

## DÉGRADATION ENZYMATIQUE DE L'ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE EN SOUS-UNITÉS

GIORGIO BERNARDI, MADELEINE CHAMPAGNE ET CHARLES SADRON

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

(Reçu le 15 Octobre 1966)

### SUMMARY

#### *Enzymic degradation of DNA in subunits*

Deoxyribonucleic acid from calf thymus (mol. wt. =  $6.5 \cdot 10^6$ ;  $s_{20,w} = 20.0$  S) or chicken erythrocytes (mol. wt. =  $8.0 \cdot 10^6$ ;  $s_{20,w} = 27.5$  S) has been degraded with a crude enzymic preparation from chicken erythrocytes. Enzymic activity shows a pH optimum close to 5.5 and is strongly inhibited by Mg ions. No appreciable amounts of dialyzable nucleotides are formed during the enzymic digestion.

Digested deoxyribonucleic acid from both sources appears to be formed by particles showing a molecular weight of  $(5.5 \pm 0.5) \cdot 10^5$ . The light-scattering data are compatible with a solution of monodisperse rods having a molecular weight per unit length  $M/L = 200 \pm 20/\text{Å}$ . The sedimentation constant  $s_{20,w} = 5.8$  S and the distribution function of the sedimentation constants is very narrow.

### INTRODUCTION

La masse moléculaire la plus généralement acceptée pour le DNA est comprise entre 6 et 8 millions<sup>1,2</sup>. Au cours d'une étude sur les méthodes de préparation du DNA employant une extraction par l'eau il avait été observé que dans des conditions expérimentales données on pouvait obtenir d'une manière reproductible à partir des érythrocytes de poulet des préparations de DNA qui montraient des masses moléculaires plus faibles<sup>3</sup>. Cette observation, rappelant des données déjà existantes dans la littérature<sup>4,5</sup>, suggérait la présence d'une activité enzymatique provoquant une dépolymérisation du DNA et une étude a été entreprise sur l'action de préparations des érythrocytes de poulet sur le DNA. Les résultats de cette étude sont exposés dans cette publication. Un rapport préliminaire a été déjà publié<sup>6</sup>.

#### *Analyses chimiques et mesures physiques*

Les teneurs en azote ont été déterminées par micro-Kjeldahl, en phosphore par la méthode de BRIGGS<sup>7</sup>. Les mesures d'absorption ultraviolette ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre Zeiss et d'un appareil enregistreur Lerès.

Un viscosimètre de Couette a été employé pour les déterminations de viscosité qui ont été faites à 20° et avec NaCl 1 M comme solvant.

Les mesures de sédimentation ont été faites à 20° dans une ultracentrifugeuse

Abréviation: DNA, acide désoxyribonucléique.

Spinco modèle E, équipée avec un dispositif de contrôle de température. On a toujours employé des cellules de 12 mm en kel-F et la technique d'absorption ultraviolette avec des solutions de DNA à 0.005 g % dans du NaCl 1 M (densité optique voisine de 1). Selon la masse moléculaire de l'échantillon étudié, la vitesse de rotation employée était comprise entre 29,500 et 44,770 tours/min. Les plaques photographiques étaient analysées avec un microdensitomètre enregistreur J. L. C.-Walker et des valeurs de  $s$  étaient calculées d'après des diagrammes donnant le logarithme du déplacement en fonction du temps. Enfin, les coefficients de sédimentation ont été ramenés aux conditions standard. On a employé la valeur  $\bar{V} = 0.55$  pour le volume spécifique partiel du DNA<sup>8</sup>.

Pour le calcul de la distribution des coefficients de sédimentation on a employé la méthode de WILLIAMS *et al.*<sup>9</sup>. Les courbes différentielles obtenues ont été extrapolées à temps infini pour éliminer l'effet de diffusion<sup>10</sup>.

