

INACTIVATION, PAR LES RAYONS X, D'UN FACTEUR TRANSFORMANT DU PNEUMOCOQUE

par

HARRIET EPHRUSSI-TAYLOR ET RAYMOND LATARJET

Laboratoire de Génétique de la Faculté des Sciences et du C.N.R.S. et

Laboratoire Pasteur de l'Institut du Radium, Paris, (France)

La détermination du poids moléculaire des acides désoxyribonucléiques se heurte à de grandes difficultés, du fait que les méthodes physiques habituellement employées ne lui sont pas applicables. Ceci tient à l'asymétrie de ces molécules hautement polymérisées, et à leur comportement anormal en solution, dû sans doute à de puissantes actions inter-moléculaires.

On peut, semble-t-il, tourner ces difficultés dans le cas particulier des agents transformants du pneumocoque (TP), dont l'identité paraît suffisamment bien établie pour les désigner comme des molécules d'ADN douées d'une activité biologique spécifique. Une irradiation appropriée inactive ces agents par des processus qui offrent l'avantage d'intéresser la molécule dans son état naturel, c'est à dire non perturbé par un traitement préalable. On doit alors pouvoir, par la méthode classique de radio-micrométrie statistique, déterminer un volume radiosensible dont on discutera l'identité avec la molécule elle-même.

Au moyen de deutérons de 3.8 mev et d'électrons de 2 mev, FLUKE, DREW ET POLLARD¹ ont effectué une première tentative dans ce sens, et conclu à un poids moléculaire d'environ $6 \cdot 10^6$. Mais leur technique paraît sujette à certaines critiques— dessication préalable du produit, suivie d'une redissolution; absence de titrations quantitatives des agents actifs; courbes d'inactivation imprécises—, sur lesquelles nous reviendrons plus loin, qui font souhaiter une confirmation de leur travail. Dans ce but, nous avons utilisé des rayons X, en nous efforçant de satisfaire aux conditions dans lesquelles le poids du volume mesuré se rapproche le plus du poids moléculaire vrai. Ce travail suggère que le TP a un poids moléculaire inférieur ou égal à $7.3 \cdot 10^5$.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Agent transformant. Parmi les divers agents transformants, nous avons choisi celui, TP Sr, qui confère au pneumocoque la résistance à 2 mg de streptomycine par cm^3 de milieu de culture environnant, sans induire la formation de bactéries à résistance intermédiaire. Ce choix fut dicté par le fait que cet agent peut être titré d'une façon rigoureusement quantitative. L'agent fut isolé à partir d'une souche de pneumocoque possédant l'aptitude héréditaire à proliférer en présence de cette énorme concentration de l'antibiotique. Cette souche nous a été procurée par HOTCHKISS qui fut le premier à

* Avec l'assistance technique de Mlle. A. MUNERAT et de Mr. P. MORENNE.

démontrer que certaines résistances de ce genre sont sous le contrôle d'agents transformants, localisés, comme l'agent capsulaire, dans l'ADN d'une bactérie². Selon des méthodes antérieurement décrites³, l'agent fut isolé sous forme de préparations d'ADN partiellement purifiées, à savoir débarrassées des protéines, des polysaccharides, et de la plus grande partie des acides ribonucléiques. Nous avons utilisé deux préparations distinctes dont les teneurs en ADN étaient respectivement 1.45 et 0.85 mg par ml.

A condition d'être suffisamment concentrée, une solution de l'agent en eau physiologique conserve son activité pendant des années. En revanche, les solutions diluées s'affaiblissent rapidement et perdent leur activité en quelques jours. Nous avons constaté qu'on stabilise parfaitement les solutions, même les plus diluées, en leur ajoutant, à des concentrations de 1 % ou plus, de l'extrait de levure Difco préalablement nettoyé par absorption sur charbon³. Cet extrait ne gêne pas les titrages d'activité biologique car il fait partie du milieu de culture utilisé pour les transformations.

Titrages de l'activité. Quand des pneumocoques sensibles à la streptomycine prolifèrent dans un milieu approprié en présence de l'ADN provenant de pneumocoques résistants, certaines bactéries acquièrent une résistance à l'antibiotique, identique à celle des bactéries qui ont fourni l'ADN. En l'occurrence ces bactéries transformées résistent à une concentration de $2 \cdot 10^{-3}$ de streptomycine. Dans les conditions décrites ci-dessous, le nombre des transformations est fonction linéaire de la quantité d'ADN ajoutée à la culture. La mesure de ce nombre, c'est à dire le titrage de l'activité, s'effectue comme suit:

1. La souche bactérienne détectrice, lignée R36A, sans capsule, est repiquée tous les jours par transfert de 0.2 ml de la culture précédente dans 5 ml de milieu de culture additionné de 0.1 ml de sang défibriné³. Après 4 heures d'incubation, la nouvelle culture, soit C, ayant atteint sa densité maximum, est prête à servir.

2. On prépare dans un flacon d'Erlenmeyer stérile la quantité désirée du mélange suivant (M)

— milieu pour transformation ³ :	100 ml
— solution stérile de sérum albumine de boeuf (Armour, fraction V) à 4 p. 100:	5 ml
— Culture bactérienne C diluée 100 fois:	2 ml

3. On prépare les "cultures à transformations" en mélangeant dans des petits tubes stériles (13 x 100 mm) 0.1 ml de la solution d'ADN à titrer, diluée ou non, et 2 ml du mélange. La quantité d'ADN est ici ajustée de façon à donner entre 100 et 500 transformations par culture. Ces cultures sont mises pendant 4 heures à l'étuve à 37°. Elles en sont ensuite retirées et refroidies dans un bain glacé.

4. Le contenu de chaque tube (assuré par un rinçage) est versé dans une boîte de Petri. On lui ajoute rapidement, et en mélangeant, environ 15 ml de milieu gélosé fondu à 50°³ contenant un peu de sang défibriné de cheval et 3 mg de streptomycine. A cette concentration ($2 \cdot 10^{-4}$), l'antibiotique sélectionne à coup sûr, exclusivement, et sans risque de les tuer, les bactéries transformées résistantes à une concentration 10 fois supérieure. Après 24 heures d'incubation à 37°, on dénombre les colonies résistantes. Les témoins, préparés de la même façon mais sans addition d'ADN, n'en présentent aucune.

Dans ces conditions et pour une culture détectrice donnée, le nombre des colonies résistantes ainsi obtenues est fonction linéaire de la quantité d'ADN tant que celle-ci ne dépasse pas 0.1 microgramme. (C'est à dire — probablement — tant qu'on évite toute compétition entre plusieurs unités de TP pour une même bactérie). Cette limite de la linéarité qui fut régulièrement contrôlée, dépend uniquement de la quantité d'ADN, et non du nombre d'unités actives, comme si les unités inactivées conservaient leur pouvoir d'interférence.

Pour une quantité donnée d'un ADN donné, le nombre des colonies résistantes varie d'un jour à l'autre, par suite de fluctuations incontrôlables du système détecteur. Ainsi, chacune de nos expériences a-t-elle comporté un étalonnage témoin de l'ADN, au cours duquel on vérifiait la linéarité de la titration. En moyenne, 0.1 ml de nos solutions stock d'ADN diluées $10^{5.5}$ fois, donnait 100 à 300 colonies résistantes.

