrégation, qui accroîtrait la diffusion de la lumière, ou désaggrégation). Nous donnons, à titre d'indication (Fig. 11) les spectres comparés de solutions d'ADN "intact" et dénatré par dilution, ainsi que la courbe obtenue en admettant que l'accroissement de  $D_{230}$  est dû à une augmentation de la diffusion de la lumière: on voit que cette hypothèse ne rendrait pas compte de l'accroissement de la densité optique aux autres longueurs d'onde.

\* Valeurs adoptées pour les proportions des bases azotées: adénine, 0.29; guanine, 0.23; cytosine, 0.22; thymine, 0.26. Coefficients d'extinction molaires des constituants, à pH 7: Adénosine (HOTCHKISS<sup>23</sup>); désoxyguanosine (*id.*); cytidine (forme du spectre, HOTCHKISS<sup>23</sup>;  $\epsilon_{\text{max}}$ , PLOESER ET LORING<sup>24</sup>); thymidine (forme du spectre, HOTCHKISS<sup>23</sup>;  $\epsilon_{\text{max}}$  utilisé: 9200 pour pH 7 et 265 mμ).

\*\* Coefficients d'extinction molaires en milieu acide: Adénine (HOTCHKISS<sup>23</sup>); guanine (forme du spectre, HOTCHKISS<sup>23</sup>;  $\epsilon_{\text{max}}$ , KERR, SERAIDARIAN ET WARGON<sup>25</sup>); désoxycytidine et thymidine, FOX ET SHUGAR<sup>26</sup>.

Une désaggrégation\* massive est, d'autre part, rendue peu vraisemblable par des mesures de masse moléculaire après acidification (CECIL ET OGSTON<sup>27</sup>; BUNCE<sup>28</sup>). Quant à une réelle dépolymérisation\* des chaînes polynucléotidiques on peut difficilement s'y attendre dans les conditions que nous avons utilisées; rappelons la variation immédiate du spectre par simple élévation du pH à 12 (FRICK<sup>29,16</sup>) alors que la stabilité du lien principal entre nucléotides est telle que l'ADN reste précipitable en milieu acide, même après une heure à 100° dans NaOH 1 M.

On se trouve donc, vraisemblablement, devant un remaniement essentiellement intramoléculaire. Comme il a été rappelé dans l'introduction, d'autres variations irréversibles des propriétés des ADN ont été interprétées comme le résultat de la rupture de liaisons secondaires. C'est ainsi que les mêmes variations du pH entraînent l'apparition de nouvelles fonctions titrables et l'accroissement de l'absorption; on serait, dès lors, tenté d'interpréter les deux phénomènes par la destruction des mêmes liaisons. En réalité, la situation est plus complexe: LALAND, OVEREND ET STACEY<sup>30</sup> ont pu réduire sensiblement la différence entre les courbes d'électrotitration directe et en retour par une irradiation ultrasonique, sans modification du spectre ultraviolet. Il semble donc que les interactions dont résultent les anomalies de l'électrotitration d'une part, du spectre U.V. d'autre part, soient distinctes; les unes et les autres sont sensibles aux variations du pH alors que les premières peuvent être détruites sélectivement par les ultrasons.

On peut tenter de localiser les interactions responsables des anomalies du spectre U.V. en se guidant sur les facteurs susceptibles de modifier le spectre des bases libres et de leurs dérivés. On constate alors que seules affectent massivement le spectre des modifications portant directement sur les cycles azotés (discussion, THOMAS<sup>9</sup>). En fait diverses hypothèses font intervenir les cycles azotés dans les liaisons labiles des ADN; ces hypothèses ne s'excluent d'ailleurs pas nécessairement l'une l'autre, puisque divers arguments font supposer qu'il doit exister plusieurs types de telles liaisons. CAVALIERI<sup>10</sup> admet la possibilité de complexes chélatés d'ions métalliques avec une fonction amine de base et une fonction acide phosphorique, ce qui justifierait en même temps l'intervention des ions métalliques dans les phénomènes de dénaturation\*\*. Nous avons d'autre part (THOMAS<sup>9</sup>) proposé une interprétation des anomalies du spectre U.V., basée sur l'idée d'un ordre local à caractère cristallin, résultant des interactions entre les cycles puriques et pyrimidiques empilés à une faible distance. Des vues analogues ont été émises par SCHWANDER ET SIGNER<sup>31</sup> et par FRICK<sup>16</sup>. Enfin les travaux récents par diffraction des rayons X (WATSON ET CRICK<sup>32</sup>; WILKINS, STOKES ET WILSON<sup>32</sup>; FRANKLIN ET GOSLING<sup>32</sup>) font croire à l'existence de ponts d'hydrogène entre les bases azotées de deux hélices polynucléotidiques complémentaires.

