

ARCHIVES INTERNATIONALES
DE
PHYSIOLOGIE
ET DE
BIOCHIMIE

(Continuation des
ARCHIVES INTERNATIONALES DE PHYSIOLOGIE,
fondées en 1904 par LÉON FREDERICQ et PAUL HEGER)

PUBLIÉES PAR

HENRI FREDERICQ,

Z. M. BACQ

et

M. FLORKIN

ALKYLATION DE L'ADN PAR LE MYLERAN MARQUÉ
ET UTILISATION ÉVENTUELLE DE CETTE TECHNIQUE
POUR MESURER LA GRANDEUR DES MOLÉCULES D'ADN
DANS LES CELLULES

PAR

A. PETITPAS-DEWANDRE et W. G. VERLY
(Université de Liège, Biochimie, Laboratoire des Isotopes)

(8 figures)

ABONNEMENTS :

VAILLANT-CARMANNE, S. A., IMPRIMEUR-ÉDITEUR
4, PLACE SAINT-MICHEL, LIÈGE (BELGIQUE)

Titre abrégé pour les citations : *Arch. Internat. Physiol. Bloch.*, 1964, 72.
Publication périodique paraissant cinq fois par an.

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Les ARCHIVES INTERNATIONALES DE PHYSIOLOGIE ET DE BIOCHIMIE publient, en français ou en anglais, des travaux originaux de caractère expérimental, à l'exclusion de toutes « Revues générales », « Berichte », « Ergebnisse », « Analyses », « Abstracts » ou « Referate ».

Titre et rédaction. — Les auteurs choisiront un titre qui donne une idée précise du contenu de leur travail et condenseront leur rédaction de manière à ne dépasser qu'exceptionnellement l'étendue d'une feuille d'impression (16 pages).

Manuscrits dactylographiés. — Nous invitons les auteurs à fournir des manuscrits dactylographiés sous forme *ne varietur*, et dont la rédaction soit *entièrement terminée* (afin d'éviter sur les épreuves les remaniements et les corrections, très onéreux, qui sont à la charge des auteurs).

Résumé. — Chaque article sera suivi d'un court résumé, objectif, pouvant être utilisé directement comme « Analyse » ou « Referat » par les organisations bibliographiques.

Citations. — Les citations seront réunies à la fin de l'article sous la rubrique « Bibliographie » (Pour les mémoires en langue anglaise, le titre sera « References »). Elles seront classées par ordre alphabétique des noms d'auteurs.

Chaque citation comprendra :

1° Nom et prénom (ou initiales des prénoms) de l'auteur en PETITES CAPITALES (souligner deux fois dans le manuscrit); 2° année de publication, entre parenthèses; 3° titre abrégé du recueil, en italique (souligner une fois dans le manuscrit); 4° tome, en chiffres arabes, caractères gras (souligner d'un trait ondulé); 5° première et dernière pages du mémoire en chiffres arabes ordinaires.

Les indications Vol., T., Bd., page, sont supprimées.

Exemples :

ZWAARDEMAKER, H. (1904). — *Arch. internat. Physiol.*, 1, 1-16.

REICHE, J. M. (1954). — *J. of Physiol.*, 124, 605-612.

Pour les livres cités dans la Bibliographie, on indiquera :

1° nom et initiales des prénoms de l'AUTEUR; 2° (date de publication); 3° titre de l'ouvrage; 4° nom de l'éditeur; 5° ville.

Dans le texte, le nom de l'auteur (souligner deux fois) et l'année de publication (entre parenthèses) suffisent à renvoyer à la Bibliographie. Si plusieurs travaux du même auteur, publiés la même année, sont cités, l'indication chronologique est donnée par les lettres a, b, c (en italique, souligner une fois), placées après l'indication de l'année.

Exemple :

BREMER, F. (1947, a).

BREMER, F. (1947, b).

Figures. — Leur nombre doit être limité au minimum strictement indispensable à l'intelligence du texte.

Les dessins seront exécutés à l'encre de Chine sur carton bristol blanc, et uniquement en traits, hachures et points, sans « gris » ni « dégradés ».

Les graphiques originaux doivent être tracés en lignes bien blanches sur fond uniformément noir.

Pour les courbes sur papier quadrillé, employer du papier millimétré noir ou rouge si le quadrillé doit apparaître sur la figure définitive; du papier millimétré bleu, si le quadrillé doit disparaître.

Ce n'est qu'à titre exceptionnel que les « Archives » peuvent accepter de publier des photographies ou des tracés destinés à être reproduits en simligravure sur cuivre; dans ce cas une entente préalable avec la Direction scientifique est nécessaire.

Les dimensions de toutes les figures seront réduites au minimum. La dimension des clichés sera telle que toutes les figures puissent être intercalées dans le texte.

Il est d'ailleurs conseillé de fournir des figures originales très grandes, destinées à être réduites aux 2/3, à la 1/2, au 1/4, etc. (La réduction ainsi indiquée porte sur les dimensions linéaires). Tenir compte de la réduction prévue dans les dimensions à donner aux chiffres, lettres et signes conventionnels incorporés dans les dessins et graphiques.

Prière de réduire dans la même proportion toutes les figures d'un même mémoire.

Les légendes des figures doivent être fournies dactylographiées, sur feuillets séparés, et non incorporées dans le manuscrit.

Tableaux. — Leur nombre et leurs dimensions seront réduits au minimum indispensable. Ne pas publier deux fois les mêmes données numériques, une fois sous forme de tableaux, une autre fois sous forme de courbes.

Reçus le 3 août 1964.

