

**MÉCANISME D'ACTION ET STRUCTURE
DE QUELQUES DÉSOXYRIBONUCLÉASES.**

par Giorgio BERNARDI.

Centre de Recherches sur les Macromolécules, Strasbourg.

Les recherches sur les désoxyribonucléases ont connu, au cours de ces dernières années un développement très important. Notre laboratoire a participé activement à ces recherches qui sont justifiées, à notre avis tout au moins, essentiellement par l'intérêt des problèmes suivants :

a) *La reconnaissance des structures (primaire et secondaire) du DNA*, et des acides nucléiques en général, par des protéines spécifiques ; ce problème, dont l'importance en biologie moléculaire est primordiale, peut être abordé avantageusement en étudiant les interactions désoxyribonucléases-acides nucléiques et la spécificité de ces enzymes vis-à-vis des séquences des nucléotides dans le DNA ; par rapport à d'autres protéines spécifiques telles que les DNA polymérases, les RNA polymérases, les méthylases, les enzymes de glucosylation du DNA et les aminoacyl-t-RNA-synthétases, les désoxyribonucléases présentent plusieurs avantages : elles sont des petites protéines, disponibles en quantités importantes, et leurs propriétés physiques et chimiques sont assez bien connues, dans quelques cas tout au moins.

b) *L'anatomie moléculaire du DNA*, c'est-à-dire la séquence de l'information contenue dans le genome ; on peut envisager d'étudier ce problème à des niveaux de résolution très différents et donc par des méthodes très différentes ; en tout cas il est essentiel de disposer d'enzymes ayant une spécificité bien définie vis-à-vis de la structure primaire et secondaire du DNA, ainsi que de techniques de séparation permettant de résoudre et d'analyser les fragments obtenus ; c'est dans cette optique que nous avons développé dans notre laboratoire de nouvelles techniques d'analyse et de séparation telles que la chromatographie des acides nucléiques sur colonnes d'hydroxyapatite [1] et la chromatographie des bases et des nucléosides sur colonnes de polyacrylamide [2].

c) *Les rôles biologiques des désoxyribonucléases* : ceux-ci sont encore très mal connus et certainement il est nécessaire que nos connaissances dans ce domaine fassent beaucoup de progrès pour que nous puissions mieux comprendre des mécanismes biologiques fondamentaux tels que la recombinaison génétique, la réparation et la replication du DNA.

Nous nous bornerons ici à résumer très brièvement des résultats portant sur deux seulement des sujets dont nous nous sommes occupés : le

mécanisme d'action et la structure de la DNase acide (DNase II de quelques auteurs), un enzyme qui semble être présent dans toutes les cellules des organismes eukariotes. Au passage, nous comparerons les propriétés de la DNase acide avec celles d'autres désoxyribonucléases.

Une revue plus détaillée portant sur ce même sujet paraîtra ailleurs [3].

I. Mécanisme d'action.

La manière dont les désoxyribonucléases attaquent le DNA peut être comprise en étudiant la cinétique et la statistique de la dégradation du DNA par ces enzymes. Les méthodes d'étude sont principalement les méthodes physiques capables de nous donner une idée des propriétés macromoléculaires du DNA au cours de la dégradation, telles que la viscosimétrie, la sédimentation, la diffusion de la lumière, la microscopie électronique.

Nous exposerons ici brièvement les résultats concernant la cinétique et la statistique de la dégradation initiale du DNA natif par quelques désoxyribonucléases, ainsi que des données concernant l'interaction DNases-polynucléotides.

Cinétique de la dégradation enzymatique.

La cinétique de dégradation du DNA natif par les désoxyribonucléases a été étudiée seulement dans le cas de quatre enzymes : la DNase pancréatique, la DNase acide de plusieurs tissus et espèces, la DNase d'*Escherichia coli* et la DNase de *Diplococcus pneumoniae*.

Tous ces enzymes agissent seulement sur le DNA (avec une préférence pour le DNA natif) selon un mécanisme exclusivement endonucléolytique, avec formation d'oligonucléotides de grandes dimensions moyennes (sauf dans le cas de la DNase pancréatique) portant un groupement phosphate en position 5' (sauf dans le cas de la DNase acide). La DNase acide a un pH optimum de 5,8, à une force ionique égale à 0,15, et n'a pas besoin de cations divalents pour son activité ; les trois autres enzymes ont un pH optimum proche de la neutralité et n'agissent qu'en présence de Mg^{2+} .

Le Tableau I résume des résultats obtenus dans notre laboratoire avec ces enzymes.

DNase pancréatique : La dégradation initiale du DNA natif par la DNase pancréatique a été étudiée par THOMAS [6], SCHUMAKER et coll. [4] et, ensuite, par BERNARDI et SADRON [7, 8] et YOUNG et SINSHEIMER [9]. La phase initiale de la digestion est caractérisée par un temps de latence, (fig. 1), pendant lequel des ruptures de liaisons phosphodiesteriques ont lieu, comme il est montré par des mesures de titration, sans que la masse moléculaire et le rayon de giration ne varient.

En représentant, selon SCHUMAKER et coll. [4], les données expérimentales obtenues dans la dégradation du DNA natif par la DNase pancréatique, on peut montrer que le nombre apparent des chaînes n est égal à 1,7 - 2,0 (fig. 2). Cela signifie que l'enzyme dégrade les molécules de DNA natif selon une cinétique à deux coups, en introduisant des ruptures au

TABLEAU I.

Mécanisme d'attaque dans les dégradations enzymatiques du DNA natif.