Les mesures de diffusion de la lumière ont été effectuées sur des solutions de DNA dans le NaCl 1 M, avec l'appareil C.R.M. de WIPPLER ET SCHEIBLING<sup>11</sup>. Les concentrations de DNA variaient de 2.5 à  $25 \cdot 10^{-5}$  g/ml, selon les échantillons étudiés. Les mesures étaient faites à la température de la pièce (environ 22°) avec de la lumière verte ( $\lambda = 5460 \text{ \AA}$ ), à des angles compris entre 30° et 150°. L'incrément spécifique de l'indice de réfraction a été trouvé être  $dn/dc = 0.174 \text{ ml/g}$  ( $\lambda = 5460 \text{ \AA}$ ; température, 20°) avec un interféromètre de Rayleigh. Les résultats ont été représentés dans la forme proposée par ZIMM<sup>12</sup>. Dans les conditions expérimentales employées la valeur du 2<sup>e</sup> coefficient de viriel est apparue comme pratiquement nulle. Les grandeurs physiques suivantes ont été calculées à partir de la courbe limite ( $c = 0$ ) du diagramme de ZIMM: masse moléculaire ( $M_w$ ), rayon de giration ( $R_z$ ) et la dissymétrie. (Voir la réf. 1 pour la signification de ces valeurs dans le cas du DNA de haute masse.) La valeur de  $M/L$  (masse par unité de longueur) a été calculée soit à partir du rapport  $M_w/R_z$ , soit de la pente de l'asymptote dans un diagramme donnant  $(kc/R_0)_{c=0}$  en fonction de  $\sin \theta/2$  (voir réfs. 13, 14).

TABLEAU I  
RÉSULTATS DE LA DIFFUSION DE LA LUMIÈRE POUR LES PRÉPARATIONS B1S ET B2

Echantillon	Masse moléculaire	Rayon de giration ( $\text{\AA}$ )	Dissymétrie
Thymus de veau B1s	6,500,000	2,810	4.5
Erythrocytes de poulet B2	8,000,000	3,170	4.4

### Digestion enzymatique

*Préparation de DNA*: Deux préparations de DNA ont été employées principalement dans ce travail. Elles ont été obtenues par un procédé dérivé des méthodes classiques et qui sera décrit ailleurs<sup>14</sup>. La préparation B1s, obtenue à partir de thymus de veau, avait une masse moléculaire de  $6.5 \cdot 10^6$  (voir Tableau I), une constante de sédimentation  $s_{20,w} = 20$  S, un rapport azote sur phosphore N/P = 1.69, une valeur du coefficient d'absorption spécifique à 260 m $\mu$ ,  $\epsilon(P) = 6300$  (voir réf. 15), un rapport des densités optiques à 280 et 260 m $\mu$  égal à 0.55. Pour la préparation B2, obtenue à partir des érythrocytes de poulet, on avait une masse moléculaire de  $8.0 \cdot 10^6$  (voir Tableau I),  $s_{20,w} = 27.5$  S, N/P = 1.73,  $\epsilon(P) = 6500$ , rapport 280/260 égal à 0.55.

*Préparation enzymatique*: Des érythrocytes obtenus en centrifugeant un volume

de sang de poulet plus un demi volume de NaCl 0.15 *M*-citrate de Na 0.01 *M*, additionné d'héparine ont été lysés avec de la saponine à 0.1 % dans le même solvant. Les noyaux récupérés par centrifugation ont été lavés avec le solvant NaCl 0.15 *M*-citrate de Na 0.01 *M*, centrifugés et mis à nouveau en suspension (en évitant d'employer un mixeur) dans le même solvant. Ce procédé a été répété trois fois, ensuite les noyaux ont été rapidement lavés à l'eau distillée, centrifugés, dispersés dans de l'eau distillée (2.5 volumes par volume de sang) et agités pendant une nuit. Toutes ces opérations ont été faites dans une chambre froide à 4°. Le matin suivant la suspension jaunâtre, visqueuse, homogène était employée pour la digestion enzymatique du DNA.

Les diverses préparations enzymatiques brutes d'érythrocytes de poulet obtenues selon le procédé qui vient d'être décrit, montraient une activité comparable.

Les résultats présentés dans ce travail se rapportent à des digestions effectuées avec trois solutions enzymatiques préparées selon la même technique. Nous les appellerons A, B et C.

On a déterminé les contenus en azote et en phosphore ainsi que l'absorption ultraviolette de la préparation C. Les résultats ont été les suivants: N, 0.70 mg/ml; P, 0.15 mg/ml; densité optique (260 m $\mu$ ) 35.

*Digestion enzymatique:* Des échantillons de 15 mg de DNA B2 ont été employés dans les expériences de digestion en solution à 0.05 g % dans du NaCl 0.15 *M*, pH = 5.3. La préparation B1s a été employée en aliquotes de 12 mg à 0.04 g %. A chaque échantillon de solution (30 ml) on a ajouté 1 ml de la préparation enzymatique brute. Le mélange était laissé ensuite en incubation à la température choisie pendant un temps donné. Des témoins étaient préparés en ajoutant aux échantillons de solution de DNA le volume convenable de la préparation enzymatique qui avait été préalablement maintenue pendant 5 min dans un bain d'eau bouillante. Dans quelques cas le DNA employé était dissous dans des tampons de force ionique  $\mu = 0.15$  et de pH différent, dans du NaCl 1 *M* ou dans du NaCl 0.001 *M*.

