

3. The nature of the disease provoked by mixed virus preparations resembled in each case that characteristic of the virus supplying the nucleic acid.

4. The chemical nature of the progeny of mixed virus preparations also closely resembled that of the virus supplying the nucleic acid, although the significance of minor differences in amino acid composition has not yet been established.

5. In contrast to these properties the serological characteristics of mixed virus preparations were those of the virus supplying the protein.

6. The dual nature of the activity of reconstituted virus particles has thus been clearly demonstrated.

7. Variants or mutants of different biological and chemical properties have occurred randomly in the course of this work, and are regarded as indications of a labilisation of the genetic material through chemical manipulation.

#### REFERENCES

- 1 H. FRAENKEL-CONRAT AND R. C. WILLIAMS, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 41 (1955) 690.
- 2 H. FRAENKEL-CONRAT, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 882.
- 3 C. A. KNIGHT, *J. Biol. Chem.*, 171 (1947) 297.
- 4 C. I. NIU AND H. FRAENKEL-CONRAT, *Arch. Biochem. Biophys.*, 59 (1955) 538.
- 5 H. FRAENKEL-CONRAT, B. SINGER AND R. C. WILLIAMS, *Biochim. Biophys. Acta*, 25 (1957) (in the press); see also: *Symposium on the Chemical Basis of Heredity, McCollum Pratt Institute, Johns Hopkins University, Baltimore*, June 1956.
- 6 H. FRAENKEL-CONRAT AND B. SINGER, *Arch. Biochem. Biophys.*, (in the press).
- 7 A. L. LEVY, *Nature*, 174 (1954) 126.
- 8 H. FRAENKEL-CONRAT AND B. SINGER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 60 (1956) 64.
- 9 G. H. BEAVAN AND E. R. HOLIDAY, *Advances in Prot. Chem.*, 7 (1952) 320.
- 10 D. FRASER AND P. NEWMARK, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 1588.
- 11 F. L. BLACK AND C. A. KNIGHT, *J. Biol. Chem.*, 202 (1953) 51.

Received January 17th, 1957

## ÉTUDE DE L'ACTION DU CHLORURE DE SODIUM SUR L'OXYHÉMOGLOBINE

### I. MESURES DE DIFFUSION DE LA LUMIÈRE

NICOLE BENHAMOU\* ET GILBERT WEILL

*Centre de Recherches sur les Macromolécules, Strasbourg (France)*

L'hémoglobine et ses dérivés soumis à diverses actions physiques ou chimiques (dilution<sup>21</sup> - pH<sup>2, 10, 17</sup> - urée<sup>3, 6, 18</sup> - amides<sup>19</sup> - sels<sup>11, 13</sup>) tendent à se dissocier en unités plus petites. La stabilité des molécules ne serait du reste pas la même suivant le matériel traité: elle varierait d'une espèce d'hémoglobine à l'autre, d'un dérivé à l'autre. L'action particulière du chlorure de sodium sur l'hémoglobine avec scission en deux moitiés a déjà été signalée<sup>2, 14</sup>.

Nous nous sommes proposé ici d'étudier l'effet du chlorure de sodium sur des solutions d'oxyhémoglobine humaine, au voisinage de son pH isoélectrique, en comparant la masse moléculaire de cette protéine dans des solutions contenant ou non du sel.

Nous avons mesuré les masses moléculaires par diffusion de la lumière.

\* Laboratoire de Chimie Physique de la Faculté des Sciences, Paris.

## MÉTHODE

On sait que la différence  $I - I_0 = R(\theta)$  des intensités diffusées à un angle  $\theta$  par une solution et par le solvant est liée à la masse moléculaire  $M$  du corps en solution par la relation<sup>8</sup>:

$$K' \frac{c}{R(\theta)} = \frac{1}{MP(\theta)} + \frac{2Bc}{RT} \quad (1)$$

$P(\theta)$  est une fonction de la taille de la molécule. Dans le cas qui nous intéresse où la molécule est petite devant la longueur d'onde, le facteur  $P(\theta)$  reste constant et égal à l'unité de telle sorte que l'expression (1) devient:

$$K' \frac{c}{R(\theta)} = \frac{1}{M} \times (1 + 2B'c) \quad (2)$$

où  $B'$  est une quantité proportionnelle au second coefficient du viriel dans le développement de la pression osmotique; son signe et sa grandeur renseignent sur les interactions en solution.

