

FONDATION EDMOND DE ROTHSCHILD  
POUR LE DEVELOPPEMENT DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

---

INSTITUT DE BIOLOGIE  
PHYSICO-CHIMIQUE

RAPPORTS  
SUR LES TRAVAUX EFFECTUES  
AU COURS DE L' ANNEE

1960

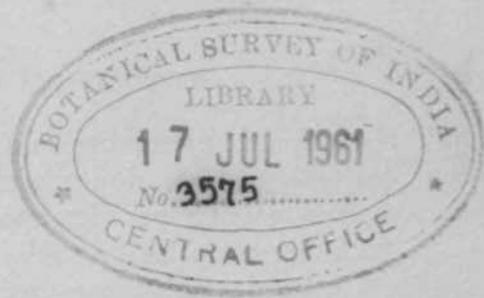
13, RUE PIERRE-CURIE  
PARIS-V\*

## CONSEIL D'ADMINISTRATION

- A. KIRRMANN, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris, Directeur adjoint de l'École Normale Supérieure.
- E. LEDERER, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris.
- A. LWOFF, F.R.S., Professeur à la Faculté des Sciences de Paris, Chef de Service à l'Institut Pasteur.
- J. PARROD, Professeur à la Faculté des Sciences de Strasbourg.
- B. PULLMAN, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris.
- J. ROCHE, Professeur au Collège de France.
- M<sup>me</sup> A. DE ROTHSCHILD.
- Lord ROTHSCHILD, F.R.S., Professeur à l'Université de Cambridge.
- MM. L. SACHS, Trésorier honoraire.
- E. TERROINE, Professeur honoraire à la Faculté des Sciences de **Strasbourg**, Directeur du Centre de Recherches sur la nutrition au C.N.R.S.
- J. TREFOUEL, Membre de l'Institut, Directeur de l'Institut Pasteur.

## COMITE DE DIRECTION

- MM. E. AUBEL, T. CAHN, G. CHAMPETIER, J. DUCLAUX, B. EPHRIEL,  
 A. DE GRAMONT, R. HEIM, E. LEDERER, FRANCIS PERRIN, B. PULLMAN,  
 J. TREFOUEL, R. WURMSER.



## SERVICE DE CHIMIE MACRO MO LECU LAI RE

Rapport de M<sup>m</sup>« A. DOBRY-DUCLAUX, Chef de Laboratoire.

L'activité du laboratoire s'est développée dans deux directions en apparence différentes :

I- — M. J. Duclaux et M<sup>me</sup> Ch. Cohn ont poursuivi leur étude sur les principes de chimie colloïdale.

L'étude des macromolécules est une forme moderne de l'étude des colloïdes, qui est beaucoup plus ancienne ; les deux termes peuvent être considérés comme synonymes.

Les colloïdes avaient attiré l'attention bien avant même que le mot soit créé. Mais leur étude n'est devenue une branche relativement indépendante de la Chimie que vers 1900. A ce moment, elle a suscité de grands espoirs. Les tissus des êtres vivants étant formés pour la plus grande partie de substances à l'état colloïdal, il semblait qu'une connaissance approfondie de cet état devait éclaircir bien des problèmes de biochimie.

Cet espoir a été déçu. A l'heure actuelle, marquée par le développement extraordinaire de nos connaissances en biologie, les faits les plus élémentaires et les plus banaux, liés à l'état colloïdal, restent inexplicables. Nous ne savons pas pourquoi un œuf mis dans l'eau bouillante devient un œuf dur. Nous ne savons pas pourquoi le lait et le sang se coagulent ou ne se coagulent pas, ni pourquoi la membrane du rein retient le glucose et laisse passer l'urée. L'efficacité de la physicochimie colloïdale, vis-à-vis de ces problèmes de biologie élémentaire qui étaient son but principal, s'est montrée dérisoire.

Si Ton recherche les raisons de cet insuccès, on les trouve dans le fait que les problèmes ont été abordés du mauvais côté et, d'une façon générale, en subissant les faits chimiques. L'accent a été mis sur les propriétés purement physiques et on s'est beaucoup servi de l'électromètre et du viscosimètre, ou même de la thermodynamique, mais non de l'analyse et de la balance. Une confusion s'est établie entre les phénomènes colloïdaux et les actions de surface, bien qu'il n'y ait entre les premiers et les seconds que quelques rares points de contact ; et cette assimilation a été inféconde. Notons qu'une réaction contre les théories purement physiques a été tentée par le grand biologiste Jacques Loeb ; mais il n'a pas été suffisamment écouté.

Sur cent travaux portant sur l'état colloïdal, il n'y en a pas un dont l'auteur se soit préoccupé de définir la nature chimique des produits qu'il a étudiés ; l'étiquette a suffi. Si tous l'avaient fait, ils seraient arrivés à un résultat très simple que Ton pourrait énoncer, en négligeant quelques nuances, en disant

qu'il n'y a rien de particulier en chimie colloïdale. Tous les faits que Ton observe sont des réactions chimiques parfaitement normales, qui ne diffèrent des réactions ordinaires que par des apparences faciles à prévoir.

L'habitude est prise de souligner les dissemblances entre la chimie des colloïdes et celle des substances ordinaires, alors qu'il est bien plus fructueux de souligner leurs analogies, et d'établir une continuité parfaite entre les colloïdes proprement dits, dont la plupart appartiennent au monde minéral, les macromolécules organiques et les molécules de petite taille. Toutes les divisions actuellement admises sont artificielles, et doivent disparaître.

Ce travail sera nécessairement long car il doit débiter par une sorte de nettoyage progressif, aboutissant au rejet de conceptions mal fondées que l'habitude a rendu en quelque sorte officielles et qu'il faut détruire l'une après l'autre.

M. J. Duclaux et M<sup>me</sup> Ch. Cohn ont commencé ce travail en 1958 et donné les premiers résultats dans deux mémoires de 1958 et 1959. Le troisième a paru en 1960. Dans ce dernier travail ils montrent, en particulier, que l'eau est un élément constitutif des colloïdes minéraux, au sens de Werner, et que beaucoup de leurs propriétés essentielles ne peuvent s'expliquer que par la présence de cette eau de constitution, dont le rôle a toujours été négligé. Elle y est en général faiblement liée, mais son départ entraîne des modifications irréversibles. En cela ils se rapprochent de beaucoup de tissus vivants, dont la dessiccation entraîne la dénaturation.

II. — C'est dans le même esprit, en s'orientant vers le côté chimique de la constitution, que M<sup>me</sup> A. Dobry-Duclaux a poursuivi ses recherches sur les macromolécules naturelles, en particulier les enzymes. L'activité de ces protéines dépend en premier lieu des fonctions chimiques qui se trouvent dans leur centre actif, au point où la réaction catalytique a lieu, et de la distribution spatiale de ces fonctions. Or nous savons très mal quelles sont les fonctions chimiques caractéristiques du centre actif, d'autant plus qu'elles sont différentes d'une enzyme à l'autre.

M<sup>me</sup> A. Dobry a signalé dans le rapport précédent qu'elle a trouvé un nouveau réactif spécifique des groupes basiques (le sel de Roussin ou le nitroso-sulfure de fer). Grâce à ce réactif, il est devenu possible de rechercher les groupes basiques dans le centre actif des enzymes. En salifiant les groupes aminés de la protéine par ce réactif, on obtient une inhibition de l'activité enzymatique. C'est en étudiant la cinétique de cette inhibition, qu'il est possible de reconnaître si les groupes basiques se trouvent dans le centre actif ou en dehors de celui-ci. Simultanément, cette méthode permet de savoir quels sont les substrats qui se fixent sur les groupes aminés des enzymes. Les résultats de cette recherche, effectuée sur huit enzymes différentes, ont été décrits dans les derniers rapports et sont parus au début de l'année 1960 dans les *Biochimica & Biophysica Acta*.

Cette année, M<sup>me</sup> A. Dobry a étudié sept autres enzymes : la lipase, la tyrosinase, la (3-amylyase, les aldéhyde-, glytamo-, glycér-aldéhyde-phosphate- et formico déshydrogénases. Le résultat en est qu'aucune de ces enzymes ne contient des groupes aminés dans son centre actif.

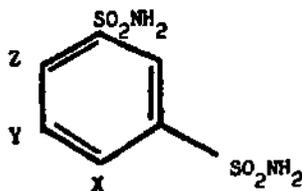
Le second sujet étudié par M<sup>me</sup> A. Dobry se rapporte à la possibilité de déterminer la fonction chimique sur laquelle se fixe le substrat sans avoir recours

aux enzymes elles-mêmes. Elle a pensé qu'en se servant de substances modèles et en étudiant la fixation de divers substrats sur ces substances, on pourrait en déduire la fonction chimique sur laquelle se fixe le substrat. Comme substances modèles elle a recours à des hauts-polymères, portant chacun une des fonctions caractéristiques des protéines. Mais il a fallu d'abord s'assurer que les résultats obtenus par cette méthode directe de fixation sont en accord avec ceux que donnent les enzymes elles-mêmes par l'étude de leur inhibition. La confrontation des résultats obtenus par ces deux méthodes a montré un accord complet pour les 19 substrats étudiés, sauf dans un cas, où le disaccord apparent a pu être levé. Il semble donc que la méthode peut être fort utile. Elle a l'avantage d'être très simple. Mais il existe un obstacle à son emploi immédiat : c'est le manque de hauts-polymères portant la plupart des fonctions caractéristiques des protéines.

On s'est donc proposé de faire au laboratoire la synthèse de certains polymères manquants. L'année dernière, M. Bourdais a préparé un polymère ayant comme chaînes latérales des restes d'histidine. On a essayé la fixation de tous les substrats, employés dans l'étude précédente, sur ce polymère. Aucun ne se fixe sur lui aux pH 6-8 qui conviennent à la plupart des enzymes. On étudie actuellement la synthèse d'un polymère qui doit contenir, en dehors des groupes aminés, des restes de phénol, correspondant à la tyrosine dans une protéine.

M. J. Bourdais a consacré son activité à la synthèse des substances organiques dont la constitution laissait prévoir une activité biologique particulière. C'est ainsi qu'il effectua la synthèse d'un copolymère doué de la propriété anti-coagulante du sang. Comme Thèparine, ce co-polymère contient des groupes sulfates, auxquels il doit son action. La synthèse et les propriétés de ce corps sont décrits dans une note aux Comptes Rendus.

Le second travail effectué par M. Bourdais, en commun avec M. F. Meyer, se rapporte à l'inhibition d'une enzyme, l'anhydrase carbonique. Il est connu que diverses disulfonamides ont un pouvoir inhibiteur sur cette enzyme. M. Bourdais a voulu savoir si une relation quelconque existe entre les propriétés physico-chimiques de ces disulfonamides et leur pouvoir inhibiteur. Il a donc effectué la synthèse de disulfonamides du type :



avec X, Y, Z = H, CH<sub>3</sub>, Cl, F, NH<sub>2</sub>, COOH, CONH<sub>a</sub>, selon le cas, et il a constaté qu'il existe une relation directe entre l'acidité du groupe SO<sub>a</sub>NHR (où R = H ou CH<sub>3</sub>) et le pouvoir inhibiteur de ces composés.

**PUBLICATIONS DE L'ANNÉE**

- J. DUCLAUX et Ch. COHN. « Constitution des colloïdes minéraux. Le rôle du solvant ». *J. Chim. phys.*, 1960, 57, 762.
- A. DOBRY-DUCLAUX. « Sur la détermination des sites actifs de certaines enzymes au moyen d'un nouveau réactif spécifique, le sel de Roussin ». I. *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 39, 33. II. *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 39, 44.
- B. E. CONWAY and A. DOBRY-DUCLAUX. « Viscosity of suspensions of electrically charged particles and solutions of polymeric electrolytes ». *Rheology, Theory and Applications*, Edit. F. R. Eirich, Acad. Press, volume III, pp. 83-120 (1960).
- J. BOURDAIS. « Copolymères de N-vinylpyrrolidone et de sulfate acide de vinyle ». *C. R. Acad. Sc.*, 1960, 251, 1636.
- J. BOURDAIS et F. MEYER. « Dérivés de benzène-disulfonamide 1-3 inhibiteurs de l'anhydrase carbonique ». *Bull. Soc. chim.* (sous presse).
- 

**COMPOSITION DU SERVICE**

M<sup>me</sup> A. DOBRY-DUCLAUX, Maître de Recherches au C.N.R.S.

M. JACQUES DUCLAUX.

M. J. BOURDAIS, Chargé de Recherches au C.N.R.S.

M<sup>me</sup> Ch. COHN, Chargée de Recherches au C.N.R.S.

M<sup>me</sup> C. ORLEY, Travailleur bénévole.

M<sup>lle</sup> N. DAUMAS, Collaboratrice technique au C.N.R.S.

## SERVICE DE BIOPHYSIQUE

Rapport de M. RENÉ WURMSER, Chef de Service.

### I. — BIOGENÈSE DES PROTÉINES SPÉCIFIQUES

*Isohémagglutinines.* — Le Rapport de Tan dernier fait état des contrastes entre les isohémagglutinines normalement présentes dans les sérums humains et celles qui sont provoquées expérimentalement ou fortuitement (S. Filitti-Würmsér et Y. Jacquot-Armand). Une différence essentielle est que les premières apparaissent comme constituées par des molécules toutes semblables, au moins en ce qui concerne les propriétés dont dépend l'affinité pour l'agglutinogène. Cette homogénéité, parce qu'elle est exceptionnelle chez les anticorps, a donné lieu à des discussions. Nous avons été ainsi amenés à la mettre en évidence d'une façon particulièrement probante. Pour cela nous avons introduit l'ensemble des données expérimentales dans une relation qui exprime la loi d'action de masse et qui a été préconisée par Scatchard, parce qu'elle a l'avantage de ne pas minimiser le domaine d'extrapolation (en pointille sur la figure i).

Soit  $r$  la fraction d'agglutinine combinée et  $(G)$  la concentration molaire des groupes agglutinogènes non combinés. On doit avoir pour toutes les valeurs de  $(G)$  :

$$\frac{r}{(G)} = m K \sim r K$$

appelant  $m$  le nombre (ici égal  $h$ ) des groupes fonctionnels pouvant réagir sur une même molécule d'agglutinine et  $K$  la constante intrinsèque de dissociation.

La figure i montre les résultats obtenus à 37° C pour l'association de trois isohémagglutinines anti-B avec les groupes agglutinogènes B. Ces isohémagglutinines sont (3(00) des sérums O, (A^A) des sérums d'individus dont le genotype est  $A_x A_{If}$  et  $p(A_x O)$ , l'isohémagglutinine hybride des individus hétérozygotes  $A_{\pm} O$ .

On voit dans tout ce domaine qui a pu être étudié expérimentalement que la relation de Scatchard est bien vérifiée. L'homogénéité de l'isohémagglutinine est prouvée plus encore par le fait que les mesures ont porté sur des sérums provenant d'un grand nombre d'individus différents et aussi sur des produits de fractionnement, constitués tantôt par le résidu d'une première agglutination, tantôt par l'agglutinine éluée à partir d'un agglutinat.

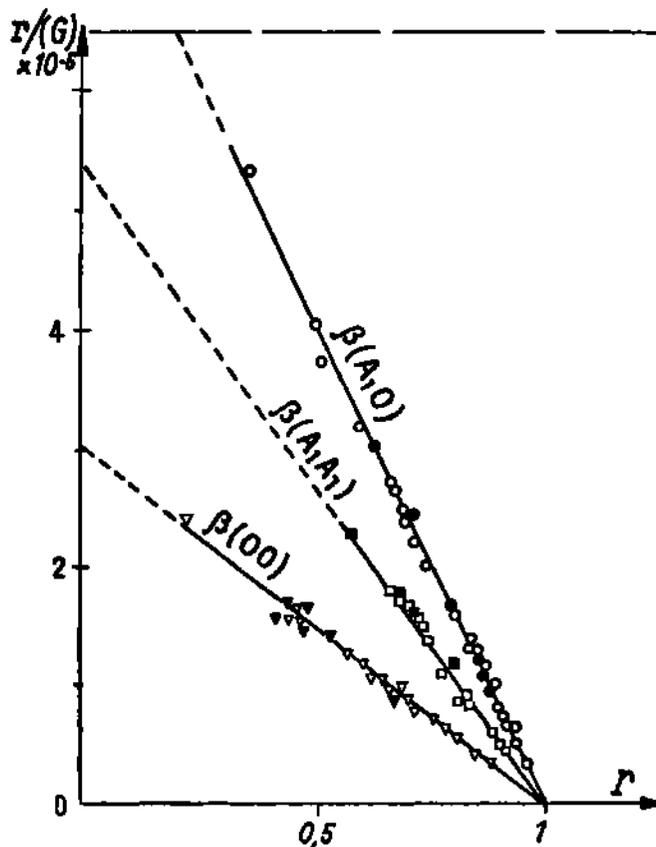


FIG. 1.

L'intérêt de cette homogénéité est illustré par un travail récent cité ici, bien qu'il ait été effectué au Centre Départemental de Transfusion Sanguine. Ch. Salmon (thèse de la Faculté des Sciences) a appliqué notre méthode à l'étude d'un phénotype Ax extrêmement rare. Il a pu par ce moyen montrer l'homogénéité de l'anticorps anti-B, non seulement dans un même sérum mais d'un sérum à l'autre, apportant ainsi une nouvelle preuve que la synthèse de l'anticorps naturel est en relation avec le génotype de l'individu.

## 11. — ETUDES SUR DES PROTEINES SPECIFIQUES

1. *Macroglobulines du sérum.* — Une source d'informations sur la biosynthèse des protéines est constituée par les protéines anormales des tissus et du plasma. Un travail de L. Hartmann et S. Filitti-Wurmser a déjà permis une classification des macroglobulines du sérum humain. Les macroglobulines correspondant au pic M des diagrammes d'ultra-centrifugation sont différenciées en deux constituants  $0.6M$  et  $0.3M$  par immunoelectrophorèse, la répartition de chacun d'eux étant imputée à des troubles pathologiques déterminés. L'étude physico-chimique du constituant  $0.3M$  a été entreprise, en particulier par des mesures de viscosité et de spectrophotométrie en ultra-violet.

Un caractère intéressant de la molécule, dont la forme est celle d'une sphère

aplatie, est son hydratation considérable. Sa composition présente des variations en relation avec Torigine pathologique.

2. *Déshydrogénases lactiques.* — Poursuivant l'étude comparative de la D<sup>ct</sup> de la L-lactico-déshydrogénase de la levure anaérobie, A. Baudras, M. Iwatsubo et F. Labeyrie donnent un argument nouveau pour penser que la flavine spécifique de cette enzyme est la flavine-adénine-dinucléotide (FAD).

Ceci résulte d'expériences sur l'inactivation progressive par la quinacrine (ou acébrine). En présence de FAD l'enzyme perd peu d'activité. Si FAD est ajouté au mélange enzyme-quinacrine après une inactivation notable, celle-ci cesse d'évoluer. La flavine mononucléotide (FMN) et la riboflavine & la même concentration  $10^{-5}$  n'ont aucun effet protecteur et FMN n'entre pas en compétition avec FAD.

Des expériences analogues ont été faites avec la L-lactico-déshydrogénase. Cette enzyme est inactivée, elle aussi, par la quinacrine de façon progressive. Mais FMN et FAD protègent tous deux l'enzyme de manière équivalente, et à des concentrations très grandes, de l'ordre de  $10^{-3}$  M.

Ainsi FMN, qui d'après les déterminations analytiques est le groupe actif de la L-lactico-déshydrogénase, n'a pas d'action protectrice spécifique. L'explication doit sans doute être recherchée dans le mode de liaison à l'apoenzyme.

3- *Mécanisme de l'action de la trypsine.* — J. Yon et G. Aubel-Sadron ont publié ensemble de leur travail sur l'influence des variations du pH et de la constante diélectrique sur la cinétique d'hydrolyse de la p-lactoglobuline native. Par ailleurs, dans ce qui concerne l'effet des variations de pH, les résultats ont été indiqués dans le Rapport de 1959. L'étude de la réaction en fonction de la constante diélectrique montre qu'une variation de cette constante n'a pas plus d'effet qu'une variation de pH sur la formation du complexe trypsine-lactoglobuline. Ce qui confirme le rôle des forces de van der Waals dans l'association des deux protéines. Comme lors des variations de pH, la vitesse de décomposition du complexe est fortement influencée par les variations de la constante diélectrique. Mais dans ce dernier cas il apparaît deux effets distincts. Le plus important est attribué à la présence du groupe  $\alpha$ -aminé; le second résulte soit de groupes chargés plus éloignés du centre actif, soit d'une modification du substrat.

4- *Dissociation de la lactoglobuline.* — L'étude de C. Georges et S. Guinand sur la diffusion de la lumière par la (3-lactoglobuline fournit des données précises sur la dissociation réversible de cette protéine.

Entre pH 5,5 et pH 6, le rapport I/C de l'intensité de la lumière diffusée à la concentration de lactoglobuline est indépendant du pH, mais varie avec la température. Entre pH 6 et pH 9,2, I/C varie avec le pH et la température. Ses résultats s'expliquent par l'existence d'une coupure de la molécule, une droite I<sub>1</sub>/C correspondant aux demi-molécules et I<sub>2</sub>/C aux molécules entières. On peut admettre le schéma suivant :



La valeur de la variation d'enthalpie pour l'équilibre (I),  $\Delta H^0 = 10\ 000$  cal/mole, montre que la dissociation réversible de la molécule de lactoglobuline, de pH 5,5 à pH 6, exige vraisemblablement la rupture de deux liaisons si Ton admet une valeur de 5 000 calories pour l'enthalpie de rupture d'une liaison électrostatique ou d'une liaison hydrogène.

Au delà de pH 6 on constate la disparition progressive d'une de ces liaisons par ionisation d'un groupe chargé dont le  $pK_a$  et l'enthalpie correspondent à celui d'un groupe imidazole.

La seconde des liaisons qui interviennent dans l'équilibre (I) serait responsable de l'équilibre (III). La variation d'enthalpie de ce dernier équilibre entre 20° et 35° C correspond à une seule liaison dont la nature est encore inconnue.

D'autre part, alors qu'on trouve une variation d'entropie de 10 unités jusqu'à 35° dans l'équilibre (III), valeur normale pour une seule liaison rompue, on a par contre dans l'équilibre (I) une variation d'entropie de 11 unités au lieu de 25, valeur à laquelle on aurait dû s'attendre étant donné qu'il s'agit de la rupture de deux liaisons. Il est vraisemblable que l'augmentation de désordre provoquée par la coupure de la molécule est compensée dans une certaine mesure par l'organisation des molécules d'eau autour des groupes chargés qui, par suite de la coupure, deviennent plus accessibles.

*5. Dénaturation de l'hémoglobine.* — Les recherches de R. Banerjee sur la dénaturation de l'hémoglobine par l'urée et la guanidine ont finalement établi que Faction de ces deux agents porte sur la partie globine de la molécule. L'action de la guanidine n'est pourtant pas identique à celle de l'urée puisque, contrairement à cette dernière, elle s'accompagne de la disparition d'une ionisation ( $pK_a$  6,5) de la méthémoglobine, et que la modification du potentiel d'oxydoréduction observée est insensible aux variations de température.

Ainsi l'action de divers agents dénaturants cependant apparentés peut provoquer dans la molécule de la même protéine des transformations primaires de caractères différents.

### III

Les recherches sur la photosynthèse (voir le Rapport de 1959) sont actuellement poursuivies par R. Delosme.

Une nouvelle détermination du potentiel d'oxydoréduction du système lactate pyruvate a été effectuée par F. Labeyrie, L. Naslin, A. Curdel et R. Wurmsler. Il existait en effet un désaccord entre les résultats de toutes les mesures électrométriques directes effectuées par divers auteurs et la valeur calculée à partir d'autres équilibres. La nouvelle détermination  $E'_0 = -0,190$  v à pH 7 et 27° C coïncide avec la valeur calculée. L'écart de 0,030 volt avec les mesures anciennes a pour origine la stéréospécificité de l'enzyme qui n'avait pas été prise en considération.

## LJSTE DES PUBLICATIONS

- S. FIUTTI-WURMSER, Y. JACQUOT-ARMAND et R. WURMSER : « Sur les isohdmagglutinines naturelles du système A, B, 0 ». *Rev. Hématologie*, 1960, 15, pp. 201-216.
- L. HARTMANN, S. FILITTI-WURMSER, N. LELIIVRE-ARDAILLOU et P. BOIVIN : « fitude biologique des macroglobulines s<sup>^</sup>riques ». *Le Sang*, 1960, 31, pp. 491-527.
- A. BAUDRAS, M. IWATSUBO et F. LABEYRIE : « Groupes flaviniques des Iactico6shydrognases de la levure ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960, 250, pp. 2621-2623.
- J. X<sup>?</sup>, N. G\* AUBEL-SADRON : a Influence des variations du pH et de la constante dielectrique sur la cin6tique d'hydrolyse de la (3-lactoglobuline native par la tryptisme ». *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1960, 42, pp. 209-219.
- Cl. GEORGES et S. GUINAND : « Sur la dissociation reversible de la p<sub>3</sub>-lactoglobuline \* des pH supérieurs à 5,5.1. fitude par la diffusion de la lumiere ». *J. Chim. Phys.*, 1960, 57, pp. 606-614.
- R. BANERJEE : « Essai de localisation de Taction de Turk sur le potentiel d'oxydoréduction de TWrnoglobine ». *J. Chim. Phys.*, 1960, 57, pp. 615-626.
- R. BANERJEE : « Essai de localisation de Taction du chlorhydrate de guanidine sur le Potentiel d'oxydoreduction de rhémoglobine. *J. Chim. Phys.*, 1960, 57, pp. 627-633.
- J. MONTREUIL, J. TONNELAT et S. MULLET : « Préparation et piopri<sup>^</sup>tés de la lacto<sup>^</sup>erophiline (lactotransferrine) du lait de femme ». *Biochim. Biophys. A'ta*, 1960, 43, pp. 43-45.
- F. LABEYRIE, L. NASLIN, A. CURDEL et R. WURMSER : « Nouvelle determination du potentiel d'oxydor6duction du systeme lactate-pyruvate ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 41, pp. 509-515.
- M. DUPONT : « « Influence des sels de sodium sur la dcnauration thermique de la p-lactoglobuline bovine ». Doctorat de Speciality. 14 juin 1960.
- P. JOLIOT : « Contribution`a Tetude des phe'nomenes d'induction de la photosynthese ». Thèse (Sciences Physiques), Paris, juin 1960.
- P<sup>n</sup>\* MORIN : « Etude de la fluorescence de la chlorophylle in vivo dans les premiers instants qui suivent le début de Téclairage ». Diplôme d'fitudes Sup<sup>^</sup>rieures de la Faculty des Sciences, Paris, 1960.