A la fin de la digestion, les échantillons étaient centrifugés pendant 2 h à 30,000 tours/min et 0°. Une petite quantité de sédiment était présente dans chaque tube. Le surnageant limpide était versé dans des sacs à dialyse et était dialysé contre du NaCl 1 *M*, à 4°. Les échantillons dans le NaCl 1 *M* ou 0.001 *M* étaient d'abord ramenés à 0.15 *M* par dialyse ou par addition de NaCl solide, respectivement, avant d'être clarifiés. Après la dialyse contre le NaCl 1 *M* les échantillons étaient employés pour les mesures physiques et les analyses chimiques.

## RÉSULTATS

Les Figs. 1 et 2 et le Tableau II montrent que des changements très importants des propriétés physiques du DNA ont lieu dans les premières heures de la digestion enzymatique. Une limite est atteinte après 24-48 h à 37°. Des temps de digestion plus longs (jusqu'à 120 h) conduisent à des produits dont les caractéristiques physiques ne montrent pas de différences significatives par rapport aux produits obtenus au bout de 48 h (voir DISCUSSION). La masse moléculaire, le rayon de giration et la dissymétrie varient d'une manière parallèle pendant la digestion. Pour les deux préparations de DNA étudiées les valeurs finalement atteintes sont: masse moléculaire,  $(5.5 \pm 0.5) \cdot 10^5$ ;  $R_z$ , 900 Å;  $z$ , 1.8.

En même temps que la masse moléculaire décroît, la constante de sédimentation chute jusqu'à atteindre une valeur de 5,8 S et la courbe de distribution des constantes de sédimentation se rétrécit remarquablement (Fig. 3). L'élargissement par l'effet de la diffusion brownienne de la courbe de distribution de  $s$  est appréciable dans le DNA dégradé et doit être corrigé par une extrapolation à  $t = \infty$  (Fig. 3). Rappelons que dans le DNA initial l'effet de la diffusion est négligeable.

Enfin, le produit final de digestion présente une grande assymétrie moléculaire

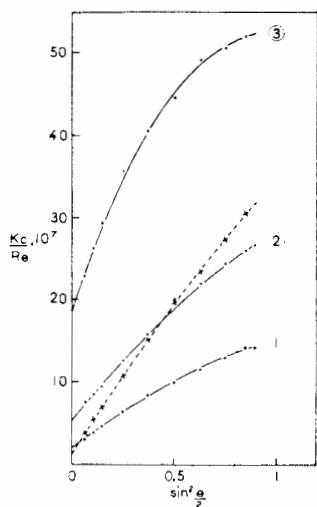


Fig. 1. Effet du temps sur la dégradation du DNA. Courbes limites ( $c = 0$ ) de la diffusion de la lumière du DNA B2, ———, et des échantillons B2 34, 35, 36 (courbes 1, 2, 3) (voir Tableau II).

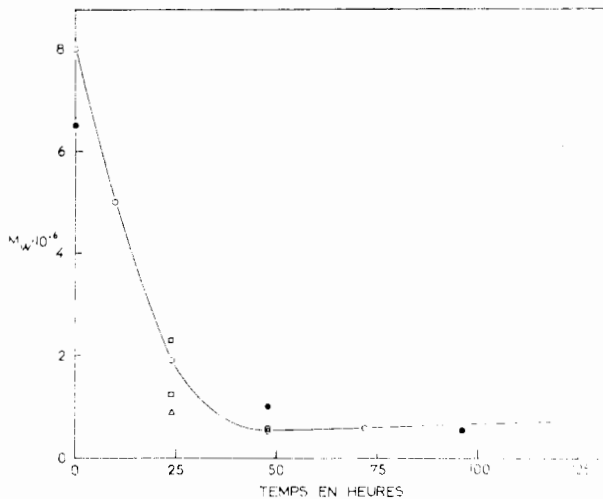


Fig. 2. Effet du temps sur la dégradation du DNA. DNA B2 traité avec les préparations enzymatiques A,  $\Delta$ ; B,  $\square$ ; C,  $\circ$ . DNA B1s traité avec la préparation enzymatique C,  $\bullet$  (voir Tableau II).