ALKYLATION DE L'ADN PAR LE MYLERAN MARQUÉ
ET UTILISATION ÉVENTUELLE DE CETTE TECHNIQUE
POUR MESURER LA GRANDEUR DES MOLÉCULES D'ADN
DANS LES CELLULES ⁽¹⁾

PAR

A. PETITPAS-DEWANDRE et W. G. VERLY
(Université de Liège, Biochimie, Laboratoire des Isotopes)

(8 figures)

Dans un article précédent (VERLY, DEWANDRE, MOUTSCHEN-DAHMEN et MOUTSCHEN-DAHMEN, 1963), nous avons essayé d'évaluer la taille d'une molécule d'ADN (acide désoxyribonucléique) portant un locus génétique connu en utilisant un agent alkylant bifonctionnel marqué dans sa portion alkyle. Des cellules de *Clamydomonas eugametos* Moevus, de sexe minus, haploïdes et normalement résistantes à la streptomycine, avaient été traitées par du myleran (diester de butanediol et d'acide méthanesulfonique = 1,4-diméthanesulfonyloxybutane) marqué avec du tritium dans sa partie butanediol et l'on avait trouvé une relation linéaire entre le taux de cellules devenues sensibles à la streptomycine et la radioactivité spécifique de l'ADN isolé. Partant de l'hypothèse que, lorsque la mutation atteint toutes les cellules issues de celle qui a été traitée, la lésion chimique doit être un pontage entre les hélices complémentaires de la molécule d'ADN, et en tenant compte de la fraction des groupes alkyle fixés à la macro-molécule qui servent à de tels pontages, on doit pouvoir évaluer la taille de la molécule d'ADN porteuse du locus génétique compétent. Dans le cas de *Chlamydomonas eugametos* et de la résistance à la streptomycine, nous avons calculé un poids de 3.000.000 u.m.a. pour la molécule d'ADN intéressée ; cette valeur n'est que provisoire à cause de plusieurs corrections arbitraires qui ont été introduites dans les calculs et qui doivent être vérifiées.

⁽¹⁾ Ce travail a été subsidié par l'Euralom (contrat 022-62-10-BIOB) et par le Fonds Belge de la Recherche Scientifique Fondamentale Collective.

Cette technique de l'évaluation *in situ* du poids d'une molécule d'ADN, caractérisée fonctionnellement, au moyen d'un agent alkylant bifonctionnel, donne également des renseignements utiles pour l'élaboration d'un modèle raisonnable permettant de rendre compte des propriétés des chromosomes des cellules non bactériennes. L'hypothèse de base de notre travail n'est valable que si le chromosome est constitué de molécules d'ADN indépendantes reliées par des liens fragiles. D'autre part, la méthode offre aussi un moyen de reconnaître les loci génétiques portés par la même molécule d'ADN et de savoir si chaque molécule d'ADN est une unité opérationnelle intégrée (JACOB et MONOD, 1961).

On pense généralement que l'alkylation de l'ADN atteint principalement les bases puriques et qu'elle est suivie d'une hydrolyse plus ou moins rapide de ces bases alkylées (voir par exemple BAUTZ et FRIESE, 1960). Il est évident qu'une dépurination rapide qui, dans nos études, entraînerait la perte du traceur radioactif, rendrait l'application de la méthode proposée particulièrement difficile. Les développements possibles de notre travail rendaient donc obligatoire une révision soignée du problème de la perte des groupes alkyle fixés sur l'ADN après réaction avec le myleran. Une note préliminaire a été publiée dans *Nature* (VERLY et PETITPAS-DEWANDRE, 1964).

Expériences et résultats

Renseignements généraux.

a) Du myleran marqué avec du tritium dans les positions 2 et 3 de sa portion butanediol a été préparé par réduction du butynediol avec de l'hydrogène tritié, suivie d'estérification par le chlorure de méthanesulfonyle (KOCH, VERLY et BACQ, 1959; KOCH, 1959). L'activité spécifique du myleran tritié utilisé dans ce travail est de 20 mC/m-mole.

b) Toutes les expériences ont été faites dans un thermostat à 22° C, c'est-à-dire à la température utilisée pour l'étude sur *Chlamydomonas*. A cause de la dissolution lente des substances dans l'eau, les solutions d'ADN et de myleran ont été préparées séparément; leur mélange permettait de donner un point de départ précis à la réaction d'alkylation. Les concentrations

après mélange ont toujours été de 0.1 mg par ml pour le myleran, mais elles ont varié de 1.2 à 2.1 mg par ml pour l'ADN ; cette variation ne se reflète toutefois pas dans la présentation des résultats qui ont toujours été rapportés à 1 mg d'ADN. L'ADN utilisé provenait de thymus de veau.

c) *Mesures de radioactivité.* — Après dessiccation des fibres sous vide en présence de P_2O_5 , environ 1 mg de l'ADN alkylé était dissous dans 0.5 ml d'une solution méthanolique 1.0 M d'hydroxyde d'hyamine (di-isobutylcrésoxyéthoxyéthyl-diméthylbenzyl ammonium) (traitement de 40 h à 65° C dans l'obscurité). On ajoutait alors une solution scintillante (10 g de diphényloxazole, 250 mg de di[phényloxazolyl]-benzène et 100 g de naphthalène par litre de p-dioxane) au produit de digestion dilué avec un mélange de méthanol et de toluène.

Lorsque la chémiluminescence avait disparu, la mesure du tritium était faite dans un spectromètre Tri-Carb de la firme Packard. L'utilisation d'un étalon de naphtylacétamide tritiée, calibré par rapport à l'eau tritiée N.B.S., a permis d'exprimer les résultats en désintégrations par minute.

La mesure de la radioactivité des produits d'hydrolyse de l'ADN alkylé a été faite d'une manière analogue mais sans qu'il y ait de digestion préalable à 65° C.