## COMPOSITION DU SERVICE

- M. RENÉ WURMSER, Professeur Honoraire à la Faculté des Sciences.
- M<sup>me</sup> S. FILITTI-WURMSER, Maitre de Recherches au C. N. R. S.
- M. J. TONNELAT, Professeur à la Faculté des Sciences.
- M<sup>me</sup> Y. JACQUOT-ARMAND, Chargée de Recherches au C. N. R. S.
- M<sup>me</sup> s. GUINAND, Maitre de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> F. LABEYRIE, Maitre de Recherches au C. N. R. S.
- M<sup>me</sup> J. YON, Chargée de Recherches au C.N.R.S.
- M. P. JOLIOT, Charge de Recherches au C.N.R.S.
- M. R. BANERJEE, Charge de Recherches au C. N. R. S.

M. CL. GEORGES, Assistant à la Faculty des Sciences.  
M. J. BIDALLIER, Chef de Travaux à la Faculté des Sciences.  
M. R. DELOSME, Attaché de Recherches au C. N. R. S.  
M<sup>lle</sup> A. CURDEL, Attachée de Recherches au C. N. R. S.  
M. M. IWATSUBO, Professeur & l'Université d'Osaka.  
M<sup>Ue</sup> M. DUPONT, Attachée de Recherches au C. N. R. S.  
M. A. BAUDRAS, Attaché de Recherches au C. N. R. S.  
M<sup>lle</sup> M. MONNOT, Stagiaire au C. N. R. S.  
M. R. CHABAUD, Assistant à la Faculté des Sciences.  
M. PH. MORIN, élève de l'Ecole Normale Supérieure.  
M. D. PANTALONI, Boursier de 3<sup>e</sup> Cycle.  
M<sup>Ue</sup> L. NASLIN, Collaborateur technique au C. N. R. S.  
M<sup>lle</sup> D. WAECKERLE, Secrétaire au C. N. R. S.  
M<sup>lle</sup> A. BARNIQUOD, Collaborateur technique au C. N. R. S.  
M. L. SAGAERT, Collaborateur technique au C. N. R. S.  
M<sup>me</sup> D. BENSOUSSAN, Collaborateur technique au C. N. R. S.  
M<sup>me</sup> J. ZALTA, Collaborateur technique au C. N. R. S.  
M<sup>lle</sup> M. CHARLES, Collaborateur technique au C. N. R. S.

## SERVICE DE BIOCHIMIE THEORIQUE

Rapport de M. BERNARD PULLMAN, Chef de Service.

### I. — STRUCTURE SUB-MOLÉCULAIRE DES ACIDES NUCLÉIQUES.

A. et B. Pullman ont poursuivi leurs recherches sur la structure électronique des bases puriques et pyrimidiques entrant dans la constitution des acides nucléiques. Les calculs relatifs à la distribution des niveaux d'énergie électronique et des charges électriques dans ces composés permettent de dresser une carte des susceptibilités réactionnelles des acides nucléiques vis-à-vis des principaux réactifs chimiques.

L'ensemble des résultats obtenus est schématisé sur les figures 1 et 2.

La figure 1 indique quels sont, selon le cas, les atomes ou les groupes d'atomes, ou même les bases entières pour qui les différents indices énergétiques ou électroniques possibles prennent une valeur particulièrement significative (en fait, les indices sont soulignés par un trait plein pour les positions pour lesquelles leur valeur est la plus importante, et par un trait en pointillé pour des positions de deuxième importance).

La figure 2 indique la nature et le siège des propriétés chimiques et physico-chimiques correspondantes. Ainsi, par exemple, on remarque sur la figure 1 que l'atome le plus basique des acides nucléiques est l'atome N<sub>7</sub> de la guanine. Corrélativement, on voit sur la figure 2 que cet azote est effectivement dans les acides nucléiques le siège essentiel de la protonisation, des alcoylations et des chélationes par des ions métalliques. De même, on remarque sur la figure 1 que les liaisons hydrogène de la paire guanine-cytosine apportent un plus grand incrément d'énergie de résonance que les liaisons correspondantes de la paire adénine-thymine. Corrélativement, on constate sur la figure 2 que les liaisons hydrogène de la paire adénine-thymine sont plus fragiles que celles de la paire guanine-cytosine (résultats de Doty *et al* sur la température de dénaturation des acides nucléiques). Il convient de souligner tout particulièrement que cette étude a permis une interprétation très détaillée des aspects structuraux de l'effet des radiations sur les acides nucléiques et aussi qu'elle a mis en évidence la stabilité thermodynamique et réactionnelle particulière du noyau de l'adénine, stabilité qui n'est peut-être pas sans relation avec le rôle particulier de ce composé en biochimie.

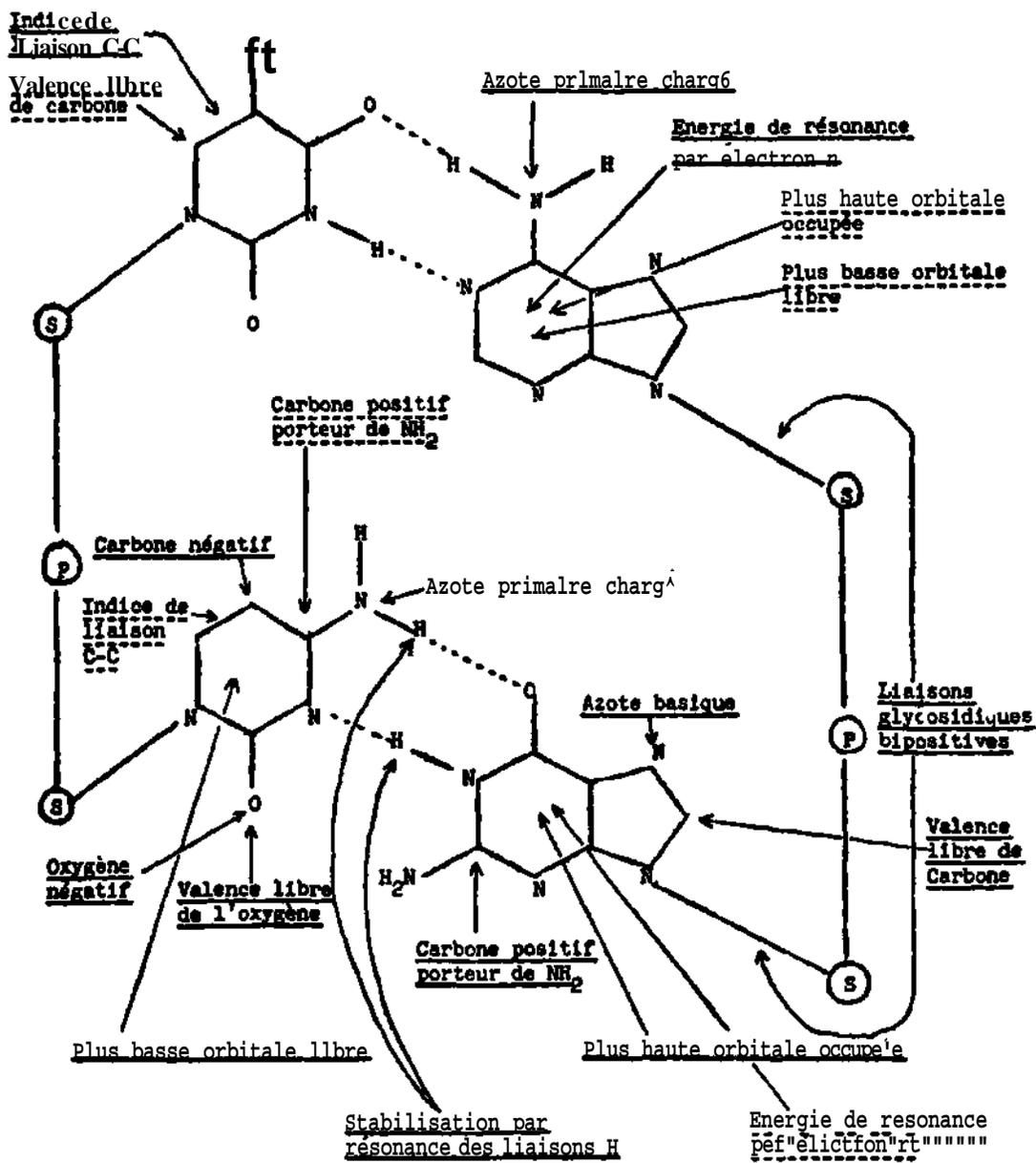


Fig.1, Sièges les plus significatifs des Indices électroniques et énergétiques des bases hétérocycliques des acides nucléiques\*.

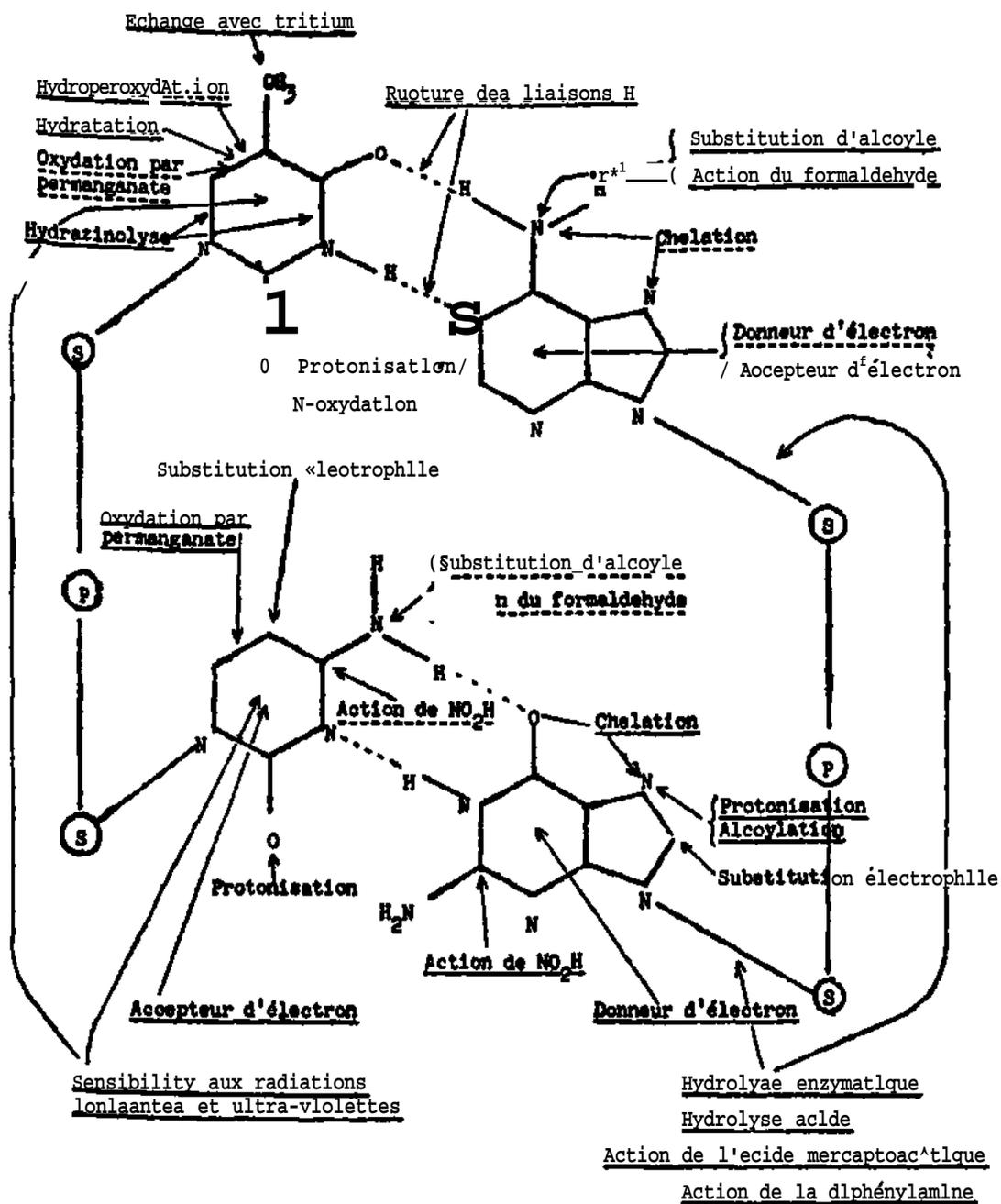


Fig.2. Localisation des centres essentiels de propriétés chimiques et physico-chimiques des bases hétérocycliques des acides nucléiques.

## II. - LE MÉCANISME ELECTRONIQUE DU FONCTIONNEMENT DES COENZYMES.

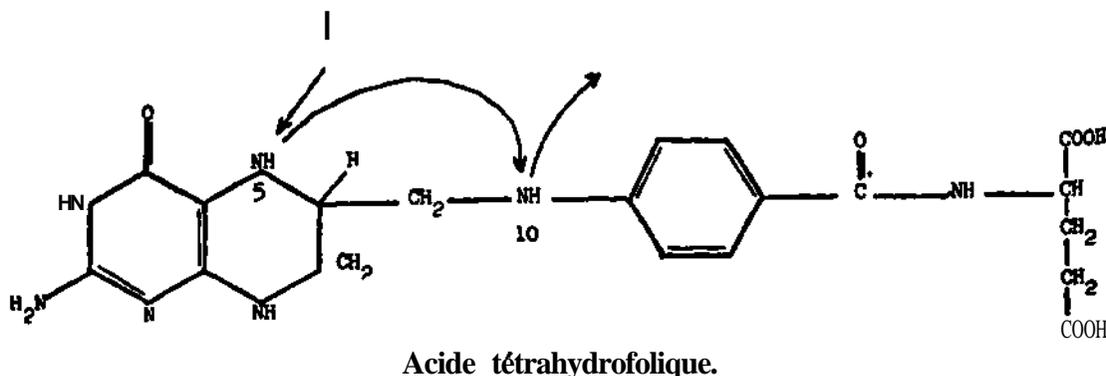
Les recherches dans ce domaine, qui ont constitué un des aspects principaux de l'activité de notre laboratoire pendant cette année, sont de deux sortes.

### A. — EXTENSION AUX CYTOCHROMES DE NOS TRAVAUX PRÉCÉDENTS SUR LE MÉCANISME DE FONCTIONNEMENT DES COENZYMES DE TRANSFERT D'ÉLECTRONS.

M<sup>lle</sup> Spanjaard, G. Berthier et B. Pullman ont effectué des calculs des niveaux d'énergie dans les différents types de complexes fer-porphyrine et en ont déduit que le mécanisme du transfert électronique par des cytochromes peut être interprété, comme celui des coenzymes d'oxydo-réduction, en fonction des énergies de la plus haute orbitale occupée et de la plus basse orbitale libre des formes oxydées et réduites de ces substances. A la différence toutefois des coenzymes, l'oxydo-réduction ne s'accompagne dans les cytochromes que d'une faible variation de ces énergies. La forme réduite présente l'anomalie de posséder une plus haute orbitale occupée antiliante, la forme oxydée la particularité d'avoir 3 électrons  $n$  sur deux orbitales dégénérées.

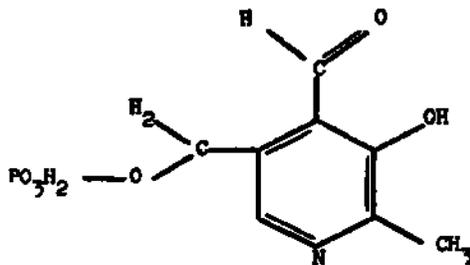
### B. — ÉTUDE DES ASPECTS ÉLECTRONIQUES DU MÉCANISME DE FONCTIONNEMENT DES COENZYMES DE TRANSFERT DE GROUPES.

Les quatre coenzymes principaux, l'acide folique, le phosphate du pyridoxal, le pyrophosphate de la thiamine et le CoA ont été étudiés en détail.



Le mécanisme (action des coenzymes de l'acide folique a été étudié par M<sup>lle</sup> A. M. Perault et B. Pullman. C'est l'acide tétrahydrofolique qui est le coenzyme actif pour le transfert des unités monocarbonées. Ce transport comporte l'acceptation de ces unités par N<sub>5</sub> du squelette, leur transfert interne en N<sub>10</sub> (éventuellement la formation d'un intermédiaire N<sub>5</sub> — N<sub>10</sub>) et le don de ces unités par N<sub>10</sub> (ou par l'intermédiaire précité). Les auteurs ont montré que l'acceptation par N<sub>5</sub> est due à la réactivité particulièrement élevée de cette position du fait de sa grande valence libre et du faible taux de conjugaison de

son doublet libre et que, en revanche, le don à partir de la position  $N_{10}$  (ou  $^{\wedge e} \wedge^{nterm}$  médiane  $N_5 - N_{10}$ ) est le plus facile à effectuer, à cause de la biposivite élevée des liaisons à rompre. Chaque étape du transfert est donc régie par des conditions électroniques particulières qui en garantissent le rendement élevé.



Phosphate de pyridoxal.

Le mécanisme de fonctionnement du *phosphate de pyridoxal* a été examiné par Miles A. M. Perault et C. Valdemoro et par B. Pullman. Tout en adoptant l'hypothèse que les réactions catalysées par ce coenzyme comportent une suite de bases de Schiff intermédiaires, les auteurs ont montré que la théorie qualitative de Snell-Metzler-Braunstein, généralement admise, reposait sur une idée erronée. Une étude très détaillée de la quasi-totalité des réactions très différentes catalysées par ce coenzyme a montré qu'elles étaient toutes régies par un mécanisme assez semblable. L'étape essentielle s'est avérée être la transformation de la base de Schiff initiale en une base intermédiaire, par le départ d'un des atomes ou groupes d'atomes fixés sur le carbone à des acides aminés des protéines, cette transformation s'accompagnant toujours d'une forte stabilisation par résonance de la base intermédiaire. A titre d'exemple, cette transformation est indiquée sur la figure 3 pour la labilisation du proton en  $\alpha$ . Elle s'accompagne dans ce cas d'un gain d'énergie de résonance de l'ordre de  $10^4$  Kcal/mole.

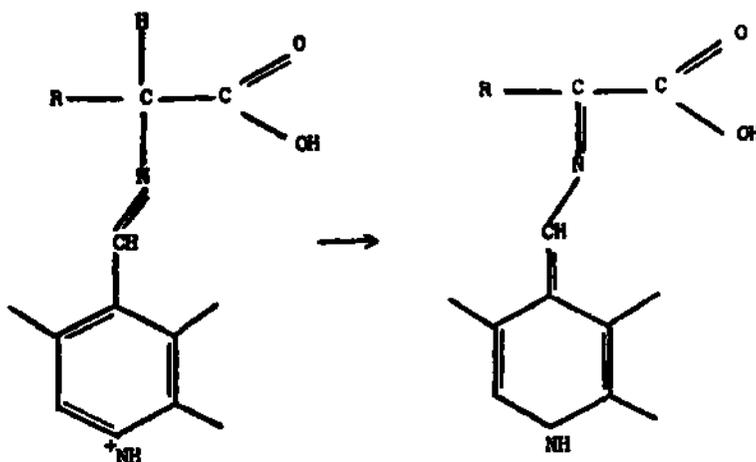
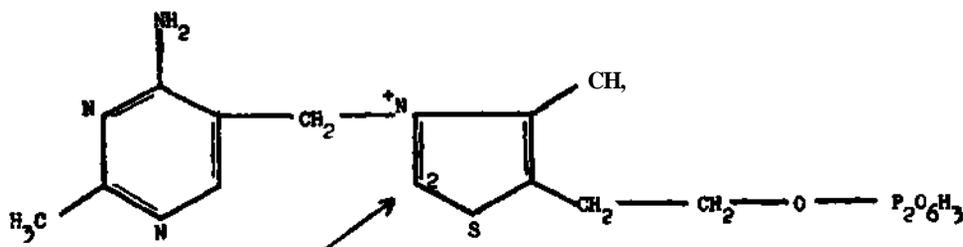


FIG. 3.

L'étude de la structure de la base intermédiaire permet alors de prévoir l'évolution future de la réaction et les résultats sont en parfait accord avec l'expérience. La base intermédiaire est caractérisée en effet, en général, par

des concentrations locales très fortes des charges électriques, garantissant un développement rapide de la réaction.



Pyrophosphate de la thiamine.

Le mécanisme des réactions catalysées par le *pyrophosphate de la thiamine* a été étudié par M<sup>Ue</sup> Spanjaard et B. Pullman. Les auteurs ont montré que le centre actif du coenzyme est constitué probablement par le C<sub>2</sub> de son noyau thiazolium et ont de nouveau examiné en détail les différentes phases de la catalyse. Us ont également rendu compte du comportement d'un certain nombre d'analogues de la thiamine.

Finalement, le mécanisme de fonctionnement du CoA a été étudié par B. Pullman. Les calculs effectués pour les principaux types de composés intervenant dans les réactions catalysées par ce coenzyme ont rendu compte de la nature « riche en énergie » de ces corps et ont permis une interprétation satisfaisante de leurs réactions.

Outre l'interprétation détaillée des réactions concernant ces différents coenzymes de transport des groupes, ces recherches ont permis de dégager certains aspects communs, présidant visiblement à l'ensemble des transformations enzymatiques. Ainsi on a pu constater que dans chaque cas, pour chaque coenzyme, l'élément moteur essentiel de la réaction est la transformation du produit primaire, résultant de l'interaction du coenzyme avec un substrat, en un produit intermédiaire dont les caractéristiques essentielles sont, d'une part, une grande stabilité énergétique due à une forte énergie de résonance et, d'autre part, une grande réactivité chimique, due à la présence d'accumulations de fortes charges formelles, positives ou négatives, en électrons et de grandes valences libres. Par conséquent, ces intermédiaires auront à la fois une grande tendance à se former et en même temps une grande tendance à continuer à réagir. (Faible énergie d'activation pour leur formation mais également faible énergie d'activation pour leurs transformations consécutives). Ces facteurs doivent jouer un rôle essentiel dans le mécanisme des réactions enzymatiques et leur mise en évidence permet de comprendre pourquoi la quasi-totalité des coenzymes est constituée par des systèmes conjugués. C'est uniquement avec de tels systèmes que ces phénomènes de stabilisation et d'activation simultanées et prononcées des états de transitions peuvent, en effet, être obtenus.

### HI. — RECHERCHES SUR LA STRUCTURE ET LE RÔLE BIOCHIMIQUE DES POLYÈNES CONJUGUÉS (*Retinènes, caroténoïdes, vitamines A*).

M<sup>Ue</sup> Berthod et M<sup>TM</sup> Pullman ont effectué une étude, très complexe car elle nécessite l'utilisation de méthodes théoriques perfectionnées, ayant pour but

de déterminer s'il existait des différences de structure entre les différents isomères du rétinène capables de se combiner ou d'exister en combinaison avec la rétinaldésine (néo-b, iso-a, *all-trans*) et les isomères inaptés à ces fonctions (iso-b, néo-a, néo-c). Les calculs ont permis la mise en évidence de telles différences. Les trois premiers isomères du rétinène ont une plus haute orbitale occupée située légèrement plus haut et une plus basse orbitale libre située légèrement plus bas que les trois autres isomères. Le potentiel d'ionisation du doublet libre de l'oxygène terminal doit également être plus faible dans les isomères s'associant à la rétinaldésine. Il se peut que ces caractéristiques électroniques jouent un rôle dans l'établissement de la liaison entre le rétinène et la rétinaldésine, sans que l'on puisse toutefois déterminer leur importance.

M<sup>me</sup> Pullman a également établi que les caroténoïdes devraient être de très bons donneurs d'électrons, que la structure électronique du (J-carotène) milite en faveur des théories qui postulent une attaque terminale sur la liaison 7-8 lors de la transformation de cette molécule en vitamine A dans l'organisme, et a établi des caractéristiques de structure des différents apo-caroténoïdes susceptibles d'exister comme intermédiaires dans cette transformation.

#### IV. — DIVERS.

M<sup>me</sup> Pullman a étudié le problème de l'existence de l'activité cancérogène dans les hydrocarbures hydroaromatiques. Elle a montré que cette activité est probablement liée à la déshydrogénation de ces composés *in vivo* en hydrocarbures aromatiques correspondants et que le facteur essentiel responsable de la capacité des composés hydroaromatiques à subir cette transformation est leur pouvoir donneur d'électrons, mesuré par l'énergie de leur plus haute orbitale moléculaire occupée.

A. et B. Pullman ont étendu au groupe des imidazo [4,5-d] pyridazines leur théorie sur la relation entre la structure électronique et l'activité antimétabolite des bases puriques en montrant que, dans ces composés également, l'existence de l'activité était conditionnée par la présence de l'azote le plus basique sur la position 1 et par le fait que la basicité de cet azote était du même ordre de grandeur que celle de l'azote correspondant de l'adénine.

Poursuivant nos recherches antérieures sur le mécanisme d'action des enzymes d'hydrolyse, M<sup>Ue</sup> Valdemoro et B. Pullman ont étudié la structure électronique des inhibiteurs organophosphoriques des estérases. Us ont montré que la liaison hydrolysable de ces substances est, tout comme celle des substrats habituels, bipositive et que le pouvoir inhibiteur des inhibiteurs apparentés stériquement évoluait parallèlement à la charge positive de leurs atomes de phosphore.

Un certain nombre de travaux de Chimie Théorique pure ont également été effectués. Mentionnons surtout les recherches très complètes de M<sup>me</sup> Berthod sur la structure de l'éthylène, compte tenu de tous les électrons (problème de l'interaction G-TC) et ceux de M<sup>me</sup> Suard et G. Berthier sur les caractéristiques électroniques du groupement carbonyle, qui ont servi comme point de départ aux recherches, actuellement en cours, sur la structure électronique de la liaison peptidique.

D'autre part M. Charbonnière, dont le laboratoire est rattaché au Service de Biochimie Théorique, a poursuivi ses études sur le rôle de l'eau dans l'organisation des chaînes macromoléculaires dans le grain d'amidon. Il a pu obtenir la caractérisation de plusieurs domaines d'hydratation remarquables de l'amidon et déterminer pour chacun d'eux l'énergie de la liaison eau-amidon. Il a pu mettre en évidence, par diffraction des rayons X, l'existence d'une importante différence de comportement des amidons de blé et de pomme de terre vis-à-vis de l'eau et montrer que les groupements oxhydriels de l'amidon sont responsables de l'absorption diélectrique de la mie de pain fraîche déshydratée.