Les mesures ont été effectuées avec le photogoniодiffusomètre de WIPPLER ET SCHEIBLING<sup>23</sup> en prenant pour étalon le benzène et en opérant sous un angle unique égal à  $90^\circ$ . Dans ces conditions:

$$\frac{1}{M} = \frac{2\pi^2 n^2}{N \lambda_0^4 R_B} I_B \left( \frac{dn}{dc} \right)^2 \left[ \frac{c}{I - I_0} \right]_{c=0} = K \left( \frac{dn}{dc} \right)^2 I_B \left[ \frac{c}{I - I_0} \right]_{c=0} \quad (3)$$

où  $n$  est l'indice du benzène à la longueur d'onde  $\lambda_0$

$\lambda_0$  la longueur d'onde incidente dans le vide

$N$  le nombre d'Avogadro

$R_B$  le rapport de Rayleigh du benzène à  $\lambda_0$  ( $16.3 \cdot 10^{-6}$  pour 5461 A)

$I_B$  l'intensité diffusée par le benzène

$I_0$  l'intensité diffusée par le solvant

$I$  l'intensité diffusée par la solution

$dn/dc$  l'incrément d'indice de réfraction

la concentration en g/ml

$[c/I - I_0]_{c=0}$  la valeur extrapolée à concentration nulle.

Dans le cas où les molécules sont de masses moléculaires différentes,  $M$  représente la masse moyenne en poids.

Le cas de l'oxyhémoglobine est compliqué du fait de la coloration de la solution. Il n'est pas possible de travailler dans la zone de transparence de l'oxyhémoglobine, la sensibilité du multiplicateur d'électrons (RCA 1P28) diminuant rapidement quand  $\lambda_0$  croît.

Nous avons travaillé avec une lampe de projection Mazda à filament rectiligne que nous avons filtrée à l'aide d'un filtre Kodak Wratten 22 et d'un verre au didyme qui laissent passer les radiations supérieures à 5800 A. L'ensemble lampe, filtre, multiplicateur servant aux mesures de diffusion a été également utilisé pour la mesure de transmission effectuée directement avec le photogoniодiffusomètre, de manière à déterminer le coefficient d'absorption de la solution.

On n'isole pas ainsi une raie monochromatique mais un spectre de longueur d'onde représenté par une fonction  $f(\lambda)$ . Cette fonction n'est que la combinaison du

spectre d'émission du filament déduit de sa température de couleur, de la courbe de transmission du filtre et de la sensibilité spectrale du photomultiplicateur. La longueur d'onde intervient lors de la détermination de la masse moléculaire (1) dans la détermination de l'incrément d'indice de réfraction; (2) dans la détermination de la constante  $K$  de l'équation (3).

On sait que la loi de dispersion de l'incrément d'indice de réfraction est en  $\lambda^{-2}$ . Il est facile d'obtenir la moyenne sur cette quantité soit:  $\lambda^{-2}$  équivalent =  $\int f(\lambda) \lambda^{-2} d\lambda / \int f(\lambda) d\lambda$  à l'aide d'une expérience préliminaire. Celle-ci consiste à étudier la fonction  $P^{-1}(\theta)$  d'un polymère de taille non négligeable devant la longueur d'onde, pour une raie monochromatique et pour un spectre  $f(\lambda)$ . Dans ces conditions  $P^{-1}(\theta)$  étant de la forme

$$1 + k/\lambda_2 \sin^2 \frac{\theta}{2}$$

où  $k$  est indépendant de  $\lambda$ , la longueur d'onde équivalente  $\lambda_e$  est donnée par le rapport des pentes des courbes  $[c/I]_{c=0}$  en fonction de  $\sin^2 \theta/2$  tirées du "Zimm plot".

En opérant sur un polystyrolène de masse 500,000 en solution dans le benzène ( $\sqrt{r^2} = 900$  Å) nous avons trouvé avec notre dispositif (par comparaison avec la raie 5460 Å de l'arc du mercure)  $\lambda_e = 6500$  Å. Nous avons alors déterminé l'incrément d'indice de réfraction pour la raie 6437 Å du spectre du Cadmium à l'interféromètre Zeiss. Aux erreurs d'expérience près nous avons trouvé la même valeur dans l'eau distillée et dans un tampon phosphates  $M/45$ , en absence ou en présence de sel. Pour l'ensemble des mesures on a utilisé la valeur moyenne  $dn/dc = 0.198 \pm 0.005$ .