TABLEAU II

EFFET DU TEMPS SUR LA DÉGRADATION ENZYMATIQUE DU DNA

La digestion a été effectuée à 37° dans NaCl 0.15 M, pH = 5.3.

Échantillon de DNA	Solution enzymatique	Temps (h)	Masse moléculaire	Rayon de giration (Å)	Dissymétrie
B2 34	C	10	5,000,000	1710	3.0
B2 35	C	24	1,900,000	1360	2.7
B2 36	C	48	525,000	1090	1.8
B2 37	C	72	600,000	1580	1.7
B2 38	C	96	700,000	1320	2.2
B2 39	C	120	700,000	1200	2.1
B2 22	B	48	540,000	890	1.8
B2 23	B*	48	11,000,000	1320	2.8
B1s 40	C	48	1,000,000	1245	2.0
B1s 40a	C**	48	580,000	900	1.8
B1s 41	C	96	520,000	1390	1.5

\* Gardé 5 min à 100°.

\*\* Avec agitation et dialyse contre NaCl 0.15 M.

comme le montre la viscosimétrie. En effet le DNA de départ présente une très forte viscosité intrinsèque mais qui ne dépend pas des gradients de vitesse de l'écoulement tant que ceux-ci sont plus petits que  $10 \text{ sec}^{-1}$ . Dans le DNA dégradé au contraire, la viscosité intrinsèque beaucoup plus faible dépend beaucoup du gradient de vitesse. On constate encore une dépendance très importante pour des gradients extrêmement faibles ( $0.2 \text{ sec}^{-1}$ ).

Il faut rappeler que ces phénomènes sont observés également sur les deux

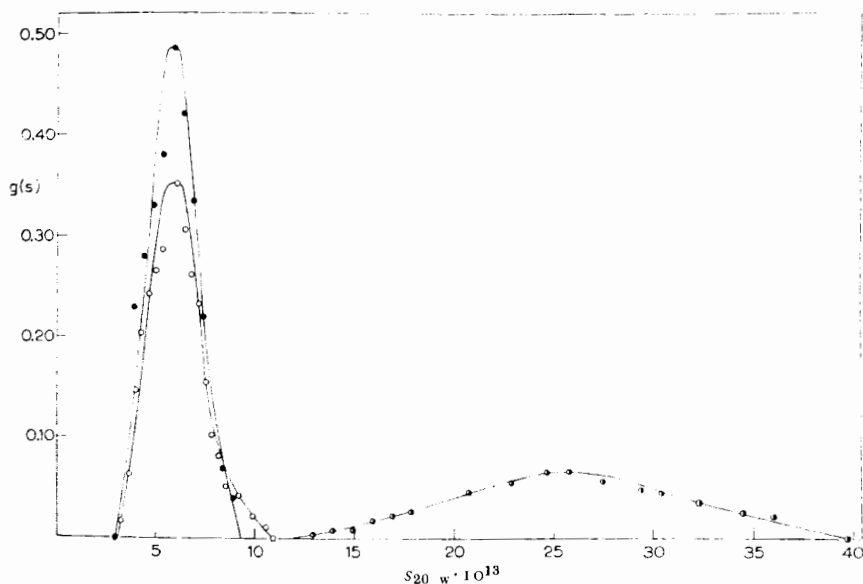


Fig. 3. Courbes de distribution des constantes de sédimentation. DNA B2 après 61 min à 29,500 tours/min, ●—●. Échantillon B2 36 (voir Tableau II) après 65 min à 44,770 tours/min, ○—○, et à  $t = 0$ , ●—●.

TABLEAU III

EFFET DE LA TEMPÉRATURE SUR LA DÉGRADATION ENZYMATIQUE DU DNA

La digestion a été effectuée pendant 24 h dans NaCl 0.15 M, pH = 5.3.

Échantillon de DNA	Solution enzymatique	Température	Masse moléculaire	Rayon de giration (Å)	Dissymétrie
B2 1	A	4	5,500,000	2450	3.7
B2 2	A	22	2,100,000	1670	3.0
B2 4	A*	22	7,300,000	2300	3.6
B2 3	A	37	890,000	1050	2.2
B2 5	A*	37	7,300,000	1730	3.0
B2 20	B	37	1,250,000	1095	2.4
B2 21	B*	37	10,000,000	1435	2.7
B2 35	C	37	1,900,000	1360	2.7
B1s 11	A	22	4,000,000	1815	3.4
B1s 12	A*	22	6,900,000	1790	3.0
B1s 24	B	37	2,300,000	1134	2.4
B1s 25	B*	37	8,400,000	1340	2.5

\* Gardé 5 min à 100°.