Expérience 1.

L'ADN a été précipité après 3 heures de contact avec le myleran tritié (addition de NaCl pour avoir une concentration 1.0 M, puis d'un volume égal d'éthanol à 95 %). Les fibres immédiatement formées ont été lavées 3 fois avec de l'éthanol et 3 fois avec de l'acétone, puis séchées et soumises à une mesure de radioactivité. Cet ADN alkylé a ensuite été purifié par redissolution dans l'eau suivie de précipitation et de lavages semblables à ceux décrits précédemment ; l'opération a été répétée 3 fois et, chaque fois, on a mesuré la radioactivité de l'ADN séché. La radioactivité, qui était de 17.000 d/min.mg ADN pour le premier précipité, n'était plus que de 5.700 d/min.mg après 3 opérations de purification (fig. 1). Cette chute peut s'expliquer de deux manières : ou bien 1) il s'agit réellement d'une perte d'alkyles fixés à l'ADN ; ou bien 2) il s'agit d'une contamination par du myleran qui n'a pas réagi. Nous pensons que c'est la deuxième explication qui rend compte de la plus

grande partie du phénomène : en effet, la réaction entre l'ADN et le myleran est très limitée de sorte que, au moment de la première précipitation, la radioactivité du surnageant est énorme par rapport à celle de l'ADN alkylé.

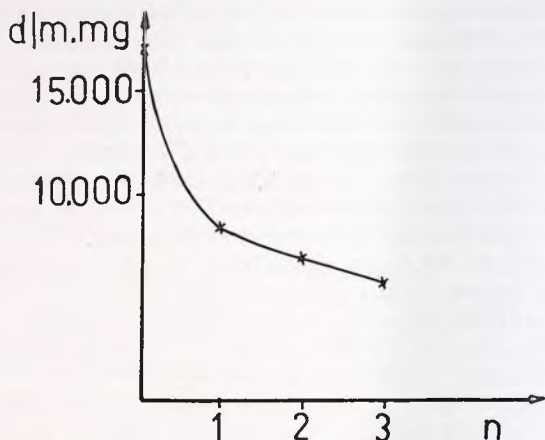


FIG. 1. — Radioactivité spécifique ($d/min.mg$) de l'ADN alkylé pendant les opérations de purification (expérience 1). n = nombre de précipitations.

L'ADN alkylé, purifié par 3 reprécipitations comme indiqué ci-dessus, a été redissous dans l'eau (temps 0 de cette partie de l'expérience) (5 mg/ml) ; des portions aliquotes ont été prises à des temps variés et l'ADN précipité. La fig. 2 montre une perte de radioactivité d'environ 30 % pendant les premières heures, puis, à partir de la 50^e heure, une stabilité totale au niveau de 4000 $d/min.mg$ ADN.

Expérience 2.

L'expérience 1 ne donne aucune indication sur l'hydrolyse de l'ADN alkylé pendant les 3 heures de contact avec le myleran trilié et la contamination du premier précipité par du myleran qui n'a pas réagi, rend difficile l'évaluation de l'importance de cette hydrolyse pendant les opérations de purification.

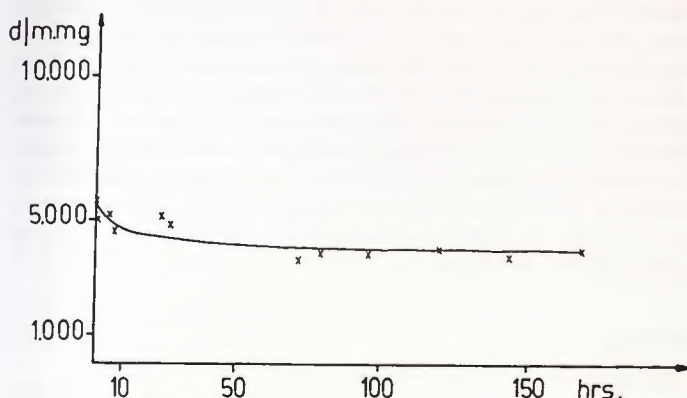


FIG. 2. — ADN alkylé dissous dans l'eau (expérience 1) : radioactivité spécifique ($d/\text{min.mg}$) en fonction du temps.

Pour éviter ces inconvénients, dans l'expérience 2 : 1) l'ADN précipité a été soigneusement débarrassé du myleran contaminant (qui est très soluble dans l'acétone); 2) on a cherché les produits d'hydrolyse dans le liquide surnageant.

Après 3 heures de contact avec le myleran tritié, l'ADN a été précipité et le surnageant gardé. L'ADN précipité a été lavé d'abord avec de l'éthanol ensuite avec de l'acétone anhydre jusqu'à ce que ce solvant n'extrait plus aucune radioactivité. Cet ADN alkylé a été redissous dans l'eau (temps 0 de cette partie de l'expérience) et des portions aliquotes ont été prises à divers intervalles de temps. L'ADN de ces prélèvements a été précipité et les surnageants gardés.

Tous les surnageants ont été traités de la manière suivante : passage à travers une colonne d'Amberlite IR-120(H) qui ne retenait ni le myleran, ni l'ADN qui n'aurait pas été précipité; la colonne était ensuite lavée avec un mélange eau-acétone (1 : 1) jusqu'à ce que l'effluent ne soit plus radioactif, puis éluee avec NH_4OH N. On mesurait alors la radioactivité du résidu sec de l'éluat (« bases alkylées »).

Le surnageant de la première précipitation, immédiatement après le traitement de 3 heures par le myleran tritié, contenait une radioactivité appréciable dans la fraction des « bases alkylées » (3600 $d/\text{min.}$ par volume ayant contenu 1 ng d'ADN).