La valeur de la constante  $K$  a été obtenue de deux manières:

1. en traçant la courbe  $K = f(\lambda)$  en utilisant les résultats de CANTOW<sup>4</sup> sur la dispersion du rapport de Rayleigh et de l'indice de réfraction du benzène. On s'aperçoit que  $K$  garde une valeur sensiblement constante entre 5500 et 7000 Å soit  $54.6 \pm 0.6$ ;

2. à l'aide d'une expérience préliminaire de diffusion de la lumière sur une protéine non colorée (sérumalbumine). En étudiant l'intensité diffusée par une solution de cette protéine la lumière excitatrice étant successivement monochromatique (5460 Å) puis polychromatique et en admettant pour dispersion du  $dn/dc$  la formule donnée par PERLMANN ET LONGSWORTH<sup>15</sup>

$$\left( \frac{dn}{dc} \right)_\lambda = \left( \frac{dn}{dc} \right)_{5780} \cdot (0.940 + \left( \frac{2.00 \times 10^6}{\lambda^2} \right))$$

le rapport des ordonnées  $[c/I]_{c=0}$  fournit une valeur de  $K = 54.9 \pm 0.5$  que nous avons admise pour l'ensemble de nos mesures. Elle est en bon accord avec la valeur précédente.

La correction d'absorption a été calculée à l'aide des formules données par CASPERSSON<sup>5</sup> et généralisées par TONNELAT ET BATSCHE<sup>22</sup>. Cependant les cellules cylindriques de mesure ayant un diamètre  $d = 29$  mm et, le volume diffusant observé au milieu de la cellule ayant une section de 2 mm  $\times$  2 mm, ce facteur se ramène à la simple correction

$$I' = \frac{I}{t}$$

$t$  étant le pourcentage de lumière transmise par la solution avec une erreur ne dé-

Bibliographie p. 554.

passant pas 2%. Nous avons adopté cette formule qui nous permettait une mesure directe du coefficient de correction à l'aide du photogoniiodiffusomètre employé à angle  $0^\circ$ .

L'erreur globale sur la mesure de la masse moléculaire est dans ces conditions de  $\pm 10\%$ .

La masse moléculaire de l'oxyhémoglobine ainsi déterminée est de

$$M = 69,000 \pm 6,900$$

et  $M = 64,000 \pm 6,400$  pour 2 préparations différentes. Ces valeurs sont en bon accord avec la valeur moyenne de 68,000 mesurée par d'autres méthodes<sup>1, 16, 20</sup> ce qui montre la validité de nos corrections.

#### CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Les solutions mères d'oxyhémoglobine préparées à partir de sang humain<sup>2</sup> sont conservées à  $2^\circ C$ . Leur concentration est déterminée par un dosage par absorption au spectrophotomètre Jobin et Yvon: la densité optique d'une solution d'oxyhémoglobine à 1 milliatome de fer/litre soit 17 grammes de protéines est de 14.8 à 5400 Å et de 15.2 à 5750 Å pour 1 cm d'épaisseur. Nous n'avons observé aucune modification significative du spectre de l'oxyhémoglobine entre 5000 et 6000 Å dans ces solutions lorsque l'on introduit du NaCl ou de l'urée.

Nous avons défini le *temps de contact* dans les expériences comme le temps pendant lequel une solution de protéine à 0.4-0.5% avait été laissée en présence de NaCl à  $2^\circ C$  avant d'être diluée pour les mesures de diffusion de la lumière, effectuées à la température du laboratoire.

Le dépoussiérage des solutions diluées pour la diffusion de la lumière a été effectué par centrifugation à 14,000 tours/minute (25,000 g) dans une centrifugeuse Phywe Pirouette.

#### RÉSULTATS

Tous les résultats ont été portés sur le Tableau I. La masse moléculaire de l'oxyhémoglobine diminue notablement en solution 1 M NaCl à pH 7. On voit qu'elle passe après 1 heure de contact de 64,000 à 40,000.

Nous avons alors précisé l'action du NaCl en étudiant l'influence sur une même concentration protéique (0.4-0.5%) d'une part du temps de contact avec NaCl, d'autre part de la concentration en NaCl.