échantillons mais que dans le cas de la préparation B1s (thymus de veau) la dégradation est plus lente que dans celui de la préparation B2 (érythrocytes de poulet). Toutefois les produits finaux de digestion sont semblables.

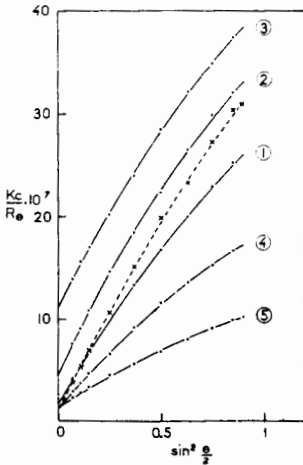


Fig. 4. Effet de la température sur la dégradation enzymatique du DNA. Courbes limites ( $c = 0$ ) de la diffusion de la lumière du DNA B2, -----, et des échantillons B2 1, 2, 3, 4, 5 (voir Tableau III).

Les échantillons de DNA traités avec la solution enzymatique portée pendant 5 min à  $100^\circ$  ne montrent aucune variation significative de la masse moléculaire. Cependant on observe une diminution du rayon de giration et de la dissymétrie (Fig. 4 et Tableaux II et III).

Dans le but d'obtenir des renseignements préliminaires portant sur les propriétés de l'enzyme on a effectué des digestions dans des conditions expérimentales différentes.

L'effet de la température a été étudié en employant un temps de digestion constant (24 h) et du NaCl 0.15 M, pH = 5.3 comme solvant. Les résultats obtenus pour trois

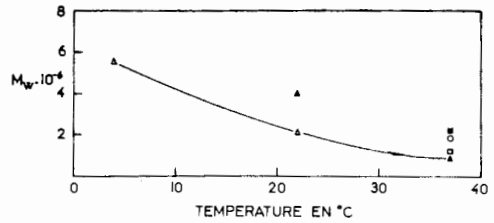


Fig. 5. Effet de la température sur la dégradation enzymatique du DNA. DNA B2 traité avec les solutions enzymatiques A,  $\Delta$ ; B,  $\square$ ; C,  $\circ$ . DNA B1s traité avec les solutions enzymatiques A,  $\blacktriangle$ ; B,  $\blacksquare$  (voir Tableau III).

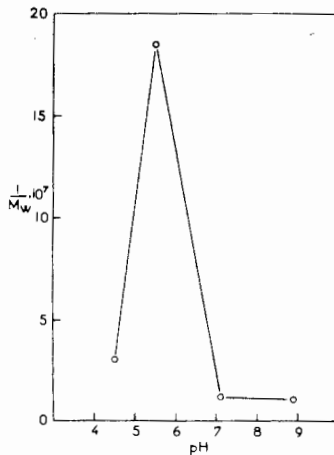


Fig. 6. Effet du pH sur la dégradation enzymatique du DNA (voir Tableau IV).

températures différentes, 4°, 22° et 37° sont montrés dans les Figs. 4 et 5 et dans le Tableau III. L'effet du pH, à une force ionique  $\mu = 0.15$ , est montré dans la Fig. 6 et dans le Tableau IV. Un optimum très marqué de pH se trouve dans le voisinage de pH = 5.5, tandis qu'aux pH  $\geq 7.0$  l'action enzymatique est totalement supprimée. L'effet de la force ionique à un pH = 5.3 est aussi montré dans le Tableau IV. A des forces ioniques  $\mu = 0.001$  et  $\mu = 1.0$  aucune action enzymatique n'a été relevée. Une très importante inhibition de l'activité a été trouvée après addition de  $MgCl_2$  0.03 M au solvant du DNA (NaCl, 0.15 M; pH, 5.3) (voir Tableau IV).

TABLEAU IV

EFFET DU pH ET DE LA FORCE IONIQUE SUR LA DÉGRADATION ENZYMATIQUE DU DNA

La digestion a été effectuée à 37° pendant 24 h avec la solution enzymatique C sauf pour l'échantillon B2 15, qui a été digéré avec la solution B.