Notons enfin que nos titrages ont tenu compte des instants où les bactéries acquièrent le TP, et où le nouveau phénotype s'exprime, au sein des "cultures à transformation". La réaction entre bactéries et TP a lieu pendant une période restreinte qui se situe entre 2 et 3 heures d'incubation. L'expression phénotypique de la transformation n'apparaît qu'une heure plus tard, ainsi qu'Hotchkiss l'a observé en d'autres circonstances².

Irradiations. Le TP a été irradié dans des cupules de plexiglass; 0.2 ml de la solution d'ADN

s'y étalaient en une couche circulaire de 16 mm de diamètre et d'épaisseur à peu près uniforme égale à 1 mm. Après l'irradiation, on prélevait 0.15 ml de l'échantillon et on procédait au titrage de l'activité résiduelle selon la technique ci-dessus décrite.

La source était une anti-cathode de molybdène débitant, sous 33 kV et 30 mA, un rayonnement filtré sur 0.05 mm d'aluminium, et dont la longueur d'onde moyenne était 0.9 Å. L'intensité du rayonnement au niveau de la préparation était contrôlée à $\pm 2\%$ près, et maintenue à 1 kiloroentgen par seconde. Par suite de la forte absorption de ce rayonnement dans la préparation, l'intensité moyenne *vraie* dans la solution était réduite à 0.9 kr/seconde. Dans la suite de cet exposé, toutes les doses indiquées représentent en roentgens les doses vraies reçues (soit, pour 1 r, une densité d'énergie absorbée de 93 ergs par gramme — 1.1 rep.).

Précision des résultats. Cette précision n'est pas limitée par la mesure des doses de rayons X, assurée à $\pm 2\%$ près, ni par les erreurs standard calculables commises sur l'échantillonnage des populations bactériennes, mais par les fluctuations statistiques du taux de transformation, et par les erreurs inhérentes aux manipulations. Nous nous sommes contentés de répéter les expériences, et de contrôler la reproductibilité des résultats. En fait, celle-ci s'est avérée très satisfaisante. (Voir Tableau III.)

IRRADIATION DU TP EN SOLUTION, EN PRÉSENCE D'AGENTS PROTECTEURS

On ne peut déterminer un volume moléculaire à partir d'une courbe d'inactivation, que si l'inactivation résulte d'un "effet direct", c'est à dire d'une réaction de type monomoléculaire consécutive à l'absorption de l'énergie radiante au sein même de la molécule considérée. A vrai dire, on évite difficilement que ne se produisent également des "effets indirects" de type bimoléculaire entre cette molécule et des éléments du milieu environnant (radicaux libres, molécules), activés par le rayonnement. La mesure du volume moléculaire exige que l'on minimise autant que possible l'importance relative de ces effets indirects, soit par dessication, soit, en solution, par l'addition de substances "protectrices" qui détournent sur elles les réactions des éléments activés du solvant, soit en opérant à l'étant solide après congélation, soit enfin, dans certains cas, en privant la solution de l'oxygène qu'elle contient.

La dessication, procédé utilisé par FLUKE *et al.*¹, nous a paru contre-indiquée dans le cas présent pour les raisons suivantes.

1. d'après McCARTY⁴ opérant sur un agent capsulaire du pneumocoque, et ZAMENHOF⁵ opérant sur un agent similaire de *Haemophilus influenzae*, la dessication totale entraîne *per se* une forte inactivation de l'agent — indépendante de l'irradiation. Inversement, en procédant à une dessication incomplète, on laisse subsister un effet indirect qui entraîne une sur-estimation incontrôlable du poids moléculaire mesuré. 2. Pour mesurer l'activité biologique des échantillons irradiés à l'état sec, il est nécessaire de les remettre en solution, et comme cette dissolution de l'ADN est très lente, FLUKE *et al.* ont dû vérifier que leur récupération était complète en mesurant l'absorption des solutions à 260 m μ . Or l'absorption UV des ADN hautement polymérisés est susceptible d'augmenter à la suite de traitements qui provoquent des changements de structure⁶. En pareil cas, la quantité récupérée est inférieure à celle que l'on déduit d'une absorption UV supposée constante. Ceci conduit à surestimer l'efficacité du rayonnement, donc le poids moléculaire recherché.

Substances organiques

C'est pourquoi nous avons préféré irradier le TP en solution aqueuse, en présence de substances protectrices. La première de celles-ci fut l'extrait de levure purifié sur charbon, déjà utilisé pour stabiliser les solutions diluées de TP, à des concentrations comprises entre 0.5 et 10%.

Sur la base de l'expérience acquise lors de multiples irradiations de bactériophages avec les rayons X⁷, nous pensons que l'extrait de levure adsorbé sur charbon donnerait une protection complète du TP à la concentration de 1 %. Il n'en est rien. Si l'on élève cette concentration jusqu'à 10 %, la protection augmente à tel point qu'on n'est pas assuré d'en avoir encore atteint la limite c'est à dire la protection totale contre les effets indirects (Fig. 1). Il n'était guère possible de dépasser cette concentration de 10 % qui approche la saturation de l'extrait. Mais sachant que l'adsorption sur charbon enlève à l'extrait environ 90 % de ses substances absorbant λ 2600 Å, on pouvait penser qu'un extrait non soumis à ce traitement sur charbon serait un protecteur plus efficace. Bien que cet extrait non adsorbé soit inhibiteur pour les transformations, nous avons pu effectuer les essais en prenant soin de diluer suffisamment les échantillons après l'irradiation et avant d'en mesurer l'activité restante. Les résultats alors obtenus sont superposables à ceux que donne l'extrait adsorbé.

Nous avons alors étudié la protection fournie par deux protéines: d'abord la sérum albumine de boeuf (fraction V d'Armour) à 4 %, qui s'est révélée, à poids égaux, moins efficace que l'extrait de levure; puis une catalase impure (crude catalase powder Armour), qui, à poids égaux, s'est montrée à peu près 2 fois plus efficace que l'extrait de levure, c'est à dire très active à condition d'utiliser des concentrations à la limite de la solubilité. Celle-ci (2.5 %) n'assure pas encore une protection maximum. Il est évident que l'action protectrice de cette catalase brute ne relève pas de son activité enzymatique, puisqu'à la concentration de 0.1 % aucune activité protectrice ne se manifeste.

Remarques

1. *Post-effet.* On connaît depuis peu la grande sensibilité des acides nucléiques et des particules qui en contiennent (virus, gènes) à l'égard du "post-effet" des radiations ionisantes, lorsque les irradiations sont pratiquées en milieux aqueux et en présence d'oxygène dissout⁸. Nous avons observé qu'en présence d'extrait de levure, même à 1 %, aucun post-effet des rayons X sur le TP ne se manifeste. Le taux d'inactivation, consécutif à une dose donnée, reste le même, qu'on le détermine dans les 30 minutes qui suivent l'irradiation ou plusieurs jours plus tard.