TABLEAU I

Solution	pH	Temps de contact	Masses moléculaires	$M/M_0^*$
<i>Préparation 1</i>				
Tampon phosphates M/45	7	0 heure	$M_0 = 69,000 \pm 6900$	1
Tampon phosphates M/45 + 0.5 M NaCl	7	1 heure	$M = 45,000 \pm 4500$	0.65
Tampon phosphates M/45 + 1 M NaCl	7	18 heures	$M = 45,000 \pm 4500$	0.65
Tampon phosphates M/45 + 2 M NaCl	7	1 heure	$M = 44,000 \pm 4400$	0.64
<i>Préparation 2</i>				
Tampon phosphates M/45	7	0 heure	$M_0 = 64,000 \pm 6400$	1
Tampon phosphates M/45 + 1 M NaCl	7	1 heure	$M = 40,500 \pm 4000$	0.63
Tampon phosphates M/45 + 1 M NaCl	7	24 heures	$M = 39,000 \pm 3900$	0.61
Tampon phosphates M/45 + 1 M NaCl	7	48 heures	$M = 42,000 \pm 4200$	0.66
Tampon phosphates M/45 + 1 M NaCl	7	72 heures	$M = 43,000 \pm 4300$	0.67
Tampon phosphates M/45 + 1 M NaCl pendant 48 heures, puis dialysé	7	72 heures	$M = 62,000 \pm 6200$	0.97
Tampon phosphates M/45 + 4 M Urée	7	1 h et 24 heures	$M = 54,000 \pm 5400$	0.85

\*  $M$  est la masse moléculaire de l'oxyhémoglobine dissociée;  $M_0$  est la masse moléculaire de l'oxyhémoglobine "native".

*Effet de la variation du temps de contact dans les solutions 1 M NaCl*

Nous avons mesuré la masse moléculaire en solution après 1, 24, 48 et 72 heures de contact et constaté qu'elle ne variait pratiquement pas avec le temps de contact.

On observe sur la Fig. 1 que les droites  $c/I - I_0$  en fonction de  $c$  correspondant aux temps 1 heure et 72 heures sont très voisines et s'extrapolent à concentration nulle à la même valeur, aux erreurs d'expérience près, tout en étant nettement séparées de la droite correspondant au témoin d'oxyhémoglobine en tampon phosphates à pH 7.

*Effet de la variation de la concentration en NaCl*

La masse moléculaire dans des solutions 0.5 et 2 M après 1 heure de contact, et dans la solution 2 M après 48 heures, est très voisine de celle obtenue en 1 M NaCl.

Il restait à connaître l'évolution de cette masse moléculaire lorsqu'on élimine le sel. Une solution protéique de concentration 0.47% laissée en contact 48 heures à 2° C dans 1 M NaCl à pH 7, était dialysée pendant 3 jours contre de l'eau distillée pour éliminer NaCl. Le diagramme de diffusion de la lumière donné dans la Fig. 2 montre que la droite  $c/I - I_0$  s'extrapole à concentration nulle à peu près au même point que la droite correspondant à la solution témoin non soumise à l'action du NaCl. Elle présente cependant par rapport à cette dernière un changement de signe du second coefficient du viriel.

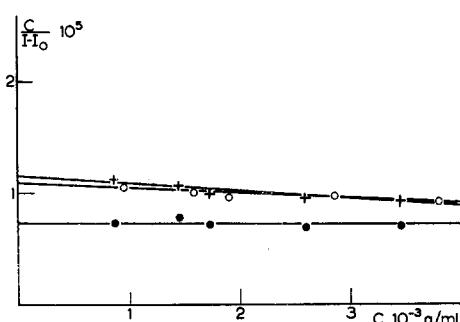


Fig. 1.

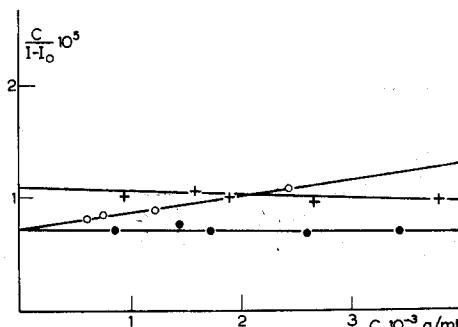


Fig. 2.

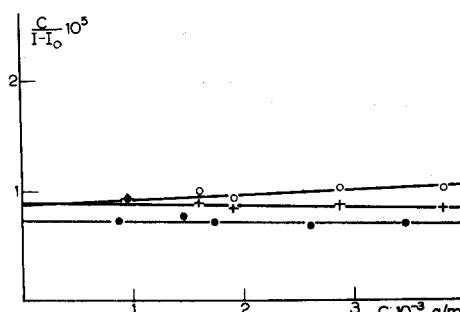


Fig. 3.