Échantillon de DNA	pH	Force ionique	Masse moléculaire	Rayon de giration (Å)	Dissymétrie
B2 28	4.5*	0.15	3,300,000	2090	3.2
B2 29	5.5*	0.15	540,000	850	1.8
B2 30	7.1**	0.15	8,000,000	1540	3.2
B2 31	8.9***	0.15	9,300,000	1560	3.0
B2 32	5.3§	0.001	6,000,000	2420	2.8
B2 33	5.3§	1.0	8,000,000	2200	3.0
B2 15	5.3§§	0.2	5,000,000	1730	2.8

\* Tampon acétate.

\*\* Tampon phosphate.

\*\*\* Tampon véronal.

§ NaCl.

§§ NaCl + 0.03 M  $MgCl_2$ .

Après la clarification des mélanges de digestion (voir *digestion enzymatique*) les courbes d'absorption ultraviolette de tous les échantillons de DNA ont été enregistrées. Les densités optiques à 260 m $\mu$  ont été trouvées égales à 90–100 % de celles montrées par les solutions de DNA de départ. Ces valeurs ne montrent aucune variation pouvant être mise en corrélation avec le temps de digestion. Après la dialyse contre le NaCl 1 M, les échantillons digérés ont été ramenés à un volume donné, leurs spectres ont été enregistrés à nouveau, leur teneur en phosphore a été mesurée et les valeurs de  $\epsilon$  (P) ont été calculées. Ces mesures ont montré que le DNA était finalement récupéré avec un rendement de 80–90 % et que aucun effet hyperchromique n'était décelable. D'après les résultats qui viennent d'être décrits il paraît que la dialyse contre le NaCl 1 M est suivie d'une perte de DNA. Toutefois la première valeur (90–100 %) est exprimée en termes de concentration et la deuxième (80–90 %) est exprimée en termes de quantité de DNA. Pourtant toute perte mécanique pendant la manipulation des échantillons apparaîtra dans la deuxième valeur. Ensuite, il semble que la première valeur est plus haute à cause de la contribution à l'absorption de produits dialysables dérivés du groupe prostétique de l'hémoglobine (les mêmes produits qui ont été trouvés dans les dialysats du mélange de digestion; voir plus bas). Cette conclusion est confirmée par le fait qu'on a trouvé les rapports de densité optique 220/260 plus hauts avant dialyse qu'après dialyse.

Dans le but de contrôler si des nucléotides dialysables étaient formés au cours

de la digestion enzymatique, deux quantités relativement importantes de DNA (120 mg de B1s et 150 mg de B2 chacun dans 300 ml de NaCl 0.15 M) étaient mises à digérer à 37° avec 10 ml de la préparation enzymatique C. Le tout était maintenu pendant 48 h dans un sac à dialyse, avec agitation et au contact à l'extérieur avec 200 ml de NaCl 0.15 M qui étaient renouvelés une fois au cours de l'opération. Un témoin renfermant seulement la préparation enzymatique était traité de la même façon. A la fin de la digestion les dialysats réunis étaient concentrés à 30 ml à 60° sous pression réduite. Les solutions jaunâtres et troubles étaient clarifiées par centrifugation et leurs spectres étaient enregistrés. Aucune différence significative n'était trouvée entre le dialysat du témoin et les deux dialysats des DNA. La courbe d'absorption ne montrait aucun maximum dans la région 220–300 m $\mu$ , mais l'absorption augmentait vers les courtes longueurs d'onde, particulièrement en-dessous de 240 m $\mu$ . En tout cas, on a calculé que même en admettant que l'absorption à 260 m $\mu$  des dialysats des échantillons B1s et B2 était due à la présence de nucléotides, ceux-ci ne pouvaient représenter plus de 1% du DNA traité.

#### DISCUSSION

Les résultats donnés ci-dessus peuvent être interprétés en supposant qu'il existe dans les préparations d'érythrocytes de poulet un enzyme capable de dégrader le DNA. On ne peut rien dire jusqu'à présent sur la nature de cet enzyme. Les possibilités qu'on peut envisager étant représentées d'un côté par un enzyme attaquant les liaisons phosphodiester avec une spécificité particulière vis-à-vis des séquences des bases, de l'autre par un enzyme attaquant des liaisons non-nucléotidiques. Il est raisonnable de considérer dans ce deuxième cas surtout la possibilité d'un enzyme protéolytique attaquant les peptides résiduels<sup>17</sup> qui auraient dans ce cas une signification structurelle.