Enzyme	Nombre apparent des chaînes (a)	
	Diffusion de la lumière	Viscosimétrie
DNase pancréatique.....	1.7 — 2.0 (b,c)	1.5 ± 0.1 (c,d,e)
DNase acide de la rate de porc.....	1.0 ± 0.1 (b,g)	1 ± 0.1 (dt,g)
DNase de <i>E. coli</i>	1.0 ± 0.1 (d,h)	1 ± 0.1 (c,d)
DNase de <i>D. pneumoniae</i>		1 ± 0.1 (h,i)

(a) Le nombre apparent des chaînes n , a été calculé à partir de l'équation suivante [4, 5] :

$$\log (1-R)/R = n \log t + \text{const} \quad (1)$$

R est égale à M_t/M_0 ou à η_t/η_0 , M_t , M_0 , η_t , η_0 étant les masses moyennes en poids ou les viscosités réduites (à un gradient de vitesse d'environ 45 sec⁻¹) aux temps t et 0 de digestion, respectivement.

(b) Données de BERNARDI et SADRON [8].

(c) Solvant : tampon acétate 0,1 M, pH 5,0 + Mg Cl₂ 0,02 M.

(d) Données de BERNARDI et CORDONNIER [17].

(e) Une valeur plus faible que la valeur théorique ($n = 2$) a été trouvée, par viscosimétrie, aussi par SCHUMAKER et coll. [4].

(f) Les mêmes résultats ont été obtenus avec des DNases acides extraites de la rate et du thymus de veau, de l'épithéliome mammaire de souris, des érythrocytes de poulet et de porc, de l'urine humaine et de l'invertébré *M. mercenaria* [12].

(g) Solvant : tampon acétate 0,15 M, pH 5,0 + EDTA 0,01 M.

(h) Solvant : tampon tris 0,066 M pH 7,5 + Mg Cl₂ 0,006 M.

(i) Solvant : tampon tris 0,01 M pH 7,5 + Mg Cl₂ 0,005 M.

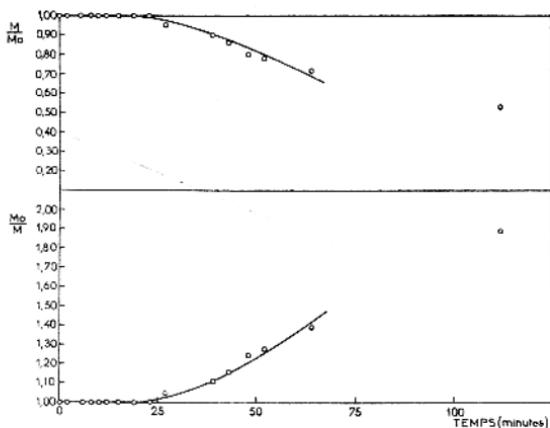


Fig. 1. — Digestion de l'échantillon de DNA B 11/2 (érythrocytes de poulet avec de la DNase pancréatique. BERNARDI et SADRON, [8]). Les cinétiques montrées dans les figures 1-5 ont été étudiées par diffusion de la lumière.

hasard sur l'une ou l'autre des deux chaînes ; la diminution de la masse moléculaire ne commence que lorsque deux ruptures ont lieu l'une vis-à-vis (ou presque vis-à-vis) de l'autre. Nous avons suggéré [3] d'appeler « haplotomique » ce mécanisme de rupture d'une chaîne à la fois.

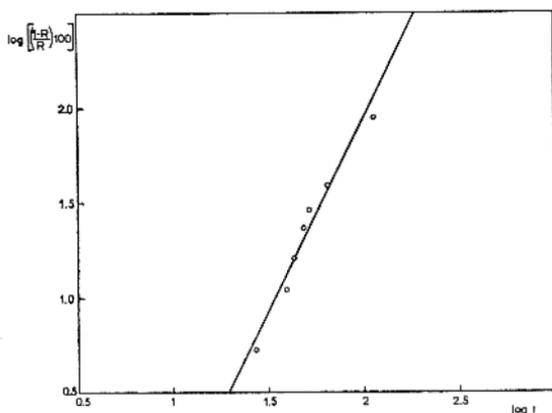


FIG. 2. — Digestion de l'échantillon de DNA B 11/2 (érythrocytes de poulet) avec de la DNase pancréatique. Les données de la figure précédente sont représentées selon SCHUMAKER et coll. [4] (BERNARDI et SADRON, [8]). Voir équation (1) dans le Tableau I.

DNase acide : A la différence de la DNase pancréatique, la DNase acide de la rate dégrade initialement le DNA natif selon une cinétique à un coup. Ceci a été d'abord suggéré par OTH, FREDERICQ et HACHA [10], en-

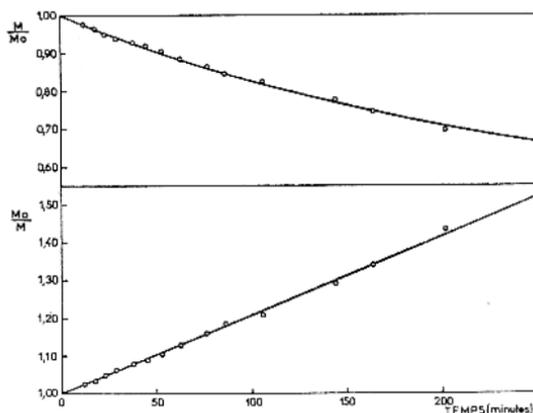


FIG. 3. — Digestion de l'échantillon du DNA B6z N/1 (érythrocytes de poulet) avec de la DNase acide. (BERNARDI et SADRON, [8]).