Fig. 1. Diagrammes comparés de diffusion de la lumière. Action de NaCl 1 M. ● dans tampon phosphate M/45, pH 7; + idem + 1 M NaCl 1 heure, pH 7; ○ idem + 1 M NaCl 72 heures, pH 7.

Fig. 2. Diagrammes comparés de diffusion de la lumière. Action de NaCl et reversibilité par dialyse. ● dans tampon phosphate M/45, pH 7; + idem + 1 M NaCl 48 heures, pH 7; ○ idem + 1 M NaCl 48 heures, pH 7, puis dialysée.

Fig. 3. Diagrammes comparés de diffusion de la lumière. Action de l'urée, 4 M. ● dans tampon phosphate, pH 7; + témoin après 48 heures; ○ dans tampon + 4 M urée (1 h et 24 h).

## DISCUSSION DES RÉSULTATS

Cette étude permet d'affirmer que le chlorure de sodium provoque une scission de la molécule d'oxyhémoglobine humaine. Si l'on admet que cette scission aboutit à la formation de deux fragments de masse moléculaire identique, moitié de la masse initiale, la valeur du rapport des masses moléculaires moyennes en poids de l'oxyhémoglobine attaquée et "native"  $M/M_0 = 0.65$  conduit à un pourcentage de 70% de molécules coupées puisque dans notre hypothèse on a:

$$(y) = (1 - x) + \frac{x}{2}$$

où  $y$  est le rapport de dissociation en poids,  $x$  est le rapport de dissociation en nombre.

Le nombre de molécules scindées est indépendant du temps de contact et de la concentration saline (Tableau I) à condition que celle-ci soit assez forte. Dans les solutions étudiées (0.5, 1 et 2 M NaCl) la scission est pratiquement immédiate.

Ces résultats sont en accord avec des expériences faites sur de l'oxyhémoglobine étalée en couche monomoléculaire sur des supports 0.5 M NaCl. Mais alors que la masse moléculaire de la protéine *dans le film* devient moitié dans ces conditions, l'action de NaCl *en solution* ne provoque pas la scission de toutes les molécules comme l'un de nous l'avait mentionné<sup>2</sup> et comme le confirment ces expériences.

Le fait que l'on ait toujours le même nombre de molécules scindées et qu'en solution, NaCl n'attaque jamais la totalité des molécules, conduit à deux hypothèses: soit à un équilibre entre molécules dissociées et non dissociées; soit à l'existence dans une même solution de deux sortes de molécules, dont l'une ne serait pas attaquée par le sel. Il est en effet possible que l'hémoglobine humaine ne soit pas homogène<sup>9,18</sup>.

Les expériences de dialyse montrent qu'il y a réagré gationdes molécules, ce que serait en faveur d'un équilibre réversible. DOGNON ET GOUGEROT<sup>9</sup> avaient du reste signalé que l'oxyhémoglobine mousse en présence de chlorure de sodium et que cette propriété disparaît après élimination du sel par dialyse. Il est cependant probable que les molécules reconstituées ne sont plus identiques aux molécules initiales, le deuxième coefficient du viriel ayant changé de signe, indice d'une modification des interactions.

Comme l'urée peut provoquer la scission des molécules de certaines hémoglobines ou de leurs dérivés<sup>3,6,19</sup>, nous avons effectué une expérience de diffusion de la lumière sur de l'oxyhémoglobine humaine dissoute dans une solution d'urée 4 M. Les résultats sont portés sur la Fig. 3.

Les deux droites extrêmes correspondent à deux expériences faites dans les mêmes conditions, l'une en présence, l'autre en absence d'urée, à pH voisin de 7. On observe en présence d'urée une faible diminution de la masse moléculaire qui n'évolue pas avec le temps (Tableau I) et qui est comparable à l'effet de vieillissement observé dans une solution témoin abandonnée 48 heures à 2° C. Le second coefficient du viriel change de signe ce qui indiquerait la possibilité d'une modification de la forme de la molécule comme dans les expériences de GUTTER *et al.*<sup>12</sup> sur la carboxy-hémoglobine humaine.

Le chlorure de sodium et l'urée n'ont donc pas des actions identiques sur la molécule d'oxyhémoglobine humaine. Des mesures de coefficients de diffusion de translation et de constantes de sédimentation seront nécessaires pour appuyer l'hypo-

thèse, d'une scission dans le cas de NaCl, et d'un simple changement de forme dans le cas de l'urée.