Il faut souligner toutefois qu'en plus de l'enzyme les préparations d'érythrocytes de poulet contenaient des nucléoprotéines et des protéines. Sur la base de l'absorption ultraviolette et de l'analyse de phosphore et d'azote on a estimé que la quantité de nucléoprotéines, provenant de la préparation enzymatique et ajoutée à chaque échantillon de DNA était égale à environ 25% de la quantité de ce dernier, tandis que la quantité de protéines était égale à environ 10%.

La nucléoprotéine a été éliminée par l'emploi de NaCl 0.15 M comme solvant; dans ce milieu elle donne un précipité qui est enlevé à la fin de la digestion par centrifugation. En vue de se débarrasser préalablement de la nucléoprotéine présente dans la préparation enzymatique celle-ci était dialysée contre du NaCl 0.15 M avant tout essai de digestion et clarifiée par centrifugation. Aucune activité enzymatique n'a été retrouvée dans le surnageant. On doit donc penser que l'enzyme copécipite avec la nucléoprotéine ou bien qu'un co-facteur enzymatique est perdu au cours de la dialyse.

Le deuxième contaminant présent dans la préparation enzymatique est constitué par des protéines. On doit supposer que celles-ci aussi ont été éliminées, en grande partie du moins, par copécipitation avec une partie du DNA en milieu NaCl 0.15 M. En effet le DNA a été récupéré avec un rendement de 80 à 90% à la fin de la digestion et comme on n'a pas trouvé formation de nucléotides dialysables on est amené à penser que du DNA a disparu par précipitation avec la protéine. En outre le rapport des densités optiques à 280 et 260 m $\mu$  est le même que dans le DNA de départ.



Il peut être intéressant de rappeler qu'en dialysant à fond la préparation enzymatique brute contre de l'eau distillée on a obtenu un précipité protéique (la nucléoprotéine reste dans le surnageant) et encore une fois aucune activité enzymatique n'était présente dans la solution après clarification.

D'après les données des mesures physiques présentées plus haut (voir RÉSULTATS) il paraît que les effets fondamentaux de la dégradation enzymatique du DNA sont doubles; changement de la masse moléculaire et changement de la forme. On a vu que la diffusion de la lumière indique une chute de la masse moléculaire du DNA au cours de la digestion enzymatique jusqu'à une valeur de  $(5.5 \pm 0.5) \cdot 10^5$ . Les valeurs légèrement plus élevées qu'on retrouve au bout de temps de digestion très longs (96 et 120 h) sont vraisemblablement à attribuer à des phénomènes secondaires dus à la présence des protéines dans le mélange de digestion.

Avec le changement de masse on a un changement de forme du DNA. Cela apparaît sur les résultats obtenus par diffusion de la lumière. Représentons par exemple les valeurs de  $(kc/R_\theta)_{c=0}$  en fonction de  $\sin \theta/2$  (Fig. 7). Ce diagramme montre que les particules de DNA dégradé sont vraisemblablement des bâtonnets tous pratiquement de la même longueur.

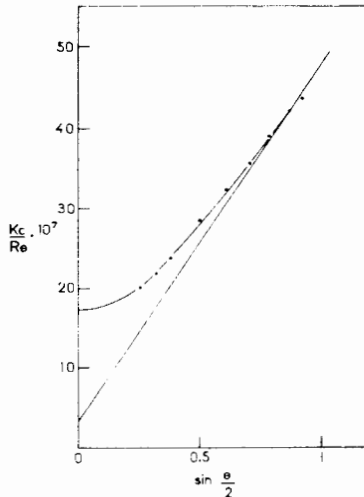


Fig. 7. Courbe limite ( $c = 0$ ) de la diffusion de la lumière de l'échantillon B1s 40a (voir Tableau II).

En effet la courbe obtenue est sensiblement identique à celle que l'on peut calculer théoriquement pour une solution monodisperse de bâtonnets de masse moléculaire  $(5.5 \pm 0.5) \cdot 10^5$  et dont la masse par unité de longueur est  $M/L = 200 \pm 20 \text{ \AA}$ . Cette courbe est caractérisée, on le sait<sup>13</sup>, par l'existence d'une asymptote rectiligne dont l'ordonnée à l'origine a pour valeur  $\pi^2/2M_n$ , c'est-à-dire environ 5 fois plus petite que la valeur  $1/M_w$  déterminée par extrapolation à  $\theta = 0$ . Les valeurs expérimentales de  $M_w$  (tirées de l'extrapolation à  $\theta = 0$ ) et de  $M_n$  (tirées de l'ordonnée à l'origine de l'asymptote) sont pratiquement égales, ce qui indique que la polydispersité est peu importante.