suite démontré rigoureusement par BERNARDI et SADRON [7, 8 ; figures 3 et 4], et enfin confirmé par YOUNG et SINSHEIMER [9]. Comme cette cinétique est due à la rupture simultanée des deux chaînes du DNA au même

niveau [8, 9], on peut appeler « diplotomique » ce mécanisme de rupture [3]. En fait, la dégradation par la DNase acide de la rate est caractérisée par l'absence d'un temps de latence (fig. 3), et, lorsque les données ciné-

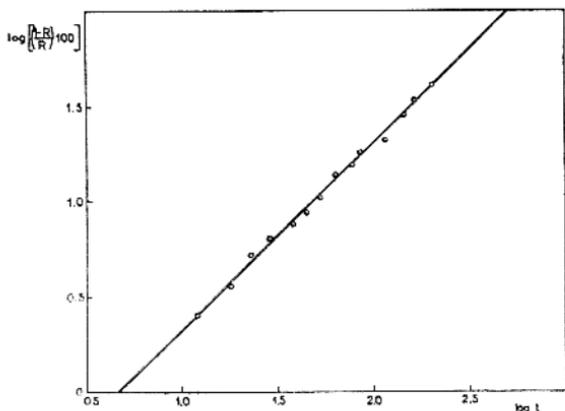


FIG. 4. — Digestion de l'échantillon de DNA B6z N/1 (érythrocytes de poulet) avec de la DNase acide. Les données de la figure précédente sont représentées selon SCHUMAKER et coll. [4]. (BERNARDI et SADRON, [8]).

tiques sont représentées selon l'équation (1) (voir Tableau I), le nombre apparent des chaînes, n , est égal à 1 (fig. 4).

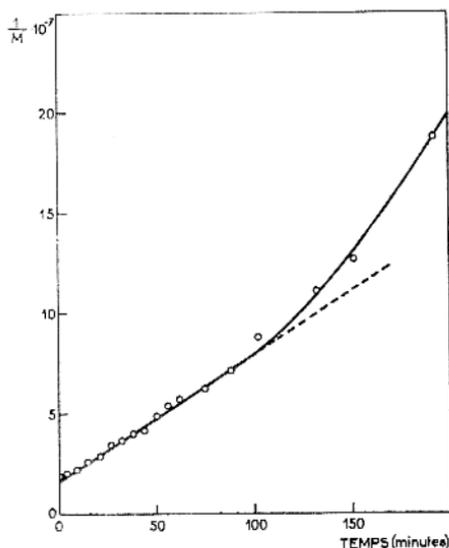


FIG. 5. — Digestion de l'échantillon de DNA B 13/46 (érythrocytes de poulet) avec de la DNase acide. (BERNARDI et SADRON, [8]).

La cinétique à un coup obtenue avec la DNase acide, a été trouvée dans tous les cas étudiés jusqu'ici dans notre laboratoire par des techniques

diverses, malgré les différentes origines, préparations et concentrations tant du DNA que de l'enzyme [8, 11, 12].

Contrairement aux suggestions de quelques auteurs [9, 13], la DNase acide de la rate ne dégrade pas le DNA natif seulement selon une cinétique à un coup, mais aussi bien selon une cinétique à deux coups, ainsi que le montrent les résultats suivants :

a) Si l'on suit la dégradation pour un temps suffisamment long, on peut voir que l'augmentation linéaire initiale de $\frac{1}{M}$ en fonction du temps de digestion, est suivi par une relation d'ordre supérieur (fig. 5) lorsqu'une masse d'environ 1.10^6 est atteinte. Comme l'hydrolyse des liaisons phosphodiesteriques est linéaire en fonction du temps [14], ce résultat est incompatible avec l'existence d'une cinétique diplotomique pure et simple et peut être expliquée par la superposition de deux différents mécanismes de dégradation ; l'un d'eux, le mécanisme diplotomique, est immédiatement efficace pour ce qui concerne la diminution de la masse, tandis que l'autre, le mécanisme haplotomique, ne devient efficace qu'après un temps de latence.

b) Les données de titration [14] montrent que pour une diminution donnée de la masse du DNA, le nombre de liaisons rompues est plus grand que prévu pour une cinétique diplotomique, mais aussi beaucoup plus petit que prévu pour une cinétique haplotomique. En effet, on a trouvé que 10 à 20 ruptures (au maximum) étaient nécessaires pour réduire la masse (moyenne en poids) de chaque molécule de 6.10^6 , à une valeur moitié tandis que 200 ruptures sont nécessaires dans une dégradation à deux coups [6] et 6 (3 scissions) dans une dégradation à un coup pour obtenir le même résultat. Les données de titration obtenues pendant la dégradation du DNA natif par la DNase acide de la rate à pH 5.0 permettent, donc, d'estimer le rapport r du nombre total de liaisons rompues à celui des liaisons rompues par le mécanisme diplotomique comme compris entre 1.7 et 3.3.

c) Le rapport r peut être estimé à partir des mesures de masses d'échantillons de DNA, obtenues au cours de la dégradation enzymatique ; ces mesures sont effectuées soit à l'état natif, soit à l'état dénaturé. On exploite le fait que la séparation des chaînes qui intervient à la suite de la dénaturation, met en évidence les « ruptures latentes ». Ce rapport peut être calculé [15] comme compris entre 1.45 et 1.9, et 1.2 et 1.6, respectivement, à partir des données de BERNARDI et SADRON [8] et YOUNG et SINSHEIMER [9] (Tableau II). On arrive donc à un résultat en bon accord avec celui qu'on a obtenu à partir des mesures de titration.