Il a également abordé l'étude des moments dipolaires des purines et pyrimidines d'intérêt biochimique.

---

### LISTE DES PUBLICATIONS

- B. PULLMAN. « Les transitions électroniques dans les molécules organiques » dans *Struttura delle molecole*, Accademia Nazionale dei Lincei, 1959, p. 23.
- B. PULLMAN. « Relazione tra struttura elettronica ed attività cancerogène delle sostanze aromatiche » dans *Struttura delle molecole*, Accademia Nazionale dei Lincei, 1959, p. 5\*.
- B. PULLMAN et A. PULLMAN. « The electronic structure of energy-rich phosphates » *Radiation Research*, 1960. Suppl. 2, 160.
- B. PULLMAN et A. PULLMAN. « Some electronic aspects of biochemistry », *Rev. Modern Physics*, 1960, **32**, 428.
- B. PULLMAN et A. PULLMAN. « Structural aspects of radiation effects on nucleic acids and related substances » dans *Comparative effects of radiations* (M. Burton, J. & Kirby-Smith et J. L. Magee, éditeurs), Wiley and sons, 1960, p. 105.
- A. M. PERAULT et B. PULLMAN. « Electronic structure and biochemical function of folic acid coenzymes ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, **44**, 251.
- B. PULLMAN et A. PULLMAN. « Electronic structure and antitumor activity of imidazo[4, 5-d]-pyridazines ». *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 1960, 2, 239.
- B. PULLMAN, C. SPANJAARD et G. BERTHIER. « Features of the electronic structure of the iron-porphyrin complexes with special reference to the oxidoreductive properties of cytochromes ». *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 1960, 46, 101.
- B. PULLMAN et C. VALDEMORO. « Electronic structure and activity of organophosphorous inhibitors of esterases ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, **43**, 548.
- H. BERTHOD and A. PULLMAN. « Aspects de la structure électronique du rétinène et de ses isomères d'intérêt biologique ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960, 251; 808.
- A. PULLMAN. « Caractéristiques électroniques des polyènes conjugués d'intérêt biologique (Caroténoïdes, Vitamines A, Rétinènes) ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960, **251**, 1430.
- B. PULLMAN. « Aspects électroniques des transformations biochimiques catalysées par la Coenzyme A ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960, 251, 1581.
- A. PULLMAN. « Sur l'activité cancérigène des hydrocarbures hydroaromatiques ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960, **251**, 2438.

- B. PULLMAN. « Aspects électroniques de la relation entre la structure des composés organiques, leur activité cancérogène et leur interaction éventuelle avec des constituants cellulaires ». *Berliner Symposium über Fragen der Carcinogenese*. Abh Deuts. Akad. Wissensch. Berlin, 1960, 3, 69.
- A. M. PERAULT, B. PULLMAN et C. VALDEMORO. « Electronic aspects of the reactions of pyrodoxal phosphate enzymes ». *Biochim. Biophys. Acta* (sous presse).
- B. PULLMAN et C. SPANJAARD. « Electronic aspects of the mechanism of thiamine catalyzed reactions ». *Biochim. Biophys. Acta* (sous presse).
- B. PULLMAN. « Quelques aspects de la relation entre la structure moléculaire et les spectres ultra-violetts ». *Chimia* (sous presse).
- P. ABADIE, R. CHARBONNIERE, P. GIRARD f et A. GUILBOT. « Étude du rassisement de la mie de pain par spectroscopie hertzienne. Groupements responsables de l'absorption diélectrique dans la mie fraîche déshydratée ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960, 250, 503.
- A. GUILBOT, R. CHARBONNIERE, P. ABADIE et P. GIRARD f. « L'eau de sorption de Tamidon : étude par spectrologie hertzienne ». *Die Stärke*, 1960, 12, 327.
- B. PULLMAN. « La structure moléculaire ». Presses Universitaires de France, Collection « Que sais-je ? » 3<sup>e</sup> Edition française, Edition espagnole et édition anglaise.

---

### COMPOSITION DU SERVICE

- M. B. PULLMAN, Professeur à la Faculté des Sciences.
- M<sup>TM</sup> A. PULLMAN, Maître de Recherches au C. N. R. S.
- M. G. BERTHIER, Maître de Recherches au C. N. R. S.
- M. MILTON TAMRES, Professeur Stranger (U. S. A.).
- M<sup>II\*</sup> C. VALDEMORO, Chercheur Stranger (Espagne).
- M. W. KUTZELNIGG, Boursier de TO. T. A. N. (Allemagne).
- M<sup>me</sup> J. SERRE, Professeur à l'École Normale Supérieure de Jeunes Filles de Sèvres.
- M. R. CHARBONNIERE, Chargé de Recherches au C. N. R. S.
- M<sup>me</sup> Y. GARREAU, Chargée de Recherches au C. N. R. S.
- M<sup>me</sup> H. BERTHOD, Attachée de Recherches au C. N. R. S.
- M<sup>me</sup> M. SUAPD, Agrégée-Préparatrice à l'École Normale Supérieure de Jeunes Filles de Sèvres.
- M. S. DINER, Attaché de Recherches au C. N. R. S.
- M<sup>me</sup> A. M. PERAULT, Attachée de Recherches au C. N. R. S.
- M<sup>me</sup> J. BAUDET, Attachée de Recherches au C. N. R. S.
- M. A. VEILLARD, Stagiaire-Agrégée au C. N. R. S.
- M<sup>me</sup> C. SPANJAARD, Élève de l'École Normale Supérieure de Jeunes Filles de Sèvres.
- M. SUREAU, Boursier de 3<sup>e</sup> cycle.
- M<sup>me</sup> R. ASTIC, Collaboratrice technique au C. N. R. S.
- M<sup>me</sup> L. PILLARD, Aide-technique de l'E. N. I. A.

## SERVICE DE BIOCHIMIE A

Rapport de M<sup>TM</sup> Y. KHOUVINE, Chargée de Service.

Comme les années précédentes, mes collaborateurs travaillent essentiellement sur le métabolisme des nucléoprotéides et ceux de M. le Professeur Rosenberg, sur la biochimie cellulaire en particulier sur la biochimie de la cellule cancéreuse.

### I. — *BIOCHIMIE DES NUCLÉOPROTÉIDES*

Nous avons continué à étudier le métabolisme des nucléoprotéides et les synthèses de protéines par les particules cellulaires. Cette année, ces recherches ont porté, surtout, sur le fractionnement des nucléoprotéides du cytoplasme des cellules normales et néoplasiques, sur les relations nucléocytoplasmiques, sur l'incorporation des acides aminés marqués dans les noyaux et dans les fragments nucléaires, sur le rôle des histones et sur l'incorporation des acides aminés dans les fragments de microsomes.

A. — M. Szafarz et M<sup>me</sup> Dugandzic ont fractionné à plusieurs pH les liquides surnageants, non sédimentables à grande vitesse, provenant de cellules hépatiques de rat normal et de cellules de l'épithélioma T 8 de Guérin. Us ont constaté que la composition des diverses fractions et l'incorporation de <sup>32</sup>P dans l'acide ribonudéique ne sont pas les mêmes dans le foie et dans l'épithélioma. Il semble que le liquide surnageant possède des propriétés caractérisant les tissus à mitoses nombreuses.

B. — MM. Szafarz et Sripati ont montré qu'au cours de l'incubation de noyaux de foie normal et d'épithélioma T 8, des particules nucléoprotéiques sortent des noyaux et passent dans le milieu tamponné quand il ne contient pas d'ions Mg<sup>4+</sup>, Na<sup>+</sup> ou K<sup>+</sup>. Mg<sup>+</sup> a, en outre, la propriété d'empêcher les particules de sortir des noyaux et les précipite, quand elles sont en suspension dans les liquides cytoplasmiques. Une partie de ces particules se sédimente à grande vitesse, l'autre reste en suspension. Elles sont toutes très riches en **acide désoxyribonucléique**, moins riches en **acide ribonudéique** et les protéines **ne** contiennent pas les 20 acides aminés qu'on trouve généralement dans les **protéines**.

Ayant, au préalable, montré que les noyaux isolés, ajoutés au liquide surnageant, inhibent la glycolyse, ils se proposent, maintenant, d'étudier l'action des fragments nucléaires.

C. — M<sup>lles</sup> Hirschbein et Rozencwajg ont cherché à déterminer le rôle des histones du placenta humain par incorporation des acides aminés marqués au <sup>14</sup>C, tout d'abord dans les noyaux entiers, puis dans les fragments nucléaires obtenus par l'action des tensio-actifs. Elles ont observé que l'incorporation se fait dans les noyaux sans intervention de systèmes énergétiques extérieurs, que l'ion Na<sup>+</sup> est indispensable tandis que l'ion K<sup>+</sup> est inhibiteur et que l'ion Mg<sup>++</sup> empêche la sortie des particules au cours de l'incubation. Voulant préciser le rôle des histones dans ces incorporations, elles ont voulu les extraire et les caractériser; mais elles n'ont obtenu que des produits dialysables qui ne sont donc pas des protéines non basiques, ni des histones. D'ailleurs, l'étude de l'incorporation dans les fragments nucléaires, obtenus selon la méthode de M. Zalta, met en évidence le rôle inhibiteur de la polylysine et des protéines basiques, comme les histones et les protamines. Enfin, elles ont montré que la désoxyribonucléase inhibe l'incorporation dans les fragments les plus lourds et que la ribonucléase, elle, stimule l'incorporation dans tous les fragments. Le système mis en évidence dans ces fragments nucléaires est donc tout à fait particulier et mérite une étude approfondie.

D. — M. Zalta continue à étudier la biosynthèse des protéines par des fragments de microsomes de foie de rat et s'est attaché, cette année, à caractériser le système enzymatique qu'il a trouvé. Ce système diffère essentiellement de ceux trouvés jusqu'ici par le fait qu'il ne contient pas d'enzymes activant les acides aminés et que l'ARN soluble n'intervient pas dans les réactions. Il reste, cependant, lié à des activités enzymatiques permettant les échanges entre les ribonucléosides triphosphates et diphosphates correspondants. Il n'est pas inhibé par la ribonucléase, mais est inhibé par le chloramphénicol. L'incorporation est stimulée par l'addition des acides aminés et elle peut durer au moins 90 à 120 minutes, ce qui permet de croire que le système étudié par M. Zalta produit une synthèse de protéines ou de polypeptides.

Le système trouvé par M. Zalta existe également dans les ribosomes du pancréas, du poumon et des réticulocytes et nous avons vu que M<sup>lles</sup> Hirschbein et Rozencwajg le retrouvent dans les noyaux de placenta humain. C'est donc un système très répandu dans les tissus où il doit jouer un rôle important dans la synthèse des protéines.

M. Zalta a déterminé, au microscope électronique, la structure morphologique des fragments de microsomes et il a constaté qu'ils ont l'aspect de grains de Palade.

L'étude de leur composition a prouvé qu'ils sont très riches en phospholipides et on sait, par ailleurs, que les phospholipides sont susceptibles de jouer un rôle dans la synthèse des protéines.

M. Zalta a donc apporté une contribution importante à l'étude de la biosynthèse des protéines.

E. — Les synthèses protéiques sont également étudiées par M. Sutra; mais d'un tout autre point de vue. M. Sutra étudie l'action inhibitrice de la chlorpromazine sur les cultures d'*E. coli* et détermine la concentration optimale et les variations des teneurs en ADN et ARN. Les dosages, par la méthode qu'il a mise au point la dernière, montrent de fortes diminutions en ADN,

alors que le taux d'ARN reste constant. Us confirment ainsi les résultats de MM. Rosenberg, Szafarz et Wyssmann qui ont montré, sur la cellule cancéreuse, que la chlorpromazine inhibe la multiplication cellulaire sans inhiber la synthèse des protéines. Les résultats de M. Sutra, qui se rapprochent de ceux que S. S. Cohen obtient en croissance déséquilibrée, montrent le rôle qu'on peut attribuer à l'ADN dans la synthèse de TARN et dans celle des protéines.

## II. — BIOCHIMIE CELLULAIRE

A.-M. Rosenberg et M<sup>me</sup> Emanoïl étudient la transformation des cellules hépatiques normales en cellules néoplasiques par dosage des composés flaviniques dans les cellules en voie de cancérisation et dans les cellules cancéreuses. Us étudient ces phénomènes dans des foies de rats normaux ou de rats nourris au paradiméthylaminoazobenzène (jaune de beurre). Us ont observé que le taux des flavines est plus faible dans les cellules néoplasiques que dans les cellules normales et que les cellules des régions voisines des nodules cancéreux ont un taux de flavines normal. La diminution du taux de flavines est donc caractéristique de la cellule cancéreuse. Us ont ensuite étudié la répartition des flavines dans les fractions cellulaires obtenues par centrifugation différentielle. Us ont montré que le taux des flavines baisse surtout dans les microsomes, dans les débris cellulaires et dans les noyaux, alors qu'il diminue beaucoup moins dans les mitochondries et dans la fraction soluble. Enfin, ils ont étudié l'effet de 1\* cancérisation sur la répartition des différents composés flaviniques connus. Ik ont montré que le taux de riboflavine libre qui est normalement très bas, change peu, tandis que celui des mono- et dinucléotides est le plus touché. Ils ont prouvé, en outre, qu'un nouveau composé flavinique inconnu apparaît surtout dans les mitochondries et ils ont pu Identifier par ses propriétés chromatographiques. La cancérisation affecte d'une façon différente, non seulement les diverses fractions cellulaires, mais les divers nucléotides flaviniques.

On peut rapprocher ces résultats des propriétés enzymatiques des particules. On sait que les microsomes normaux sont le siège de phénomènes de détoxication dans lesquels interviennent des enzymes flaviniques et qu'ils contiennent des hydroxylases. Or, les flavines diminuent dans les microsomes &<sup>u</sup> cours de la cancérisation pendant laquelle la détoxication diminue aussi. A<sup>u</sup> contraire, la fraction soluble qui contient les enzymes glycolitiques perd relativement peu de flavines. Or, depuis Warburg, on sait que l'augmentation de 1\* glycolyse est une propriété essentielle et caractéristique de la cellule cancéreuse\*. Enfin, les mitochondries qui sont moins nombreuses que dans les cellules normales, gardent leur activité respiratoire normale (même consommation d'oxygène<sup>e</sup> et mêmes rapports de phosphorylations oxydatives). On peut expliquer ce fait<sup>1\*</sup> en supposant que certaines enzymes flaviniques cataboliques, en dehors de la chaîne respiratoire, sont préférentiellement touchées. Dans les fractions où se font les réactions productrices d'énergie, les enzymes flaviniques sont, au contraire, le moins touchées. Ces perturbations enzymatiques sont, probablement\* un des aspects des modifications apportées par la cancérisation.

B. — ASPECTS BIOCHIMIQUES DES ACTIONS CONJUGUÉES  
DE L'IRRADIATION ET DU JAUNE DE BEURRE SUR LE FOIE DE RAT.

M. Rosenberg a montré, avec M. Lacassagne et M<sup>me</sup> Hurst, que les rayons X, administrés localement sur le foie, retardent la marche du processus de cancérisation provoqué par l'administration continue de jaune de beurre. Pour expliquer cette action, des recherches ont été entreprises dans plusieurs directions :

Avec M. Lacassagne et M<sup>me</sup> Emanoïl, M. Rosenberg a montré que le processus de détoxication est plus actif du côté du foie irradié, après irradiations partielles et alimentation au jaune de beurre.

Avec M<sup>me</sup> Fourcade, M. Rosenberg étudie comparativement les quotients respiratoire et glycolytique, ainsi que l'activité catalasique des coupes de foie de rats normaux, ou nourris au jaune de beurre, et dont le foie a été partiellement irradié. Enfin, avec M<sup>lle</sup> Ruet, M. Rosenberg étudie, dans les mêmes conditions, le métabolisme des acides ribo- et désoxyribonucléiques.

C. — INFLUENCE DE L'HYDROCORTISONE, *in vitro* :

Avec M<sup>me</sup>s Dugandzic et Emanoïl, M. Rosenberg a continué l'étude de l'effet de l'hydrocortisone sur la glycolyse aérobie et la respiration de la cellule ascitique entière ainsi que sur le broyat ascitique. Lorsque le substrat est le glucose-6-phosphate, l'hormone stéroïde exalte la glycolyse aérobie. En présence d'autres substrats de la chaîne glycolytique (fructose-6-phosphate, fructose-1-6-diphosphate, 3-phosphoglycérate, pyruvate), l'hormone a une action inhibitrice. Avec le broyat et en présence de l'hormone et quel que soit le substrat, la glycolyse est inhibée.

---

LISTE DES PUBLICATIONS

- T. TABATA, D. SZAFARZ et L. WYSSMAN. « Comparaison de l'activité adénosinetriphosphatase des mitochondries de répitelioma 18 de Guérin et du foie de rat ». *Bull. Soc. chim. biol.*, 1960, 41, 1605.
- L. HIRSCHBEIN. « Lipides liés aux histones du placenta humain ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960, 250, 222.
- J.-P. ZALTA. « Nouveau système d'incorporation des acides aminés isolés du foie de rat ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960, 250, 4058.
- J.-P. ZALTA, F. LACHURIE et S. OSONO. « Existence de deux systèmes permettant l'incorporation des acides aminés dans les microsomes du foie de rat ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960, 251, 814.
- L. HIRSCHBEIN et R. ROZENCWAJG. « Action du diisopropylphosphofluorure et du pH dans l'association et la dissociation des histones du placenta humain ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960, 251, 1309.

- D. SZAFARZ et S. DUGANDZIC. « Importance relative des complexes protéiques de la fraction cytoplasmique non sédimentable à grande vitesse ». *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1960, 42, 712.
- L. KLYZEJKO et Y. KHOUVINE. « Désoxyribonucléoprotéides du pancreas de boeuf. I. Obtention et composition des histones, des acides désoxyribonucléiques et des protéines résiduelles ». *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1960, 42, 761.
- S. DE MENDE, L. KLYSZEJKO, Y. KHOUVINE. « Désoxyribonucléoprotéides du pancreas de boeuf. II. Propriétés physico-chimiques et comportement électrophorétique des histones totales ». *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1960, 42, 775.
- K. YAGI, D. SZAFARZ, Y. MATSUOKA et Y. KHOUVINE. « Epithelioma atypique du rat. Incorporation *in vitro* de  $^{32}\text{P}$  dans les acides nucléiques ». *Ada Union Internationale contre le Cancer*, 1960, 16, 1052.
- J. P. ZALTA. Rapport fait à l'informal discussion on cytoplasmic particles and their role in protein synthesis. Faraday Society, 28 mars 1960.
- A. LACASSAGNE, L. HURST et J. ROSENBERG. « Effet de l'irradiation X du foie du rat sur la production de l'hépatome par intoxication au para-diméthylaminoazobenzène ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960, 251, 1053.
- Y. KHOUVINE. « Le métabolisme des acides nucléiques à l'aide du phosphore radioactif » et « Les protéines basiques liées aux acides désoxyribonucléiques ». Conférences à la Faculté de Pharmacie de Belgrade, juin 1960.

---

## COMPOSITION DU SERVICE

### I. — Biochimie des nucléoprotéides.

- M<sup>me</sup> Y. KHOUVINE, Directeur de Recherches au C. N. R. S., Directeur du Laboratoire de Biochimie des nucléoprotéides à l'École Pratique des Hautes Etudes.
- M. D. SZAFARZ, Chargé de Recherches au C. N. R. S.
- M. R. SUTRA, Chargé de Recherches au C. N. R. S.
- M. J.-P. ZALTA, Attaché de Recherches au C. N. R. S.
- M<sup>lle</sup> L. HIRSCHBEIN, Attachée de Recherches au C. N. R. S.
- M<sup>Ue</sup> F. ROBERT, attaché de Recherches au C. N. R. S.
- M<sup>Ue</sup> R. ROZENCWAJG, Boursière de la Ligue Nationale française contre le Cancer.
- M. C. E. S. SRIPATI, Assistant à l'Institut du cancer de Madras, Boursier des Relations Culturelles.
- M. S. OSONO, Assistant à l'Université de Tokyo, Boursier de la Coopération technique.
- M. J. ZYLBERBERG, Assistant stagiaire à l'Institut National de Recherches agricoles.
- M<sup>Ue</sup> F. LACHURIE, Collaboratrice technique au C. N. R. S.
- M<sup>lle</sup> D. LACROIX, Collaboratrice technique au C. N. R. S.
- M<sup>lle</sup> F. LEFEUVRE, Collaboratrice technique au Laboratoire de synthèse atomique.

II. — *Mitbolisme intermédiaire.*

**M. A. J. ROSENBERG**, Professeur à la Faculté des Sciences de Poitiers,  
Directeur-Adjoint à Pficole Pratique des Hautes fitudes.

**Mme R. EMANOIL**, Attachée de Recherches au C. N. R. S.

**M<sup>me</sup> A. FOURCADE**, Attachée de Recherches au C. N. R. S.

**M<sup>me</sup> S. DUGANDZIC**, Assistante à la Faculté de Médecine de Belgrade,  
Boursière de TUNESCO.

**M<sup>lle</sup> SERVOUZE**, Assistante à la Faculté des Sciences de Poitiers.

**M<sup>lle</sup> A. RUET**, Collaborates technique au C. N. R. S.

## SERVICE DE BIOCHIMIE B

Rapport de M<sup>TM</sup> M. GRUNBERG-MANAGO, Chargée de Service.

### I. — SYNTHÈSE ENZYMATIQUE DES RIBOPOLYNUCLÉOTIDES

Nous avons poursuivi nos recherches sur les mécanismes de synthèse des acides ribonucléiques en nous attachant plus particulièrement à élucider le rôle que peut y jouer *in vivo* la polynucléotide phosphorylase. Nous avons également continué l'étude *in vitro* du mécanisme d'action de cette enzyme, étude qui nous a conduits à des recherches sur la phosphorylation de l'ARN soluble (ARN isolé du cytoplasme); nous avons pu ainsi obtenir des renseignements sur la structure macromoléculaire et sur les propriétés de cet ARN.

Enfin nous avons isolé des enzymes responsables de la synthèse des ribopolynucléotides à partir d'autres microorganismes que ceux étudiés jusqu'à présent. Certaines des propriétés de ces enzymes se sont révélées être différentes de celles des systèmes décrits jusqu'ici.

#### A. — RÔLE DE LA POLYNUCLÉOTIDE PHOSPHORYLASE *in vivo*.

Bien que de nombreuses études aient été effectuées sur la polynucléotide phosphorylase, le rôle physiologique de cette enzyme demeure obscur. Étant donné que la séquence des nucléotides des polymères synthétisés *in vitro* ne présente pas de caractère de spécificité, il est probable que si l'enzyme joue un rôle dans la synthèse de l'ARN *in vivo*, c'est que d'autres enzymes ou facteurs interviennent dans la formation de séquences spécifiques.

Afin d'étudier le rôle de la polynucléotide phosphorylase *in vivo*, nous avons cherché, en collaboration avec M. Levin, un système aussi proche que possible de la cellule vivante. Les suspensions de cellules intactes de *E. coli* ne peuvent pas être utilisées pour un test de la polynucléotide phosphorylase du fait qu'elles sont imperméables aux diphosphates, mais nous avons trouvé que si les cellules sont exposées au toluène, elles deviennent perméables aux nucléotides.

Nous nous sommes tout d'abord assurés que les activités mesurées à l'aide de telles cellules sont bien le fait de la polynucléotide phosphorylase. Des études portant sur la spécificité, le besoin en cofacteurs, les inhibiteurs, ainsi que les propriétés du polymère formé montrent qu'il en est bien ainsi. Cette méthode a été appliquée à l'étude de l'activité de la polynucléotide phosphorylase des cellules d'*E. coli* requérant le tryptophane (trypt-) et traitées par l'chloramphenicol. Gros (*Exp. Cell Research*, 14, 104, 1958) et plusieurs autres chercheurs ont démontré que, lorsque la synthèse protéique est bloquée par l'

chloramphenicol, la synthèse de TARN par des mutants d'*E. coli* requérant des amino-acides, ne peut se faire que si les amino-acides requis sont ajoutés au milieu de culture. L'utilisation du mutant (trypt-) révéla qu'en absence de synthèse protéique, la présence du tryptophane provoquait une augmentation (<sup>2</sup> à 3 fois) de l'activité spécifique de la polynucléotide phosphorylase ainsi que de la quantité d'ARN synthétisé, les deux accroissements étant fonction de la concentration en tryptophane. Le tryptophane, par contre, n'a aucun effet sur l'activité d'autres enzymes. Le tryptophane peut être remplacé par le pL-5-méthyltryptophane. D'autres amino-acides augmentent également — mais à un degré moindre — l'activité spécifique de la polynucléotide phosphorylase, mais sans toutefois permettre la synthèse de TARN. Nous étudions actuellement, en collaboration avec M. Thang et M<sup>lle</sup> Réveillon, le mécanisme de cette action des amino-acides sur l'activité spécifique de la polynucléotide phosphorylase.