Mais si l'on passe à travers une colonne d'Amberlite IR-120 (H) une solution qui ne contient que du myleran tritié, on constate que, après les lavages eau-acétone, l'éluat ammoniacal contient autant de radioactivité à cataloguer comme « bases alkylées » : il semble donc que la résine elle-même soit alkylée et que le NH_4OH enlève des fragments alkylés. Donc, presque toutes les « bases alkylées » trouvées dans le premier surnageant ne dérivent pas de l'ADN alkylé, mais sont des artefacts dus à la réaction du myleran tritié avec l'échangeur d'ions utilisé pour séparer les bases.

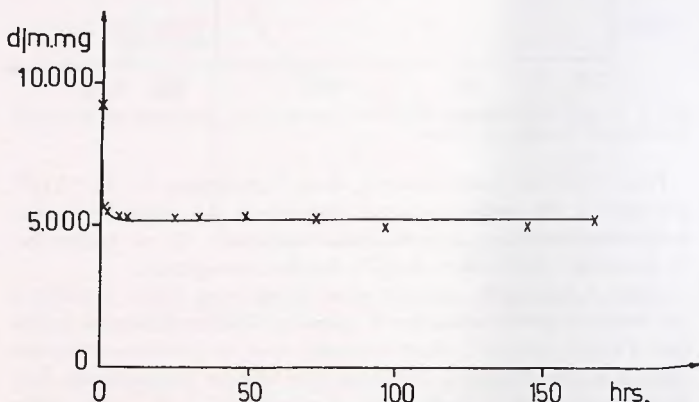


FIG. 3. — ADN alkylé dissous dans l'eau (expérience 2) : radioactivité spécifique ($d/\text{min.mg}$) en fonction du temps.

Cette difficulté n'existe heureusement pas pour les surnageants des autres précipités qui ne contiennent presque plus de radioactivité sous la forme de myleran tritié. Le résultat des mesures de radioactivité pour leur fraction « bases alkylées » est représenté dans la figure 4.

La figure 3 et la figure 4 indiquent que, très rapidement, la radioactivité de l'ADN se stabilise aux environs de 5000 $d/\text{min.mg}$ et que, parallèlement, l'accroissement des « bases alkylées » dans le surnageant cesse très vite aussi.

Pendant la première heure qui suit la redissolution dans l'eau de l'ADN alkylé, il y a une importante chute de sa radio-

activité (de 9100 $d/min.mg$ à 5600 $d/min.mg$), mais seulement 20 % de cette différence se retrouvent dans le surnageant sous la forme de « bases alkylées ». Les 80 % restants (2800 d/min par mg d'ADN) peuvent avoir deux causes : 1) hydrolyse d'alkylphosphates donnant simplement du butanediol, ou 2) contamination par du myleran; nous reviendrons sur ce point en discutant les résultats de l'expérience 3.

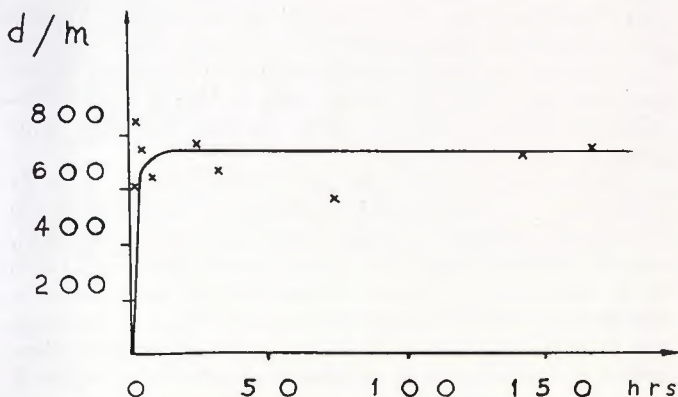


FIG. 1. — ADN alkylé redissous dans l'eau (expérience 2). « Bases alkylées » ($d/min.$) libérées dans le surnageant par mg ADN.

Il est très important de noter que l'ADN normal et l'ADN alkylé se comportent de la même manière dans notre procédé d'isolement. En effet, les échantillons d'ADN précipités à différents moments au cours de cette expérience et qui avaient tous à peu près la même activité spécifique, ont été dissous et précipités ensemble; après 4 dissolutions et reprécipitations successives, la radioactivité spécifique de l'ADN alkylé était encore aux environs de 5000 $d/min.mg$.

Expérience 3.

Dans cette expérience, l'ADN est resté 170 heures dans la solution de myleran tritié; des portions aliquotes ont été examinées à différents moments. L'ADN était précipité, lavé à l'éthanol puis à l'acétone anhydre jusqu'à ce que le liquide

de lavage ne soit plus radioactif. Les surnageants n'ont pas été étudiés parce qu'ils contenaient de trop grandes quantités de myleran tritié (voir plus haut).

La mesure de radioactivité au temps 0 (précipitation immédiatement après mélange des solutions d'ADN et de myleran tritié) donne une valeur de $2800d/min.mg$ ADN. Ceci correspond précisément à la radioactivité qui n'est pas due à des « bases alkylées » et que l'on trouve dans le surnageant après dissolution et reprécipitation de l'ADN alkylé par un contact de 3 heures avec du myleran tritié (expérience 2). Il s'agit donc : ou bien 1) d'une réaction avec les phosphates qui se trouverait instantanément dans un état de steady state, ou bien 2) d'une contamination par du myleran. Cette dernière hypothèse nous paraît la plus vraisemblable.