DNase de E. coli : Le troisième enzyme pour lequel des données cinétiques sont disponibles est la DNase de *E. coli* (endonucléase I de LEHMAN, ROUSSOS et PRATT [15]). BERNARDI et CORDONNIER [17] ont pu montrer que cet enzyme dégrade le DNA natif selon une cinétique diplotomique, ce qui a été aussi montré indépendamment par STUDIER [18] ; comme

un phénomène du type montré dans la fig. 5 a aussi été mis en évidence [17], on peut conclure que le mécanisme d'action de cet enzyme est à la fois diplo- et haplotomique, donc identique à celui de la DNase acide.

DNase de D. pneumoniae : Des résultats récents de KOPECKA et BERNARDI [19] ont montré que cet enzyme dégrade initialement le DNA natif selon un mécanisme diplotomique.

TABLEAU II (a).

Dégradation du DNA par la DNase acide de la rate.

Temps de digestion (min)	DNA natif		DNA dénaturé		Scissions DNA dénaturé
	$M_w \cdot 10^{-6}$	Scissions (b)	$M_w \cdot 10^{-6}$	Scissions (b)	Scissions DNA natif (c)
DNA d'érythrocytes de poulet (BERNARDI et SADRON, [8]; Tableau III)					
0	3.80	—	2.20	—	—
30	2.35	1.85	1.16	2.70	1.45
60	1.75	3.51	0.75	5.82	1.66
90	1.45	4.86	0.54	9.20	1.90
DNA de phage lambda (YOUNG et SINSHEIMER, [9]; Tableau I)					
0	27.3	—	14.5	—	—
5	24.9	0.29	12.5	0.47	1.62
10	24.2	0.36	9.3	1.52	4.22
15	20.3	1.00	9.7	1.35	1.35
20	16.3	1.80	8.0	2.14	1.19
45	10.9	3.65	4.5	5.60	1.53

(a) D'après BERNARDI et BACH [15].

(b) Le nombre de scissions a été calculé selon les équations de CHARLESBY [20].

$$\frac{(M_w)_t}{(M_w)_0} = \frac{1}{1 + \frac{1}{3} p} \quad (2a); \quad \frac{(M_w)_t}{(M_w)_0} = \frac{2(e^{-p} + p - 1)}{p^2} \quad (2b).$$

L'équation (2a) est valable lorsque la distribution initiale des masses est la plus probable ; elle a été utilisée dans le cas du DNA d'érythrocytes de poulet. L'équation (2b) est valable quand la distribution initiale des masses est uniforme ; elle a été utilisée dans le cas du DNA de lambda. Dans les deux cas, p est le nombre moyen de scissions.

(c) Cette colonne donne le rapport du nombre total de liaisons rompues/ nombre de liaisons rompues par le mécanisme diplotomique, par molécule native de départ.

Statistique de la dégradation enzymatique.

La statistique de la dégradation enzymatique du DNA natif n'a été étudiée que dans le cas de la digestion du DNA de phage T 5 par la DNase acide de la rate [21], en utilisant des molécules « entières » de DNA (masse moléculaire $80 \cdot 10^6$). La distribution des longueurs moléculaires a été étudiée par microscopie électronique à trois temps de digestion différents et l'on a montré qu'elle était en accord avec celle qu'on aurait pu calculer en utilisant la théorie de MONTROLL et SIMHA [22 ; fig. 6].

Celle-ci permet de prévoir la distribution des tailles moléculaires provenant par dégradation au hasard d'une fraction très serrée de macromolécules linéaires ayant une dimension finie. L'accord entre les données expérimentales et la théorie indique que la dégradation diplotomique du DNA natif par la DNase acide de la rate à pH 5,0 se fait par scissions qui se situent au hasard le long des molécules. Cette conclusion est en parfait accord avec la linéarité de $\frac{1}{M}$ en fonction du temps de digestion dans la phase initiale de la dégradation.

Une conclusion intéressante obtenue à partir soit des résultats de microscopie électronique soit d'autres mesures physiques est que les fragments obtenus par digestion enzymatique ont une structure de DNA natif jusqu'à des masses de 1.10^5 , ce qui n'est pas surprenant à cause du très petit nombre de ruptures haplotomiques qui ont lieu pendant la phase initiale de la dégradation.

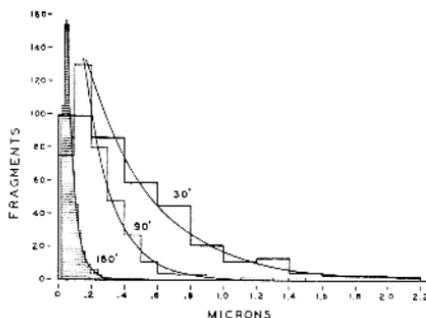


FIG. 6. — Distribution des tailles des fragments de molécules entières de DNA de bactériophage T5 obtenus à 30, 90 et 160 minutes de digestion avec la DNase acide de rate de porc. Les courbes représentent les distributions théoriques calculées sur la base de scissions au hasard correspondantes à 97, 231 et 832 scissions par molécule de départ de longueur égale à 40 μ . L'ordonnée pour l'histogramme relatif au temps de digestion de 160 minutes est trois fois plus grande que celle représentée sur la figure. (MAC HATTIE, BERNARDI et THOMAS, [21]).

Un modèle pour le mécanisme d'action de la DNase acide.