#### B. — MÉCANISME D'ACTION.

Des études ont été entreprises sur la cinétique, la spécificité, les cofacteurs et les amorces de la polynucléotide phosphorylase hautement purifiée à partir de sources différentes.

a) *Cinétique*. — On savait que les ions  $Mg^{++}$  ont un rôle activateur pour la polymérisation de PADP. Nous avons montré (en collaboration avec M. J. Mas-soulié et M<sup>me</sup> Yon) que le Mg et PADP en excès sont tous deux inhibiteurs de la vitesse de polymérisation de TADP. La vitesse maximum de la réaction se produit quand le rapport  $\frac{ADP}{Mg} = 3$ . Des différents mécanismes qui peuvent être envisagés pour expliquer cette double action de l'ADP et du Mg, deux ont été éliminés : celui qui correspond à une fixation totalement indépendante de l'ADP et de Mg sur l'enzyme, et celui qui fait intervenir seulement la fixation d'un complexe ADP-Mg.

b) *Spécificité*. — La polynucléotide phosphorylase est spécifique pour les nucleotides diphosphates mais par contre manque de spécificité en ce qui concerne la base du nucléotide (adénine, uracile, guanine, cytosine, hypoxanthine, thymine). En collaboration avec M. J. Dondon et M. Michelson, invité par l'Institut de Biologie, nous avons testé les dérivés diphosphates de divers analogues des bases, ce qui nous a donné des renseignements non seulement en ce qui concerne le mécanisme d'action de l'enzyme mais quant à son rôle physiologique : l'action des analogues sur l'activité de la polynucléotide phosphorylase *in vitro* est parallèle à leur action sur la synthèse *in vivo* des acides ribonucléiques.

c) *Amorces*. — L'action des polyribonucléotides comme amorces dans la synthèse des poly A et AGUC (ac. polyadenylique et polymère contenant les 4 bases adénine, guanine, uracile et cytosine) a été recherchée avec des préparations de polynucléotide phosphorylase hautement purifiées dont la teneur en ac. nucléique contaminant est très faible. Ces préparations purifiées exigent un amorceur pour synthétiser les polymères. Le mode d'action des polynucléotides comme amorces de la polymérisation n'était pas clair; en particulier la question qui se posait était de savoir si les polynucléotides ajoutés

servent de point de départ pour la formation de nouvelles chaînes, en fixant des unités de mononucléotides. Il a été montré que ce n'est pas le cas, en utilisant des amorces radioactifs (coll. avec M. Monier) et en comparant les poids moléculaires des polynucléotides en présence ou absence d'amorceur. Ce dernier travail a été effectué en collaboration avec M<sup>lle</sup> Guinand et M<sup>me</sup> Wurmser au Centre d'ultracentrifugation du C. N. R. S.

d) *Phosphorolyse de l'ARN soluble*. — Il a été démontré (M. Grunberg-Manago, *J. Mol Biol.* 1, 240, 1959, et Singer et Coll., *Biochim. Biophys. Acta*, 38, 568, 1960) que la polynucléotide phosphorylase peut phosphorolyser complètement diverses préparations d'ARN — à l'exception de TARN soluble (S-ARN) isolé des tissus animaux. La phosphorolyse du S-ARN s'arrête lorsque environ 20 % seulement de TARN ont été dégradés. Il était intéressant, d'une part de vérifier que les S-ARN provenant d'autres sources se comportaient de la même façon, et, d'autre part, de définir la nature des fractions sensibles et résistantes à la phosphorolyse.

Avec MM. R. Monier et J. Dondon, nous avons étudié la phosphorolyse de diverses fractions qui avaient été purifiées à partir de S-ARN de levure par chromatographie sur DEAE-cellulose. Alors que TARN isolé des ribosomes de levure est presque complètement phosphorolysé, 70 à 80 % des ARN qui peuvent servir d'accepteur des amino-acides sont résistants à la phosphorolyse. La fraction du S-ARN qui résiste à la phosphorolyse conserve son activité en tant qu'accepteur de tyrosine et de phénylalanine et perd 50 % de son activité en tant qu'accepteur de valine. La méthode utilisée permet ainsi de mettre en évidence une différence entre les ARN acceptant les différents amino-acides. D'autre part les études sur le comportement à la température, aux pH alcalins et vis-à-vis de la polynucléotide phosphorylase des ARN solubles, suggèrent que leur résistance à la phosphorolyse est due à leur configuration moléculaire. Us se présentent sous forme de complexes dont les chaînes sont reliées par des liens hydrogène particulièrement résistants.

#### C. — ISOLEMENT A PARTIR DE DIFFÉRENTES SOURCES D'ENZYMES RESPONSABLES DE LA SYNTHÈSE DES RIBOPOLYNUCLÉOTIDES.

Au cours de travaux concernant le rôle physiologique des polyphosphates d'*Eub. sarcosinogenwn*, M. Szulmajster a été amené à étudier, en collaboration avec M. T. Tildon (Boursier Fullbright), la polynucléotide-phosphorylase, isolée pour la première fois d'une bactérie anaérobie stricte. Les propriétés de cette enzyme, partiellement purifiée, ainsi que la formation de différents polymères ont été étudiées. D'après le comportement de Penzyme au cours de la purification et d'après révélation de l'activité enzymatique, mesurée par 1\* « réaction d'échange » et par l'incorporation du C<sup>14</sup>-ADP dans les polymères, il semble que ces deux activités soient dues à des enzymes différentes. La séparation complète de ces deux activités est en cours.

D'autres enzymes responsables de la synthèse des ribopolynucléotides ont été isolées par M. Dolin et M<sup>me</sup> T. Stadtman de deux bactéries anaérobies et partiellement purifiées. Les propriétés de ces enzymes (spécificité, affinité pour les substrats et relation entre les réactions d'échange et de polymérisation) ont

ét. Comparées avec celles des polynucléotides phosphorylases d'*Azotobacter* *ineiandu* et d'*E. coli*. En particulier, M. Dolin en collaboration avec M<sup>Ue</sup> Godiniaux a montré que, dans le cas de l'enzyme purifiée à partir de *Cl. perfringens*, la présence d'un activateur qui peut être remplacé par certaines protéines basiques. Il se pourrait ainsi qu'une protéine basique soit nécessaire à l'activité de la polynucléotide phosphorylase de *Cl. perfringens*. M. J. Tavlitzki a poursuivi l'étude des systèmes enzymatiques qui, extraits de la levure, catalysent l'incorporation des nucléotides dans les acides nucléiques. Il semble qu'il s'agisse ici de systèmes différents de ceux dont il vient d'être question. Leur isolement et leur purification sont actuellement en cours.

## II. — MÉTABOLISME MICROBIEN

### 1. — RECHERCHES SUR LE DÉTERMINISME BIOCHIMIQUE DE LA SPOROGÈNESE.

Dr Szulmajster a entrepris en collaboration avec M. P. Schaeffer, de l'Institut Pasteur à Paris, des recherches sur le contrôle génétique et biochimique de la sporulation. Une telle étude est rendue possible chez *B. subtilis* par l'isolement de mutants asporogènes (Sp<sup>-</sup>) (spontanés ou induits) et par la possibilité de restaurer chez ces mutants la capacité de sporuler par transformation, c'est-à-dire sous l'action de l'acide désoxyribonucléique de la souche sauvage. L'analyse biochimique effectuée comparativement sur des extraits acellulaires provenant de souches sporogènes (Sp<sup>+</sup>) et asporogènes a révélé que toutes les souches Sp<sup>+</sup> de *B. subtilis* analysées développent au cours de leur sporulation un système DPNH-oxydase particulière, dont l'activité spécifique, mesurée avant l'apparition des spores thermoresistantes, est 10 à 30 fois supérieure à celle observée pendant la croissance. Chez les mutants Sp<sup>-</sup>, cette activité se maintient pendant la même période au niveau existant au cours de la croissance.

### 2. — DÉGRADATION ANAÉROBIE DE LA CRÉATININE.

Dans le cadre de ses recherches sur la dégradation anaérobie de la créatinine, Dr Szulmajster a étudié le mécanisme enzymatique par lequel l'énergie nécessaire à la croissance d'*Eub. sarcosinogenum* est fournie à partir de la créatinine. Il a pu démontrer que la dégradation de la créatinine par des extraits acellulaires est associée à la formation d'ATP à partir d'ADP et de carbamyl-phosphate. Ce dernier composé, comme il a été démontré antérieurement, est un intermédiaire dans la dégradation de la créatinine par ces bactéries. L'ensemble de ce travail a été effectué avec l'assistance technique de M<sup>mes</sup> A. M. Wyssman et L. Dondon.

### 3. — MÉTABOLISME DE *Acetobacter xylinum*.

En poursuivant l'étude comparative du métabolisme de *Ac. xylinum* après croissance sur le saccharose ou le fructose comme source de carbone, M. Prieur a pu mon-

trer que le comportement respiratoire et oxydatif des cellules intactes ainsi que des extraits cellulaires était différent.

Les bactéries intactes non proliférantes ayant crû sur glucose (« bactéries glucose ») respirent le glucose avec une vitesse dont la valeur n'atteint que les 2/3 de celle des bactéries ayant crû sur fructose (« bactéries fructose »). Vis-à-vis du fructose, le phénomène est encore plus accentué, la vitesse d'oxydation des « bactéries glucose » n'étant dans ce cas que la moitié de celle des « bactéries fructose » après une heure de respiration et le tiers après deux heures. La mesure du dégagement de gaz carbonique donne lieu à des constatations identiques.

En opérant avec des extraits cellulaires dialysés, on constate une absorption d'oxygène en présence de glucose avec les deux sortes d'extraits bactériens, mais le fructose n'est oxydé directement par aucun d'eux. En étudiant alors l'influence des coenzymes nucléotidiques sur l'oxydation de ces deux sucres, il s'est révélé que l'addition d'ATP (adénosine triphosphate) et de TPN et DPN (tri et diphosphopyridine nucléotide) débloquent l'oxydation du fructose par les deux extraits; par contre, si ces coenzymes exaltent aussi l'oxydation du glucose par l'« extrait fructose », leur présence diminue la vitesse d'oxydation de ce sucre par « l'extrait glucose ». Ce dernier phénomène qui rappelle l'effet Crabtree (inverse de l'effet Pasteur) a retenu l'attention de M. Prieur qui en poursuit actuellement l'étude. Il s'avère que les « bactéries fructose » ne possèdent pas de phosphofruktokinase, ce qui leur interdit la voie de dégradation de Embden-Meyerhoff; de telles bactéries semblent par contre posséder toutes les enzymes du cycle des pentoses. Quant aux « bactéries glucose », elles doivent pouvoir dégrader le glucose par les deux voies.

#### 4. — MÉTABOLISME DU PYRUVATE.

M<sup>me</sup> Delavier-Klutchko a poursuivi l'étude de la réaction classique du pyruvate par *Clostridium saccharobutyricum* :



Elle s'est particulièrement attachée cette année à l'étude de la réaction d'échange entre le  $^{14}\text{CO}_2$  et le pyruvate qui constitue un test de la réversibilité de cette réaction. Un tel échange est rapidement réalisé par les extraits cellulaires de *C. saccharobutyricum*; il n'est stimulé ni par « FCL », facteur protéique qu'elle a isolé de l'extrait bactérien lui-même (voir rapport de l'année 1959), ni par l'acide N<sub>10</sub> formyltétrahydrofolique, qui présente un certain nombre d'analogies avec « FCL ». Ces corps n'interviennent donc pas dans cette réaction d'échange, alors qu'ils stimulent la réaction de scission du pyruvate (rapport de 1959).

M<sup>me</sup> Delavier-Klutchko a mis en évidence l'intervention de la biotine dans cette réaction d'échange. En effet, l'incorporation du  $^{14}\text{CO}_2$  dans le pyruvate est en grande partie inhibée par addition au milieu d'expérience d'avidine, protéine qui complexe spécifiquement la biotine : 76 % d'inhibition sont obtenus avec 2 unités d'avidine par mg d'extrait brut et par ml. Cette inhibition est toutefois prévenue si l'on incubé préalablement l'avidine avec la biotine. Sans doute se forme-t-il dans cette réaction un complexe « enzyme-biotinc-



## LISTE DES PUBLICATIONS

- M. F. SINGER, R. J. HILMOE et M. GRUNBERG-MANAGO. « Studies on the mechanism of action of polynucleotide phosphorylase ». *J. biol. Chem.*, 1960, 235, 2705.
- M. GRUNBERG-MANAGO. « Polynucleotide phosphorylase », dans *The enzymes*, éd. par Boyer, Lardy et Myrbäck, Acad. Press, New York (sous presse).
- M. GRUNBERG-MANAGO. « Synthèse enzymatique des ribopolynucléotides ». *Cahiers de Physique de la Revue de l'Institut d'Optique*, Paris, 1960, 122, 405.
- M. GRUNBERG-MANAGO. « Mode of action of polynucleotide phosphorylase ». *Biochem. J.*, 1960, 77, 641.
- R. MONIER et M. GRUNBERG-MANAGO. « Phosphorolyse des ARN solubles ». Abstracts of Joint Meeting of French and British Biochemical Societies, Paris, mai 1960.
- D. LEVIN et M. GRUNBERG-MANAGO. « Recherches sur le rôle *in vivo* de la polynucleotide phosphorylase ». Abstract of Joint Meeting of French and British Biochemical Societies, Paris, mai 1960.
- J. MASSOULIE. « Contribution à l'étude cinétique de la polynucléotide phosphorylase ». Diplôme d'études Supérieures, Faculté des Sciences, Paris, 1960.
- D. LEVIN et M. GRUNBERG-MANAGO. « Studies on the physiological role of polynucleotide phosphorylase in *E. coli* ML. *Federat. Proceedings* (sous presse).
- M. I. DOLIN, E. GODINIAUX et M. GRUNBERG-MANAGO. Polynucleotide phosphorylase of *Clostridium perfringens* ». *Abst. for Soc. of American BacU*, 1961 (sous presse).
- T. TILDON et J. SZULMAJSTER. « Isolement d'une polynucléotide-phosphorylase d'une bactérie anaérobie stricte ». *Biochim. Biophys. Acta* (sous presse).
- J. SZULMAJSTER. « Le carbamyl-phosphate intermédiaire dans la dégradation de la créatinine par des extraits enzymatiques d'*Eub. sarcosinogenum* ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 44, 173.
- J. SZULMAJSTER et P. SCHAEFFER. « Augmentation de la DPNH-oxydase au cours de la sporulation ». *C. R. Acad. Sci.*, 1961, 252, 220.
- J. SZULMAJSTER et M. KAISER. « Étude d'une nouvelle espèce anaérobie : *Eubacterium sarcosinogenum*, nov. sp. ». *Ann. Inst. Pasteur*, 1960, 98, 747.
- F. MEYER. « A propos du mode d'action de certains biguanides hypoglycémisants » Communication faite à la 394<sup>e</sup> séance de la Biochemical Society de Londres le 27 mai 1960.
- F. MEYER. « Étude sur le mode d'action des biguanides hypoglycémisants ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960, 251, 1928.
- F. MEYER. « Signification pour le transfert du glucose de la mono-amino-oxydase par des guanides ». *C. R. Acad. Sci.* (sous presse).
- J. BOURDAIS et F. MEYER. « Benzène-Disulfonamides — 1 — 3, inhibiteurs de l'anhydrase carbonique ». *Bull. Soc. Chim.*, 1961, fasc. 3.
- M. N. THANG. « Contribution à l'étude du métabolisme des nitrates chez *Chlorella pyrenoidosa* à l'obscurité ». Thèse, Faculté des Sciences, Paris, 1960.
- C. DELAVIER-KLUTCHKO. « Intervention de la biotine dans la réaction clastique du pyruvate par *Clostridium saccharobutyricum* ». *C. R. Acad. Sci.* 1961 (sous presse)
-

*COMPOSITION DU SERVICE*

- M<sup>me</sup> M. GRUNBERG-MANAGO, Maitre de Recherches au C. N. R. S.**  
**M. J. SZULMAJSTER, Maitre de Recherches au C. N. R. S.**  
**M. F. MEYER, Chargé de Recherches au C. N. R. S.**  
**M. J. TAVLITZKI, Chargé de Recherches au C. N. R. S.**  
**M. M. N. THANG, Chargé de Recherches au C. N. R. S.**  
**M<sup>me</sup> C. DELAVIER-KLUTCHKO, Attaché de Recherches au C. N. R. S.**  
**M. P. PRIEUR, Attaché de Recherches au C. N. R. S.**  
**M- J. MASSOULIER, Élève à l'École Normale Supérieure.**  
**M»» P. DAUTA, Élève à l'École Normale Supérieure de Sévres.**  
**M<sup>e</sup> M. COUSIN, Boursière du 3<sup>e</sup> cycle.**  
**M<sup>e</sup> M. L. LESNE, Boursière de la Ligue Nationale contre le Cancer.**  
**M<sup>me</sup> L. DONDON, Collaborateur technique au C. N. R. S.**  
**M. J. DONDON, Collaborateur technique au C. N. R. S.**  
**M<sup>e</sup>« E. GODINIAUX, Collaborateur technique au C. N. R. S.**  
**M<sup>m</sup>« A. M. WYSSMAN, Collaborateur technique au C. N. R. S.**  
**M<sup>U</sup><sup>e</sup> J. RÉVEILLON, Collaborateur technique au C. N. R. S.**  
**M»« H. COSTINESCO, Secrétaire.**  
**M- M. I. DOLIN, Boursier Guggenheim.**  
**M. D. LEVIN, Boursier National Science Foundation,**  
**M<sup>me</sup> T. STADTMAN, Boursière des Affaires culturelles.**  
**M. T. TILDON, Boursier Fullbright.**

# SERVICE DE CHIMIE DES SUBSTANCES ORGANIQUES NATURELLES

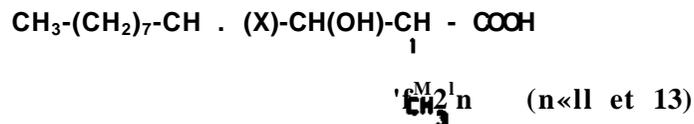
Rapport de M. EDGAR LEDERER, Chef de Service.

## I. — CHIMIE ET BIOCHIMIE MICROBIENNES

### A. — CHIMIE D'ACIDES BACTÉRIENS.

M. J. Asselineau a analysé par chromatographie gaz-liquide, la nature des acides gras de plusieurs souches bactériennes (*C. diphtheriae*, *C. ovis*, *P. pestis*, *B. subtilis*). Cette méthode pourrait éventuellement apporter une aide pour les classifications d'espèces bactériennes mal définies.

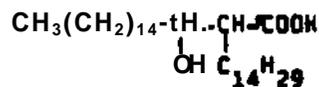
Un nouveau type d'acide mycolique naturel a été isolé de l'Actinomycète, *Nocardia asteroides* : *Yacide nocardique*. Cette substance  $C_{50}H_{96}O_3 \pm 3 CH_2$  est, en fait, un mélange d'homologues et correspond à la formule provisoire (I) où X est un radical monoéthylénique  $C_{24}H_{45} \pm 3 CH_2$  qui contient une ramification [3].



(I)

### B. — BIOSYNTHESE D'ACIDES BACTÉRIENS.

M<sup>me</sup> M. Gastambide a terminé la dégradation de l'acide corynomycolique radioactif (II) obtenu par incubation de bacilles diphtériques avec de l'acide palmitique -i-<sup>14</sup>C. Les résultats montrent que seuls les carbones 1 et 3 de l'acide corynomycolique sont radioactifs, ce qui prouve la biosynthèse à partir de deux molécules d'acide palmitique [12].



(II)

En collaboration avec le D<sup>r</sup> H. Grisebach (Freiburg), M<sup>me</sup> M. Gastambide a étudié l'incorporation d'acide propionique dans les acides ramifiés de la souche humaine, avirulente, H 37 Ra de *M. tuberculosis* en utilisant de l'acide pro-

pionique marqué par le tritium dans le méthyle et par le <sup>14</sup>C dans le carboxyle.

Les premiers essais ont montré une bonne incorporation des deux isotopes dans l'acide tuberculostéarique (10-méthyl-stéarique) et dans l'acide mycosérosique (2, 4, 6, 8-tétraméthyl-octacosanoïque). Dans ce dernier, 75 % du tritium se trouve dans les groupes méthyles, ce qui semble être une preuve satisfaisante de l'incorporation directe d'acide propionique.

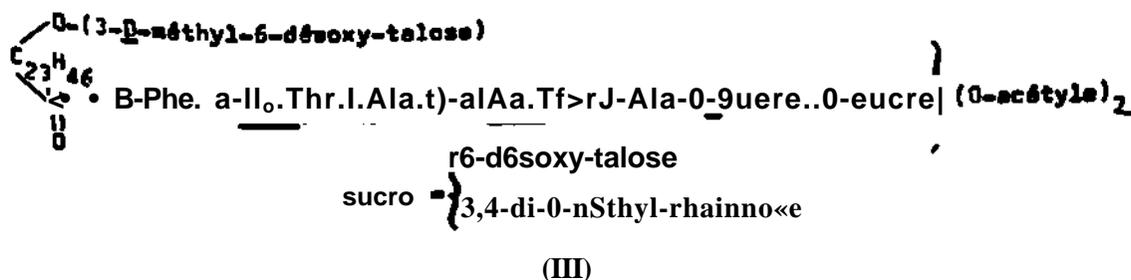
Ces essais sont en accord avec ceux publiés récemment sur l'incorporation d'acide propionique dans les chaînes ramifiées des antibiotiques du groupe des macrolides (erythromycines : Corcoran, Grisebach; methymycine : Birch).

C. — LES MYCOSIDES.

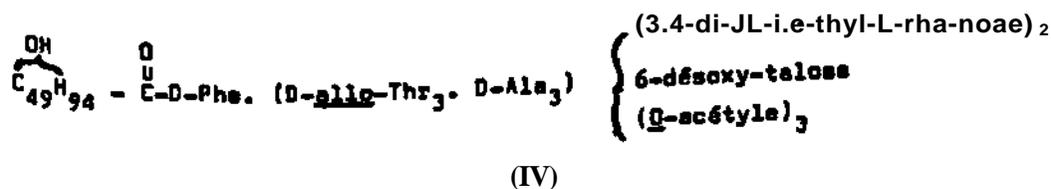
Les mycosides sont des glycolipides caractéristiques de certaines espèces de Mycobactéries [4].

*Mycoside B* : M<sup>me</sup> H. Demartean-Ginsburg a étudié la structure de ce composé qui est caractéristique des souches bovines de *M. tuberculosis*. La formule approximative est C<sub>85</sub>H<sub>156</sub>O<sub>10</sub>. Par hydrolyse acide, on obtient du 2-O-méthyl rhamnose et une fraction lipidique. Celle-ci donne par hydrolyse alcaline un mélange d'acides gras saturés et ramifiés de formule moyenne C<sub>24</sub>H<sub>48</sub>O<sub>2</sub> et un glycol-phénol méthoxyté de formule C<sub>30</sub>H<sub>54</sub>O<sub>4</sub>. Le 2-O-méthyl rhamnose est attaché à Thydroxyle phénolique.

*Mycoside C* : il est caractéristique de *M. avium*. Il s'agit en fait d'un flange de peptido-glycolipides de structure très voisine. Pour un de ces mycosides appelé Mycoside C<sub>19</sub> la formule provisoire (III) est proposée et remplacée par la formule provisoire indiquée dans le rapport de 1959. Tous les cinq J<sup>c</sup> des amines sont de configuration D (« non naturelle »); c'est la première fois que l'on a trouvé de la D-«/o-thréonine dans la nature.



Le mycoside Cm a été trouvé par M. G. Michel et M<sup>me</sup> M. Chaput, dans *M. "uirianum"*. Il contient sept molécules de D-amino-acides et trois ^ u ^ de 6-désoxy sucres. La formule provisoire (IV) est proposée pour cette substance.



La présence fréquente d'acides aminés de configuration D dans des peptido-glycolipides bactériens est très remarquable [n].

## D. — ACTIVITY BIOLOGIQUE DES PHOSPHOLIPIDES DES MYCOBACTÉRIES.

Dans le rapport de 1959, nous avons indiqué la structure du phosphatidyl-inosito-dimannoside, phospholipide typique des mycobactéries [30, 31].

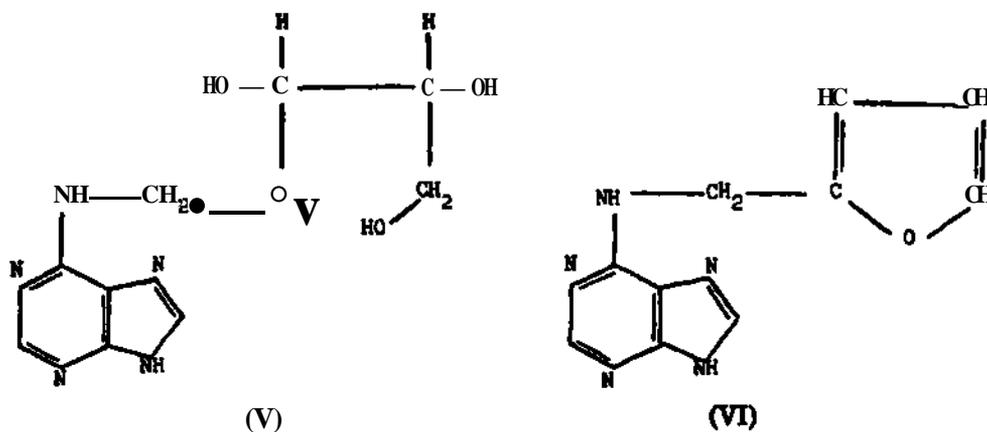
Au cours d'une collaboration avec le Professeur H. Bloch (Dpt. of Microbiology, Pittsburgh University, Pennsylvania, U.S.A.), nous avons étudié l'activité immunisante de diverses fractions sur des souris. Les fractions les plus actives, extraites du B.C.G. présentent une composition chimique très proche de celle d'un phosphatidyl inosito-fránannoside.

## E. — LIPIDE TOXIQUE DE CORYNEBACTERIUM OVIS.

M. J. Asselineau a continué la purification du lipide toxique de *C. ovis* (en collaboration avec le Professeur Carne de Sydney). Il semble que la fraction toxique soit un phospholipide; il n'y a donc aucune analogie de structure avec le cord factor (6, 6'-dimycolate de tréhalose) lipide toxique des Mycobactéries.

## F. — SUBSTANCES STIMULANT LA FORMATION D'ENZYMES RESPIRATOIRES CHEZ LA LEVURE (COFACTEURS E).

Le début de cette étude a été mentionné dans le rapport précédent. La spécificité de structure du 2,5-anhydro-L-idose est très grande, puisqu'une série d'isomères et analogues synthétisés par M. J. Defaye s'est trouvée être inactive. Par contre, les essais de M. P. Slonimski ont montré que plusieurs autres sucres (en dehors du glucose étudié précédemment) fournissent, par traitement acide, des polymères qui sont actifs dans l'induction de l'adaptation respiratoire de la levure [6].



M<sup>me</sup> Audrain-Legault-Démare et M. P. Slonimski ayant trouvé que deux analogues structuraux des pyrimidines (6-azauracile et 2-thiocytosine) inhibent l'adaptation respiratoire des levures, l'effet antagoniste des deux polymères obtenus à partir du D-glucose et du D-érythrose a été étudié. M<sup>me</sup> Audrain a trouvé que ces deux fractions empêchent l'effet inhibiteur des deux analogues

de pyrimidines. Cet antagonisme est spécifique : le cofacteur issu du D-glucose agit seulement vis-à-vis du 6-azauracile, tandis que celui issu du D-érythrose agit seulement vis-à-vis de la 2-thiocytosine [10].

M. R. Wolff et M<sup>me</sup> M. Lenfant ont étudié la synthèse des 6-glycyl-amino-purines afin d'étudier si ces substances possèdent une ou plusieurs des activités physiologiques suivantes : cofacteur E, kinétine (hormone de division cellulaire) [u] et anti-tumorale.