2. *Sensibilité du TP aux actions indirectes.* Il ressort des expériences précédentes que le TP dissout en milieu aqueux est remarquablement sensible à l'action indirecte des produits actifs de l'eau irradiée. Si, comme nous l'avons fait, on irradie parallèlement le TP et de petits bactériophages (phages anti-coli T1 et anti-dysentérique S-13), on con-

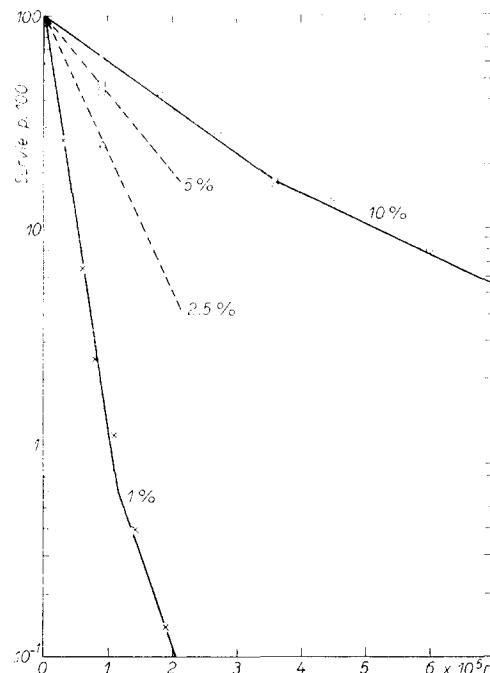


Fig. 1. Courbes d'inactivation du TP en solution à 10^{-3} dans des extraits de levure à 1 %, 2.5 %, 5 % et 10 %.

state que les phages sont totalement protégés par l'extrait de levure à 1%, tandis que le TP ne l'est peut-être pas encore par l'extrait à 10% (cf. Fig. 1 et 2). Le TP manifeste une "affinité" beaucoup plus grande que les phages pour les produits actifs de l'eau irradiée.

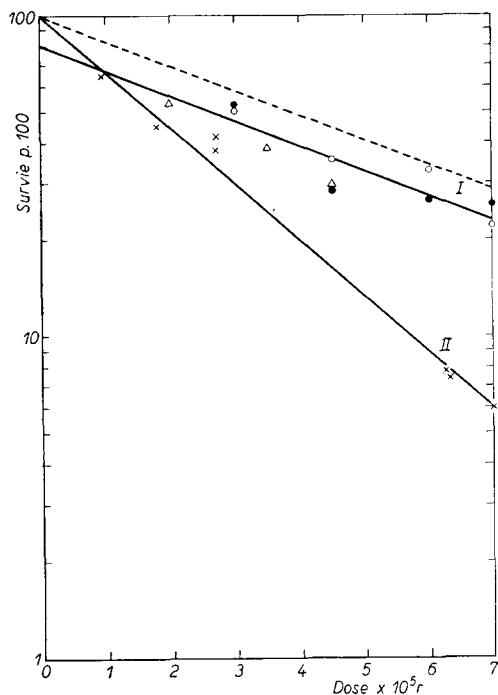


Fig. 2. Courbes d'inactivation par effet direct. I. du TP (en extrait de levure à 10% congelé) : ○ ● △ (en pointillés, la courbe corrigée); II. du bactériophage S-13: ×.

Auto-protection

Dans son travail initial, DALE⁹ a démontré, sur un enzyme, le phénomène d'auto-protection, reconnu depuis lors comme très général. Il est fondé sur le fait que les particules inactivées restent des accepteurs de radicaux libres, et protègent, en conséquence, les particules encore actives. La radio-résistance de la solution augmente avec la concentration en particules; lorsque celle-ci devient suffisamment élevée, on atteint une protection presque totale contre les effets indirects.

Les résultats ci-dessus décris laissent prévoir une forte protection du TP par soi-même. Les deux expériences suivantes le confirment (Tableau I).

Des données plus nombreuses de ce type pourraient être utilisées pour calculer, connaissant le poids moléculaire du TP, la probabilité d'inactivation d'une molécule de TP lors de sa rencontre avec un radical actif.

TABLEAU I
AUTO-PROTECTION DU TP CONTRE L'INACTIVATION PAR LES RAYONS X

Concentration d'ADN dans l'extrait de levure à 1% (γ par ml)	Survie p. 100 après une dose de 54 kr
430	96
140	58
43	25
14	18
4.3	22

Concentration d'ADN dans l'extrait de levure à 0.5% (γ par ml)	Survies p. 100 après les doses de (kr)			
	45	90	180	360
430	55	8.5	0.23	
220	20	1.7	0.20	
110		8	0.9	0.08
55	54	3.8	0.5	

Influence de l'oxygène

Pour savoir si l'absence d'oxygène modifie la radiosensibilité du TP en solution, nous avons procédé aux expériences suivantes: une solution de TP en extrait de levure est complètement dégazée par une succession de congélations à -60° suivies d'un lent réchauffement sous vide. Le dégazage final est vérifié par le fait qu'aucune ébullition ne se produit plus sous vide à la température ordinaire. Ce traitement modifie peu, et d'une quantité toujours mesurée (voir Tableau III) le titre de la solution en TP actif. On irradie alors dans les mêmes conditions a. l'échantillon dégazé maintenu sous vide; b. un échantillon semblable, soumis au même traitement, puis saturé d'air avant l'irradiation. Les trois expériences ainsi conduites ont donné les résultats suivants:

TABLEAU II
IRRADIATION DU TP EN PRÉSENCE ET EN ABSENCE D'OXYGÈNE

Extrait de levure	Dose kr	Survie p. 100	
		sans O_2	avec O_2
I	1 %	80	9.6
II	1 %	72	10.5
III	10 %	200	35
			32

Les protocoles des expériences 2 et 3 sont décrits en détails dans le Tableau III. Ils indiquent en particulier le degré de reproductibilité atteint dans les numérasions.

On voit que la radiosensibilité du TP est à peu près la même en absence et en présence d'oxygène. La même indifférence avait été déjà observée chez les bactériophages⁷, et il a été précisé depuis lors que leur inactivation directe et indirecte immédiate est insensible à la présence de l'oxygène (ALPER⁸).

TABLEAU III
IRRADIATION DU TP EN PRÉSENCE ET EN ABSENCE D'OXYGÈNE. PROTOCOLES DE 2 EXPÉRIENCES

- I. La solution originelle de TP, contenant 0.85 mg d'ADN par ml, est diluée 10³ fois dans l'extrait de levure.
- II. Conditions de traitement des divers échantillons. Le dégazage est effectué, comme il est indiqué dans le texte, par congélations et fusions répétées sous vide.
- III. Concentrations de l'ADN dans les cultures de transformation, par rapport à celle de la solution originelle.
- IV. Nombres de transformations dans chaque culture (3 cultures par échantillon).
- V. Pourcentages de survie (non inactivation) du TP.