A l'échelle de la macromolécule, et indépendamment de la nature exacte des liaisons labiles, on peut supposer que la dénaturation consiste en l'écroulement d'une structure secondaire ordonnée, transformant, par exemple, la paire d'hélices polynucléotidiques en pelote statistique. S'il en est bien ainsi, la chute de l'affinité pour le vert de méthyle

\* Désaggrégation sera utilisé ici dans le sens d'une chute de la masse des particules par rupture de liaisons secondaires, dépolymérisation, dans le cas où des liaisons phosphoesters sont attaquées.

\*\* L'existence réelle de complexes de ce type nous paraît ressortir du fait que l'adénosine-5'-phosphate, dont la fonction amine et le groupement acide phosphorique sont du même côté du plan du ribofuranose, forment un complexe avec le cuivre, alors que les isomères 2' et 3' dont la situation stérique est inverse, ne forment pas de tel complexe. Dans le cas des acides nucléiques pourraient intervenir la fonction amine d'un nucléotide et la fonction acide phosphorique d'un autre.

(qui, comme l'a fait remarquer KURNICK, doit probablement son comportement exceptionnel vis-à-vis des ADN à ses deux fonctions cationiques) peut résulter de la perte d'un espacement régulier et approprié des fonctions acides phosphoriques.

### b. Aspects biologiques

Le rôle des ADN dans la transmission des caractères héréditaires a été suggéré d'abord par leur localisation dans les chromosomes. Les phénomènes de transformation des bactéries par des ADN purifiés à partir d'autres souches laissent aujourd'hui peu de doute quant au bien-fondé de ces hypothèses.

On peut se demander si l'activité biologiques des ADN n'est pas liée, comme celle de beaucoup de protéines, à l'intégrité de leur structure secondaire (THOMAS<sup>8, 34, 9</sup>). Un important travail de ZAMENHOF<sup>35</sup> et ses collaborateurs semble prouver qu'il en est bien ainsi: ces auteurs ont montré qu'il est possible d'inactiver les facteurs transformants des bactéries sous l'action du pH, de la température et de l'abaissement de la concentration en sels, dans des conditions semblables à celles où se produisent les variations du spectre U.V.\*. Des substances connues pour dénaturer les protéines ne paraissent pas exercer de profonde modification *intramoléculaire* sur les ADN. C'est ainsi que le phénol n'inactive pas les facteurs transformants (ZAMENHOF<sup>35</sup>) et que l'urée est sans action sur le spectre U.V. (THOMAS<sup>15</sup>). Il serait cependant utile, comme nous l'a suggéré P. ALEXANDER, d'examiner *après dialyse* (contre une solution saline) le spectre U.V. de l'ADN traité par l'urée.

Nous avons décrit plus haut des différences dans la résistance à la dénaturation, selon l'organisme dont l'ADN provient; de telles différences avaient déjà été signalées en ce qui concerne la chute de la viscosité en fonction du pH (ZAMENHOF ET CHARGAFF<sup>2</sup>). BRACHET<sup>36, 37, 38</sup> a attribué l'arrêt du développement embryonnaire (métazoaires) ou de la multiplication (microorganismes) par des chocs thermiques, à l'inactivation des granules ribonucléoprotéiques du cytoplasme et à des altérations chromosomiales. On peut se demander jusqu'à quel point ces effets sur les constituants cellulaires sont explicables par une dénaturation de leurs acides nucléiques, et dans quelle mesure les températures critiques dépendent de l'acide nucléique lui-même d'une part, des cations présents d'autre part.