Pour expliquer le double mécanisme d'action de la DNase acide de la rate de porc, nous avons suggéré [8] que l'enzyme est une molécule dimérique avec deux sites actifs, un sur chaque sous-unité. Les deux sites agiraient sur les deux chaînes du DNA natif lorsque deux séquences sensibles à l'enzyme se trouveraient l'une vis-à-vis de l'autre (mécanisme diplotomique), tandis que seulement un site actif agirait lorsque une séquence sensible se trouverait en face d'une séquence résistante (mécanisme haplotomique). Cette hypothèse de travail a été inspirée par les travaux de BROOKES et LAWLEY [23] sur la dégradation du DNA par les agents alkoïlants. Ces auteurs ont pu montrer que, en utilisant certaines conditions expérimentales, l'alkoïlation a lieu au niveau de PN_7 de la

guanine ; les agents alkoïlants monofonctionnels donnent des 7-alkoïl-guanines, tandis que les agents difonctionnels donnent, *en outre*, des dérivés diguanylés ; la formation de ces dérivés a lieu quand les deux guanines se trouvent sur des chaînes opposées dans la position indiquée par la figure 7. Une fois alkoïlé, le DNA se décompose avec perte des guanines alkoïlées et hydrolyse successive des liaisons phosphodiesteriques correspondantes. Le résultat net de l'alkoïlation par les agents monofonctionnels donne donc lieu à une dégradation haplotomique du DNA, tandis que l'alkoïlation par les agents difonctionnels provoque une dégradation haplo- et diplotomique à la fois.

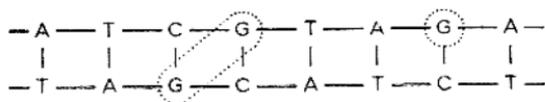


FIG. 7. — Schéma de dégradation du DNA par les agents alkoïlants bifonctionnels. (BROOKES et LAWLEY [23]).

Inhibition compétitive des désoxyribonucléases par les polyribonucléotides.

Toutes les DNases que nous avons mentionnées jusqu'ici ont une plus grande affinité pour le DNA natif que pour le DNA dénaturé, ce qui indique que leur interaction avec le substrat est influencée par la structure secondaire de ce dernier. Il en est de même pour leur interaction avec des inhibiteurs compétitifs comme les polyribonucléotides. A l'exception de la DNase pancréatique, toutes les DNases mentionnées jusqu'ici sont inhibées compétitivement par les RNA et quelques polyribonucléotides biosynthétiques. Ce phénomène a été étudié par LEHMAN, ROUSSOS et PRATT [24, 25] pour la DNase de *E. coli*, par nous-mêmes [26] et par JACQUEMIN-SABLON et coll. [27] pour la DNase acide de la rate. La figure 8 montre, à titre d'exemple, l'inhibition compétitive de la DNase acide par le t-RNA.

Dans tous les cas, l'inhibition est due à une interaction spécifique DNase-polyribonucléotides et pas du tout à une simple interaction électrostatique entre un polyélectrolyte acide et une protéine basique. Ceci est nettement démontré par le fait que, dans le cas de la DNase acide, par exemple, des polyribonucléotides tels que le poly A et le poly C ne causent aucune inhibition et, d'un autre côté, la présence d'un énorme excès d'une autre protéine basique, le cytochrome *c*, dans le mélange d'incubation n'empêche nullement l'inhibition [26].

Nos résultats sur le système DNase acide-polyribonucléotides montrent qu'il y a des corrélations évidentes entre le type de structure secondaire des polyribonucléotides et leur capacité inhibitrice. Ainsi, les polyribonucléotides à deux chaînes antiparallèles, tels que les poly A-poly U, le poly I-poly C et les polyribonucléotides naturels comme le RNA de transfert et le RNA ribosomique (qui, présentant des boucles, contiennent des régions ayant une structure à deux chaînes antiparallèles) sont des

excellents inhibiteurs. Au contraire, les polyribonucléotides à deux chaînes coparallèles, tels que le poly A et le poly C à pH 5,0, n'ont aucune activité inhibitrice.

Un cas intermédiaire est représenté par les polyribonucléotides à une chaîne, tels que le poly U, qui sont des inhibiteurs faibles ; on retrouve ici, dans le domaine des inhibiteurs, le même phénomène qui était connu [8] dans le cas du substrat naturel de l'enzyme, c'est-à-dire que l'affinité pour les polyribonucléotides à une chaîne (DNA dénaturé) est plus faible que celle pour les polynucléotides à deux chaînes (DNA natif). Une autre

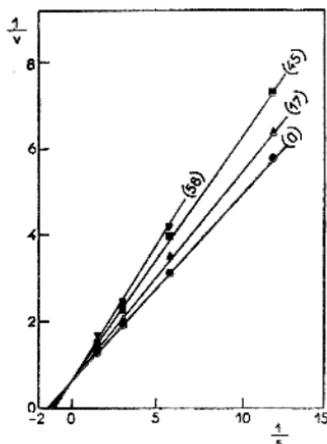


Fig. 8. — Inhibition compétitive de la DNase acide de la rate de porc par le t-RNA de levure. Les chiffres entre parenthèses indiquent les μ moles de P de t-RNA/ml. V est exprimé comme μ moles de P de DNA libérées en 15' ; S comme μ moles de P de DNA/ml. (BERNARDI, [26]).

considération intéressante est que l'interaction de l'enzyme avec les polyribonucléotides semble être indépendante de leur composition en bases et dépendre seulement de leur structure secondaire.