I	II	III	IV			V
			1	3	moyenne	
Extrait à 1 %	Témoin non traité, non irradié	$0.5 \cdot 10^{-6.5}$	332	377	335	348
	Témoin dégazé, non irradié	$0.5 \cdot 10^{-6.5}$	286	376	375	340
	Dégazé, puis irradié à l'air	$0.5 \cdot 10^{-6}$	85	90	102	92
	Dégazé, puis irradié sous vide	$0.5 \cdot 10^{-6.5}$	24	22	35	27
Extrait à 10 %	Témoin non traité, non irradié	$0.5 \cdot 10^{-6.5}$	120	104	107	110
	Témoin dégazé, non irradié	$0.5 \cdot 10^{-6.5}$	45	35	37	39
	Dégazé, puis irradié à l'air	$0.5 \cdot 10^{-6.5}$	167	159	147	158
	Dégazé, puis irradié sous vide	$0.5 \cdot 10^{-6.5}$	177	147	191	172

Rappelons ici, pour préciser les idées, que sur les systèmes dont l'irradiation est sensible à l'oxygène, la présence de ce gaz équivaut à une réduction de la dose de rayons X dans un rapport de 3 à 3.5. Ceci signifie que pour obtenir le même effet en absence d'oxygène, il faut administrer une dose 3 à 3.5 fois plus grande. Dans le cas du TP, cette réduction de dose varie, d'après les trois expériences précédentes, de 1 à 1.2.

IRRADIATION DE LA SOLUTION CONGELÉE ET CALCUL DU POIDS MOLÉCULAIRE

En ce qui concerne notre recherche des conditions d'effet direct nécessaires pour calculer le poids moléculaire du TP à partir de la courbe d'inactivation, l'expérience précédente montre que, contrairement à la dessication, la congélation suivie de fusion ne diminue guère l'activité biologique de la solution*. Il est donc possible d'irradier celle-ci à l'état solide. Sous cet état, le parcours moyen des radicaux est très diminué; le volume de solution, au sein duquel les radicaux radio-formés peuvent attaquer une molécule de TP, se rétracte autour de celle-ci; le "volume radiosensible" tend vers le "volume moléculaire" vrai.

Par exemple, il a été démontré sur le phage T2 que la congélation (-16°) assure la même protection complète contre les effets indirects que le bouillon à 5%¹⁰. Nous avons donc déterminé la courbe d'inactivation du TP en extrait de levure à 10% congelé à -70° C. Cette courbe révèle la plus forte radio-résistance que nous ayons obtenue (Fig. 2). En se fondant sur elle, le calcul suivant postule qu'elle est voisine de celle que fournirait l'effet direct seul.

Toutes les courbes obtenues montrent, par leur forme exponentielle, que l'inactivation d'une molécule de TP résulte d'un seul "coup". Nous admettrons que ce coup consiste en la production d'une ionisation dans la molécule, ce qui revient à négliger les effets des excitations vis à vis de ceux des ionisations. Cette assertion nous paraît légitime. En effet, en admettant que dans l'acide nucléique, fait d'atomes légers, l'énergie électronique se répartit en parts approximativement égales entre ionisations et excitations, à chaque ionisation ne correspondent (par exemple) pas plus de 4.5 excitations mettant en jeu 5 eV chacune. Or le rendement quantique d'un photon de 5 eV mesuré sur divers matériaux génétiques (mutations géniques, inactivation de phages, division cellulaire, induction lysogénique) reste toujours de l'ordre de 10^{-2} à 10^{-3} par rapport au rendement d'une ionisation (LATARJET). Dans le cas présent, il est raisonnable d'estimer que les excitations ne participent pas pour plus de 1/20 dans l'effet total de l'énergie radiante transférée, et par suite de les négliger.

La courbe obtenue dans les conditions de protection maximum (Fig. 2) nous donne pour dose laissant 37% de survie (un coup par cible en moyenne)

$$D_{0.37} = 570 \text{ kr} \text{ soit } 9.0 \cdot 10^{17} \text{ ionisations g}^{-1}$$

ou $1.5 \cdot 10^{18}$ ionisations cm^{-3} d'ADN

Supposons d'abord que toutes les ionisations agissent indépendamment les unes des autres. Le coup correspond à une ionisation. La masse sensible théorique est:

$$M_0 = \frac{1}{D_{0.37}} = 1.1 \cdot 10^{-18} \text{ g}$$

qui correspond au "poids moléculaire"

$$P_0 = 1.1 \cdot 10^{-18} \cdot 6.06 \cdot 10^{23} = 6.7 \cdot 10^5$$

* Dans ces expériences, le traitement par congélation abaissait le titre d'environ 20 p. 100. La courbe d'inactivation (Fig. 2) coupe donc l'abscisse zéro à l'ordonnée 0.8. En pointillés, la courbe corrigée.

1. Le rayonnement X utilisé a pour longueur d'onde moyenne $0,9 \text{ \AA}$; il contient en forte proportion la radiation $K\alpha$ du molybdène ($0,71 \text{ \AA}$). On peut admettre que le voltage moyen des électrons primaires est 15 kV , correspondant, dans l'ADN de densité $1,65$, à un parcours moyen de $3,1 \mu$ et à la production de 450 ionisations. De celles-ci, on peut admettre que la moitié (a) se forment le long des trajectoires électroniques primaires avec un intervalle moyen de $14 \text{ m}\mu$. L'autre moitié (b) se distribuent en amas plus ou moins serrés le long des trajectoires des électrons secondaires dont l'énergie reste inférieure à 350 eV pour la plupart.

2. Pour la dose $D_{0,37}$, la densité des ionisations (a) formées le long des trajectoires primaires est $7,5 \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-3}$, soit une ionisation par cube de $12 \text{ m}\mu$ de côté. Il se trouve ainsi, par hasard, que l'espacement moyen des ionisations (a) provenant des trajectoires primaires différentes ($12 \text{ m}\mu$) est du même ordre que l'espacement moyen le long d'une même trajectoire ($14 \text{ m}\mu$). Pour cette dose, la distribution statistique des ionisations primaires est donc uniforme. En conséquence, ces ionisations interviennent dans le calcul de la cible d'une manière indépendante de la forme de celle-ci, aussi dissymétrique soit-elle.

3. Quant aux $7,5 \cdot 10^{17} \text{ cm}^{-3}$ ionisations (b), on peut admettre avec la plupart des auteurs (JAFFÉ, JORDAN, GRAY, LEA, FANO) qu'elles sont groupées en moyenne par 3 , leur distance restant faible, indéterminée, et, dans le cas présent, inférieure à $6 \text{ m}\mu$. S'il suffit d'une ionisation pour inactiver une molécule de TP (ce dont on s'assurerait en répétant ces expériences avec des rayons X de longueurs d'onde différentes), tout amas équivaut à la perte de 2 ionisations par saturation, dès l'instant qu'il se forme en entier dans la cible.

Ici intervient la forme très allongée de la molécule d'ADN. En admettant par exemple un rapport axial d'environ 300^{11} , nous déduisons de la masse ici estimée que le diamètre moyen de la fibre est inférieur à $2 \text{ m}\mu$. Il est donc probable que la saturation par les amas n'intervient ici que partiellement. Le nombre total des ionisations qu'il importe de considérer dans le calcul de cible est donc compris entre le maximum $a + b = 2a = 9 \cdot 10^{17} \text{ g}^{-1}$ et le minimum $A + b/3 = 6 \cdot 10^{17} \text{ g}^{-1}$.

Il vient alors pour la masse sensible vraie M :

$$1,1 \cdot 10^{-18} < M \leq 1,7 \cdot 10^{-18} \text{ g}$$

et pour le poids moléculaire P :

$$0,7 \cdot 10^5 < P \leq 1,0 \cdot 10^6$$

4. Le calcul précédent laisse subsister trois incertitudes. Celle qui se rapporte au groupement des ionisations se traduit par l'intervalle de l'inégalité précédente. Ce calcul suppose par ailleurs que le rendement ionique est égal à 1 , c'est à dire que toute ionisation produite dans le volume calculé entraîne l'inactivation du TP. Cette hypothèse est étayée par les résultats, acquis sur d'autres systèmes (enzymes, petits virus), mais elle n'est pas démontrée dans le cas présent. Enfin nous ne sommes pas certains de l'élimination complète des effets indirects.