Comme l'a montré BRACHET<sup>39</sup>, il est possible de distinguer, sur coupes histologiques, les ARN des ADN en utilisant la coloration d'Unna (le vert de méthyle se fixant sur l'ADN, la pyronine, sur l'ARN) combinée à l'emploi de la ribonucléase, qui permet de contrôler la part des colorations due à l'ARN. Les modifications de la colorabilité des ADN dues à la dénaturation pouvaient, dans ce domaine, poser des problèmes nouveaux. En fait (THOMAS<sup>18</sup>) des conditions d'acidité suffisantes pour rendre l'ADN, en solution, pyroninophile ne modifient pas la colorabilité de l'ADN en phase solide (goutte de solution d'ADN évaporée sur une lame de microscope; coupe histologique); ceci permet de comprendre que les fixateurs usuels n'altèrent pas la colorabilité de l'ADN par l'Unna. Certaines observations, cependant, peuvent faire supposer que l'ADN existe, dans certaines circonstances de la vie cellulaire, en partie dans un état analogue à celui des formes dénaturées; c'est, par exemple, ce que suggère le fait que les différents articles du chapelet de noyaux d'un infusoire (*Stentor*) se colorent inégalement au vert de

\* Des mécanismes autres que la dénaturation peuvent évidemment intervenir; c'est ainsi que les ions  $Fe^{+2}$  inactivent les facteurs transformants, probablement à la suite de phénomènes d'oxydoréduction (ZAMENHOF).

méthyle, mais non au Feulgen (WEISZ<sup>40</sup>). Un tel constituant normal de la cellule, apparenté aux ADN dénaturés, pourrait être une étape de la synthèse ou du catabolisme de l'ADN.

L'examen des variations du spectre U.V. d'un ADN pourrait fournir une méthode de détermination du degré d'intégrité de l'acide nucléique. Combinée aux techniques de séparation sur colonne d'histone (BROWN ET WATSON<sup>41</sup>) qui distinguent l'ADN présumé intact de l'ADN dénaturé, cette méthode pourrait être utilisée à l'analyse des effets dénaturants des techniques d'isolement des ADN et à l'étude des éventuels constituants normaux de la cellule, apparentés aux ADN dénaturés.

### RÉSUMÉ

L'absorption ultra-violette des acide desoxyribonucléiques (ADN) en solution saline neutre est de loin inférieure à celle que l'on peut calculer par la sommation des absorptions de leurs constituants. Le spectre observé s'approche du spectre calculé sous l'action de traitements doux (changements du pH, de la température, ou de la force ionique) qui sont probablement sans action sur les liaisons phosphoester. Les rapports de ces phénomènes avec la structure chimique et les propriétés biologiques des ADN sont discutés. Les résultats sont interprétés comme résultant d'une dénaturation des ADN, c'est-à-dire de la destruction d'une structure secondaire de liaisons labiles impliquant les cycles puriques et pyrimidiques.

### SUMMARY

The ultraviolet absorption of desoxyribonucleic acids (DNA) in neutral saline solution is much less than that expected from the sum of the absorptions of its constituents. The observed spectrum can be made to approach the calculated one by applying mild treatments which are presumably without action on phosphoester linkages (pH, temperature and salt concentration changes). The incidence of these facts on the questions of the chemical structure and biological properties of DNA is discussed. The results are interpreted as reflecting a denaturation of the DNA, *i.e.* the destruction of a secondary molecular structure constituted by labile bounds involving the puric and pyrimidic rings.

### ZUSAMMENFASSUNG

Die Ultraviolettabsorption von Desoxyribonucleinsäuren (DNS) in neutralen Salzlösungen ist weitaus geringer als die sich aus der Absorption der Bestandteile errechnende Summe. Nach milder Behandlung (Änderung des pH's, der Temperatur oder der Salzkonzentration), die wahrscheinlich ohne Wirkung auf die Phosphoesterbindung ist, nähert sich das beobachtete Spektrum dem berechneten. Der Einfluss dieser Erscheinungen auf die Frage der chemischen Struktur und die biologischen Eigenschaften der DNA werden besprochen. Die Resultate werden als ein Ergebnis einer Denaturierung der DNA interpretiert, d.h. einem Abbau einer sekundären Molekülstruktur von labilen Bindungen mit Purin und Pyrimidinringen.