L'alkylation de l'ADN étant peu étendue même à la fin de l'expérience (la radioactivité maximum de $50.000 d/min.mg$ correspond à environ 1 groupe alkyle par 3000 nucléotides), on peut supposer, en première approximation (négligeant l'effet de la variation de pH car le milieu n'est pas tamponné et le rôle du mono-ester formé par l'hydrolyse partielle du myleran), que la vitesse d'alkylation de l'ADN (par mg) est proportionnelle à la concentration du myleran. La figure 5 montre que la

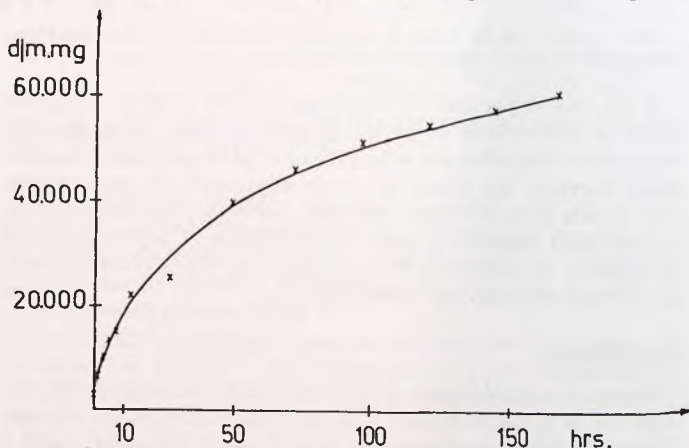


FIG. 5. — Alkylation de l'ADN par le myleran tritié en solution aqueuse (expérience 3).

radioactivité de l'ADN monte pendant plus de 170 heures; cet accroissement n'est cependant pas linéaire, ce qui peut s'expliquer :1) par une hydrolyse progressive du myleran, et 2) par une perte des groupes alkyle fixés sur l'ADN.

Expérience 4 : cinétique de l'hydrolyse du myleran dans une solution aqueuse à 0.1 mg/ml à 22° C.

L'expérience a été faite avec du myleran tritié. A des portions aliquotes de 1 ml de la solution prélevées à des temps différents, on a ajouté des quantités connues de myleran non radioactif dissous dans l'acétone. On a isolé le myleran du mélange homogénéisé et on l'a recristallisé dans l'éthanol jusqu'à ce que sa radioactivité spécifique soit constante. Cette technique ne permet évidemment de suivre que l'hydrolyse du diester en monoester, mais cette étape est suivie de l'hydrolyse du monoester qui échappe à notre enquête. Les deux réactions sont accompagnées par une acidification de la solution.

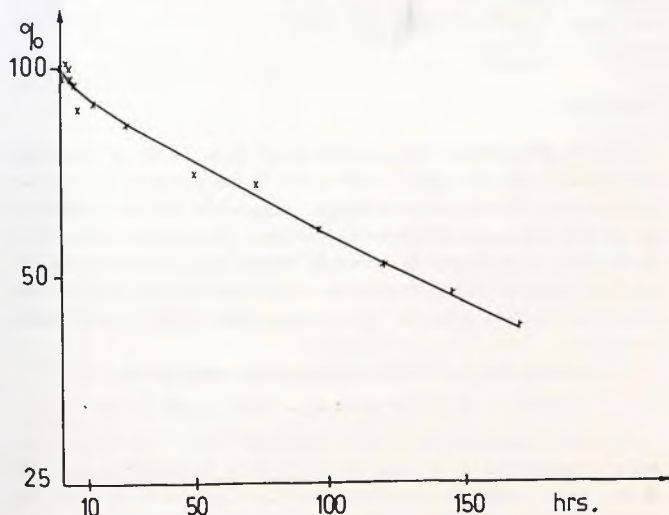


FIG. 6. — Hydrolyse du myleran en solution dans l'eau distillée (expérience 4).

La quantité du myleran tritié par ml de solution est représentée comme une fonction du temps en coordonnées semi-logarithmiques dans la figure 6.

La première partie du graphique n'est pas linéaire, ce qui indique, que, pendant les premières heures, la réaction n'est pas de premier ordre; il est possible qu'il s'agisse là du résultat de l'acidification de la solution.

Expérience 5 : hydrolyse du myleran dans une solution tamponnée.

L'expérience 4 a été répétée mais dans un milieu tamponné (0.1 M phosphate) de pH 6.6; la concentration molaire était donc environ 25 fois celle du myleran (0.1 mg/ml). Dans cette solution, à côté de l'hydrolyse, on peut aussi avoir une alkylation des ions phosphate négatifs.

La figure 7 montre, en coordonnées semi-logarithmiques, la persistance du myleran dans le temps. On a une ligne droite jusqu'à la 100^e heure, puis la réaction semble aller plus vite. La partie rectiligne du graphique permet de calculer que le myleran a une demi-vie de 132 heures, ce qui donne, pour la constante k_1 , d'hydrolyse du diester en monoester la valeur de $8.75 \times 10^{-5} \text{min.}^{-1}$

Expérience 6.

Comme l'hydrolyse du myleran est plus facile à exprimer mathématiquement dans l'expérience 5, on a décidé de répéter l'expérience 3 dans une solution tamponnée 0.1 M phosphate de pH 6.6. La figure 8 donne les mesures de la teneur en tritium de l'ADN isolé selon le procédé décrit dans l'expérience 3; les résultats ont été corrigés pour éliminer la part due au myleran qui restait adsorbé sur le précipité d'ADN (voir expérience 3).