Us ont synthétisé la 6-ribityl-amino-purine (V) par condensation de la ribityl-amine (désoxy-1 amino-1 ribitol) avec la 6-chloro purine.

Cette substance, qui sera soumise à des essais biologiques, pourrait être un Précurseur de la kinétine (VI).

#### G. — DIVERS.

M<sup>me</sup> H. Robert et M. M. Barbier ont commencé l'étude de la structure chimique d'un agent complexant, isolé d'une souche d'*Aspergillus*.

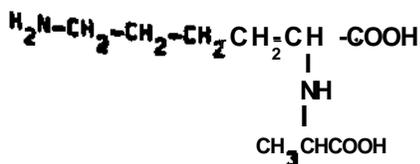
## II. — CHIMIE VÉGÉTALE

### A. — STRUCTURE DE LA LYSOPINE, NOUVEL ACIDE AMINÉ ISOLÉ DE TISSU DE CROWN-GALL.

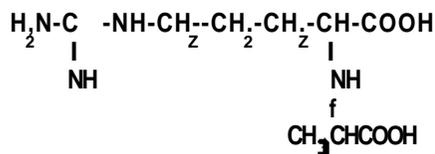
M. Lioret avait isolé en 1956, à partir de tissus de crown-gall de salicorne (*Scorzonera hispanica*), tabac (*Nicotiana tabacum*), Vigne vierge (*Parthenocissus tricuspidata*) et artichaut (*Helianthus tuberosus*) un nouvel acide aminé neutre à viscosité cristalline.

MM. K. Biemann, J. Asselineau et M<sup>me</sup> J. Polonsky ont déterminé la structure chimique (VII) de cette substance grâce à la spectrométrie de masse, et l'ont prouvée par la synthèse à partir de *N*-carbobenzoxy-L-lysine et d'acide  $\alpha$ -bromopropionique [a].

Le nom de lysopine a été proposé pour cette substance pour exprimer son rapport avec la lysine et son analogie de structure avec celle de Toctopine (VIII) constituant caractéristique du muscle d'Octopus. La stéréochimie de la lysopine est intéressante, car comme pour Toctopine, le carbone  $\alpha$  de la chaîne principale est de configuration D [29].



(VII) Lyaopinc.



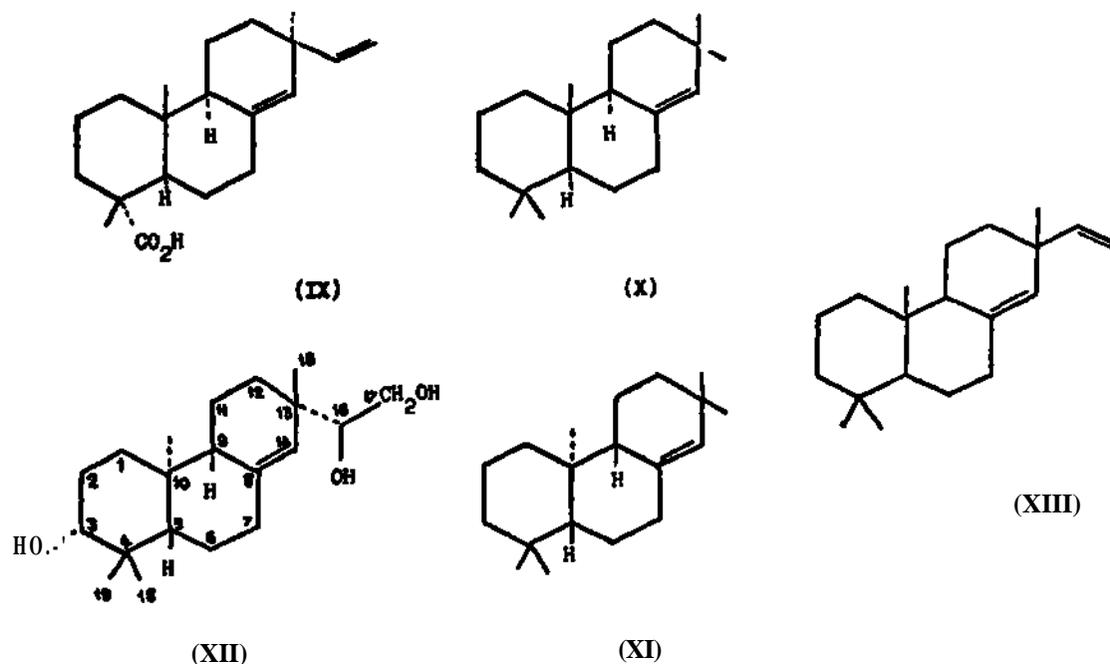
(VIII) Octopine.

### B. — ÉTUDE SUR DES DITERPÈNES.

Juillet A. Diara et M<sup>me</sup> C. Asselineau ont continué l'étude de la structure du darutigénol. En transformant l'acide pimarique (IX) en nor-pimarène (X)

et en montrant que ce dernier est l'antipode optique du nor-darutène (XI) dérivé du darutigénol, elles ont pu prouver la formule (XII) pour le darutigénol. On voit que ce dernier possède *k* tous les centres asymétriques connus la configuration inverse de celle de la plupart des diterpènes et stéroïdes [13].

M<sup>me</sup> S. Bory et M<sup>me</sup> C. Asselineau ont continué l'étude des produits de cyclisation du manool dont Tun est un isomère du rimuène (XIII). Pour déterminer la stéréochimie de ce composé, deux hydrocarbures tétrahydrogénés de l'acide pimarique (IX) ont été préparés. Le produit d'hydrogénation de l'hydrocarbure dérivé du manool est isomère de ces deux nouveaux hydrocarbures.



### C. — ÉTUDE SUR DES TRITERPÈNES.

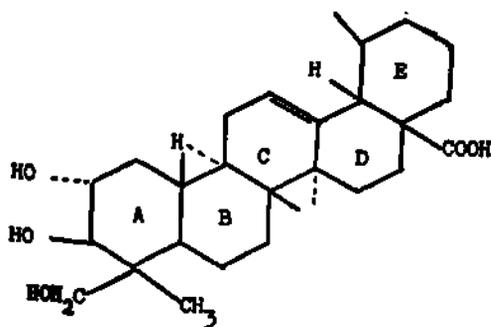
1° *Acide polygalacique*. M<sup>me</sup> J. Polonsky et M<sup>lle</sup> J. Seilgmann ont commencé une étude des constituants de *Polygala paenea* de provenance de Haïti, ce qui leur a permis d'isoler une nouvelle sapogénine qu'elles proposent d'appeler *acide polygalacique*.

La formule brute et la nature des groupements fonctionnels ont pu être établies. L'acide polygalacique C<sub>30</sub>H<sub>48</sub>O<sub>5</sub> est un acide triterpénique pentacyclique tétrahydroxylé dont deux hydroxyles forment un groupement glycol. Une seule double liaison non hydrogénable a pu être mise en évidence dans l'acide polygalacique [26].

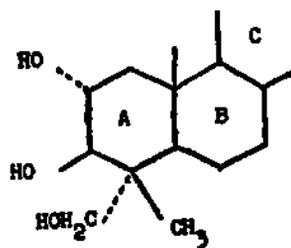
2° *Chimie de Vasiaticoside*. La structure de l'asiaticoside, hétéroside isolé de *Centella asiatica* de provenance de Madagascar avait été élucidée : celle de Taglycone, *Vacide asiatique* (XIV), en 1951 et celle de la partie glucidique en 1959\*

En ce qui concerne la stéréochimie de l'acide asiatique, il restait un seul point à éclaircir, *k* savoir la conformation du groupement -CH<sub>2</sub>OH.

M<sup>me</sup> J. Polonsky et M. J. Zylber ont pu, par une série de réactions chimiques portant sur le cycle A, montrer que le groupement -CH<sub>2</sub>OH a la conformation équatoriale *a* (XV).



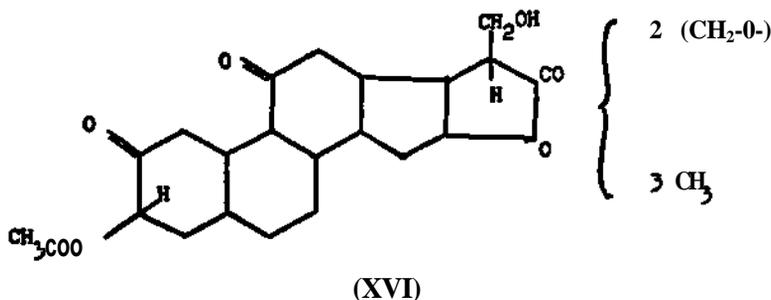
(XIV)



(XV)

## D. — PRINCIPES AMERS DES SIMARUBACÉES.

<sup>10</sup> *Sitnarolide* : M<sup>me</sup> J. Polonsky a poursuivi l'étude de la structure du *Simarolide* C<sub>27</sub>H<sub>36</sub>O<sub>7</sub>, principe amer qu'elle avait isolé de l'écorce de *Simarubana*. Les résultats obtenus permettent d'adopter la formule (XVI) comme hypothèse de travail.



(XVI)

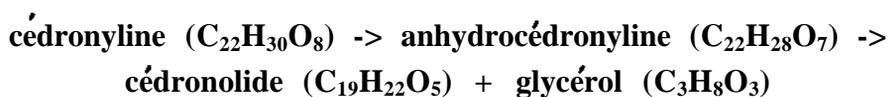
<sup>20</sup> *Cédronine* et *cédronyline* : une étude des constituants des graines de *Simarubana cedron* a été entreprise par M<sup>me</sup> J. Polonsky. Elle a pu isoler deux nouveaux composés cristallisés amers : la *cédronine* et la *cédronyline*.

La *cédronine*, F 280° [α]<sub>D</sub> — 12,6°, de formule probable C<sub>22</sub>H<sub>28</sub>O<sub>8</sub>, renferme les groupements fonctionnels suivants : un groupement y lactonique, une cétone oc,(3-insaturée, deux doubles liaisons, et au moins deux hydroxyles.

La *cédronyline* a la formule brute C<sub>22</sub>H<sub>30</sub>O<sub>8</sub>, qui est en bon accord avec les résultats d'analyses élémentaires et qui a été confirmée par l'étude de ses Produits d'hydrolyse.

Le *cédronyline* est un éther de glycérol qui peut être hydrolysé en glycérol et la *cédronolide* C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub> appelé *cédronolide*. Le poids moléculaire du *cédronolide* a été confirmé par spectrométrie de masse.

l'hydrolyse de la *cédronyline* est précédée d'une déshydratation avec formation de *Tanhydro-cédronyline*; le schéma de l'hydrolyse est le suivant :



L'étude spectrale et l'analyse fonctionnelle montrent que la cédronyline est un éther de glycérol possédant une fonction lactone et quatre fonctions alcool [25].

Tandis que les glycosides sont très répandus dans la nature, très peu d'éthers de glycérol naturels ont été isolés jusqu'à présent.

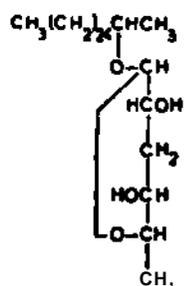
### III. — CHIMIE ET BIOCHIMIE ANIMALES

#### A. — ASCAROSIDES.

M<sup>mes</sup> C. Fouquey et J. Polonsky ont terminé l'étude de la structure des ascarosides A, B et C, isolés de l'insaponifiable de l'*Ascaris*.

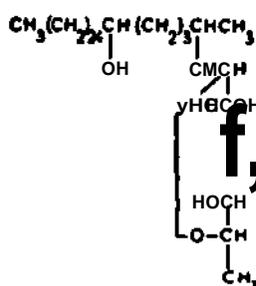
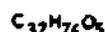
Les trois ascarosides peuvent être représentés par les formules XVII à XIX\*

#### ASCAROSIDE A



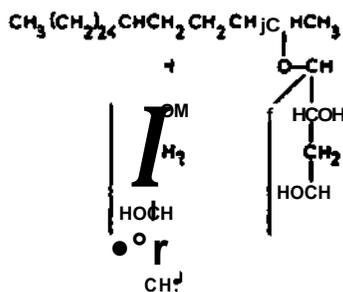
(XVII)

#### ASCAROSIDE B



(XVIII)

#### ASCAROSIDE C



(XIX)

L'ascaroside A est d'ailleurs un mélange de glycosides homologues contenant des méthylcarbinols en C<sub>27</sub> à C<sub>31</sub>.

Les Ascarosides sont des glycosides de l'ascarylose ayant la configuration α-L. Rappelons que ce sucre, dont M<sup>mes</sup> J. Polonsky et C. Fouquey avaient déterminé la structure et effectué la synthèse, appartient à une nouvelle classe de sucres naturels, les 3,6-didésoxy-hexoses, dont les autres membres ont été isolés de bactéries intestinales.

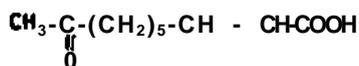
## B. — ACIDE GASCARDIQUE.

M<sup>mes</sup> G. Brochéré-Ferréol et J. Polonsky ont poursuivi l'étude de la structure de *Vacide gascardique* C<sub>25</sub>H<sub>38</sub>O<sub>2</sub>, substance isolée de *Gascardia tnadagascariensis* (cochenille de Madagascar) [21].

## C. — CHIMIE DE L'ECTOHORMONE DE LA REINE D'ABEILLES.

M. M. Barbier a poursuivi ses recherches sur la chimie de rectohormone des Reines d'abeilles. On sait que cette sécrétion possède trois activités : attractivité vis-à-vis des jeunes abeilles, pouvoir d'inhiber le développement de leurs ovaires, et pouvoir d'inhiber la construction de cellules royales. L'isolement, les propriétés et l'examen chromatographique de la fraction possédant à la fois les trois activités ont été décrits [9, 17, 23] ; les essais biologiques ont été effectués par M<sup>lle</sup> J. P<sup>ai</sup>n (Bures-sur-Yvette).

La substance responsable de l'inhibition de la construction des cellules royales a été identifiée : il s'agit de l'acide C<sub>29</sub> décène-2 trans oïque (XX) [5].



(XX)

La synthèse de cet acide, en quatre étapes à partir de la cycloheptanone, a été effectuée au P<sup>o</sup> M<sup>nt</sup> W<sup>W</sup> L<sup>L</sup>. La production de cette hormone par les glandes mandibulaires des Reines en fonction de leur âge et du rôle social a été étudiée par examen direct, par chromatographie gaz-liquide [20, 32]. L'étude des substances responsables des autres activités de rectohormone des reines d'abeilles est en cours, ainsi qu'une série de synthèses de dérivés de l'acide céto-Q décène-2 trans oïque (XX).

## D. — DIVERS.

Avec la collaboration de M<sup>s</sup>. L. Zavialov, M. M. Barbier a appliqué la technique des chromato-plaques à la séparation des oestrogènes [28].

## LISTE DES PUBLICATIONS

1. M. BARBIER, M. F. HUGEL et E. LEDERER. « Isolement du 24-méthylène-cholestérol à partir du pollen de différentes plantes ». *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1960, 42, 91-97.
2. M. LIEMANN, C. LIORET, J. ASSELINEAU, E. LEDERER et J. POLONSKY. « On the structure of lysopine, a new amino-acid isolated from crown-gall tissue ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, 40, 369-370.

3. G. MICHEL, C. BORDET et E. LEDERER. « Isolement d'un nouvel acide mycolique : l'acide nocardique à partir d'une souche de *Nocardia asteroides* ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960, **250**, 3518-3520.
4. D. W. SMITH, H. M. RANDALL, A. P. MACLENNAN et E. LEDERER. « Mycolipides : a new class of type-specific glycolipides of Mycobacteria ». *Nature*, 1960, **186**, 887-888.
5. M. BARBIER et E. LEDERER. « Structure chimique de la « substance royale » (« Queen substance ») de la reine d'abeille (*Apis mellifica*) ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960, **250**, 4467-4469.
6. J. DEFAYE, P. P. SLONIMSKI, G. PERRODIN et E. LEDERER. « Sur la nature chimique des substances qui stimulent la formation des enzymes respiratoires chez la levure. Préparation de nouveaux composés actifs et spécificité d'action ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960, **251**, 817-819.
7. M. BARBIER, E. LEDERER et T. NOMURA. « Synthèse de l'acide cété-9- $\Delta^6$ -2-trans-oïque (« substance royale ») et de l'acide cété-8- $\Delta^6$ -2-trans-oïque ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960, **251**, 1133-1135.
8. P. JOLLES, H. NGUYEN-TRUNG-LUONG-CROS et E. LEDERER. « Sur la structure chimique de la partie peptidique de la cire D d'une souche humaine de *M. tuberculosis* ». (58<sup>e</sup> commun. sur les constituants des mycobactéries). *Biochim. Biophys. Acta*, 1960, **43**, 559-561.
9. M. BARBIER, E. LEDERER, T. REICHSTEIN et O. SCHINDLER. « Auftrennung der sauren Anteile von Extrakten aus Bienenköniginnen (*Apis mellifica*) : Isolierung der als Königinnen-Substanz bezeichneten Pheromone ». *Helv. Chim. Acta*, 1960, **43**, 1682-1689.
10. L. AUDRAIN-LEGAULT-DEMARE, P. P. SLONIMSKI, J. DEFAYE et E. LEDERER. « Antagonismes spécifiques entre les analogues structuraux de pyrimidines et des cofacteurs oligosaccharidiques dans l'adaptation respiratoire de la levure ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960, **251**, 1828-1830.
11. M. IKAWA, E. E. SNELL et E. LEDERER. « Occurrence of D-phenylalanine, D-allo-threonine and other D-amino-acids in peptido-lipides of bacterial origin ». *Nature*, 1960, **188**, 558-560.
12. M. GASTAMBIDE-ODIER et E. LEDERER. « Biosynthèse de l'acide corynomycolique à partir de deux molécules d'acide palmitique ». (12<sup>e</sup> commun. sur les constituants des Corynebactéries). *Biochemische Zeitschrift*, 1960, **333**, 285-295.
13. A. DIARA, C. ASSELINEAU et E. LEDERER. « Sur la structure du darutigénol » (33<sup>e</sup> commun. sur les terpènes). *Bull. Soc. Chim.*, 1960, 1271-1272.
14. E. LEDERER. « Lipides des Mycobactéries et Tuberculose ». *Il Farmaco*, 1960, **15**, 44-70.
15. E. LEDERER. « Lipide der Mycobakterien. Chemische Struktur und Biologische Wirkung ». *Angew. Chem.*, 1960, **72**, 372.
16. J. ASSELINEAU et E. LEDERER. « Chemistry and metabolism of bacterial lipides » in *Lipid Metabolism* (K. Bloch Editor, Wiley and Sons), 1960, 336-406.
17. J. PAIN et M. BARBIER. « Mise en évidence d'une substance attractive extraite du corps des ouvrières d'abeilles non orphelines ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960\*, **250**, 1126-1127.
18. J. ASSELINEAU/« Sur la structure d'un acide mycolique isolé de la souche **humaine** anetti du bacille tuberculeux ». *Bull. Soc. Chim.*, 1960, 135-141.

- \*9- J. ASSELINEAU et S. DAUCHY. « Sur les acides gras des lipides de *Escherichia coli*. Existence d'un acide  $C_{17}H_{22}O_2$  contenant un cycle propanique ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960, **250**, 2635.
- 20- M. BARBIER et J. PAIN. « Étude de la sécrétion des glandes mandibulaires des reines et des ouvrières d'abeilles (*Apis mellifica*) par chromatographie en phase gazeuse ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960, **250**, 3740-3742.
- 21 • G. BROCHÉRE et J. POLONSKY. « Sur la structure d'un nouvel acide alicyclique : l'acide gascardique isolé de la gomme laque de la cochenille *Gascardia madagascariensis* ». *Bull. Soc. Chim.*, 1960, 963-967.
- 22- R. TOUBIANA et J. ASSELINEAU. « Structure de l'acide corynolique; synthèse de la DL-méthyl-21 hexatriacontanone-2 ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960, **251**, 884-886.
- 23- J. PAIN, M. F. HÜGEL et M. BARBIER. « Sur les constituants du mélange attractif des glandes mandibulaires des reines d'abeilles (*Apis mellifica* L.) à différents stades de leur vie ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960, **251**, 1046-1048.
- 24- C. ASSELINEAU et J. ASSELINEAU. « Chimie des acides mycoliques. Étude de quelques hydroxy-acides insaturés et de leurs produits de déshydratation ». (57<sup>e</sup> commun. sur les constituants des mycobactéries). *Bull. Soc. Chim.*, 1960, 1776-1784.
- 25- J. POLONSKY. « Étude des constituants des graines de *Simaba cedron*; sur la structure de deux composés cristallisés : cédronine et cédronyline ». *Bull. Soc. Chim.*, 1960, 1845-1847.
- 26 - J. POLONSKY, H. POURRAT et J. SEILIGMANN. « Étude des constituants des racines de *Polygala paenea* L. Sur la structure d'une nouvelle sapogénine : l'acide polygalactique ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960, **251**, 2374-2376.
- 27- J. ASSELINEAU. « Composition de la partie périphérique du bacille tuberculeux ». 16<sup>e</sup> Congrès international sur les Mycobactéries, 1960, 71-84.
- 28 - M. BARBIER et S. I. ZAVIALOV. « Séparation d'oestrogènes stéroïdiques à l'aide de chromatoplaques ». *Izvestija, Académie des Sciences d'U.R.S.S.*, 1960, 1309-1310.
- 29 - K. BIEMANN, C. LIORET, J. ASSELINEAU, E. LEDERER et J. POLONSKY. « Sur la structure chimique de la Lysopine, nouvel acide aminé isolé de tissu de crown-gall ». *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1960, **42**, 979-991.
30. E. VILKAS. « Sur divers types des phospholipides présents dans le bacille Calmette-Guérin ». *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1960, **42**, 1005-1012.
31. P. VILKAS et E. LEDERER. « Sur la structure du phosphatidyl-inositol-dimannoside de *Mycobacterium tuberculosis* ». *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1960, **42**, 1013-1022.
32. M. BARBIER. « Recherches sur la fraction attractive des reines d'abeilles ». Communication au XI<sup>e</sup> Congrès d'Entomologie, Wien, 1960. Symposium 3 : Insect Chemistry, 82.

---

### COMPOSITION DU SERVICE \*

- M. E. LEDERER, Professeur à la Faculté des Sciences.  
 Mme J. ASSELINEAU, Maître de Recherches au C. N. R. S.  
 M<sup>l</sup> I. ASSELINEAU, Charge de Recherches au C. N. R. S.  
 Mme G. BARBIER, Chargée de Recherches au C. N. R. S.  
 S. BORY, Stagiaire de Recherches au C. N. R. S.

M<sup>me</sup> Z. BASKEVITCH, Collaborates technique au C. N. R. S.  
M<sup>»e</sup> N. BOURGUIGNON, Collaborates technique au C. N. R. S.  
M<sup>me</sup> G. BROCHURE, Attachfe de Recherches au C. N. R. S.  
M. J. DEFAYE, Attache de Recherches au C. N. R. S.  
M<sup>lle</sup> D. BOGDANOWSKI, Collaborates technique au C. N. R. S.  
M<sup>lle</sup> A. DIARA, Attach6e de Recherches au C. N. R. S.  
M<sup>\*e</sup> C. FOUQUEY, Attachée de Recherches au C. N. R. S.  
M<sup>me</sup> H. GINSBURG, Chargée de Recherches au C. N. R. S.  
M<sup>lle</sup> M. F. HOGEL, Collaborates technique au C. N. R. S.  
M<sup>lle</sup> S. KASK, Cherches Wnévole.  
M<sup>me</sup> M. LENFANT, Attachée de Recherches au C. N. R. S.  
M<sup>^e</sup> Y. LIBMANN, Secrétaire au C. N. R. S.  
M. D. MERCIER, Collaborates technique au C. N. R. S.  
M<sup>me</sup> A. M. MIQUEL, Collaborates technique au C. N. R. S.  
M<sup>lle</sup> J. MORON, Attachée de Recherches au C. N. R. S.  
M<sup>m\*</sup> J. POLONSKY, Maitre de Recherches au C. N. R. S.  
M<sup>lle</sup> J. SEILIGMANN, Stagiaire de Recherches au C. N. R. S.  
M. R. TOUBIANA, Attaché de Recherches au C. N. R. S.  
M<sup>me</sup> E. VILKAS, Chargée de Recherches au C. N. R. S.  
M. R. WOLFF, Chargé de Recherches au C. N. R. S.  
M. J. ZYLBER, Stagiaire de Recherches au C. N. R. S.

---

• M. et M<sup>me</sup> Asselineau ont quitté le Service fin septembre 1960, M. Asselineau ayant été nommé Maitre de Conférences à la Faculté des Sciences de Toulouse ; les autres travailleurs du Service ont quitté l'Institut de Biologie Physico-Chimique en décembre 1960 et sont maintenant installés dans l'Institut de Chimie des Substances naturelles du C.N.R.S. à Gif-sUT Yvette (Seine-et-Oise).

## SERVICE DE PHYSIOLOGIE

Rapport de M. THOPHILE CAHN, Chef de Service.

et dans une série de recherches effectuées il y a quelques années, MM. Cahn et Houget ont montré que l'absorption de nourriture provoque chez le Lapin une augmentation des échanges allant de 20 à 50 % suivant que la quantité de nourriture absorbée couvre tout juste les besoins caloriques ou les dépasse. Des travaux analogues avaient été rapportés par quelques auteurs sur le Lapin. Dans la suite ils ont pu établir qu'au cours de l'absorption digestive des aliments chez le Lapin il y a une augmentation du taux des glycérides dans le sang, augmentation qui est proportionnelle à la quantité de nourriture ingérée et présente un maximum quelques heures après le début de l'ingestion; concomitamment ils ont observé une forte augmentation du transport des glycérides par le sang. Comme la nourriture des animaux est essentiellement de glucides et ne contient qu'une très faible quantité de lipides (de l'ordre de 1 %) ils en ont déduit qu'une grande partie des lipides alimentaires est transformée en lipides au cours de la traversée intestinale. Cette conclusion est en accord avec l'augmentation du quotient respiratoire observée et dont la valeur, au moment de l'absorption de nourriture, surtout chez les Lapins jeunes, dépasse souvent l'unité; elle cadre avec le fait que le pouvoir de stockage des glucides d'un Lapin de 4 kg ne suffit pas à servir les 60 à 79 g de sucres que lui apporte sa ration journalière. Il était tentant de rapprocher ces deux constatations: l'augmentation de la production calorique au cours de la digestion et la transformation des glucides alimentaires en lipides, et ceci d'autant plus que cette transformation exige un apport important d'énergie. Pour obtenir, l'organisme est obligé de brûler une certaine quantité de substances et l'excès de chaleur produit correspond à l'énergie non utilisée pour cette transformation. En admettant que la conversion des glucides alimentaires en lipides se fasse avec un rendement de 45 %, la valeur que l'on observe dans l'oxydation du glucose couplée à la phosphorylation de l'acide adényl-pyrophosphorique, on trouve une corrélation satisfaisante avec l'augmentation des échanges observés. Tout ce qui a été dit de précédents concordantes a permis de conclure que l'augmentation des échanges observée chez le Lapin après ingestion de sa ration habituelle est due à la transformation d'une grande partie des glucides alimentaires en lipides. Si les substances alimentaires, qui ne peuvent être mises telles quelles à disposition, doivent être rapidement transformées en lipides, on doit s'attendre à ce que l'absorption de lipides ne soit pas suivie d'une augmentation de la production de chaleur; et c'est en effet ce qui a été observé par d'autres auteurs et par MM. Cahn et Houget.