Pour minimiser quelque peu ces incertitudes, nous avons eu l'idée d'irradier conjointement au TP, donc dans des conditions identiques, le petit phage $S1_3$, dont le volume radiosensible calculé peut être comparé au volume observé au microscope. Le phage $S1_3$ semble être une particule nucléoprotéique sphérique d'un diamètre moyen de $15,4 \text{ m}\mu^*$, soit, pour une densité de $1,45$, une masse de $2,75 \cdot 10^{-18} \text{ g}$.

* La valeur $15,4 \text{ m}\mu$ adoptée ici résulte de mesures directes sur clichés faîtes par ELFORD ET HOTCHIN sur des échantillons hautement purifiés. Non encore publiée, elle nous a été aimablement communiquée par le Dr. J. E. HOTCHIN.

Irradié dans l'extrait de levure à 10% qui lui confère une protection totale, ce phage donne (Fig. 2):

$$D_{0.37} = 250 \text{ kr}$$

Il vient ainsi: masse S-13/masse T P = $570/250 = 2.3$ soit, pour le TP

$$\begin{aligned} M &= 1.2 \cdot 10^{-18} \text{ g} \\ \text{et } P &= 7.3 \cdot 10^5 \end{aligned}$$

Il est satisfaisant de constater que cette valeur se situe dans l'intervalle calculé $6.7-10 \cdot 10^5$. Pour une densité 1.65, le volume correspondant est

$$V = 7.3 \cdot 10^{-19} \text{ ml.}$$

Soit, en admettant un rapport axial de 300, une fibre ayant une longueur de 4500 Å et un diamètre de 15 Å.

HÉTÉROGÉNÉITÉ

Il apparaît sur la Fig. 1, et plus encore sur la Fig. 3, que les courbes d'inactivation ne sont pas exponentielles sur toute leur étendue, et présentent une queue correspondant à une plus grande résistance. Ce fait reflète une hétérogénéité soit (a) dans la taille et la radiosensibilité du TP, soit (b) dans le regroupement des unités actives, la majorité d'entre elles étant séparées, et les autres agrégées.

A propos d'une éventuelle agrégation, précisons que nos titrages sont exécutés avec de très faibles concentrations d'ADN qui ne dépassent jamais $10^{-8} \text{ g cm}^{-3}$. Dans l'hypothèse (b), il faudrait supposer que l'on est en présence d'agrégats stables qui ne se défont pas lorsqu'on dilue les solutions—sans quoi, d'ailleurs, on ne pourrait obtenir de titrages linéaires—. La concentration de l'ADN au moment de l'irradiation ne semble pas intervenir non plus sur la déformation de la courbe (Fig. 3).

L'éventuelle hétérogénéité des particules de TP pourrait avoir une origine génétique, puisque l'ADN est préparé à partir d'une population de bactéries qui manifeste forcément une certaine hétérogénéité pour quelques caractères génétiques. Supposons qu'au sein de toute solution de TP existent, en minorité, des particules plus radio-résistantes, et que cette propriété se perpétue dans les bactéries qui les propagent. Les particules survivant à une très forte dose de rayons X devraient alors provoquer la formation de souches de pneumocoques contenant uniquement des particules TP radio-résistantes. Nous avons soumis cette hypothèse au contrôle expérimental: une solution de TP dans l'extrait de

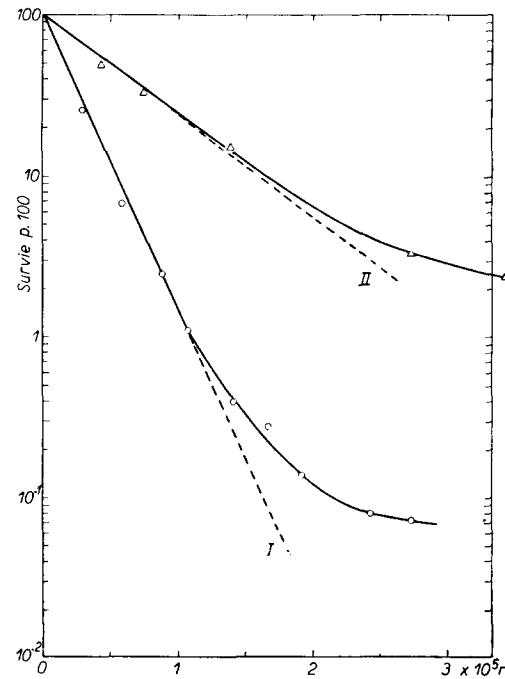


Fig. 3. Courbes d'inactivation du TP en extract de levure à 1%. I. TP 10^{-8} ; II. TP 10^{-1} (en pointillés: le prolongement de la partie rectiligne de la courbe met la cassure en évidence).

levure à 1% recevait une dose de 270 kr (survie 0.08 p. 100). Après traitement de la souche détectrice par l'échantillon irradié, on établissait 4 clones à partir de 4 bactéries indépendamment transformées par 4 particules de TP survivantes et supposées radio-résistantes. On isolait un ADN à partir de chacun des 4 clones, et l'on déterminait les courbes d'inactivation par les rayons X. Dans tous les cas, on a retrouvé la même sensibilité que celle de l'échantillon d'origine. Par conséquent, si l'hétérogénéité est due à une différence de radiosensibilité des particules de TP, cette différence n'est pas l'expression de propriétés qui se perpétuent au cours de la multiplication des particules par le pneumocoque.

DISCUSSION

En raison de la situation particulière qu'occupent les agents transformants en biologie, les faits apportés par ce travail intéressent non seulement nos conceptions sur ces agents, mais aussi, d'un point de vue plus général, les mécanismes de certains effets biologiques des radiations ionisantes.

1. Poids moléculaire du TP

Les expériences précédentes mettent en évidence, pour le TP Sr, un "poids moléculaire radiosensible"

$$P < 7.3 \cdot 10^5$$

Rappelons qu'en raison de l'impossibilité d'affirmer que nous avons totalement évité l'inactivation par l'effet indirect, la valeur précédente représente une limite supérieure du poids vrai.

Parmi les poids attribués aux ADN préparés par des méthodes douces, et qui s'échelonnent entre 0.5 et $20 \cdot 10^6$ (cf.¹¹), celui auquel nous avons abouti compte parmi les plus bas. Les mesures faites par diffusion de la lumière^{11, 12} concluent à $5 \cdot 10^6$ environ; les mesures faites par sédimentation et ultracentrifugation^{13, 14} concluent à environ $1 \cdot 10^6$. Notre résultat s'accorde évidemment mieux avec ce dernier.

Il faut toutefois remarquer que notre calcul est fondé sur la partie initiale linéaire de la courbe d'inactivation, laquelle correspond à la grande majorité du TP, et néglige la minorité hétérogène radiorésistante. Si celle-ci est faite de quelques agrégats de particules Sr, on comprendrait pourquoi notre résultat concorde avec celui de la centrifugation, méthode de mesure qu'une minorité de gros agrégats ne sauraient influencer. En revanche, ceux-ci interviendraient assurément dans les mesures par diffusion de la lumière, en élevant la valeur du résultat moyen obtenu.