La réaction entre l'ADN et le myleran peut s'écrire :



Si nous supposons que l'alkylation de l'ADN est proportionnelle uniquement à la concentration « a » du myleran, en utilisant « dx » pour représenter l'incrément de radioactivité (en d/min) de 1 mg d'ADN pendant le temps « dt », on peut écrire :

$$dx = k_2 a dt$$

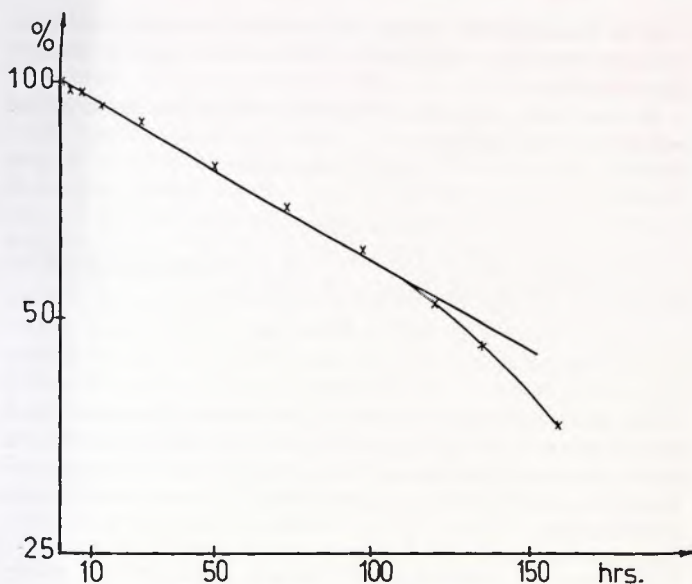


FIG. 7. — Hydrolyse du myleran en solution dans un tampon phosphate de pH 6.6 (expérience 5).

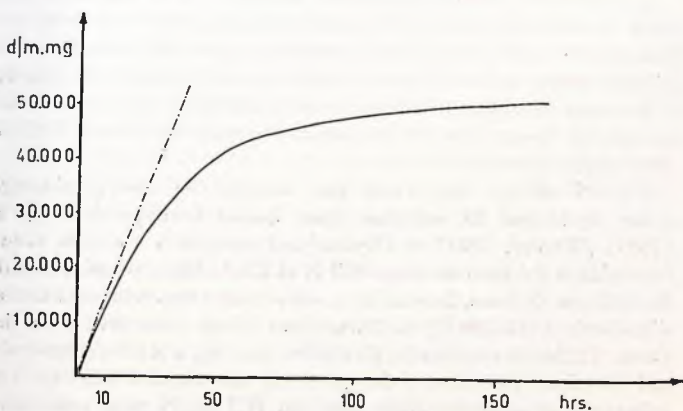


FIG. 8. — Alkylation de l'ADN par le myleran tritié en solution dans un tampon phosphate de pH 6.6 (expérience 6). La ligne discontinue donne une valeur théorique qui tient compte uniquement de l'hydrolyse du myleran.

Si la concentration initiale du myleran « a^0 » est prise égale à l'unité, la pente initiale de la courbe de la figure 8 donne : $k_2 = 19.2 \text{ min}^{-1}$.

D'autre part, moyennant : $a^0 = 1$, l'hydrolyse du myleran suit la loi exponentielle :

$$a = e^{-k_1 t}$$

d'où :

$$dx = k_2 e^{-k_1 t} dt$$

Si on suppose que l'ADN alkylé ne s'hydrolyse pas, la radioactivité de l'ADN, au temps t , devrait être :

$$x = \frac{k_2}{k_1} (1 - e^{-k_1 t})$$

La figure 8 montre que la courbe théorique représentative de la fonction « x » se place au-dessus de la courbe expérimentale. Outre les simplifications introduites dans la discussion mathématique, cette différence pourrait être due à un hydrolyse de l'ADN alkylé.

Expérience 7 : localisation des groupes alkyle attachés solidement à l'ADN.

L'ADN a été soumis pendant 3 heures à l'action du myleran tritié ; il a été précipité, lavé à l'éthanol puis à l'acétone anhydre jusqu'à ce que ce solvant n'entraîne plus de radioactivité. L'ADN alkylé a été redissous dans l'eau et, 5 heures plus tard, à nouveau précipité. On a montré précédemment que ce traitement ne laisse que du tritium fermement attaché à l'ADN (voir expérience 2).

L'ADN alkylé, qui avait une activité de 5000 d/min.mg, a été hydrolysé 30 minutes dans l'acide formique à 98 % à 175° C (WYATT, 1951) et l'hydrolysate évaporé à sec sous vide. Le résidu a été dissous dans HCl N et filtré. Après remplacement du HCl par de l'eau, la solution a été passée à travers une colonne d'Amberlite IR-120(H) et l'échangeur d'ions a été lavé avec de l'eau : l'effluent contenait 880 d/min. (par mg d'ADN hydrolysé) qui n'étaient pas liées à des produits absorbant à 260 m μ . La colonne a ensuite été éluée avec du NH₄OH N pour entraîner les bases faibles qui contenaient 3500 d/min (par mg d'ADN hydrolysé).

Cette expérience montre qu'au moins les 2/3 de la radioactivité attachée solidement à l'ADN après le traitement par le myleran tritié se trouvent dans des groupes alkyle fixés sur les bases de la macromolécule.

La fraction des bases a alors été soumise à une chromatographie à deux dimensions sur papier Whatman n° 1 selon la méthode utilisée par BROOKES et LAWLEY (1960). Le premier solvant était un mélange méthanol : éthanol : HCl concentré : eau (50 : 25 : 6 : 19, en vol.) et le second un mélange n-butanol : NH_4OH concentré : eau (86 : 1 : 13, en vol.) La lumière U.V. montra les taches fluorescentes des quatre bases normales de l'ADN plus deux supplémentaires, très faibles, aux endroits donnés par BROOKES et LAWLEY pour le dérivé 7-alkyle ($R_f = 0.48$ et 0.15) et le composé correspondant di-guanyl ($R_f = 0.26$ et 0.00). On n'a trouvé de la radioactivité qu'au niveau de ces deux dernières taches : 2950 et 250 *d/min* respectivement (par mg d'ADN hydrolysé). La radioactivité solidement liée à l'ADN traité par le myleran tritié se trouve donc principalement dans des guanines alkylées et environ 10 % des groupements alkyle forment des ponts entre deux guanines voisines.