II. — STRUCTURE.

Parmi les nombreuses désoxyribonucléases qui ont été étudiées jusqu'à présent, deux seulement ont été caractérisées suffisamment dans leurs propriétés chimiques et physiques : la DNase acide de la rate et la DNase pancréatique. Une autre nucléase est, à présent, très bien connue dans ses propriétés : la nucléase de *Staphylococcus aureus*. Nous ne nous occuperons pas ici de cet enzyme qui diffère des désoxyribonucléases mentionnées dans la première partie de cet exposé en deux aspects fondamentaux : il n'a pas de spécificité vis-à-vis des sucres des acides nucléiques et hydrolyse donc soit le RNA, soit le DNA (avec une préférence nette pour le DNA dénaturé), et il peut agir soit par un mécanisme endonucléolytique, soit par un mécanisme exonucléolytique.

Propriétés physiques.

Les propriétés physiques de la DNase acide de la rate et de la DNase pancréatique sont résumées dans le Tableau III, qui montre qu'il s'agit dans les deux cas de petites protéines globulaires ayant des masses égales à 38 000 (DNase acide de la rate) et 31 000 (DNase pancréatique), respectivement. La DNase acide est une protéine basique, avec un point isoélectrique voisin de 10,2, tandis que la DNase pancréatique est une protéine acide, dont le point isoélectrique est égal à 4,7.

En ce qui concerne les DNases de *E. coli* et de *D. pneumoniae*, nous savons seulement qu'il s'agit, là aussi, de petites protéines, car leurs constantes de sédimentation (déterminées par centrifugation en gradient de saccharose) sont égales à 2,5 S [30] et à 2,2 S [19], respectivement.

TABLEAU III.
Propriétés physiques.

	DNase acide (rate) (a)	DNase pancréatique (b)
$S_{20,w}^0$ (Svedbergs).....	3.4	2,78
$D_{20,w}$ (10^{-7} cm ² /sec).....	7.8	8,7
\bar{V}	0.72	0,733
Masse.....	38,000	31.000
f/f^0	1.34	
E $\frac{1 \text{ p. } 100, 1 \text{ cm}}{280 \text{ m}\mu}$	12.1	12,3
Point isoélectrique.....	10.2	4,7

(a) G. BERNARDI, E. APPELLA, R. ZITO [24].

(b) U. LINDBERG [25].

Très peu de renseignements sont disponibles sur la structure secondaire des deux DNases mieux connues. CHENG [31] a conclu, sur la base d'études de dispersion optique rotatoire et de spectroscopie infrarouge que la DNase pancréatique ne contient pratiquement pas de structure en hélice alpha ; la structure secondaire serait formée pour environ 50 p. 100 par une structure β et pour le reste par une structure en pelote statistique.

Propriétés chimiques.

Le Tableau IV montre la composition en aminoacides de la DNase acide de la rate et de la DNase pancréatique. Il est intéressant de constater que les deux enzymes ont une teneur assez élevée en aminoacides aromatiques, qui représentent 10 p. 100 des résidus dans le cas de la DNase acide et 12 p. 100 dans celui de la DNase pancréatique. Dans la DNase acide les 8 résidus de demi-cystine forment 4 ponts disulfures [32] ; il est vraisemblable que les 4 demi-cystines de la DNase pancréatique forment également 2 ponts disulfures. Deux autres observations qui ont un certain intérêt concernent la DNase acide : il s'agit là de la très haute teneur en ammoniacque d'origine amidique de son hydrolysate acide et de la présence d'un oligosaccharide contenant glucosamine et sucres neutres.

Structure dimérique et propriétés allostériques de la DNase acide [33].

Nous avons pu démontrer que la DNase acide de la rate est formée par deux sous-unités vraisemblablement identiques en utilisant soit des techniques physiques, soit des méthodes chimiques. Pour obtenir la dissociation de l'enzyme, nous avons d'abord utilisé l'urée 8 M et le β -mercaptoéthanol 0,1 M ; dans ce solvant le coefficient de sédimentation est passé de 2,8 S (tous les coefficients cités ont été obtenus à une concentration de 1 p. 100) à 0,8 S ; en urée 4 M + β -mercaptoéthanol 0,05 M, nous

TABLEAU IV.
Composition en aminoacides.

	DNase acide (rate) (a)	DNase pancréatique (b)
Lys.....	20	9
His.....	6	6
(NH ₂)	(49)	
Arg.....	13	12
Asp.....	33	34
Thr.....	21	15
Ser.....	37	30
Glu.....	32	20
Pro.....	27	9
Gly.....	26	9
Ala.....	25	23
$\frac{1}{2}$ Cys.....	8	4
Val.....	13	27
Met.....	4	4
Ileu.....	8	12
Leu.....	36	24
Tyr.....	12	16
Phe.....	16	12
Try.....	6	4
Total.....	343	270
Glucosamine	8	

(a) G. BERNARDI, E. APPELLA, R. ZITO [24].

(b) U. LINDBERG [25].

avons obtenu deux frontières ayant des coefficients de sédimentation égaux à 2,6 S et 0,8 S, respectivement (fig. 9). Ce même type d'expérience a été répété en utilisant comme agent dissociant la guanidine 6 M ou la guanidine 6 M + β -mercaptoéthanol 0,1 M ; dans ces cas, les coefficients de sédimentation étaient égaux à 2,1 S et 1,5 S, respectivement. Une dissociation partielle a pu être mise en évidence par l'emploi de guanidine 3 M.

Ces résultats semblent indiquer que la protéine est dissociée en urée ou guanidine concentrée ; la présence d'agents réducteurs fait baisser ultérieurement le coefficient de sédimentation, ce qui s'explique par le fait qu'il y aurait une augmentation du coefficient de frottement à cause

de l'ouverture plus complète des chaînes polypeptidiques. Les différences rencontrées dans les coefficients de sédimentation en urée et guanidine pourraient tenir à des différences dans l'influence de la concentration sur les coefficients de sédimentation dans les deux cas ou à une fixation préférentielle de ces molécules sur l'enzyme.

