

## N° 46. — EFFETS DES FORCES DE CISAILLEMENT SUR DES MOLÉCULES D'ACIDE DÉSOXYRIBONUCLÉIQUE AVEC « RUPTURES LATENTES »,

par GIORGIO BERNARDI et CHARLES SADRON

[*Centre de Recherches sur les Macromolécules, Strasbourg.*]

(Manuscrit reçu le 2.12.63.)

On a constaté expérimentalement que les forces de cisaillement peuvent réduire considérablement la masse des molécules d'acide désoxyribonucléique (DNA) en solution (1, 2). Cet effet a été considéré du point de vue théorique par KUHN (3). On a suggéré (4), en assimilant la molécule de DNA à un bâtonnet, que la force maximum développée sur une molécule par des gradients de vitesse augmente en fonction du carré de la masse. Les ruptures produites par les forces de cisaillement conduiraient à une distribution étroite de masses parce qu'elles doivent être plus fréquentes près du milieu des molécules, où les forces sont plus grandes (5).

En relation avec un travail sur la dégradation du DNA par la désoxyribonucléase (DNase) acide (6, 7) en cours à présent dans notre laboratoire, il nous a semblé intéressant d'étudier l'effet des forces de cisaillement sur des molécules de DNA dans lesquelles des « ruptures latentes » (« hidden breaks ») avaient été introduites par une digestion ménagée de très courte durée avec de la DNase pancréatique. Il est connu que cet enzyme hydrolyse au hasard les liaisons phosphodiesteriques des deux brins (« strands ») du DNA et qu'une décroissance de la masse du DNA ne commence que lorsqu'un certain nombre de « ruptures latentes » ont eu lieu (8, 9). Nous allons donner ici brièvement quelques résultats préliminaires.

Le DNA a été préparé à partir d'érythrocytes de poulet par une modification de la méthode au détergent (10). La DNase pancréatique cristalline était un produit commercial (Worthington, Frechold, N. J., U.S.A.). Plusieurs échantillons de 30 ml de DNA (140 µg/ml) en tampon acétate 0,2 M, pH = 5,5, contenant du MgCl<sub>2</sub> 0,02 M, ont été digérés à 22 °C directement dans les cuves de diffusion de la lumière avec des quantités identiques d'enzyme (concentration finale environ 0,15 µg/ml). Après 12 mn de digestion et avant que le moindre changement dans la diffusion de la lumière ait eu lieu, l'action enzyma-

lique était arrêtée dans un certain nombre d'échantillons en les émulsifiant avec un volume de chloroforme-alcool isoamylique (5 : 1 ; v/v) (11). Le même traitement a été appliqué à quelques échantillons utilisés comme témoins. Dans d'autres échantillons l'hydrolyse était continuée pour pouvoir estimer la durée du temps de latence. Nous l'avons trouvée égale à 24 mn.

Le traitement mécanique du DNA était effectué à 4 °C sur des volumes égaux soit des échantillons partiellement digérés soit des témoins, en les mélangeant à un volume égal de chloroforme-alcool isoamylique dans un mixeur Turmix tournant à pleine vitesse pendant 30 s. Nous avons ensuite déterminé la masse moléculaire des échantillons ainsi traités par diffusion de la lumière. Des résultats typiques sont présentés dans le tableau suivant :

Échantillons	$M_w \cdot 10^{-6}$	$R_g(\text{Å})$
1) Non digéré, non traité mécaniquement .	6,6	2 500
2) Non digéré, traité mécaniquement . . . .	1,9	1 430
3) Digéré, traité mécaniquement . . . . .	1,3	1 190

Il est évident que les échantillons partiellement digérés montrent, à la suite du traitement mécanique, une diminution de la masse qui est plus importante que pour les témoins non digérés. Il faut remarquer que les masses moléculaires qui figurent dans les deux dernières lignes du tableau sont des masses moléculaires limites qui n'auraient pas été modifiées par un traitement mécanique plus prolongé.

Les « ruptures latentes » modifient donc la résistance mécanique des molécules de DNA, bien qu'elles ne provoquent aucun changement ni de masse ni de rayon de gyration.

N'ayant pas effectué de mesures de titration il nous est impossible de connaître exactement le nombre de « ruptures latentes » provoquées par l'action enzymatique. D'après les données de THOMAS<sup>(8)</sup> et de SCHUMAKER, RICHARDS et SCHACHMAN<sup>(9)</sup> on peut estimer ce nombre à 25-50 par molécule de DNA. Or le nombre de ruptures effectives provoquées par les forces de cisaillement dans les échantillons traités par l'enzyme est d'environ 4,1 par molécule, contre environ 2,5 par molécule dans les échantillons non digérés. On trouve ainsi par molécule environ 1,6 ruptures liées à l'action enzymatique alors que le nombre de « ruptures latentes » est beaucoup plus grand. Il est donc possible que seules les « ruptures latentes » proches du centre de la molécule jouent le rôle de points faibles.

En ce qui concerne le mécanisme de cette rupture on peut envisager deux possibilités : ou bien elle porte sur les liaisons phosphodiesteriques situées en face des « ruptures latentes », ou bien elle est due au clivage des liaisons d'hydrogène interposées entre

deux « ruptures latentes » situées à proximité sur les deux brins de la double hélice. Il est impossible à présent de choisir entre ces deux mécanismes.

## BIBLIOGRAPHIE

- (1) L. F. CAVALIERI et B. H. ROSENBERG. — *J. amer. chem. Soc.*, 1959, **81**, 5136.
- (2) P. F. DAVISON. — *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1959, **45**, 1560.
- (3) W. KUHN. — XI<sup>e</sup> Conseil de Chimie Solvay, Bruxelles, 1959.
- (4) C. LEVINTHAL. — *Trans. Ist Conference on Genetics*, Josiah Macy, Jr, Foundation, 1960, p. 39.
- (5) A. D. HERSHEY et E. BURGI. — *J. Mol. Biol.*, 1960, **2**, 143.
- (6) G. BERNARDI et C. SADRON. — *Nature*, 1961, **191**, 809.
- (7) G. BERNARDI et C. SADRON. — « A. BASELLI » Conference on Nucleic Acids and their Role in Biology, Milan, 1963 (sous presse).
- (8) C. A. THOMAS, JR. — *J. amer. chem. Soc.*, 1956, **78**, 1861.
- (9) V. N. SCHUMAKER, E. G. RICHARDS et H. K. SCHACHMAN. — *J. amer. chem. Soc.*, 1956, **78**, 4230.
- (10) E. R. M. KAY, N. SIMMONS et A. L. DOUNCE. — *J. amer. chem. Soc.*, 1952, **74**, 1724.