Nous pensons que le désaccord entre notre résultat et celui ($6 \cdot 10^6$) obtenu par FLUKE *et al.*¹ après irradiation par deutons et électrons, provient de causes techniques. L'absence de titrages quantitatifs, la dessication suivie de dissolution (totale ou partielle?) de l'ADN, les courbes d'inactivation très imprécises, que l'on relève dans le travail cité, suffisent pour expliquer ce désaccord. Néanmoins, on peut envisager d'autres causes:

a. que le TP capsulaire, dont la complexité est établie³, soit en fait plus volumineux que le TP Sr;

b. que les rayonnements employés, X d'une part, corpuscules chargés d'autre part, entraînent des résultats différents. Cette considération soulève le vieux problème suivant: dans quelle mesure la masse radiosensible est-elle superposable à la molécule entière,

ou à une fraction de celle-ci? En d'autres termes, existe-t-il des régions de la molécule au sein desquelles une dissipation d'énergie puisse se produire sous forme d'ionisation, sans que disparaîsse l'activité biologique?

Les rayonnements corpusculaires à forte densité d'ionisation, et dosés en trajectoires ionisantes (FLUKE *et al.*) évitent cette question, car ils délivrent un tel excès d'énergie dès qu'ils atteignent un point quelconque de la molécule, qu'on imagine difficilement que l'activité biologique puisse subsister. En revanche, les rayons X, attaquant les molécules d'ADN par ionisations uniques ou peu nombreuses, "distinguaient" peut-être dans celles-ci une fraction radiosensible qu'il suffit de supposer correspondre à 1/8 du volume total pour expliquer l'écart observé.

Cette éventualité doit d'autant moins être écartée que l'image la plus satisfaisante du processus de transformation consiste en une sorte de crossing-over au cours duquel la bactérie incorpore parfois la totalité d'un TP, parfois un fragment seulement de celui-ci³. Selon cette image, l'activité transformatrice serait attachée à une région restreinte d'une unité plus volumineuse.

Contre l'idée que les rayons X distinguent des régions différentes au sein de la molécule d'ADN, s'inscrit la migration facile de l'énergie tout au long des molécules hautement polymérisées à structure pseudo-cristalline. Dans le cas d'une molécule filamenteuse contenant des régions différenciées pour des fonctions distinctes, on présume souvent, sans en être assuré, qu'une seule ionisation puisse désorganiser suffisamment la molécule entière pour supprimer toutes ces fonctions*. Afin de donner une réponse à cette question fondamentale, il serait très intéressant d'étudier en détail l'action des rayons X sur un TP complexe, tel que celui qui provoque la synthèse de la capsule du type III.

2. Hétérogénéité du TP

Les courbes d'inactivation révèlent une hétérogénéité constante, intéressant quelques pour cent des unités actives, qui peut être due à l'existence de particules dissemblables ou à des agrégats de particules actives. S'il s'agit d'agrégats, il faut admettre que ceux-ci sont suffisamment stables pour résister à de fortes dilutions. Nous avons pu constater que les solutions très diluées conservent une activité constante et le même degré d'hétérogénéité vis à vis des radiations.

Cette hétérogénéité, quelle qu'en soit l'origine, existe, et ne manquera pas de compliquer la recherche des relations entre structure moléculaire de l'ADN et activité génétique.

3. Sensibilité aux radicaux libres

Un résultat frappant de ce travail est la grande sensibilité du TP aux effets indirects des rayons X. Tandis que les phages T1 et S-13 sont totalement protégés contre ces effets par l'extrait de levure à 1% (Fig. 2), le TP témoigne encore d'une protection considérable lorsqu'on augmente la concentration de l'extrait de 1 à 10% (Fig. 1). Or, la radiosensibilité des phages est bien due à leur ADN^{15, 16} et leurs volumes radiosensibles correspondent bien aux quantités d'ADN qu'ils contiennent¹⁷.

Pour expliquer l'insensibilité relative des phages aux radicaux, on peut supposer

* Cette idée s'appuie notamment sur l'impossibilité d'obtenir par effet direct des rayons X, chez les petits virus, les effets biologiques partiels, c'est à dire les dissociations de fonctions, que l'on obtient avec les rayons UV.

que leur membrane protéique s'oppose à la diffusion de ceux-ci vers l'ADN. On peut supposer aussi que leur ADN, plus concentré grâce à sa forme et à une faible hydratation, offre une surface réduite à la phase aqueuse dans laquelle les radicaux sont formés. Il est clair, en revanche, que par sa grande assymétrie, l'ADN du TP offre à cette phase, pour un volume donné, une surface remarquablement étendue.

Cette observation est peut-être de quelque conséquence pour la sensibilité des chromosomes aux radiations X, dans la mesure où celles-ci agissent sur l'ADN. Si l'ADN chromosomique est étendu en filaments au sein d'une phase aqueuse, conformément à l'image que nous nous faisons du TP dissout, l'action indirecte des radiations s'exercerait avec ampleur. Ainsi, tous changements réduisant l'assymétrie de l'ADN, ou augmentant la concentration locale en cet acide ou en substances protectrices, diminueraient les effets indirects, en même temps que la radiosensibilité du chromosome. Ces considérations expliquent peut-être certaines des variations de la sensibilité observées au cours de la méiose et de la mitose.

4. Faible influence de l'oxygène

L'irradiation du TP en extrait de levure à 1%, c'est à dire dans un milieu aqueux riche en matières organiques, mais où persistent d'importants effets indirects des rayons X, nous a révélé l'absence de post-effet et l'insensibilité de l'inactivation à la présence d'oxygène. Rappelons à ce propos des résultats récents mis en lumière lors de l'irradiation de solutions aqueuses d'ADN (CONWAY ET BUTLER, SCHOLES ET WEISS) et du phage S-13 en milieu aqueux (ALPER⁸), en prenant pour tests d'action l'inactivation du phage, et des modifications physiques (viscosité) ou chimiques (perte de phosphate et de NH₂) de l'ADN dissous:

a. L'action immédiate, aussi bien directe qu'indirecte, ne met pas l'oxygène en jeu. Elle n'est donc pas due à des groupes actifs tels que HO₂ et H₂O₂ dont la formation exige l'oxygène libre. L'action indirecte produit, à côté des inactivations, des "effets partiels", c'est à dire qu'elle fragilise l'ADN vis à vis de l'action inactivatrice ultérieure de certains groupes à vie longue du milieu irradié.

b. Les groupes à vie longue se forment surtout en présence d'oxygène. Donc lorsque l'irradiation a été pratiquée en présence de ce gaz et dans des conditions où l'effet indirect se produit, l'effet immédiat est suivi d'un post-effet*. Certaines substances organiques, présentes au moment de l'irradiation, peuvent protéger le système contre le post-effet, sans supprimer l'effet indirect initial. Les résultats obtenus sur le TP, où nous enregistrons la disparition d'une activité biologique, s'accordent bien avec ces observations. En présence d'extrait de levure à 1%, nous constatons seulement des effets immédiats directs et indirects, qui sont indifférents à la présence d'oxygène**.