Il est important de souligner que la valeur de  $M/L$  obtenue est en parfait accord avec celle du modèle de WATSON ET CRICK<sup>18</sup>.

La constante de sédimentation trouvée pour le DNA dégradé (5.8 S) est assez proche de la valeur théorique égale à 8 S calculée pour une solution de bâtonnets ayant la masse moléculaire et les caractéristiques géométriques indiquées par la diffusion de la lumière. L'écart entre les deux valeurs doit pourtant être souligné.

Enfin les données viscosimétriques sont en accord avec les conclusions tirées des autres techniques physiques.

Il est évident que beaucoup de travail est encore nécessaire pour préciser la nature de l'enzyme, dont nous pensons avoir montré l'existence, son mécanisme d'action, la nature des points sensibles de la particule de DNA et enfin la morphologie du produit final. Ces problèmes ainsi que ceux que posent la détermination de la nature des groupes en bout de chaîne du DNA dégradé et les propriétés biologiques de ce dernier font l'objet de recherches actuellement poursuivies.

Toutefois il apparaît que les résultats présentés dans cette publication autorisent à supposer que la particule originelle de DNA (de masse de 6 à 8 millions) est constituée par des sous-unités pratiquement rectilignes et de même longueur, ayant la structure de la double hélice, et reliées les unes aux autres—probablement bout à bout—par des ponts souples dont la nature chimique reste encore inconnue.

L'effet de l'enzyme serait, en coupant ces ponts, de libérer les sous-unités que nous avons caractérisées dans leurs grandes lignes.

Il faut enfin remarquer qu'une telle structure du DNA est conforme aux conclusions que l'on peut tirer de l'étude physique de ses solutions, notamment par le moyen de la diffusion de la lumière<sup>19</sup>.

#### RÉFÉRENCES

- <sup>1</sup> C. SADRON ET J. POUYET, dans O. HOFFMAN-OSTENHOF, *Proceedings of the Fourth International Congress of Biochemistry, Vienna 1958*, Vol. IX, Pergamon Press, London, 1959, p. 52.
- <sup>2</sup> G. ZUBAY ET P. DOTY, *J. Mol. Biol.*, 1 (1959) 1.
- <sup>3</sup> M. CHAMPAGNE, en préparation.
- <sup>4</sup> C. SADRON, dans C. LIÉBECQ, *Proceedings of the Third International Congress of Biochemistry, Brussels, 1955*, Academic Press, New York, 1956, p. 125.
- <sup>5</sup> D. O. JORDAN, dans E. CHARGAFF ET J. N. DAVIDSON, *The Nucleic Acids*, Vol. 1, Academic Press, New York, 1955, p. 470.
- <sup>6</sup> G. BERNARDI, M. CHAMPAGNE ET C. SADRON, *Nature*, 188 (1960) 228.
- <sup>7</sup> A. P. BRIGGS, *J. Biol. Chem.*, 53 (1922) 13.
- <sup>8</sup> H. KAHLER, *J. Phys. Colloid Chem.*, 52 (1948) 676.
- <sup>9</sup> T. W. WILLIAMS, R. L. BALDWIN, W. M. SAUNDERS ET P. G. SQUIRE, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 1542.
- <sup>10</sup> R. L. BALDWIN, *J. Phys. Chem.*, 58 (1954) 1081.
- <sup>11</sup> C. WIPPLER ET G. SCHEIBLING, *J. Chem. Phys.*, 51 (1954) 201.
- <sup>12</sup> B. H. ZIMM, *J. Chem. Phys.*, 16 (1948) 1093; 1099.
- <sup>13</sup> A. M. HOLTZER, *J. Polymer Sci.*, 17 (1955) 432.
- <sup>14</sup> E. F. CASASSA, *J. Chem. Phys.*, 23 (1955) 596.
- <sup>15</sup> G. BERNARDI, en préparation.
- <sup>16</sup> E. CHARGAFF ET S. ZAMENHOF, *J. Biol. Chem.*, 173 (1948) 327.
- <sup>17</sup> J. A. V. BUTLER, D. M. PHILLIPS ET K. V. SHOOTER, *Arch. Biochem. Biophys.*, 71 (1951) 423.
- <sup>18</sup> J. D. WATSON ET F. H. C. CRICK, *Nature*, 171 (1953) 737.
- <sup>19</sup> C. SADRON, *XI<sup>e</sup> Conseil de Chimie Solvay, Bruxelles, 1959*.