### BIBLIOGRAPHIE

- 1 J. M. GULLAND, D. O. JORDAN ET H. F. W. TAYLOR, *J. Chem. Soc.*, (1947) 1131.
- 2 S. ZAMENHOF ET E. CHARGAFF, *J. Biol. Chem.*, 186 (1950) 207.
- 3 L. F. CAVALIERI ET A. ANGELOS, *J. Am. Chem. Soc.*, 72 (1950) 4686.
- 4 W. A. LEE ET A. R. PEACOCKE, *J. Chem. Soc.*, (1951) 3361.
- 5 C. F. LI, W. G. OVEREND ET M. STACEY, *Nature*, 163 (1949) 538.
- 6 W. G. OVEREND, M. STACEY ET M. WEBB, *J. Chem. Soc.*, (1951) 2450.
- 7 B. MAGAZANIK ET E. CHARGAFF, *Biochim. Biophys. Acta*, 7 (1951) 396.
- 8 R. THOMAS, *Experientia*, 7 (1951) 261.
- 9 R. THOMAS, *Bull. soc. chim. biol.*, 35 (1953) 609.
- 10 L. F. CAVALIERI, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 1242.
- 11 K. K. TSUBOI, *Biochim. Biophys. Acta*, 6 (1950) 202.

- 12 M. KUNITZ, *J. Gen. Physiol.*, 33 (1950) 349.
- 13 J. A. LITTLE ET C. G. BUTLER, *J. Biol. Chem.*, 188 (1951) 695.
- 14 N. B. KURNICK, *Arch. Biochem.*, 29 (1950) 41.
- 15 R. THOMAS, *Trans. Faraday Soc.*, Mars 1954 (sous presse).
- 16 G. FRICK, *Biochim. Biophys. Acta*, 8 (1952) 625.
- 17 J. SHACK ET J. M. THOMPSETT, *J. Biol. Chem.*, 197 (1952) 17.
- 18 R. THOMAS, *Arch. Internat. Physiol.*, 61 (1953) 270.
- 19 A. E. MIRSKY ET A. W. POLLISTER, *J. Gen. Physiol.*, 30 (1941) 117.
- 20 M. G. SEVAG, D. B. LACKMANN ET J. SMOLENS, *J. Biol. Chem.*, 124 (1938) 425.
- 21 J. SHACK, R. J. JENKINS ET J. M. THOMPSETT, *J. Biol. Chem.*, 203 (1953) 373.
- 22 E. CHARGAFF ET S. ZAMENHOF, *J. Biol. Chem.*, 173 (1948) 327.
- 23 R. D. HOTCHKISS, *J. Biol. Chem.*, 175 (1948) 315.
- 24 J. M. PLOESER ET H. S. LORING, *J. Biol. Chem.*, 178 (1949) 431.
- 25 S. E. KERR, K. SERAIDARIAN ET M. WARGON, *J. Biol. Chem.*, 181 (1949) 761.
- 26 J. J. FOX ET D. SHUGAR, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 369.
- 27 CECIL ET A. G. OGSTON, *J. Chem. Soc.*, (1948) 1382.
- 28 B. H. BUNCE (cité par E. PETERLIN, *Nature*, 171 (1953) 259).
- 29 G. FRICK, *Biochim. Biophys. Acta*, 3 (1949) 103.
- 30 S. G. LALAND, W. G. OVEREND ET M. STACEY, *J. Chem. Soc.*, (1952) 303.
- 31 H. SCHWANDER ET R. SIGNER, *Helv. Chim. Acta*, 34 (1951) 1344.
- 32 J. D. WATSON *et al.*, *Nature*, 171 (1953) 737.
- 33 N. B. KURNICK, *J. Gen. Physiol.*, 603 (1950) 243.
- 34 R. THOMAS, *Biochim. Biophys. Acta*, 8 (1952) 71.
- 35 S. ZAMENHOF, H. E. ALEXANDER ET G. LEIDY, *J. Exp. Med.*, 98 (1953) 373.
- 36 J. BRACHET, *J. Cyto-embryol. belgo-néérl.*, Gand, 1949.
- 37 J. BRACHET, *Ann. Soc. Roy. Zool. Belg.*, 81 (1950) 185.
- 38 J. BRACHET, *Le rôle des acides nucléiques dans la vie de la cellule et de l'embryon. Actualités bio-chimiques*, No. 16.
- 39 J. BRACHET, *Compt. rend. soc. biol.*, 133 (1940) 88.
- 40 P. B. WEISS, *J. Morphol.*, 87 (1950) 275.
- 41 G. L. BROWN ET M. WATSON, *Nature*, 172 (1953) 339.

Reçu le 22 janvier 1954