Il est très probable que l'ADN est aussi bien protégé contre les post-effets dans les cellules vivantes que dans nos solutions d'extrait de levure à 1%. Notre observation entraîne donc pour conséquence qu'aucun phénomène radiobiologique cellulaire, sensible à la présence de l'oxygène, ne saurait être attribué à l'attaque primaire de l'ADN. Si, par

* Il existe néanmoins un post-effet très réduit après irradiation sous vide¹⁸.

** Cette indifférence n'est pas limitée à l'ADN. COLLINSON *et al.*¹⁹ l'ont observée chez la ribonucléase (alors que d'autres enzymes sont sensibles à l'oxygène) et l'ont attribuée à l'absence de groupes SH dans la molécule. Mais il est bien établi aujourd'hui que non seulement la ribonucléase contient ces groupes, mais que leur existence à l'état réduit est une condition essentielle de son activité enzymatique²⁰. Il semble plus vraisemblable d'expliquer le comportement de la ribonucléase par une relative simplicité de structure, laquelle confère en même temps à cet enzyme une notable résistance à d'autres traitements telle la chaleur, qui dénaturent des protéines plus complexes.

nature, ce que nous appelons l'inactivation du TP n'est pas trop éloigné de ce qu'on appelle une mutation génique, il devient possible, en étudiant l'influence de l'oxygène, d'envisager une corrélation entre certains effets génétiques induits par un rayonnement et les structures cellulaires sur lesquelles celui-ci exerce son action primaire.

Les ruptures de chromosomes et les réarrangements qui, depuis l'observation première de THODAY ET READ²¹ ont été reconnus sur de nombreux systèmes comme étant sensibles à l'oxygène, se trouvent ainsi écartés d'une catégorie hypothétique d'effets primaires sur l'ADN. Il s'agit d'ailleurs en fait de lésions pour lesquelles il n'y a pas de raison d'invoquer une action directe sur l'ADN puisque celui-ci n'est pas indispensable au maintien de l'unité du chromosome²².

La radio-induction de létaux dans le chromosome X de la Drosophile²³ a révélé une influence notable de l'oxygène, mais moindre que sur les ruptures de chromosomes. On peut penser qu'une partie des létaux résultent d'aberrations chromosomiques dont la production est favorisée par l'oxygène. Mais qu'aurait-on observé si l'étude avait pu se borner à l'induction de létaux ne portant pas de réarrangements chromosomiques, c'est à dire à l'induction de mutations génétiques? Il est fort probable que celles-ci représentent une atteinte directe de l'ADN du chromosome laquelle, d'après notre travail, serait indifférente à la présence d'oxygène.

On songe ici à une observation générale sur laquelle MULLER²⁴ a mis l'accent, à savoir que les radiations ionisantes produisent des mutations principalement par ruptures de chromosomes, tandis que les ultraviolets agissent surtout par mutations génétiques. Or, ces UV sont principalement absorbés par les acides nucléiques et leurs effets génétiques sont insensibles à la présence d'oxygène.

Une étude du rôle de l'oxygène lors de l'induction de mutations de nature bien caractérisée montrerait la justesse de ces propos. A ce titre, un travail d'ANDERSON²⁵, revêt un intérêt particulier. Cet auteur disposait de deux souches d'*Escherichia coli* exigeant pour leur croissance l'une la purine, l'autre la streptomycine. Il étudia l'influence de l'oxygène sur l'induction, par les rayons X, de mutations vers l'indépendance à l'égard de ces deux substances, et constata que ces deux mutations répondent différemment. L'induction de la mutation "purine" est très sensible à la présence d'oxygène, c'est à dire très diminuée en l'absence de ce gaz, tandis que l'autre lui est indifférente. Nous sommes tentés d'expliquer ce résultat en supposant que les rayons X induisent la mutation "streptomycine" en affectant un facteur génétique de même constitution que le TP, et induisent la mutation "purine" par un processus qui ressemblerait plutôt à un réarrangement chromosomique et résulterait de l'altération primaire de constituants autres que l'ADN. Cette interprétation est en accord avec le fait que la courbe dose-effet est à un coup pour la mutation "streptomycine" et ne l'est pas pour la mutation "purine". Il est regrettable de ne pas pouvoir étudier plus en détails, par une analyse mendélienne, les caractéristiques génétiques de ces deux mutations.

Nous suggérons ainsi d'envisager l'effet oxygène pour distinguer, entre certaines radio-mutations. *L'indifférence à l'oxygène suggérerait que l'on a affaire à des altérations produites par le rayonnement dans l'ADN du chromosome. La sensibilité à l'oxygène signifierait que d'autres substances appartenant à l'appareil génétique sont atteintes.* Cette distinction ne préjuge en rien des interactions subséquentes de ces substances et de l'ADN. Elle suggère en tous cas diverses expériences, par exemple un travail analogue à celui d'ANDERSON sur un microorganisme tel que *Neurospora*, accessible à l'analyse mendélienne.

Insistons, pour terminer, sur la situation, unique jusqu'ici, que procure le TP à l'étude radiochimique et radiobiologique des acides desoxyribonucléiques, puisque la perte d'activité transformatrice offre le moyen de déceler, par un test hautement spécifique, l'altération d'un acide pur et isolé.

REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier les Drs. B. EPHRUSSI, M. FRILLEY, L. H. GRAY, et J. D. WATSON pour le fructueux intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

RÉSUMÉ

Le TP Sr, qui confère au pneumocoque la résistance à une concentration de $2 \cdot 10^{-3}$ de streptomycine, a été inactivé en solution aqueuse par des rayons X de 0.7-0.9 Å. Les faits suivants ont été mis en évidence:

1. La courbe de survie est exponentielle, mais présente une cassure pour une survie de quelques pour cent dénotant une hétérogénéité. Celle-ci ne provient pas de la présence de particules d'ADN héréditairement différentes des autres: les molécules résistant à une très forte dose n'induisent pas chez le pneumocoque la formation de TP résistant. Il s'agit d'une hétérogénéité de la solution, actuellement à l'étude.

2. Le TP est extrêmement sensible aux actions indirectes du rayonnement. Tandis que l'extrait de levure à 1% protège complètement des petits bactériophages contre l'effet indirect, il faut utiliser une concentration d'extrait de 10% pour atteindre une protection à peu près complète du TP contre ces effets. Ce fait est sans doute en relation avec l'absence de membrane protéique autour de l'ADN et aussi avec la forme filamenteuse très dissymétrique qui, pour un volume donné d'ADN, offre une très grande surface acceptrice aux radicaux libres.

3. L'irradiation étant provoquée dans les conditions d'effet direct (notamment sur des solutions congelées), la courbe d'inactivation a fourni pour le poids moléculaire du TP, une valeur inférieure ou égale à $7.3 \cdot 10^5$. Dans ce calcul, les incertitudes liées au groupement des ionisations ont été très diminuées en irradiant conjointement des petits bactériophages de volume connu.

4. La présence d'oxygène est sans influence notable sur l'inactivation du TP. Si cette inactivation n'est pas trop éloignée dans sa nature de ce qu'on appelle une radio-mutation génique, on peut concevoir que celle-ci serait également indifférente à la présence d'oxygène. Comme les ruptures de chromosomes lui sont très sensibles, on peut penser qu'elles résultent de l'atteinte primaire de substances différentes de l'ADN.