On sait depuis les expériences de Rubner que, chez le Chien, l'absorption de viande en quantité suffisante pour couvrir les besoins amène une augmentation de la production calorique de 30 % environ; si Ton augmente considérablement la ration de viande, cette augmentation peut atteindre 80 %. Ce sont là des résultats très comparables & ceux obtenus sur le Lapin par MM. Cahn et Houget. Toutefois Rubner n'observait cet effet qu'après ingestion de viande, et non avec les lipides ou avec des glucides; c'est pour cela qu'il lui avait donné le nom d'action dynamique spécifique. Un grand nombre d'auteurs ont cherché à élucider les raisons et le mécanisme de cet effet, et naturellement ont tenté de l'expliquer par un processus particulier au métabolisme des protides. Rien ne s'oppose *a priori* à l'idée que, lors d'une absorption d'une grande quantité de protides, une fraction au moins puisse être transformée en lipides et que l'augmentation de la production calorique soit pour une part due au déchet de cette transformation. Mais il reste à expliquer pourquoi Rubner n'a pas observé d'augmentation des échanges lorsqu'il a donné à ses chiens un excès de sucres dont une fraction aurait dû être transformée en lipides. Rubner n'a fait que peu d'expériences d'alimentation avec un excès de glucides; elles lui ont montré une surproduction de chaleur allant de 6 à 8 %, exceptionnellement & 18 %. Il faut remarquer qu'un animal carnivore, brusquement inondé de sucres peut présenter une forte glucosurie et Rubner l'a observée dans toutes ses expériences qu'il n'a d'ailleurs jamais prolongées plus de 2 jours. Rubner n'a pas déterminé le quotient respiratoire, il ne connaissait donc pas la nature exacte du combustible et il admettait que l'animal, en dehors des protides, ne brûlait que des glucides. Son calcul de la production calorique comporte donc une part d'incertitude; n'ayant pas dans ses expériences effectué de mesure directe de la chaleur produite, il n'a pas pu se rendre compte de l'ampleur de son erreur. Il faut se rappeler aussi que le Chien peut déposer une quantité non négligeable de glucose dans le tissu adipeux sous-cutané où il sera transformé très lentement en lipides. Il ne semble donc pas qu'il faille attacher trop d'importance à ces résultats négatifs chez le Chien, et ceci d'autant plus que plusieurs auteurs ont observé chez l'Homme, après absorption de glucides, des augmentations non négligeables de la production calorique.

Il semble donc qu'on puisse généraliser les résultats obtenus sur le Lapin et admettre qu'il se produit une augmentation de la production calorique après ingestion de tout aliment qui ne peut être stocké en quantité suffisante et que l'organisme est, de ce fait, obligé de transformer en un composé qui, lui, peut être mis en réserve en quantités presque illimitées : seuls les lipides présentent cette possibilité; l'augmentation de la production calorique constitue le déchet énergétique de cette transformation. Puisque cet effet peut être obtenu aussi bien après ingestion de protides que de glucides, l'appellation d'action dynamique spécifique ne peut pas être maintenue; MM. Cahn et Houget proposent de lui donner le nom de « dépense de conversion des aliments ».

On peut se demander si l'organisme perd obligatoirement une même proportion d'énergie lorsqu'il effectue ces transformations dans les divers tissus ou si ce mauvais rendement énergétique au cours de l'assimilation des aliments est dû au fait qu'elles se font très rapidement dans un tissu qui ne peut, dans un temps aussi court, utiliser toute l'énergie mise en jeu. Le besoin important de chaleur de l'homéotherme pour le maintien

de sa température corporelle enlève à ce problème une grande part de son intérêt.

MM. Cahn et Houget ont, d'autre part, continué leurs recherches sur le transport des lipides dans le sang et sur les facteurs qui le conditionnent, en étudiant l'influence du jeûne sur la lipémie du Lapin. Cette étude a été grandement facilitée par les microméthodes, mises au point par M. Houget et M<sup>lle</sup> Boutou, qui permettent de doser avec précision les acides gras totaux esterifiés, les acides gras des glycérides, des phosphatides et des esters de cholestérol, le cholestérol libre et le phosphore lipidique sur une prise de 2 cm<sup>3</sup> de sang. Grâce à cette faible prise de sang on évite toute répercussion sur le transport des lipides.

C'est l'absence de microméthodes précises qui est une des causes du peu de connaissances sur ce problème.

Les animaux reçoivent leur ration tous les jours à 11 heures. Si on ne la leur donne pas, on observe dès la 3<sup>e</sup> heure de jeûne une diminution des acides gras totaux, chute qui est très souvent plus accusée encore après 5 et 7 heures de jeûne. Avec la prolongation du jeûne, l'évolution se fait selon deux types. Selon le premier, observé chez deux mâles et une femelle, la chute des acides gras totaux se prolonge et est encore très accusée au bout de 24 heures, cette diminution est due principalement aux glycérides; mais leur transport s'intensifie ensuite tout en restant inférieur à ce qu'il était à l'état post-absorptif, de telle sorte qu'après 7 jours de jeûne les acides gras circulants n'ont pas retrouvé leurs valeurs de départ. Chez les animaux du second type qui ne renferme que des femelles, l'intensification du transport des lipides est plus précoce; après un jeûne de 24 heures, les glycérides ont à peu près repris leur valeur de départ; ils continuent à augmenter par la suite, avec des vitesses inégales suivant les individus, pour atteindre après 7 jours de jeûne plus du double ou du triple de la valeur de départ.

Les variations du taux des phospholipides du plasma sont les mêmes dans les deux groupes d'animaux : diminution rapide pendant les 24 premières heures du jeûne, mais moins profonde que celle des glycérides, puis remontée avec des oscillations plus ou moins amples & des valeurs inférieures ou voisines de leur taux initial. Leur synthèse dans l'organisme jeûneur est donc insuffisante pour équilibrer leur utilisation par les tissus.

Les esters de cholestérol sont les seuls constituants lipidiques qui ne subissent pas de chute le premier jour de jeûne mais, au contraire, une augmentation régulière chez tous les animaux de l'ordre de 25 % et progressant tout au long du jeûne pour atteindre à la fin un peu plus de 50 %. Ces variations font penser que ce composé constitue un des éléments de la mobilisation des lipides. Le cholestérol libre, après une légère dépression, augmente lui aussi, mais plus faiblement.

Dans un autre travail MM. Cahn et Houget montrent que l'administration d'une faible quantité d'adrénaline (50 µg/kg) ralentit chez le Lapin la prise de nourriture, retarde et diminue l'hyperlipémie alimentaire et provoque, au bout de 24 heures, une augmentation dans le plasma du transport des glycérides, des phosphatides et du cholestérol libre; les esters de cholestérol ne sont pas modifiés.



Dans une autre série d'expériences M<sup>me</sup> Azam et M<sup>lle</sup> Picavet ont analysé les effets de l'insuline et de l'adrénaline sur la glycémie. Elles ont pu observer que les animaux, dont la glycémie à jeûn est assez stable au cours de l'année, répondent aussi d'une façon régulière et modérée à l'injection d'hormone; ce sont des animaux dont les mécanismes de régulation entrent rapidement en action. Chez les autres, bien que l'on ait maintenu les conditions aussi semblables que possibles, les réponses obtenues peuvent varier grandement d'une fois sur l'autre. Les réponses glycémiques consécutives à l'administration d'hormones sont plus faibles en hiver; ce fait s'observe chez tous les Lapins après administration d'insuline, mais seulement chez les mâles après l'adrénaline. Dans le cas de l'insuline, l'hypoglycémie s'installe en général plus vite chez les femelles et le retour à la normale se fait aussi plus tôt. L'insuline peut être injectée à des concentrations très différentes sans que cela se répercute sur la courbe hypoglycémique; on observe au contraire avec l'adrénaline des hyperglycémies plus importantes si on injecte cette hormone à des concentrations plus fortes, et ceci est surtout accusé chez les femelles. Plusieurs auteurs avaient observé que l'hypoglycémie insulinique pouvait, chez certains Lapins, être précédée d'une pointe d'hyperglycémie qu'ils ont attribuée au glucagon contenu dans l'insuline. M<sup>me</sup> Azam montre que cet effet est encore décelable avec l'insuline actuelle qui ne contient plus de glucagon et qu'il est dû aux manipulations car on l'obtient chez les mêmes animaux après une simple injection d'eau physiologique.

\*  
\* #

Au cours de l'année 1960, M. Kepinov a achevé une partie de ses recherches relatives à l'action du froid sur l'organisme des mammifères.

Des expériences faites avec des Rats dressés à consommer leur ration journalière de pain dans un délai déterminé montrent que la mise en réserve du glycogène dans le foie ainsi que sa mobilisation sont différentes suivant que les animaux sont maintenus à une température de 34-35° ou à + 4°. Le glycogène hépatique est sans doute un facteur important dans le processus d'adaptation au froid.

L'amplitude des variations du glycogène hépatique chez les Rats soumis à l'action prolongée du froid paraît dépendre étroitement de la quantité d'aliments contenus dans le tube digestif.

Les résultats de ce travail ont été exposés dans un mémoire : « Variations du taux du glycogène hépatique chez le Rat soumis à l'action prolongée du froid » (*Journal de Physiologie*, sous presse).

Actuellement, M. Kepinov poursuit des recherches sur le même sujet.

# #

Pendant l'année 1960, M. Agid a poursuivi avec M<sup>lle</sup> George l'étude du métabolisme des sucres chez les lapins rendus anémiques par des saignées

répétées. Il se confirme que les animaux présentent des tests anormaux : augmentation de l'hyperglycémie après ingestion de glucose ou après injection d'adrénaline (la glycémie plasmatique dépasse 600 mg % avec 50 y d'adrénaline par kg d'animal, au lieu de 300 à 350 avant Panémie), et également augmentation de la résistance à l'insuline (les lapins résistent à des doses convulsivantes de 1 à 2 unités/kg à jeun, et leur courbe d'hypoglycémie est très modifiée). Ces caractères n'apparaissent nettement que lorsque la Panémie est importante (moins de 22 % de globules rouges à Phématocrite).

D'autre part une injection d'insuline fake au Lapin anémique diminue au bout de quelques heures les valeurs souvent énormes de la lipémie (de 20 à 35 %). M. Agid a suivi aussi chez ces animaux l'évolution des acides gras non estérifiés du plasma grâce à une méthode de dosage qu'il a modifiée. Les premiers résultats montrent, sous l'effet de l'insuline, une chute appréciable en une heure des acides gras non estérifiés, précédant la chute lipémique proprement dite. Il est donc possible que l'insuline agisse en bloquant la mobilisation des acides gras au niveau des réserves, comme le suggèrent certains travaux.

M. Agid a avec M<sup>me</sup> Martojat (qui poursuit par ailleurs un travail histologique sur la « glande digestive » d'un Mollusque, la Nasse) examiné la teneur en glycogène et en lipides de cet organe, dont le rôle n'est pas connu, en fonction du cycle évolutif et de l'alimentation. Cette glande ne pesant que 25 à 50 mg a exigé la mise au point d'une méthode donnant avec une bonne précision les valeurs du glycogène et des acides gras totaux de la glande. Des résultats nombreux s'échelonnant sur une année montrent qu'il n'existe aucune relation apparente entre la prise de nourriture et la teneur de cette glande en substance de réserve.

Enfin, M. Agid avait montré antérieurement avec M. Duguy et M. Saint-Girons que la glycémie de la vipère présente des valeurs très basses pendant la période d'hibernation et trouvé à l'intérieur d'une même série expérimentale une relation assez stricte entre la valeur glycémique et la température. Par contre ils avaient observé qu'en Janvier, pour une température égale ou inférieure à celle de décembre, la glycémie présente des valeurs nettement supérieures, ce qui montrait l'influence en dehors de la température, de l'état endocrinien de l'animal. L'examen histologique des glandes endocrines de ces animaux a en effet montré qu'en décembre les cellules de la médullaire surrénale sécrétant l'adrénaline et la noradrénaline sont boursées de granulations, ce qui est interprété comme une mise au repos de la glande. Au contraire en Janvier, précédant d'ailleurs les sorties de Printemps, ces cellules recommencent graduellement à fonctionner et à sécréter de l'adrénaline. Les valeurs plus élevées de la glycémie à ce moment (20 à 30 mg % au lieu d'une glycémie pratiquement nulle) sont sans doute en rapport avec ce début de radrénalino-sécrétion.

#  
##

Des recherches antérieures de M<sup>me</sup> Gallien-Lartigue avaient montré que la rate joue un rôle important dans l'apparition de Panémie chez l'animal irradié à des doses léthales : elle fragilise les hématies et contribue à leur destruction.

M<sup>me</sup> Gallien-Lartigue essaie actuellement de déterminer par quels mécanismes la rate exerce ce double rôle. Dans un premier temps, la recherche des

autohémolysines a été effectuée par la méthode de Dameshek, elle s'est révélée négative. Une expérience est maintenant en cours pour étudier les variations de la glucuronidase plasmatique du Lapin. Cette enzyme, abondante dans la rate, fragilise les hématies *in vitro* et les hémolyse; elle peut devenir un agent causal d'anémies *in vivo*. Les premiers résultats montrent qu'il se produit effectivement une nette élévation de la teneur en glucuronidase dans la deuxième semaine après l'irradiation. Il faudra ensuite suivre ces variations chez des Lapins splénectomisés irradiés, qui ne font pas d'anémie dans 50 à 60 % des cas, avant de pouvoir discuter de la corrélation entre l'augmentation de la glucuronidase et l'anémie des rayons X.

Dans une autre série de recherches qui est en cours depuis quelques années, M<sup>me</sup> Gallien-Lartigue montre que les modifications des acides gras estérifiés du plasma chez le cobaye après irradiation de la tête seule à plus de 1.000 r entraînant la mort sont relativement faibles : leur teneur ne s'élève que de 38 % alors qu'au même moment la teneur en glycérides du foie augmente de 100 à 200 % par rapport aux témoins recevant la même quantité de nourriture et non irradiés.

\* \* #

Poursuivant ses recherches sur l'absorption intestinale du glucose avec les méthodes décrites en 1959, M<sup>me</sup> Lourau a éclairci cette année les deux points suivants :

1° L'absorption de glucose se fait d'une façon analogue chez l'animal intact et par l'intestin isolé : la vitesse de l'absorption croît en fonction du logarithme des concentrations.

2° Chez l'animal irradié totalement par les rayons X, les variations des deux mécanismes qui normalement règlent la vitesse d'absorption (glycémie, dilution de la solution par la sécrétion gastrique) n'expliquent pas le ralentissement constaté après l'irradiation. Par ailleurs, la perméabilité de la muqueuse intestinale au glucose restant normale, l'hypothèse la plus satisfaisante est que le glucose intracellulaire est difficilement renouvelé, hypothèse qui rattache le ralentissement de l'absorption au trouble de l'utilisation des glucides qu'entraîne l'irradiation et qui a été étudié antérieurement par M<sup>me</sup> Lourau (1950-1954)-

---

#### LISTE DES PUBLICATIONS

- Th. CAHN et J. HOUGET. « Sur l'action dynamique spécifique ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960, 251, 452.
- Th. CAHN et J. HOUGET. « Étude de la lipémie du Lapin et des facteurs qui la conditionnent. Influence du jeûne ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960, 251, 2419.
- Th. CAHN et J. HOUGET. « Étude de la lipémie du Lapin et des facteurs qui la conditionnent. Influence de l'adrénaline ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960, 251, 2613.

- Th.** CAHN et J. HOUGET. « Les réactions métaboliques consécutives à la prise de nourriture chez le Lapin ». *Arch. Sc. physiol.*, 1960, 14, 279.
- Th.** CAHN et J. HOUGET. « La circulation des matériaux ». *Encycl. française*, tome IV, La Vie.
- M.** A. AZAM. « Étude de l'action hypoglycémisante de l'insuline. Variabilité de la réponse et influence de la concentration de l'hormone. Effet de l'ACTH ». Diplôme d'Études Supérieures de Sciences Naturelles, Faculté des Sciences, Paris, 1960.
- S.** PICAUVET. « Sur l'hyperglycémie adrénalinique chez le Lapin : influence de la concentration de l'adrénaline, influence de l'ACTH ». Diplôme d'Études Supérieures de Sciences Naturelles, Faculté des Sciences, Paris, 1960.
- O.** GALLIEN-LARTIGUE. « Effets de l'irradiation X totale sur les principaux constituants chimiques du foie de Cobaye ». *Rev. franç. d'Études chimiques et biologiques*, 1960, 5, 139.

---

*COMPOSITION DU SERVICE*

- M. TH. CAHN**, Directeur de Recherches au C. N. R. S.  
**M. J. HOUGET**, Directeur de Recherches au C. N. R. S.  
**M. R. AGID**, Maître de Recherches au C. N. R. S.  
**M. L. KEPINOV**, Maître de Recherches en retraite.  
**M. R. VALENCIA** (actuellement sous les drapeaux).  
**M. J. NEKHOROCHEFF**, Chargé de Recherches au C. N. R. S.  
**M<sup>m\*</sup> O. GALLIEN-LARTIGUE**, Chargé de Recherches au C. N. R. S.  
**M<sup>me</sup> M. LOURAU**, Chargé de Recherches au C. N. R. S.  
**M<sup>me</sup> G. WEISS**, Collaborateur technique au C. N. R. S.  
**M<sup>me</sup> M. A. AZAM**.  
**M<sup>lle</sup> S. PICAUVET**.  
**M. M. ZANNAD**.  
**M<sup>lle</sup> C. PLAS**.  
**M<sup>lle</sup> N. FRANGI**.  
**M<sup>lle</sup> M. GEORGE**, Boursière du 3<sup>e</sup> cycle.  
**M<sup>lle</sup> F. CARDOU**, Boursière du 3<sup>e</sup> cycle.

## SERVICE DE GENETIQUE

Rapport de M. BORIS EPHRUSSI, Chef de Service.

### I. -- MICROSCOPIE & ELECTRONIQUE

M. Y. Yotsuyanagi, en collaboration avec le Service de microscopie électronique de l'Institut du Cancer, a poursuivi l'étude des techniques de détection des systèmes enzymatiques. Les techniques de détection des déshydrogénases au tellurite et au nitro-blue-tetrazolium (Barnett, 1957, 1958, 1959) ont été appliquées au foie et au rein, afin de voir si elles permettent de différencier la localisation de la succinodéshydrogénase et du système DPN-lactico-déshydrogénase. Les essais n'ont pas apporté des résultats convaincants et font douter de la validité des techniques courantes.

M. Y. Yotsuyanagi a par ailleurs continué l'étude de l'ultra-structure de la levure en relation avec sa génétique et sa biochimie. Une amélioration récente de la technique a permis l'examen des levures dans différents états physiologiques et a facilité l'étude des mutants *k* déficience respiratoire. Dans ces derniers, une anomalie du chondriome a été observée. L'étude de révolution du chondriome au cours du cycle de croissance aérobie est en cours. Son objectif est de découvrir le mode de reformation du chondriome après sa « disparition » au cours de la phase exponentielle.

M. Y. Yotsuyanagi participe également aux essais d'isolement de la fraction mitochondriale de la levure, poursuivis à l'Institut de Génétique de Gif-sur-Yvette par MM. Slonimski, Fukahara et M<sup>me</sup> Somlo.

### II. — STRUCTURE FINE DU GENE

MM. Lissouba et Mousseau ont continué, sous la direction de M. Rizet, l'étude de mutants à ascospores blanches appartenant à deux séries d'allèles chez *Ascobolus immersus*. Chacune de ces séries correspond apparemment à deux unités élémentaires du chromosome, unités contiguës ou « polarons ». Les recombinaisons à l'intérieur de ces polarons correspondent toujours à des conversions : il n'y a jamais dans un même tétrade de recombinaisons réciproques. Au contraire, les recombinaisons résultant d'événements localisés entre les unités élémentaires correspondent à des crossing-over classiques : une même tétrade fournit alors les deux types de recombinants complémentaires.

*LISTE DES PUBLICATIONS*

- B.** LISSOUBA et G. RIZET. « Sur l'existence d'une unité génétique polarisée ne subissant que des échanges non réciproques ». *C. R. Acad. Sci.*, 1960, 250, 3408.
- G.** RIZET, P. LISSOUBA et J. MOUSSEAU. « Sur l'interférence négative au sein d'une série d'allèles chez *Ascobolus immersus* ». *C. R. Soc. Biol.*, séance du 25 nov. 1960 (*sous presse*).
- P.** LISSOUBA. « Mise en évidence d'une unité génétique polarisée et effet d'analyse d'un cas d'interférence négative ». Thèse de Doctorat ès Sciences (en cours de publication).
- 

*COMPOSITION DU SERVICE*

- M. B. EPHRUSSI, Professeur à la Faculté des Sciences.
- M. G. RIZET, Professeur à la Faculté des Sciences.
- M. J. MOUSSEAU, Chef de travaux à la Faculté des Sciences.
- M. P. LISSOUBA, Stagiaire de Recherches O. R. S. T. O. M.
- M. Y. YOTSUYANAGI, Attaché de Recherches au C. N. R. S.
- M<sup>me</sup> S. CHEVAIS, Ingénieur C.N. R.S.

## Rapport de M<sup>lle</sup> NINE CHOUCROUN, Directeur de Laboratoire.

Nos recherches se sont poursuivies dans le sens indiqué dans notre rapport précédent.

*Vétude comparative des réactions intradermiques au lipopolysaccharide Pmko et à la tuberculine, a été étendue aux sujets tuberculeux ou non tuberculeux, faiblement allergiques ou anergiques à Tun ou à l'autre de ces antigènes. Cette étude a montré que de ces deux antigènes, le Pmko est, sauf dans le cas des tuberculoses aiguës, le révélateur le plus sensible (l'allergie faible, spécifiquement liée au bacille tuberculeux).*

Le lipopolysaccharide Pmko permet de révéler, mieux que la tuberculine, des allergies faibles telles que Ton peut en observer au cours de certaines tuberculoses chroniques; au cours des pleurésies séro-fibrineuses chez les sujets âgés ou débilisés. Ceci implique que, dans l'affaiblissement simultané des allergies, sous l'influence de causes perturbatrices de l'état général, l'hypersensibilité au lipopolysaccharide conserve un degré d'intensité supérieur à celui de l'hypersensibilité tuberculinique.

C'est bien ce qui se produit chez les sujets cliniquement non tuberculeux, normaux ou atteints d'autres maladies, pour lesquels nous avons constaté que l'affaiblissement simultané de ces allergies, est moins important pour l'hypersensibilité au Pmko, que pour l'allergie tuberculinique.

Or, il s'agit de sujets, comme nous l'avons souligné, de sujets *allergiques*, sans tuberculose clinique, de sujets qui ont opposé une résistance incontestable au bacille de Koch, puisqu'ils ont triomphé sans tuberculose-maladie, d'une agression bacillaire qui a développé en eux les allergies spécifiques constatées.

Ainsi, la *persistance* de l'hypersensibilité au Pmko, et non pas seulement son développement, seraient liés aux facteurs de résistance de l'organisme, conformément aux conclusions suggérées par l'analyse comparative des intensités des réactions intradermiques au Pmko et à la tuberculine, chez des sujets tuberculeux atteints de formes différentes, plus ou moins graves, de la maladie.

Si cette relation possible, d'intérêt théorique fondamental, appartient surtout au domaine de l'investigation, l'existence même de cette hypersensibilité au Pmko, si longtemps insoupçonnée, offre la possibilité d'utiliser, pour le dépistage systématique de l'allergie développée par le bacille de Koch, un antigène qui présente sur la tuberculine certains avantages incontestables.

Le fait que le lipopolysaccharide Pmko est un constituant chimique de grande stabilité dont la constitution est beaucoup mieux définie que celle des

tuberculines les plus purifiées, permet d'obtenir des préparations de cet antigène, toujours semblables à elles-mêmes, dont l'activité biologique aisément dosable *in vitro* ne s'altère pas avec le temps (comme nous avons pu le constater par l'utilisation de préparations remontant à plusieurs années). Ce n'est certainement pas le cas pour la tuberculine, dont les préparations peuvent avoir des propriétés différentes d'un pays à l'autre, souvent d'un lot à l'autre dans le même pays, et pour lesquelles le contrôle de l'activité biologique, qui s'altère avec le temps, doit nécessairement se faire *in vivo*.

En dehors de ces propriétés du lipopolysaccharide Pmko, qui pourraient permettre la purification souhaitable d'un test de grande utilisation, la nature particulière de la réaction intradermique au Pmko présente sur la réaction tuberculique, des avantages de précision et de commodité de lecture, qui ont été soulignés par le D<sup>r</sup> W. Hartston du « County Council of London ».

Le D<sup>r</sup> Hartston qui dirige et contrôle à Londres, toutes les épreuves tuberculiques et la vaccination par le B.C.G., utilise ce test au Pmko concurrentement avec le test tuberculique (PPD) depuis plusieurs années. Après avoir observé les réactions intradermiques à ces deux antigènes chez des centaines de sujets devant être soumis à la vaccination par le B.C.G., le D<sup>r</sup> Hartston pense que le test au Pmko pourrait remplacer avantageusement le test tuberculique, non seulement pour le dépistage systématique de l'allergie avant toute vaccination, mais aussi comme indicateur précoce de l'allergie qui se développe au cours de la vaccination par le B.C.G.

Les Services sanitaires de la région parisienne, chargés du dépistage de l'allergie au bacille tuberculeux, doivent commencer prochainement l'étude de ce test au lipopolysaccharide Pmko.