Une démonstration indépendante de la structure dimérique de la DNase acide de la rate a été obtenue en étudiant l'hydrolysats tryptique de la protéine réduite et carboxyméthylée. Après séparation bidimensionnelle

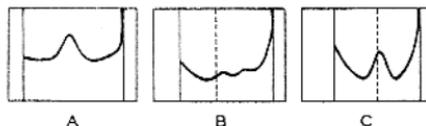


FIG. 9. — Diagrammes de sédimentation de DNase acide de rate centrifugée à 59.780 t/min. dans une ultracentrifugeuse Spinco modèle L.

A) En tampon acétate 0,15 M pH 5,0 + versène 0,01 M après (122 min).

B) En acétate-versène + urée 4 M + β -mercaptoéthanol 0,05 M (après 76 min).

C) En acétate-versène + urée 8 M + β -mercaptoéthanol 0,01 M (après 93 min). L'expérience (A) a été faite dans une cellule habituelle ; les expériences (B) et (C) dans des cellules à frontière synthétique ; la position de la frontière initiale est indiquée par le trait discontinu. Les coefficients de sédimentation de l'enzyme en acétate-versène et du composant rapide en urée 4 M étaient voisins de 2,8 S ($c = 1$ p. 100) ; ceux de l'enzyme en urée 8 M et du composant lent en urée 4 M étaient voisins de 0,8 S ($c = 1$ p. 100). (BERNARDI, [33]).

sur papier des peptides (fig. 10), nous avons trouvé 17 à 19 peptides tryptiques, une valeur qui est très proche de la moitié du nombre de résidus de lysine et arginine présents dans la protéine (dimérique) de départ : ce nombre est égal à 32-34. Les peptides donnant des colorations spéci-

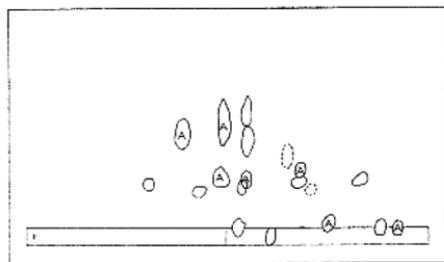


FIG. 10. — Electrophorèse-chromatographie des peptides tryptiques obtenues à partir de DNase acide de rate de porc, réduite et carboxyméthylée. Les peptides contenant de l'arginine sont marqués (A). (BERNARDI, APPELLA et ZIRO, [32]).

riques pour l'arginine, le tryptophane et l'histidine ont été trouvés en un nombre correspondant à la moitié ou à moins que la moitié du nombre des aminoacides respectifs dans la protéine de masse 38 000.

Un résultat qui est également lié à la structure dimérique de la DNase acide a été obtenu dans une étude de la cinétique d'hydrolyse du bis (p-nitrophényl) phosphate par l'enzyme. En effet, si l'on étudie les vitesses initiales d'hydrolyse de ce substrat synthétique par la DNase acide en fonction de la concentration en substrat, on s'aperçoit que la courbe que l'on obtient a une forme sigmoïdale, tandis que l'on n'a pas ce phénomène dans le cas de l'hydrolyse du DNA natif qui présente, au contraire, une courbe du type Michaelis-Menten (fig. 11). Ce résultat indique que le bis (p-nitrophényl) phosphate est lié d'une manière coopérative à la DNase acide, ou, en d'autres termes, que ce substrat est un effecteur allostérique homotrope de l'enzyme [34].

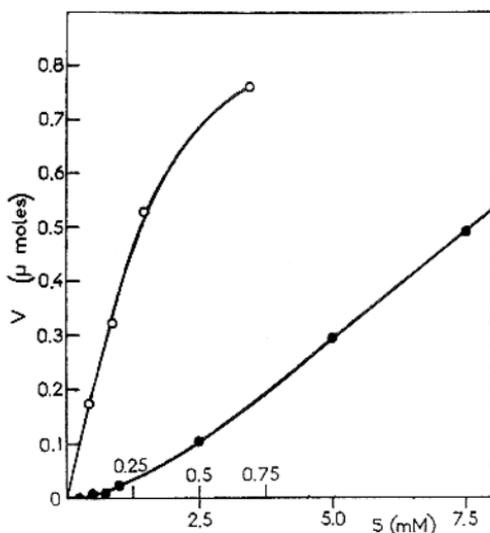


Fig. 11. — Vitesse d'hydrolyse à 37° du DNA (cercles) et du bis (p-nitrophényl) phosphate (points) par la DNase acide de rate de porc en fonction de la concentration des substrats. Le résultat est donné en μmoles de phosphore nucléotidique libéré en 120 min (substrat synthétique). La concentration en enzyme utilisée dans le dosage DNAsique était environ 100 fois plus faible que celle utilisée dans le dosage phosphodiésterasique. Des concentrations en substrats plus élevées de celles montrées dans la figure n'ont pas été utilisées à cause de l'inhibition par excès de substrat dans le cas du DNA et de la faible solubilité dans le cas du bis-p-nitrophénylphosphate. (BERNARDI, [33]).

Ces résultats permettent de tirer deux conclusions : la première est que la DNase acide a une structure dimérique, ce qui est en accord avec le modèle que nous avons postulé sur la seule base des résultats cinétiques ; la transition allostérique présentée par l'enzyme pourrait jouer un rôle soit en facilitant la formation du complexe enzyme-DNA, soit en favorisant la deuxième rupture dans le mécanisme diplotomique.