### RÉSUMÉ

On a utilisé la méthode de diffusion de la lumière pour déterminer la masse moléculaire de l'oxy-hémoglobine humaine en solution, en présence ou en absence de NaCl, au voisinage de son pH isoélectrique. Le chlorure de sodium provoque une scission de la molécule, probablement en deux moitiés. Cette action n'est jamais totale en solution, ni par augmentation du temps de contact dans le sel, ni par augmentation de la concentration saline. Après élimination du sel, il y a ré-agrégation des molécules.

Il ne semble pas que l'urée ait une action comparable à celle du chlorure de sodium.

### SUMMARY

The method of light scattering has been used to measure the molecular weight of human oxy-hemoglobin in solution, in the presence or absence of sodium chloride, near the pH corresponding to its isoelectric point. The sodium chloride causes the dissociation of the oxyhemoglobin molecule, probably into two halves. Neither by increasing the time of contact with the salt, nor by increasing the salt concentration, does this action ever go to completion in solution. After elimination of the sodium chloride, the molecules are formed again.

Urea does not seem to have the same effect as sodium chloride.

### BIBLIOGRAPHIE

- <sup>1</sup> G. S. ADAIR, *Proc. Roy. Soc. (London)*, A, 108 (1925) 627.
- <sup>2</sup> N. BENHAMOU, *J. Chim. Phys.*, 53 (1956) 32 et 44.
- <sup>3</sup> N. F. BURK ET D. M. GREENBERG, *J. Biol. Chem.*, 87 (1930) 197.
- <sup>4</sup> H. J. CANTOW, *Makromol. Chem.*, 18-19 (1956) 367.
- <sup>5</sup> T. CASPERSSON, *Kolloid Z.*, 65 (1933) 162.
- <sup>6</sup> H. COLSON-GUASTALLA, *Thèse*, Paris, 1956.
- <sup>7</sup> D. L. DRABKIN ET J. H. AUSTIN, *J. Biol. Chem.*, 112 (1935) 89.
- <sup>8</sup> P. DEBYE, *J. Phys. & Colloid Chem.*, 51 (1947) 18.
- <sup>9</sup> A. DOGNON ET L. GOUGEROT, *Compt. rend. soc. biol.*, 142 (1948) 1490.
- <sup>10</sup> E. O. FIELD ET J. R. P. O'BRIEN, *Biochem. J.*, 60 (1955) 656.
- <sup>11</sup> H. GUTFREUND, in F. J. W. ROUGHTON AND J. C. KENDREW, *Haemoglobin*, Butterworths Sci. Publ., London, 1949, p. 147.
- <sup>12</sup> F. J. GUTTER, H. A. SOBER ET E. A. PETERSON, *Arch. Biochem. Biophys.*, 62 (1956) 427.
- <sup>13</sup> J. MICHEL ET N. BENHAMOU, *Compt. rend.*, 228 (1949) 1577.
- <sup>14</sup> K. O. PEDERSEN ET K. ANDERSSON, cités par I. SVEDBERG ET K. O. PEDERSEN dans *The Ultracentrifuge*, Oxford Univ. Press, 1940.
- <sup>15</sup> G. E. PERLMANN ET L. G. LONGSWORTH, *J. Am. Chem. Soc.*, 70 (1948) 2719.
- <sup>16</sup> R. B. PORTER ET F. SANGER, *Biochem. J.*, 42 (1948) 287.
- <sup>17</sup> M. E. REICHMANN ET J. ROSS COLVIN, *Can. J. Chem.*, 34 (1956) 411.
- <sup>18</sup> J. ROCHE, Y. DERRIEN ET M. MOUTTE, *Bull. soc. chim. biol.*, 23, (1941) 1143.
- <sup>19</sup> J. STEINHARDT, *J. Biol. Chem.*, 123 (1938) 543.
- <sup>20</sup> T. SVEDBERG, *Trans. Faraday Soc.*, 26 (1930) 740.
- <sup>21</sup> A. TISELIUS ET D. GROSS, *Kolloid Z.*, 66 (1934) 11.
- <sup>22</sup> J. TONNELAT ET H. BATSCHE, *Compt. rend.*, 231 (1950) 960.
- <sup>23</sup> C. WIPPLER ET G. SCHEIBLING, *J. Chim. Phys.*, 51 (1954) 201.

Reçu le 11 janvier 1957