Discussion

1) La conclusion la plus importante de ce travail est que, après traitement par le myleran, l'ADN fixe des groupements alkyle qui n'ont aucune tendance à se détacher. Ceci est évident dans les expériences 1 et 2 où l'activité spécifique de l'ADN alkylé et purifié reste stable pendant de nombreuses heures.

L'expérience 7 montre que ces groupements alkyle solidement attachés à l'ADN se trouvent principalement fixés à des résidus de guanine, 10 % environ servant à former des ponts entre deux guanines. Rappelons ici que BROOKES et LAWLEY (1961) avaient trouvé jusque 25 % des alkyles formant de tels ponts après traitement par l'ypérite.

Nous avons cherché si, à côté de ce pool de tritium lié d'une manière stable à l'ADN, il n'existait pas un ou plusieurs pools labiles caractérisés chacun par une demi-vie particulière. Notre enquête a été handicapée par des contaminations importantes dues au myleran qui n'avait pas réagi et qui était toujours présent en grand excès.

Les expériences 3 et 6, dans lesquelles l'ADN a été laissé continuellement au contact du myleran tritié, montre un accroissement pratiquement linéaire de la radioactivité liée à la macromolécule pendant les 10 premières heures et, en dépit de l'hydrolyse du myleran, cette radioactivité augmente encore après 150 heures. Ces expériences ne donnent donc aucune indication sur la présence d'un ou plusieurs pools de tritium à turnover moyennement rapide.

Pour serrer le problème de plus près, nous avons calculé ce que devrait être l'alkylation de l'ADN s'il n'y avait aucune hydrolyse de la macromolécule alkylée, mais en tenant compte de l'hydrolyse du myleran. La courbe théorique se place au-dessus de la courbe expérimentale ce qui semblerait indiquer une perte de groupements alkyle par l'ADN. Cependant notre calcul fait appel à de nombreuses simplifications, ce qui enlève beaucoup de poids à cet argument qui paraît en contradiction avec les résultats précédents.

Nous avons également recherché les produits de l'hydrolyse de l'ADN alkylé. La présence d'un excès de myleran dans le milieu réactionnel a empêché de recueillir toutes les données souhaitables. On a pu cependant montrer que, pendant les toutes premières heures après son alkylation, l'ADN n'abandonnait qu'une très petite partie de sa radioactivité sous la forme de bases alkylées (expérience 2).

2) L'action mutagène des agents alkylants électrophiliques a été attribuée à des causes très diverses.

Pour ALEXANDER et STACEY (1958), l'alkylation des groupements phosphate de l'ADN pourrait être suffisante pour induire des mutations; le mécanisme chimique de cette action pourrait dépendre de l'hydrolyse du triester formé qui est très instable, avec rupture de la chaîne sucre-phosphate.

LAWLEY et BROOKES (1962) ont postulé que la guanine alkylée en N-7 s'accouple à la thymine au lieu de la cytosine: deux reproductions successives de l'ADN conduiraient à une transition (G — C est remplacé par A — T).

Mais l'alkylation de la guanine ou de l'adénine peut être suivie de l'hydrolyse de la base alkylée (BAUTZ et FREESE, 1960). Une telle dépurination peut agir de deux manières: le trou qui apparaît offre des possibilités de transition, transversion ou de délétion d'un nucléotide lors de la reproduction de l'ADN;

la dépurination est suivie d'une rupture de la chaîne sucrophosphate.

Il est capital de remarquer que tous les mécanismes cliniques qui viennent d'être décrits, ne lésent qu'une des deux chaînes de l'ADN exposé à l'agent alkylant mono- ou bi-fonctionnel et que la mutation ne doit apparaître que dans la moitié des génomes des générations suivantes.

Mais la formation d'un pont entre les deux hélices par un agent alkylant bifonctionnel empêcherait la reproduction de la molécule d'ADN et entraînerait sa délétion au moment de la reproduction du génome; la macromolécule pontée n'aurait aucune descendance dans les générations suivantes (VERLY, DEWANDRE, MOUTSCHEN-DAHMEN et MOUTSCHEN-DAHMEN, 1963) A côté de cette différence qualitative, la mutation consécutive à la formation d'un pont est vraisemblablement la plus fréquente pour les agents alkylants bifonctionnels parce que la cible que doit atteindre le réactif est alors toute la macromolécule porteuse du gène compétent plutôt que quelques triplets sensibles à l'intérieur du gène.

3) *Peut-on utiliser le myleran tritié pour mesurer la taille de molécules d'ADN dans les cellules ?*

Dans le cas de cellules possédant des chromosomes formés d'un grand nombre de molécules d'ADN soudées par des liens plus fragiles, il est possible d'observer des mutations dues à des pontages entre les hélices d'une molécule d'ADN et il est possible de les sélectionner en choisissant seulement les mutations qui sont présentes dans tous les génomes des générations suivantes.

Par ailleurs, le myleran fixe sur l'ADN des groupements alkyle qui y restent solidement fixés. Nous aimerions connaître le pourcentage de ces groupements qui forment des ponts entre les hélices complémentaires des molécules d'ADN; la valeur de 10 % des groupements alkyle formant des ponts entre deux molécules de guanine, qui a été trouvée expérimentalement, fournit une indication qui doit être vérifiée par d'autres méthodes.