Les essais de vaccination de Bovidés par le lipopolysaccharide Pmko, se sont poursuivis avec la collaboration des laboratoires de recherches de l'École Vétérinaire de Maisons-Alfort. Je rappelle que l'intérêt fondamental de ces expériences serait d'aboutir à une vaccination n'entraînant pas, comme le B.C.G., le développement de l'allergie tuberculique, dont la présence est encore le seul test de discrimination entre les animaux tuberculeux et ceux qui ne le sont pas.

Ces expériences devaient nous permettre d'apprécier le degré de protection éventuellement conféré par l'antigène Pmko, et de le comparer à celui que devait entraîner la vaccination par le B.C.G. A cette fin, nous nous étions placés dans des conditions expérimentales décrites par l'École française, pour que l'immunité conférée par le B.C.G. se manifeste. Nous avons même ramené de 5 à 1/50 de mgr la dose de bacilles tuberculeux virulents de l'épreuve infectante, pratiquée par la voie intraveineuse, après avoir fait un étalonnage d'activité de la souche bovine de bacilles utilisée, sur les bovins eux-mêmes.

Deux expériences successives, portant chacune sur 12 vaches : 5 animaux préparés avec le lipopolysaccharide Pmko; 5 animaux de contrôle de l'infection développée par l'épreuve infectante et 2 animaux vaccinés par le B.C.G., ont montré que, dans ces conditions d'expérimentation :

<sup>10</sup> la vaccination par le B.C.G. ne protège pas complètement les Bovidés contre le développement de l'infection tuberculeuse;

2° le degré de protection conféré par le lipopolysaccharide Pmko est tout fait comparable, sinon supérieur, à celui conféré par le B.C.G. dans les mêmes conditions d'expérimentation.

Nous pensons que l'efficacité de la vaccination des Bovidés par le B.C.G., parfaitement démontrée à l'Étranger (par des expériences exposant les animaux vaccinés aux voies naturelles de contamination) n'est pas en cause, et que seule la brutalité de l'épreuve infectante par voie intraveineuse, est responsable des résultats que nous avons constatés.

Il semble raisonnable d'espérer que des expériences de ce genre permettront de démontrer la protection conférée par le lipopolysaccharide Pmko, que nous avons vu se manifester, au même titre que celle du B.C.G., dans nos essais de vaccination.

Le Ministère de l'Agriculture étudie actuellement les possibilités de réalisation d'une telle expérience.

*Étude de l'électrisation superficielle des spermatozoïdes*, d'origine animale ou humaine, par la méthode de Plectrophorèse et Utilisation de notre dispositif pour l'observation microscopique des éléments chargés a été poursuivie. Cette étude nous a permis d'infirmer les résultats des auteurs qui ont cru observer, et séparer par le champ électrique, des éléments de charge électrique de signes différents : les spermatozoïdes sont tous chargés négativement.

Nous pensons que ces auteurs ont fait une séparation des spermatozoïdes selon l'importance de leur charge.

---

### LISTE DES PUBLICATIONS

- Nine CHOUCROUN, P. GRESLAND, R. KOURILSKY. « Hypersensibilité de type « retardée » au lipopolysaccharide du bacille tuberculeux ». *Revue de la Tuberculose*, 1960, 24, pp. 589-604.
- R. KOURILSKY, P. GRESLAND, Nine CHOUCROUN. « Étude des variations d'intensité des hypersensibilités au lipopolysaccharide Pmko et à la tuberculine en fonction de l'évolution anatomo-clinique de la tuberculose ». *Revue de la Tuberculose*, 1960, 24, pp. 605-632.
- Nine CHOUCROUN, R. KOURILSKY et P. GRESLAND. « Étude comparative des épreuves intradermiques à la tuberculine et au lipopolysaccharide Pmko chez les sujets faiblement allergiques ou anergiques ». *Revue de la Tuberculose*, 1960, 24, pp. 980-997.

---

### COMPOSITION DU LABORATOIRE

- M<sup>lle</sup> N. CHOUCROUN, Directeur de Recherches au C. N. R. S.  
 M. P. GRESLAND, Attaché de Recherches au C. N. R. S.  
 M<sup>lle</sup> J. FAURE, Collaborateur technique au C. N. R. S.  
 M<sup>lle</sup> J. FOUBARD, Collaborateur technique au C. N. R. S.

## PROFESSEURS EN VISITE

Le Professeur I. C. Gunsalus, Chef du Département de Biochimie à l'Université d'Illinois (Urbana), a séjourné pendant l'année scolaire 1959-60 à l'Institut de Biologie physico-chimique. Il s'est intéressé de très près à plusieurs des recherches qui y sont poursuivies :

Le mécanisme d'action du pyridoxalphosphate, intervention de l'acide oléique et de la biotine dans la dégradation phosphoroclastique du pyruvate, le métabolisme de *Acetobacter Xylinum*, propriétés des D- et L- lacticodéshydrogénases.

Il a également participé activement aux discussions sur les travaux actuellement en cours sur la synthèse des acides nucléiques et sur le mécanisme de la sporulation chez les bactéries.

Pendant son séjour à Paris, le D<sup>r</sup> Gunsalus a donné plusieurs conférences dont une à l'Institut de Biologie sur « La dégradation bactérienne des terpènes ».

Le D<sup>r</sup> A. M. Michelson, chargé du Service de Chimie de la Firme A. Guinness & Dublin, a passé 15 jours en novembre 1960 dans le Service de Biochimie où il a travaillé sur le mécanisme d'action de la polynucléotide phosphorylase et de l'enzyme « d'échange » de la levure. Différents nucléotides que le D<sup>r</sup> Michelson a synthétisés chimiquement ont permis de déterminer la spécificité de ces enzymes et la structure requise pour qu'un oligo-nucléotide puisse servir d'initiateur pour la polymérisation des ribopolynucléotides.

Le D<sup>r</sup> Michelson a donné une conférence à l'Institut de Biologie sur « les méthodes de synthèse chimique des différents nucléotides et des coenzymes ».

## TABLE DES MATURES

COMPOSITION DU CONSEIL D'ADMINISTRATION .	S
COMPOSITION DU COMITÉ DE DIRECTION	6
SERVICE DE CHIMIE MACROMOLÉCULAIRE, rapport de M <sup>TM</sup> A. DOBRY- DUCLAUX.	7
SERVICE DE BIOPHYSIQUE, rapport de M. R. WURMSER.	11
SERVICE DE BIOCHIMIE THÉORIQUE, rapport de M. B. PULLMAN	17
SERVICE DE BIOCHIMIE A, rapport de M <sup>«»</sup> Y. KHOUVINE	26
SERVICE DE BIOCHIMIE B, rapport de M <sup>*e</sup> M. GRUNBERG-MANAGO	32
SERVICE DE CHIMIE DES SUBSTANCES ORGANIQUES NATU- RELLES, rapport de M. E. LEDERER .	40
SERVICE DE PHYSIOLOGIE, rapport de M. Th. CAHN	51
SERVICE DE GÉNÉTIQUE, rapport de M. B. EPHRUSSI .	58
LABORATOIRE DE M <sup>»e</sup> N. CHOUCROUN. PROFESSEURS	60
EN VISITE	63

FONDATION EDMOND DE ROTHSCHILD  
POUR LE DÉVELOPPEMENT DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

---

INSTITUT DE BIOLOGIE  
PHYSICO-CHIMIQUE

RAPPORTS  
SUR LES TRAVAUX EFFECTORS

AU COURS DE L'ANNÉE

1961

13, RUE PIERRE-CURIE  
PARIS-V\*

## CONSEIL D'ADMINISTRATION

### *Président :*

to. FRANCIS PERRIN, Membre de l'Institut, Professeur au Collège de France, Haut-Commissaire à l'Energie Atomique.

### *Vice-Présidents :*

to. G. CHAMPETIER, Membre de l'Institut, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris,

to. A. DE GRAMONT, Membre de l'Institut, Président de l'Institut d'Optique.

### *Secrétaire Général :*

to. R. WURMSER, Professeur honoraire à la Faculté des Sciences de Paris.

### *Trésorier :*

to. EDMOND DE ROTHSCHILD.

- MM.** E. AUBEL, Professeur honoraire à la Faculté des Sciences de Paris.  
P. AUGER, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris.  
E. BAUER, Professeur honoraire à la Faculté des Sciences de Paris.  
L. BINET, Membre de l'Institut, Doyen de la Faculté de Médecine de Paris.  
T. CAHN, Directeur à l'école des Hautes Études, Directeur de Recherches au C.N.R.S.  
R. COURRIER, Secrétaire Perpétuel de l'Académie des Sciences, Professeur au Collège de France.  
J. DUCLAUX, Membre de l'Institut, Professeur honoraire au Collège de France.  
B. EPHRUSSI, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris.  
R. FABRE, Membre de l'Institut, Doyen honoraire de la Faculté de Pharmacie de Paris.  
L. FAGE, Membre de l'Institut, Professeur honoraire au Muséum National d'Histoire Naturelle.  
P. FLEURY, Professeur honoraire à la Faculté de Pharmacie de Paris.  
M. FONTAINE, Membre de l'Institut, Professeur au Muséum National d'Histoire Naturelle.  
R. HEIM, Membre de l'Institut, Directeur du Muséum National d'Histoire Naturelle.

- A. KIRRMANN, Professeur à la Faculty des Sciences de Paris, Directeur-adjoint de l'École Normale Supérieure.
- R. LATARJET, Directeur de l'Institut du Radium.
- E. LEDERER, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris.
- A. LWOFF, F.R.S., Professeur à la Faculty des Sciences de Paris, Chef de Service à l'Institut Pasteur.
- J. PARROD, Professeur à la Faculté des Sciences de Strasbourg.
- B. PULLMAN, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris.
- J. ROCHE, Professeur au Collège de France, Recteur de l'Université de Paris.
- M<sup>me</sup> A. DE ROTHSCHILD.
- Lord ROTHSCHILD, F.R.S., Professeur à l'Université de Cambridge.
- MM. L. SACHS, Trésorier honoraire.
- E. TERROINE, Professeur honoraire à la Faculté des Sciences de Strasbourg, Directeur du Centre de Recherches sur la nutrition au C.N.R.S.
- J. TREFOUEL, Membre de l'Institut, Directeur de l'Institut Pasteur.

## COMITÉ DE DIRECTION

MM. E. AUBEL, T. CAHN, G. CHAMPETIER, J. DUCLAUX, B. EPHRUSSI, A. DE GRAMONT, R. HEIM, E. LEDERER, FRANCIS PERRIN, B. PULLMAN, J. TREFOUEL, R. WURMSER.

## SERVICE DE CHIMIE MACROMOLECULAIRE

Rapport de M<sup>me</sup> A. DOBRY-DUCLAUX, Chef de Laboratoire.

Les sujets traités au laboratoire se divisent en deux groupes :

- a) Problème de chimie physique des polyélectrolytes et de chimie colloïdale en général;
- b) Constitution chimique des centres actifs des enzymes.

M<sup>me</sup> A. Dobry-Duclaux a poursuivi ses recherches sur la nature chimique des centres actifs des enzymes. Les premiers résultats ont été décrits dans le rapport de l'année 1960. Un des résultats récents était que les mêmes substrats fixent sur la même fonction chimique du centre actif de divers enzymes. Mais les transformations qu'ils subissent dépendent d'autres parties de l'enzyme. Puisque chaque enzyme les modifie à sa manière. Sans doute, les parties les plus voisines du groupe de fixation ont-elles le rôle prépondérant. Nous le verrions si nous disposions d'une série d'enzymes dont le site actif ne diffère que par un seul détail. Mais nous en sommes très loin et il faut attaquer le problème d'une autre manière. L'emploi des hauts-polymères de synthèse comme modèle des centres actifs des enzymes ouvre une voie possible. En effet, nous pouvons varier leur composition de manière presque continue par une co-polymérisation. Mais un très petit nombre de ces co-polymères sont disponibles et la synthèse des autres présente des difficultés considérables qui ne sont pas encore résolues. Malgré l'appui de laboratoires industriels, dont la bonne volonté a été souvent précieuse, il n'est pas sûr que le résultat pourra être atteint avec l'effort souhaitable.

En attendant, l'ensemble des résultats déjà acquis dans l'étude de la nature chimique des sites actifs a été exposé par M<sup>me</sup> A. Dobry-Duclaux dans une conférence devant la section de Biophysique de la Société de Chimie physique, le 22 novembre 1961.

M<sup>me</sup> Orley a étudié la perméabilité, pour divers cations, des membranes protéo-lipidiques formées par un complexe de l'acide linoléique et de la gélatine. Ces membranes, préparées dans certaines conditions, semblaient être des modèles de quelques membranes biologiques qui laissent passer l'ion potassium et non l'ion sodium. Mais une étude approfondie a montré que cette analogie n'est que superficielle et que la membrane artificielle n'agit sélectivement qu'au long temps que des réactions d'échange d'ions ( $K^+$  contre  $Na^+$ ) se produisent dans son sein. Cette étude a donc été abandonnée.

M. J. Duclaux et M<sup>me</sup> Ch. Cohn ont poursuivi leurs études sur la physico-

chimie des polyélectrolytes. Le but de ce travail a été exposé dans le rapport de 1960. En résumé, il est nécessaire de débarrasser cette science des nombreuses erreurs qu'y ont introduit deux générations de physico-chimistes, plus préoccupés de théories que d'expériences.

Si une membrane sépare deux liquides, des échanges se font par diffusion et aboutissent à un équilibre final. La nature de cet équilibre diffère selon que les substances dissoutes dans les liquides peuvent ou ne peuvent pas traverser la membrane. Dans le second cas, qui est celui des milieux biologiques, on dit qu'il existe un *équilibre de membrane*, ou de Donnan.

Nous avons montré, par une voie très simple, que cette doctrine classique reposait sur une conception inexacte des phénomènes, et que tout ce qui avait été écrit sur le sujet ne faisait qu'obscurcir le problème. Il n'y a pas d'équilibre de membrane. L'équilibre est intérieur à la solution macromoléculaire et la membrane agit comme un tamis inerte, arrêtant les grosses particules et laissant passer les petites, sans modifier leur concentration.

Les *hémicolloïdes minéraux* sont une nouvelle classe de composés chimiques, curieusement analogues par leurs propriétés physico-chimiques aux polyélectrolytes organiques. Bien que leur état colloïdal soit indiscutable, ils ne possèdent aucune des propriétés que les théories classiques considèrent comme inséparables de cet état. Ils sont par exemple solubles en toute proportion dans l'eau et ne peuvent être floculés par aucun électrolyte, quelle que soit la valence de ses ions. L'analogie avec les polyélectrolytes organiques (protéines par exemple) suggère des possibilités de synthèse en faveur de la chimie biologique, actuellement peut-être trop limitée par ses propres problèmes.

---

### LISTE DES PUBLICATIONS

- A. DOBRY-DUCLAUX. « Les macromolécules de synthèse et enzymochimie ». *Die makromolek. Chem.*, 1961, 44, 155.
- A. DOBRY-DUCLAUX. « Sur la détermination des sites actifs de certaines enzymes au moyen d'un nouveau réactif spécifique, le sel de Roussin ». III. *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 54, 76. *Id.* IV. « Fixation de divers substrats sur le chlorhydrate de polyvinylamine et sur la polyacrylylhistamine ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 54, 84\*
- J. DUCLAUX et Ch. COHN. « Constitution des solutions colloïdales : IV. Micelle, liquide intermicellaire et équilibre de Donnan ». *J. de Chimie Physique*, 1961, 58, 690.
- J. DUCLAUX et Ch. COHN. « Hémicolloïdes minéraux ». III. *Bull. Soc. Chim.*, 1961, p. 1217.
- J. DUCLAUX. « Constitution macromoléculaire des colloïdes minéraux ». *Die makromolek. Chem.*, 1961, 44, 147.
-

*COMPOSITION DU SERVICE*

**M<sup>me</sup> A. DOBRY-DUCLAUX**, Maitre de Recherches au C.N.R.S.

**M. JACQUES DUCLAUX**.

**M<sup>m</sup> ch. COHN**, Chargé de Recherches au C.N.R.S.

**M<sup>lle</sup> N. DAUMAS**, Collaborates technique au C.N.R.S.

Deux travailleurs étrangers ont fait un stage au laboratoire :

**M<sup>me</sup> C. ORLEY**, de Janvier à juillet 1961.

**M<sup>me</sup> A. ULINSKA**, Professeur à l'Université de Torun (Pologne) : octobre-novembre 1961.

## SERVICE DE BIOPHYSIQUE

Rapport de M. RENÉ WURMSER, Chef de Service.

### I. — *PROTÉINES DES SÉRUMS HUMAINS*

Les recherches sur les isohémagglutinines humaines qui ont été exposées dans les rapports précédents sont entrées dans une nouvelle phase. Sous leur aspect génétique, elles sont poursuivies surtout dans des centres de transfusion disposant du matériel biologique nécessaire. Nos résultats y sont utilisés comme moyen de caractériser par des données thermodynamiques, soit des antigènes, soit des anticorps rares ou anormaux. Nous poursuivons toutefois l'étude physico-chimique de l'isohémagglutination : d'une part la purification et l'isolement des isoagglutinines, d'autre part le mécanisme de la combinaison antigène-anticorps.

Depuis 1949, une ultracentrifugeuse analytique fonctionne dans le Service de Biophysique. Elle a constitué le premier élément de ce qui est devenu la Station Centrale d'Ultracentrifugation du C.N.R.S. De très nombreuses mesures de coefficients de sédimentation — de l'ordre de plusieurs centaines par an — ont été effectuées pour les chercheurs qui en faisaient la demande. L'acquisition d'une deuxième machine a permis à M<sup>me</sup> Filitti-Wurmser d'organiser la détermination systématique des poids moléculaires et celle des faibles différences de densité.

M<sup>me</sup> Filitti-Wurmser a continué d'autre part le travail entrepris en collaboration avec L. Hartmann sur les macroglobulines du sérum. Utilisant un nombre considérable de diagrammes d'ultracentrifugation d'électrophorèse sur support et d'immunoélectrophorèse ainsi que des informations précises sur les troubles pathologiques accompagnant les anomalies observées, il a été possible de développer le travail de classification des macroglobulines dont quelques résultats seulement avaient été publiés jusqu'ici.

En marge de ces études sur les protéines du sérum, un travail a été entrepris sur des enzymes présents dans les hématies. On sait que l'activité lactico-deshydrogénase de ces cellules subit d'importantes variations dans certains cas pathologiques. La question est de savoir si les variations sont quantitatives ou qualitatives, et pour cela de déterminer les divers paramètres qui interviennent dans la cinétique de ces enzymes. M. Szylił a étudié tout d'abord les lactico-deshydrogénases des hématies normales. Avec M<sup>me</sup> Jacquot, il a obtenu, par électrophorèse continue sur rideau, sept fractions de mobilités différentes. Le problème se trouve ainsi posé d'une manière assez intéressante, puisque, en principe, la cinétique de chacune de ces fractions une fois connue, un grand nombre de paramètres pourront être comparés entre eux.

## II. — ENZYMOLOGIE

A. Les recherches menées depuis quelques années, sous la direction de M<sup>me</sup> Labeyrie, sur les lacticodeshydrogénases de la levure concernent le problème des relations entre la structure et la fonction d'un enzyme d'une part, les caractères génétiques et physiologiques des cellules qui ont synthétisé cet enzyme d'autre part; aussi sont-elles menées en collaboration avec le laboratoire de Génétique Physiologique du C.N.R.S.

On sait que le changement des conditions de culture d'une levure, en aérobie ou anaérobie, provoquent une modification de la nature des enzymes synthétisés. En ce qui concerne les lactico-deshydrogénases, une culture anaérobie donne un enzyme spécifique du D-lactate, réduisant le ferricyanure et non le cytochrome C, tandis qu'une culture aérobie donne plusieurs enzymes différents : une D-lacticodeshydrogénase réduisant seulement le cytochrome C et, principalement, une L-lacticodeshydrogénase qui peut réduire le ferricyanure et aussi le cytochrome C ; cette dernière est connue depuis longtemps.

Jusqu'à maintenant les recherches sur ces enzymes ont été développées ici dans deux voies : a) étude détaillée du site actif de la D-lacticodeshydrogénase de la levure anaérobie afin d'obtenir des informations sur le mécanisme de la catalyse par cet enzyme; b) étude de la L-lacticodeshydrogénase de la levure aérobie afin de voir s'il est possible de mettre en évidence des interactions entre deux groupes prosthétiques (un hème, une flavine) et de saisir le mécanisme de transfert des électrons.

a) *Site actif de la D-lacticodeshydrogénase de la levure anaérobie* : On a montré que l'activité de cet enzyme est liée à la présence de deux groupes prosthétiques dissociables, un métal : le zinc, une flavine : FAD. Le rôle des flavines dans les o-enzymes paraît assez évident comme intermédiaire dans le transfert des électrons entre le substrat fixé et l'accepteur. Le rôle du métal, par contre, reste à élucider. Dans ce but, M<sup>lle</sup> Curdel a étudié la possibilité de faire des analogues de l'enzyme naturel, contenant, au lieu du zinc, les cations Mn, Co, ou Ni. Les deux premiers, cobalt-enzyme et manganèse-enzyme, ont effectivement une activité catalytique, mais la vitesse de transfert des électrons  $k$  l'accepteur est petite que celle correspondant au zinc-enzyme naturel. Le mécanisme exact du transfert total n'étant pas connu, il n'est pas encore possible de savoir si le métal intervient entre substrat et flavine ou entre flavine et accepteur. Toutefois certains arguments développés ci-dessous font penser que le métal intervient entre le substrat et la flavine.

Le rôle du zinc sur l'enzyme a pu être éclairci par un travail de M. Iwatsubo relatif à l'influence du pH sur la constante de stabilité du complexe enzyme-zinc. Il semble que ce métal soit fixé simultanément sur deux sites du métal à l'état basique. Dans cet état, le zinc aurait encore deux valences, des sites non saturés. Quant à la fixation du substrat lui-même, des précédentes données par une étude de M<sup>me</sup> Labeyrie et M<sup>lle</sup> Naslin sur la formation des constantes de stabilité des complexes formes entre l'enzyme et le substrat lui-même et une série d'analogues structuraux d'autre

part. Par exemple, les résultats concernant la fixation d'une série d'acides gras mono ou Q-dicarboxyliques à chaîne droite, de longueur variable, ont montré clairement que la participation éventuelle d'une attraction ionique entre l'ion carboxylate du substrat et un groupe positif de l'enzyme est négligeable. La grande stabilité des complexes de l'enzyme avec le lactate et l'oxalate ( $K = 10^{-6}$  M) est due vraisemblablement à la formation d'un chélat sur l'atome de zinc par deux valences de coordination.

Il est malheureusement impossible dans les conditions actuelles d'étudier directement le mode de transfert des électrons et éventuellement des hydrogènes, du substrat à la flavine puis à l'accepteur; il s'agit de réactions extrêmement rapides intervenant au milieu d'une suite de réactions complexes : fixation et dissociation réversible du substrat, oxydé et réduit et, éventuellement, de l'accepteur. Par une méthode indirecte, il a cependant été possible de mettre en évidence une interaction entre la fixation sur l'enzyme d'une part du lactate, d'autre part de la quinacrine. Ceci suggère que le substrat est fixé sur l'enzyme à proximité de la flavine. Il ne serait donc pas nécessaire d'envisager un transfert des électrons par la chaîne protéique elle-même comme l'avait suggéré Szent-Gyorgyi\*

*b) Interactions des groupes prosthétiques de la L-lacticoxydéshydrogénase de la levure aérobique :* M. Baudras est parvenu à séparer le groupe prosthétique flavinique et à réactiver l'apoenzyme spécifiquement par FMN. Les recherches dans ce sens, faites par plusieurs autres groupes de chercheurs & Tétranger, avaient conduit à un échec. L'enzyme sans flavine, qui contient encore Thème, reste réductible par addition du substrat, mais devient incapable de réduire les accepteurs, cytochrome C ou ferricyanure.

Ce premier résultat montre que le transfert ne se fait pas de Thème à l'accepteur comme cela avait été suggéré, mais de la flavine à l'accepteur.

B. Les travaux effectués par le groupe que dirige M<sup>lle</sup> Yon ont porté sur les points suivants :

1. *Action du cuivre sur l'activité de la trypsine.* — Ce travail, dont une partie a été faite avec la collaboration de M<sup>me</sup> Aubel-Sadron, M. Bidallier et M<sup>lle</sup> Fiszler, a montré que, suivant la nature du substrat, la présence d'ions cuivre entraîne tantôt une inhibition, tantôt une activation de l'hydrolyse. L'effet est lié à la présence d'un résidu arginine ou lysine du substrat puisque la trypsine attaque spécifiquement les liaisons peptidiques dont le carboxyle appartient à l'un de ces acides aminés. D'après l'étude entreprise par M<sup>lle</sup> Yon, la présence de cuivre active la rupture de la liaison dont le carboxyle appartient à la lysine et inhibe celle de la liaison dont le carboxyle appartient à l'arginine, de sorte que le cuivre restreint la spécificité de la trypsine.

2. *Hydrolyse par la trypsine de deux types de lactoglobulines.* — Les lactoglobulines A et B ne diffèrent que par deux acides aminés. M<sup>lle</sup> Monnot a trouvé que la trypsine a la même affinité pour les deux molécules mais que la constante de vitesse de décomposition du complexe intermédiaire est 3, 5 fois plus grande pour la lactoglobuline A que pour la lactoglobuline B. Il semble que cet effet soit une conséquence de la différence de charge existant entre les deux substrats.

3. *Activité peroxydasique du complexe hémoglobine-haptoglobine.* — En coll.\*

bor, ation avec M. Moretti, M<sup>lle</sup> Yon a entrepris une étude cinétique de cette acti-  
 Jtj sur Thydroperoxyde d'éthyle et Teau oxygénée, en présence d'un donneur  
 - electrons, le gaiacol. Us ont constaté que Thaptoglobine agit comme un acti-  
 vateur et non comme un protecteur. Un excès de gaiacol entraîne une inhibition  
 co nipetitive, Un schéma a été proposé pour la partie initiale de la réaction et les  
 co nstantes cinétiques ont été déterminées pour les deux substrats.

### III. — ASSOCIATION DES GLOBINES A L'HEME

p<sub>h</sub>, M. Banerjee a été conduit par son travail antérieur sur la dénaturation de  
 D<sub>h</sub>ernoglobine à tenter de mesurer Ténergie d'association de la globine à Thème  
 Desirant utiliser le fait que les métalporphyrines réagissent avec certaines bases  
 azo tees en formant des complexes colorés dont les bandes d'absorption sont  
 c aracteristiques, M. Banerjee a étudié la conjugaison de la mésohémine avec  
 un dipeptide, Thistidylhistidine, contenant deux groupements imidazole.