En revanche, il est permis de supposer que les altérations insensibles à la présence d'oxygène résultent de l'atteinte primaire de l'acide nucléique.

SUMMARY

The transforming agent TP Sr. which confers on pneumococcus resistance to a $2 \cdot 10^{-3}$ concentration of streptomycin has been inactivated in aqueous solution by x rays of 0.7-0.9 Å. The following facts have been made evident:

1. The survival curve is exponential, but shows a break at a survival of a few percent indicating a heterogeneity. This does not result from the presence of particles of DNA hereditarily different from the others: the molecules which are resistant to large doses do not lead in the case of pneumococcus to the formation of resistant TP. It is a question of the heterogeneity of the solution under investigation.

2. The TP is extremely sensitive to the indirect action of radiation. Although yeast extract at 1% completely protects small bacteriophages from the indirect effect, it is necessary to use an extract of 10% concentration in order to attain an almost complete protection of TP against these effects. This fact is undoubtedly connected with the absence of protein membrane surrounding the DNA and also with the very asymmetrical filamentous form which, for a given volume of DNA provides a very large surface for reacting with free radicals.

3. When irradiation is performed under the conditions of direct effect (on frozen solution) the inactivation curve provides for the molecular weight of TP a value less than or equal to $7.3 \cdot 10^5$. In this calculation the uncertainties associated with the grouping of the ionizations have been greatly diminished in irradiating simultaneously the small bacteriophages of known volume.

4. The presence of oxygen has no appreciable influence on the inactivation of TP. If this inactivation is not too far distant in its nature from that known as X-ray induced gene mutation, one can imagine that it will be equally indifferent to the presence of oxygen. As the chromosome

fractures are very sensitive to it, one may think that they are the result of primary attack of substances other than DNA.

On the other hand, it is permissible to suppose that the alterations insensitive to the presence of oxygen are the result of the primary attack of nucleic acid.

ZUSAMMENFASSUNG

Der TP Sr. der Pneumokokken gegen Streptomycin bis zu einer Konzentration von $2 \cdot 10^{-3}$ resistant macht, wurde in wässriger Lösung durch Röntgenstrahlen von 0.7-0.9 Å inaktiviert. Folgende Befunde wurden erhoben:

1. Die Überlebenskurve verläuft exponentiell. Für ein Überleben von einigen Prozent zeigt sie einen Bruch, was auf eine Heterogenität schliessen lässt. Dies beruht nicht auf der Gegenwart von ADN-Teilchen, die sich in ihrer Abstammung von den anderen unterscheiden: Die gegen eine sehr hohe Dosis resistenten Moleküle rufen bei Pneumokokken nicht die Bildung von TP-Restistenzen hervor. Es handelt sich um eine Heterogenität der Lösung, die im Augenblick untersucht wird.

2. Der TP ist ausserordentlich empfindlich gegen die indirekten Wirkungen der Bestrahlung. Während Hefefiltrat bis zu 1% die kleinen Bakteriophagen gegen den indirekten Effekt vollständig schützt, muss man einen 10% Extrakt anwenden, um TP nahezu vollständig gegen diese Effekte zu schützen. Diese Tatsache steht ohne Zweifel in Beziehung mit dem Fehlen der Proteinmembran um die ADN und auch mit der fädigen, sehr unsymmetrischen Form, die für ein gegebenes Volumen an ADN den freien Radikalen eine sehr grosse angreifbare Oberfläche bietet.

3. Wird die Bestrahlung unter den Bedingungen des indirekten Effektes durchgeführt (besonders in gefrorenen Lösungen) so liefert die Kurve der Inaktivierung für das Molekulargewicht des PT einen Wert kleiner oder gleich $7.3 \cdot 10^5$. In dieser Berechnung ist die Unsicherheit, die mit der Gruppierung der Ionisation verbunden ist durch gleichzeitiges Bestrahlen kleiner Phagen bekannten Volumens sehr verkleinert worden.

4. Die Gegenwart von Sauerstoff ist ohne merklichen Einfluss auf die Inaktivierung von TP. So ist diese Inaktivierung ihrer Natur nach einer genetischen Radiomutation ähnlich und man kann verstehen, dass diese in gleicher Weise unempfindlich gegen Sauerstoffgegenwart ist. Da die Chromosomenbrüche selbst sehr empfindlich sind, kann man annehmen, dass sie an einer anderen Substanz als ADN hervorgerufen werden. Dagegen ist es erlaubt anzunehmen, dass die unmerklichen Veränderungen in Gegenwart von Sauerstoff durch die primäre Einwirkung auf die Nuklinäre hervorgerufen werden.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 D. FLUKE, R. DREW ET E. POLLARD, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, U.S.A. 38 (1952) 180.
- 2 R. D. HOTCHKISS, *Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biol.*, 16 (1951) 457.
- 3 H. EPHRUSI-TAYLOR, *Exp. Cell Research*, 2 (1951) 589.
- 4 M. McCARTHY, Communication privée.
- 5 S. ZAMENHOF, H. E. ALEXANDER ET G. LEIDY, *J. Exp. Med.*, 98 (1953) 373.
- 6 R. THOMAS, *Experientia*, 7 (1951) 261.
- 7 R. LATARJET ET E. EPHRATI, *Compt. rend. soc. biol.*, 142 (1948) 497.
- 8 Cf. T. ALPER, R. S. ANDERSON, B. E. CONWAY ET J. A. BUTLER, G. SCHOLES ET J. WEISS, *Brit. J. Radiol.* 27 (1954) 36.
- 9 W. M. DALE, *Biochem. J.*, 34 (1940) 1367.
- 10 T. H. WOOD, *Nature*, 173 (1954) 641.
- 11 J. W. ROWEN, M. EDEN ET H. KAHLER, *Biochim. Biophys. Acta*, 10 (1953) 89.
- 12 P. DOTY ET B. H. BUNCE, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 5030.
- 13 V. L. KOENIG ET J. D. PERRINGS, *J. Colloid Sci.*, 8 (1953) 452.
- 14 R. CECIL ET A. G. OGSTEN, *J. Chem. Soc.*, (1948) 1382.
- 15 F. L. GATES, *J. Exp. Med.*, 60 (1934) 179.
- 16 R. LATARJET, *Rev. can. biol.*, 5 (1946) 9.
- 17 H. T. EPSTEIN, *Nature*, 171 (1953) 394.
- 18 M. DANIELS, G. SCHOLES, J. WEISS, *Nature*, 171 (1953) 1153.
- 19 E. COLLINSON, F. S. DAINTON ET B. HOLMES, *Nature*, 165 (1950) 266.
- 20 L. LEDOUX, *Biochim. Biophys. Acta*, 14 (1954) 267.
- 21 J. M. THODAY ET J. READ, *Nature* 160 (1947) 608.
- 22 B. P. KAUFMANN, H. GAY ET M. R. McDONALD, *Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biol.*, 14 (1950) 85.
- 23 A. HOLLANDER, W. K. BAKER ET E. H. ANDERSON, *Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biol.*, 16 (1951) 314.
- 24 H. J. MULLER, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 35, Suppl. 1 (1950) 9.
- 25 E. H. ANDERSON, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 37 (1951) 340.

Reçu le 20 août 1954