La confrontation des deux données — génétique et chimique — doit permettre, par application de la théorie des cibles et grâce à l'utilisation de l'indicateur radioactif, de calculer la grandeur de la molécule d'ADN porteuse du locus génétique étudié.

Résumé

— On a étudié l'alkylation de l'ADN de thymus de veau par le myleran en se servant du mutagène marqué avec du tritium dans sa portion alkyle.

— Après réaction avec le myleran, la plupart des groupements alkyle fixés sur l'ADN sont attachés à des bases qui n'ont aucune tendance à être hydrolysées.

— Les bases alkylées sont surtout des guanines et, dans 10 % des cas environ, le groupement alkyle forme un pont entre deux guanines liant peut-être ainsi les chaînes complémentaires de l'ADN.

— On a supposé que l'effet mutagène du myleran sur les génomes formés de nombreuses molécules d'ADN, était dû principalement à des pontages entre les hélices complémentaires d'une molécule d'ADN entraînant son inactivation biologique et sa délétion au moment de la reproduction du génome, un tel mécanisme doit engendrer la même altération dans tous les génomes des générations suivantes.

— Cette interprétation de la mutagenèse offre la possibilité d'évaluer la taille d'une molécule d'ADN portant un locus génétique déterminé par l'utilisation de myleran marqué avec du tritium.

BIBLIOGRAPHIE

- ALEXANDER, P. et STACKY, K. A. (1958). — *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, **60**, 1225.
 BAUTZ, E. et FREESE, E. (1960). — *Proc. Natl. Acad. Sc. Wash.*, **46**, 1585.
 BROOKES, P. et LAWLEY, P. D. (1960). — *Biochem. J.*, **77**, 478.
 BROOKES, P. et LAWLEY, P. D. (1961). — *Biochem. J.*, **80**, 496.
 JACOB, F. et MONOD, J. (1961). — *J. Mol. Biol.*, **3**, 318.
 KOCH, G., VERLY, W. G. et BAGO, Z. M. (1959). — *Arch. internat. Physiol. Bioch.*, **67**, 117.
 KOCH, G. (1959). — *Bull. Soc. Chim. Belg.*, **68**, 59.
 LAWLEY, P. D. et BROOKES, P. (1962). — *J. Mol. Biol.*, **4**, 216.
 LAWLEY, P. D. et BROOKES, P. (1963). — *Biochem. J.*, **89**, 127.
 LETT, J. T., PARKINS, G. M. et ALEXANDER, P. (1962). — *Arch. Biochem. Biophys.*, **97**, 80.
 VERLY, W. G., DEWANDRE, A., MOUTSCHEN-DAHMEN, J. et MOUTSCHEN-DAHMEN, M. (1963). — *J. Mol. Biol.*, **6**, 175.
 VERLY, W. G. et PETITPAS-DEWANDRE, A. (1964). — *Nature*, **203**, 865.
 WYATT, G. R. (1951). — *Biochem. J.*, **48**, 584.

EXCERPTA MEDICA

Les EXCERPTA MEDICA publient, en langue anglaise, un service extensif d'extraits des revues médicales du monde entier. Le domaine immense de la médecine, théorique et expérimentale, est couvert en 20 sections qui sont paraitre chacune 12 fascicules mensuels par an, formant une documentation unique et indispensable.

SECTION II

PHYSIOLOGY, BIOCHEMISTRY AND PHARMACOLOGY

Environ 1000 extraits par an. Prix annuel U. S. \$ 50

ABSTRACTS OF JAPANESE MEDICINE,

Publication mensuelle. Prix annuel US \$ 30.00

BUREAU DE TRADUCTIONS

Nous désirons vous rappeler les facilités dont notre Bureau de Traductions dispose pour la traduction rapide soit de publications, soit de textes manuscrits.

Nous vous prions de nous envoyer une description de la traduction requise. Vous recevrez un relevé du prix par retour du courrier.

EXCERPTA MEDICA FOUNDATION

119-123, Herengracht
AMSTERDAM (Hollande)

2 East 103rd Street
NEW YORK 29, N. Y. (U.S.A.)

67, New Bond Street
LONDON W 1, England)

Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie

Conditions de la souscription

Les *Archives Internationales de Physiologie et de Biochimie* paraissent par fascicules de 150 à 200 pages environ, illustrés de nombreuses figures. Cinq fascicules forment un volume.

Prix du volume : 850 francs belges (affranchissement compris).

On est prié d'adresser tout ce qui concerne la RÉDACTION des Archives au Prof. Henri FREDERICQ, Place Xavier Neujean, 13c, Liège (Belgique).

Les abonnements se prennent chez :
VAILLANT-CARMANNE, S. A., Imprimeur-Editeur, 4, Place St-Michel, Liège
(Chèques postaux : Bruxelles, 43.274).
et dans toutes les librairies scientifiques importantes.

Les volumes anciens se vendent à la même adresse.

Aucune demande d'abonnement n'est reçue par la Direction scientifique de la Revue.

Les auteurs reçoivent gratuitement 40 tirages à part de leurs travaux. Ils peuvent en obtenir un plus grand nombre à leurs frais.

Prix des tirages supplémentaires (minimum 50 exemplaires) brochage compris (francs belges).

Cahier de 16 pages 50 ex., 215,—; 50 ex. suivants, 181,—; 50 ex. en plus, 145,—

Cahier de 8 pages 50 ex., 158,—; 50 ex. suivants, 131,—; 50 ex. en plus, 108,—

Cahier de 4 pages 50 ex., 114,—; 50 ex. suivants, 99,—; 50 ex. en plus, 84,—

Couverture : fr. 75 par 50 ex. minimum. — Titre spécial, 150 fr.

Les clichés sont offerts aux auteurs à titre gracieux.

Paiement par anticipation.