La deuxième conclusion est que l'enzyme doit avoir un axe binaire de symétrie, ce qui découle du fait qu'il peut agir avec ses deux sous-unités sur les deux brins antiparallèles du DNA natif, et qu'il peut se lier aux

polyribonucléotides à deux chaînes antiparallèles, et non pas à ceux à deux chaînes coparallèles. Il faut donc penser que le DNase acide a une structure semblable à celle du schéma de la fig. 12.

En ce qui concerne ce modèle, il peut être intéressant de rappeler que le dimère de la -lactoglobuline, qui a une masse de 36 000 (très voisine donc de celle de la DNase acide), présente une distance entre les deux entres des sous-unités égale à 18 Å [35], ce qui suggère que les dimensions de la DNase acide permettent certainement la formation d'un complexe enzyme-substrat avec le DNA natif (la distance entre deux phosphates situés l'un vis-à-vis de l'autre sur les deux brins complémentaires est de 18 Å).

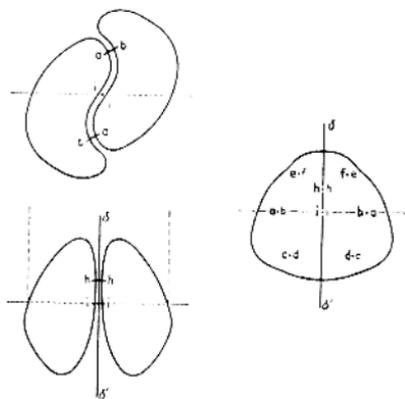


FIG. 12. — Modèle de la DNase acide. Cette figure est prise de l'article de MONOD, WYMAN et CHANGEUX [34].

L'auteur désire remercier le Professeur Charles SADRON pour l'intérêt avec lequel il a suivi ces recherches, ainsi que ses collègues qui ont contribué à leur réussite.

Ce travail a reçu le support financier du contrat UR-E9-10, 60-80 du Ministère de l'Agriculture des Etats-Unis.

BIBLIOGRAPHIE.

1. BERNARDI, G. — *Nature*, 1965, 206, 779.
2. CARRARA, M. et BERNARDI, G. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, 155, 1.
3. BERNARDI, G. — *Advances in Enzymology* (sous presse).
4. SCHUMAKER, V. N., RICHARDS, E. G. et SCHACHMAN, H. K. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, 78, 4320.
5. CAVALIERI, L. F. et ROSENBERG, B. H. — *Biophys. J.*, 1961, 1, 323.
6. THOMAS, C. A. — *J. Am. Chem. Soc.*, 1956, 78, 1861.
7. BERNARDI, G. et SADRON, C. — *Nature*, 1961, 191, 809.
8. BERNARDI, G. et SADRON, C. — *Biochemistry*, 1964, 3, 1411.
9. YOUNG, II, E. T. et SINSHEIMER, R. L. — *J. Biol. Chem.*, 1965, 240, 1274.
10. OTH, A., FREDERICQ, E. et HACHA, R. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1957, 29, 287.
11. CORDONNIER, C. et BERNARDI, G. — *Biochem. J.*, 1965, 94, 12 P.
12. CORDONNIER, C. et BERNARDI, G. — En préparation.
13. FREDERICQ, E. — *Bull. Soc. Chim. Belg.*, 1960, 69, 475.
14. RICHARDS, E. G. et BERNARDI, G. — En préparation.

15. BERNARDI, G. et BACH, M. L. — En préparation.
16. LEHMAN, I. R., ROUSSOS, G. G. et PRATT, E. A. — *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 819.
17. BERNARDI, G. et CORDONNIER, C. — *J. Mol. Biol.*, 1965, 11, 141.
18. STUDIER, W. F. — *J. Mol. Biol.*, 1965, 11, 373.
19. KOPECKA, H. et BERNARDI, G. — En préparation.
20. CHARLESBY, A. — *Proc. Roy. Soc. (London)*, 1954, A 224, 120.
21. MAC HATTIE, L. A., BERNARDI, G. et THOMAS, C. A., JR. — *Science*, 1963, 141, 59.
22. MONTROLL, E. et SIMHA, R. — *J. Chem. Phys.*, 1940, 8, 721.
23. BROOKES, P. et LAWLEY, P. D. — *Biochem. J.*, 1961, 80, 496.
24. LEHMAN, I. R., ROUSSOS, G. G. et PRATT, E. A. — *J. Biol. Chem.*, 1962, 237, 829.
25. LEHMAN, I. R. — *Progress in Nucleic Acid Research.*, 1963, 2, 83.
26. BERNARDI, G. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1964, 17, 573.
27. JACQUEMIN-SABLON, A., LAVAL, J., LE TALAER, J.-Y., LE PECQ, J. B. et PAOLETTI, C. — *C. R. Acad. Sc. Paris*, 1964, 259, 2551.
28. BERNARDI, G., APPELLA, E. et ZITO, R. — *Biochemistry*, 1965, 4, 1725.
29. LINDBERG, U. — *Biochemistry*, 1967, 6, 335.
30. CORDONNIER, C. et BERNARDI, G. — *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1965, 20, 555.
31. CHENG, P.-Y. — *Proc. Natl. Acad. Sc.*, 1966, 55, 1535.
32. BERNARDI, G., APPELLA, E. et ZITO, R. — En préparation.
33. BERNARDI, G. — *J. Mol. Biol.*, 1965, 13, 603.
34. MONOD, J., WYMAN, J. et CHANGEUX, J.-P. — *J. Mol. Biol.*, 1965, 12, 88.
35. GREEN, D. W. et ASCHAFFENBURG, R. — *J. Mol. Biol.*, 1959, 1, 54.