Les résultats conduisent à admettre que Téquilibre s'établit comme si le ligant  
 s<sub>o</sub>ntenait un groupe complexant unique (pK'» 6, 7 à 25° C). L'autre groupe a  
 ?J flet\* gKgeable. D'autre part Tehergie libre, Tenthalpie et Tentropie de Tasso-  
 c<sub>o</sub>atlo<sub>n</sub> de la mésohémine avec Thistidylhistidine et aussi avec le pilocarpinate  
 ont été mesurés à 2<sup>o</sup> et 25<sup>o</sup> C. Il apparait que la présence dans le dipeptide d'uii  
 gro<sub>u</sub>pe analogue augmente Taffinité du groupe imidazole.  
 en ce . trava<sup>Λ</sup> con<sup>n</sup>stitue la premiere étape de la détermination des constantes  
 . ergetiques de Tassociation de Thème aux globines de Thémoglobine et de  
 la ^yoglobine.

### iv. — ETUDE DES MOLECULES DE LACTOGLOBULINE

J Mu<sup>e</sup> Guinand et M. Georges ont poursuivi en collaboration Tétude thermo-  
 ynamiq<sub>ue</sub> de la dissociation de la S-lactoglobuline pour des valeurs de pH  
 8U<sup>8</sup>Perieures à 5.

La mo<sup>Λ</sup>cu<sup>Λ</sup>e de lactoglobuline, L, se coupe en deux sous-unités, 1, de même  
 - k<sup>s</sup> moléculaire; le poids moléculaire « moyen en poids », Mw, déterminé  
 par d<sub>u</sub>fusion de la lumière et par ultracentrifugation, varie en fonction de la  
 t<sub>en</sub> obt<sup>Λ</sup>erat<sup>U</sup>re> du p<sup>Λ</sup>» de \*a concentra<sup>n</sup> et de la force ionique. Les résultats,  
 (j<sup>u</sup> e<sup>Λ</sup> s Par les deux méthodes sont tout à fait comparables. La réversibilité  
 P<sup>Λ</sup>enomène de coupure, aussi bien en fonction du pH que de la température,

Permet d'écrire  $L \rightleftharpoons 1 + 1$ , avec  $K_{\text{diss}} = \frac{(1)^2}{(L)}$ ; cet équiUbre est atteint trts  
 rapidement.

A f<sub>o</sub>rCe i<sub>o</sub>ni<sub>q</sub>ue |A = 0,1, la détermination des constantes d'équilibre pour  
 des u<sup>Λ</sup> COMpris entre 5 et 8<sup>Λ</sup>8 (\* 20<sup>o</sup> et \* p<sup>H</sup> 8<sup>Λ</sup>8, K = 2<sub>-10</sub>11,4) a p<sup>Λ</sup>ermis de calcul<sub>er</sub>  
 culer la variation de Ténergie libre standard de dissociation AF<sub>0</sub>. On peut con-  
 sidé<sup>r</sup>Cr la valeur de AF<sub>0</sub> obtenue Si partir des résultats expérimentaux comme  
 la so<sup>Λ</sup>mr<sup>Λ</sup>le algébrique d'une énergie libre de dissociation AF<sub>d</sub> et d'une variation  
 d<sup>n</sup>er<sup>Λ</sup>e 'ibre électrostatique, AF<sub>e</sub>, due à la charge nette de la molécule que Ton  
 peut calculer en supposant ces molécules compactes. On constate ainsi que les  
 vale<sup>u</sup>rs de AF<sub>d</sub> sont constantes en fonction du pH, ce qui permet d'affirmer que

la dissociation de la molécule résulte principalement d'une répulsion électrostatique entre les deux sous-unités.

Pour une forte force ionique,  $|L| > 0,1$ , on observe un phénomène plus complexe, de nature différente suivant la valeur du pH. Pour les valeurs élevées du pfl K diminue lorsque la force ionique augmente : à pH 8,8,  $f_i = 1$ ,  $K = i.c_r^4$ . Ce résultat peut s'expliquer par la diminution des répulsions par suite de la présence du sel et suggère que les deux sous-unités sont liées entre elles essentiellement par des forces de Van der Waals.

Parallèlement à ce travail, M. Pantaloni a étudié les différentes modifications de structure de la molécule de lactoglobuline d'après sa dispersion rotatoire. En fonction du pH et de la température, l'étude de la dispersion rotatoire entre pH 5,25 et pH 9 met en évidence l'existence de deux formes de molécules en équilibre; le passage d'une forme à l'autre est provoqué par l'ionisation d'un groupe G de la protéine de  $pK_{a,b} = 7,25$ , dont les constantes thermodynamiques à  $20^{\circ}$  sont:  $\Delta H = 5.200 \text{ cal./mol.}$ ,  $\Delta F = 12.000 \text{ cal./mol.}$  et  $\Delta S = 8 \text{ cal./mol./}^{\circ}$ .

En rapprochant ces résultats de ceux qui ont été obtenus par M<sup>lle</sup> Guinanó et M. Georges, on est conduit à penser qu'il existe un groupe G par demi-molécule et que les demi-molécules se transforment indépendamment l'une de l'autre. La présence de chlorure de sodium à forte concentration ( $M = 1$ ) protège la molécule contre l'influence du pH et cette action est d'autant plus marquée que le pH est élevé : le chlorure de sodium à cette concentration agit soit en abaissant le pouvoir rotatoire spécifique de la forme stable en milieu alcalin, soit en diminuant la concentration des molécules de protéine susceptibles de se transformer. Cette dernière hypothèse, rapprochée des résultats obtenus par les mesures de diffusion de la lumière, amène à penser que, seules, les demi-molécules sont capables de se transformer.

L'action des métaux lourds sur la lactoglobuline en solution a été également étudiée par polarimétrie, potentiométrie, et spectrophotométrie. Deux principaux sites de fixation du cuivre sont étudiés : le premier, mis en évidence par polarimétrie, met en jeu le groupe imidazole (constante d'association de l'ordre de  $10^{+8}$ ); le deuxième mis en évidence par spectrophotométrie ultraviolette et polarimétrie, fait intervenir les groupes sulfhydryle ( $K > 10^{+10}$ ) et donne une transformation lente et irréversible de la protéine. Le mercure, l'argent et le perchloro-mercuro-benzoate produisent la même transformation.

*Action du chlorure de sodium sur la vitesse de dénaturation de la lactoglobuline*  
— La dénaturation a été étudiée par M<sup>Ue</sup> Yon en collaboration avec M<sup>lle</sup> Dupont à pH 6,9 par une méthode basée sur l'insolubilité de la protéine dénaturée à point isoélectrique. Pour des concentrations en chlorure de sodium inférieures à 0,5 M, l'ordre de la réaction est 2. L'énergie libre d'activation de la dénaturation diminue et la vitesse de la réaction augmente proportionnellement à la concentration en sel jusqu'à 0,13 M. Au-delà, l'énergie d'activation augmente et la variation de la vitesse n'est plus linéaire.

Il semble qu'aux faibles concentrations on assiste à un accroissement des interactions électrostatiques entre les molécules de la lactoglobuline et que, pour les concentrations en chlorure de sodium supérieures à 0,13, on ait un renforcement des liaisons hydrogène intramoléculaires.

## V. — PHOTOSYNTHESE

Les recherches sur la photosynthèse exposées dans le rapport de 1959 sont pour et M<sup>SUIVIE</sup>S SOUS la direction de M<sup>></sup> Pierre Joliot<sup>></sup> par M<sup>M\*</sup> Delosme<sup>></sup> Chabaud en fonction de la longueur d'onde de la lumière par la méthode ampérométrique de dosage de l'oxygène de Joliot.

Se fondant sur le fait que, en faible lumière, la vitesse d'émission de l'oxygène et le rendement de fluorescence varient de manière strictement opposée, M. Pierre Joliot développe l'étude de la cinétique de fluorescence comme source d'informations sur la réaction photochimique.

## LISTE DES PUBLICATIONS

- J. YON. « Action des métaux sur les enzymes protéolytiques ». *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1960, 42, 1263.
- J. MONTI et I. YON. « Étude cinétique de l'activité peroxydasique du complexe hémoglobine-haptoglobine ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 46, 545.
- A. CURDEL et F. LABEYRIE. « D-lactico-deshydrogénase from anaerobic yeast : Combination of apoenzyme with Zn and Co and comparison of reconstituted enzymes ». *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 1961, 4, 175.
- D. PANTALONI. « Étude de la modification réversible de la structure de la (J-lactoglobuline B) à des pH supérieurs à 5,25 au moyen de la dispersion rotatoire ». *C. R. Acad. Sci.* 1961, 252, 2459.
- P. JOLIOT. « Cinétique d'induction de la photosynthèse chez *Chlorella pyrenoidosa*. Étude des phases transitoires de la photosynthèse consécutives à une variation de l'éclairage ». *J. Chim. Phys.*, 1961, 570.
- P. JOLIOT ; Cinétique d'induction de la photosynthèse chez *Chlorella pyrenoidosa*. Étude de l'émission d'oxygène et fluorescence pendant la phase initiale d'illumination. *Chim. Phys.* 1961, 584.
- E. STACHIEWICZ et F. LABEYRIE, A. CURDEL et P. SLONIMSKI. « D-lactico-deshydrogénase de la levure anaérobie. Étude de l'inactivation irréversible par un chélateur ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 50, 45.
- A. HASSON et J. YON. « Contribution à la fixation du curare sur un récepteur extrait de la levure anaérobie. Étude de l'activation électrique de *Electrophorus electricus*. » *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 50, 89.
- D. DUBOIS et A. LABEYRIE. « Influence du ClNa sur la vitesse de thermodénaturation de la (3-lactoglobuline) bovine à pH 6,9 ». *J. Chim. Phys.*, 1961, 682.
- P. LABEYRIE et S. STACHIEWICZ. « D-lactico-deshydrogénase de la levure anaérobie. Étude de la protection vis-à-vis d'un chélateur par les substrats et inhibiteurs ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 52, 136.

*COMPOSITION DU SERVICE*

M. RENÉ WURMSER, Professeur Honoraire à la Faculté des Sciences.  
M<sup>me</sup> S. FILITTI-WURMSER, Maître de Recherches au C.N.R.S.  
M. J. TONNELAT, Professeur à la Faculté des Sciences.  
M<sup>me</sup> Y. JACQUOT-ARMAND, Chargée de Recherches au C.N.R.S.  
M<sup>lle</sup> S. GUINAND, Maître de Recherches au C.N.R.S.  
M<sup>me</sup> F. LABEYRIE, Maître de Recherches au C.N.R.S.  
M<sup>lle</sup> J. YON, Maître de Recherches au C.N.R.S.  
M. P. JOLIOT, Chargé de Recherches au C.N.R.S.  
M. R. BANERJEE, Chargé de Recherches au C.N.R.S.  
M. C. GEORGES, Assistant à la Faculté des Sciences.  
M. J. BIDALLIER, Chef de Travaux à la Faculté des Sciences.  
M. R. DELOSME, Attaché de Recherches au C.N.R.S.  
M<sup>lle</sup> M. DUPONT, Attachée de Recherches au C.N.R.S.  
M<sup>Ue</sup> A. CURDEL, Attachée de Recherches au C.N.R.S.  
M. M. SZYLIT, Attaché de Recherches au C.N.R.S.  
M. M. IWATSUBO, Professeur à l'Université d'Osaka (Japon).  
M. A. BAUDRAS, Attaché de Recherches au C.N.R.S.  
M<sup>lle</sup>\* M. MONNOT, Attachée de Recherches au C.N.R.S.  
M. R. CHABAUD, Assistant à la Faculté des Sciences.  
M. P. MORIN, Attaché de Recherches au C.N.R.S.  
M. D. PANTALONI, Attaché de Recherches au C.N.R.S.  
M<sup>lle</sup> L. NASLIN, Collaboratrice technique au C.N.R.S.  
M<sup>Ue</sup> D. WAECKERLE, Secrétaire au C.N.R.S.  
M. L. SAGAERT, Ingénieur-physicien au C.N.R.S.  
M<sup>H</sup> C. GALLE, Ingénieur, Collaborateur technique au C.N.R.S.  
M<sup>me</sup> J. ZALTA, Collaboratrice technique au C.N.R.S.  
M<sup>Ue</sup> C. BOURGEOIS, Collaboratrice technique au C.N.R.S.  
M<sup>me</sup> M. DELOSME, Collaboratrice technique au C.N.R.S.  
M<sup>Ue</sup> J. BOTTAGISIO, Collaboratrice technique au C.N.R.S.  
M. A. SPYRIDAKIS, Collaborateur technique (D.G.R.S.T.).

## SERVICE DE BIOCHIMIE THEORIQUE

Rapport de M. BERNARD PULLMAN, Chef de Service.

### I. — STRUCTURE ET ROLE BIOCHIMIQUE DES POLYENES CONJUGUES

A. et B. Pullman ont établi une thiorie expliquant la présence de l'isomère *n-cis* du rétinène dans la rhodopsine. Cette présence constituait jusqu'ici une énigme. En effet, parmi les différents isomères *cis-trans* possibles du rétinène, l'isomère *n-cis* est le siège des plus importants empêchements stériques. Cette constatation a conduit Pauling, il y a un certain nombre d'années, à affirmer que l'isomère *n-cis* est improbable. Or, des différents isomères possibles du rétinène, c'est justement l'isomère *n-cis* qui est associé à la rhodopsine dans les pigments visuels. La thiorie élaborée par A. et B. Pullman a comme point de départ la position que la présence d'un isomère du rétinène dans la rhodopsine doit occuper. Elle ne porte pas sur la stabilité de cet isomère mais de sa facilité de formation. Pour démontrer leur thèse, les auteurs ont en premier lieu établi une méthode générale nouvelle pour réévaluation des énergies d'activation pour l'isomérisation *trans-cis* des polyènes conjugués. La méthode générale des procédés faisant appel aux énergies de localisation des complexes activés. Appliquée au cas particulier du rétinène, elle indique qu'effectivement l'isomère *n-cis*, bien que stériquement défavorable, figure néanmoins parmi ceux qui doivent se former le plus facilement. Des indications expérimentales ont été trouvées qui confirment cette prédiction. Comme, d'autre part, il est évident qu'une fois formé, cet isomère peut être trappé et stabilisé par des interactions avec la prothéine, la présence dans la rhodopsine est dans ces conditions tout à fait naturelle. Une vérification doit donc être faite nettement, et ceci certainement dans d'autres cas de polyènes conjugués aussi, entre la stabilité des intermédiaires réactionnels et la facilité de leur formation.

### II. — ASPECTS ELECTRONIQUES DU MECANISME DES REACTIONS ENZYMATIQUES

#### A. — COENZYMES D'OXYDO-REDUCTION.

Une thiorie de B. et A. Pullman présentée dans le Rapport de 1959 a montré que le fonctionnement des coenzymes d'oxydo-réduction pouvait être expliqué

en termes des énergies des orbitales moléculaires impliquées dans le transfert des électrons (plus haute orbitale occupée de la forme réduite et plus basse orbitale libre de la forme oxydée). Un problème non résolu était posé par la relation entre ces énergies des orbitales moléculaires et les potentiels d'oxydo-réduction des coenzymes. Le problème a été étudié par M<sup>me</sup> A. Pullman. Le point de départ des travaux de M<sup>me</sup> A. Pullman dans ce domaine a été l'observation que les potentiels d'oxydo-réduction des systèmes réversibles sont fonction de la variation de l'énergie de résonance associée à l'oxydo-réduction. Par conséquent, toute relation entre les énergies des orbitales moléculaires individuelles et les potentiels d'oxydo-réduction doit passer par l'intermédiaire d'une relation entre ces énergies et la variation précitée de l'énergie de résonance. Utilisant la méthode des perturbations, M<sup>me</sup> A. Pullman a montré que différents cas étaient possibles dans ce domaine. Dans le cas des quinones, des relations internes lient l'énergie de résonance  $k$  la fois  $k$  l'énergie de la plus basse orbitale libre de la quinone et  $h$  l'énergie de la plus haute orbitale occupée de l'hydroquinone. Par conséquent, une dépendance stricte existe entre les énergies de ces deux orbitales et le potentiel d'oxydo-réduction. En revanche, dans les coenzymes d'oxydo-réduction, l'absence de toute relation interne de ce genre exclut l'existence d'une relation directe entre les énergies des orbitales et le potentiel d'oxydo-réduction. Toutefois, M<sup>me</sup> A. Pullman a pu, en revanche, établir pour ces coenzymes différentes corrélations spécifiques permettant une compréhension approfondie des réactions qu'ils catalysent. Ainsi, elle a montré l'existence d'une relation entre le potentiel d'oxydo-réduction et : 1) l'énergie de polarisation nucléophile du carbone 4 du DPN et de ses analogues ; et 2) la somme des charges électroniques des azotes 1 et 10 de la riboflavine. Les positions mises en jeu sont celles sur lesquelles a lieu la réduction enzymatique et ces résultats mettent ainsi en évidence l'interrelation entre les caractéristiques énergétiques et électroniques des oxydo-réductions enzymatiques.

#### B. — ANTIMETABOLITES DE L'ACIDE FOLIQUE.

Poursuivant les recherches sur le mécanisme de fonctionnement des coenzymes de l'acide folique, M<sup>lle</sup> A. M. Perault et B. Pullman ont mis en évidence des corrélations entre des caractéristiques de la structure électronique et l'activité biochimique des antimétabolites de l'acide folique. L'étude a porté, en particulier, sur les antimétabolites actifs en chimiothérapie anticancéreuse. Ces antimétabolites agissent en empêchant la transformation de la vitamine en coenzyme\*. Us sont caractérisés par une grande affinité pour les réductases à coenzyme DPN et TPN et par leur propre résistance à la réduction. Les auteurs ont montré que les antimétabolites étaient le plus probablement liés à l'enzyme par leur groupe 2-aminé et l'azote N<sub>x</sub>. Us ont également montré que la charge électronique du groupe 2-aminé des antimétabolites et la basicité de leur azote N<sub>x</sub> étaient supérieurs aux indices analogues des substrats naturels. De plus, ils ont montré que la réductibilité des cations des antimétabolites par des ions hydrides devrait être inférieure à la réductibilité des substrats naturels.

## C. — XANTHINE OXYDASE ET XANTHINE DÉHYDROGÉNASE.

M<sup>lles</sup> A. M. Pérault et C. Valdemoro et B. Pullman ont effectué une étude du mécanisme de roxydation des purines par la xanthine oxydase. Bien que, dans une étude détaillée, plusieurs cas soient à distinguer et bien que le mécanisme implique au moins deux phases distinctes (une hydratation suivie d'une déshydrogénation), l'oxydation a lieu, d'une manière tout à fait générale, sur le carbone possédant la plus faible énergie de polarisation nucléophile. L'attaque des ions négatifs sur le centre oxydable apparaît donc comme l'étape primordiale de la réaction.

## In. — SEMICONDUCTIVITE DES MACROMOLÉCULES BIOCHIMIQUES

## A. — LES PROTEINES.

Le problème de la semiconductivité des protéines est un sujet de controverses depuis de nombreuses années. La signification des résultats expérimentaux de semiconductivité avec une énergie d'activation de l'ordre de 2 eV n'est pas claire tout. Est-ce une semiconductivité électronique, est-elle intrinsèque ou extrinsèque? Autant de questions non résolues. Ce problème a été soumis à une étude théorique par M<sup>me</sup> Suard, G. Berthier et Oilman, qui ont essayé de calculer la position des bandes d'énergie éventuelles susceptibles d'apparaître dans les protéines par suite d'une délocalisation électronique à travers les liaisons hydrogènes. Le calcul qui nécessite l'emploi d'une méthode très perfectionnée a été long et pénible. La méthode utilisée était la méthode du champ moléculaire self-consistent dans l'approximation de Pariser et Parr.

Les résultats indiquent l'existence probable, dans les protéines, de quatre bandes d'énergie dont trois sont entièrement pleines et la quatrième complètement vide. L'énergie de transition pour le passage d'un électron de la plus basse bande pleine à la bande libre excède légèrement 5 eV. Ce résultat paraît pas correspondre à la semiconductivité observée expérimentalement n'est probablement due à la présence des impuretés procurant des niveaux électroniques complémentaires dans la plus haute bande occupée et la bande libre. Les auteurs ont toutefois conclu que les calculs théoriques doivent encore être perfectionnés avant qu'une conclusion définitive puisse être tirée. Récemment, M<sup>me</sup> Suard a perfectionné les calculs par l'introduction de l'interaction de configurations. L'influence de ce perfectionnement sur les résultats antérieurs a été négligeable. Actuellement cette recherche est poursuivie en essayant d'introduire explicitement dans le calcul la participation des orbitales 2p de l'hydrogène. Un résultat intéressant obtenu dans ce travail est la prédiction que le potentiel d'ionisation des protéines doit être sensiblement (1 eV) plus faible et leur électroaffinité sensiblement plus grande que ne sont ces indices dans une liaison pepti-

dique isolée. Cet état de choses peut être significatif pour le pouvoir catalytique des protéines.

#### B. — M<sup>^</sup>LANINE.

En revanche, des calculs analogues effectués par A. et B. Pullman pour des mélanines indiquent que ce type de composés devrait sans aucun doute constituer un excellent exemple de semiconducteur biologique. Ces composés sont caractérisés par des nombreuses bandes d'énergie et la séparation énergétique entre la plus haute bande occupée et la plus basse bande libre doit être très faible (0,2 eV).

Un très curieux résultat a été obtenu, & savoir que la plus basse bande libre de mélanines s'étend jusqu'au domaine liant du spectre d'énergie.

#### C. — STRUCTURE SUB-MOLÉCULAIRE DES ACIDES NUCLÉIQUES.

Les résultats obtenus antérieurement par A. et B. Pullman sur la structure électronique des bases puriques et pyrimidiques (voir rapport 1960) ont conduit à un ensemble de renseignements susceptibles d'applications dans des domaines nombreux et différents. L'importance du sujet nous a incité à entreprendre pour ce groupe de molécules des calculs plus perfectionnés basés sur la méthode du champ moléculaire self-consistant. C'est un travail de longue haleine, nécessitant la mise en oeuvre de moyens techniques très puissants (nous avons été amené à louer une machine à calcul électronique de dimensions moyennes, une IBM 1620) et comportant des recherches de programmation.

Les résultats préliminaires ont été obtenus par A. Veillard et B. Pullman qui ont utilisé l'approximation de Pariser et Parr de la méthode du champ self-consistant.

Les résultats sont extrêmement encourageants en ce sens qu'ils confirment dans les grandes lignes, la justesse des résultats antérieurs obtenus par la méthode des orbitales moléculaires dans l'approximation L.C.A.O. classique. En particulier, il apparaît que l'ordre de grandeur des charges nettes obtenues par la méthode du champ self-consistant est le même que celui donné par la méthode L.C.A.O. De même, l'ordre relatif des pouvoirs donneur et accepteur d'électrons des bases est sensiblement le même dans les deux méthodes. Des divergences de détail apparaissent néanmoins entre les deux méthodes <V peuvent avoir de l'importance. Le problème est étudié actuellement en détail<sup>9</sup>

Dans le même domaine de recherches, A. Veillard, G. Berthier et B. Pullman ont évalué les valeurs des anisotropies diamagnétiques des squelettes biochimiques<sup>5</sup> conjugués essentiels et en particulier des purines et des pyrimidines. Des recherches expérimentales sont actuellement en cours pour vérifier les prédictions de la théorie, surtout la valeur relativement élevée de l'anisotropie de l'induction de Padénine.

Les calculs précités ont servi de point de départ à A. Veillard et B. Pullman<sup>1</sup> pour des recherches sur l'interprétation des spectres de résonance nucléaire magnétique des hétérocycles biochimiques conjugués et, surtout, des purines<sup>8</sup>

et Pyrimidines. Les auteurs ont mis en évidence l'existence d'une relation linéaire entre la charge électronique des carbones de ces hétérocycles et la quantité  $T^{\text{exp}} + \frac{H}{H_0}$  où  $T$  est le déplacement chimique des protons fixés sur ces carbones,  $H_0$  le champ appliqué et  $H$  le champ secondaire induit  $k$  le placement du Proton.

Dans un domaine de recherches apparenté, M<sup>me</sup> Baudet, G. Berthier et B. Pullman ont entrepris une évaluation systématique de la répartition des densités de spin dans les hétérocycles biochimiques conjugués et, en particulier, dans les bases puriques et pyrimidiques des acides nucléiques. Cette évaluation est maintenant terminée dans ses grandes lignes, doit servir de base pour l'interprétation des spectres de résonance électronique paramagnétique de ces composés.

Enfin, dans le même domaine encore, M. Charbonnière doit procéder à une étude détaillée des moments dipolaires des hétérocycles biochimiques. Les recherches techniques préliminaires paraissent terminées et la détermination du moment dipolaire de quelques composés représentatifs (triméthylxanthine, adénosine, uracil) ont donné des résultats en excellent accord avec les prédictions théoriques.

#### IV. — DIVERS

Mlle C. Valdemoro a effectué une étude très complète de la structure électronique d'une série de N-oxydes aromatiques d'intérêt biochimique, comportant certains composés cancérigènes ou actifs en chimiothérapie anticancéreuse.

M. Charbonnière a continué ses recherches sur le rôle de Peau dans l'organisation des chaînes macromoléculaires de Tamidon et sur les processus à l'origine du rassissement du pain.

Par ailleurs, un certain nombre de travaux de chimie théorique pure ont également été poursuivis pendant cette année. Ces travaux de caractère essentiellement technique, et dont, par conséquent, on ne présentera pas ici les détails essentiels pour but l'amélioration de méthodes de calcul de la structure électronique des molécules et l'établissement des méthodes de programmation pour la calculer électroniques. Ces travaux sont poursuivis, sous l'égide de M. Berthier et M<sup>me</sup> Pullman, par M<sup>mes</sup> Baudet, Berthod et Suard,

#### LISTE DES PUBLICATIONS

- B. PULLMAN. « Quelques aspects de la relation entre la structure moléculaire et les spectres ultra-violetts ». *Chimica Acta*, 1961, 15, 4.
- A. M. PERAULT, B. PULLMAN et C. VALDEMORO. « Electronic aspects of the reactions of Pyridoxal phosphate enzymes ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 46, 555.
- B. PULLMAN et C. SPANJAARD. « Electronic aspects of the mechanism of thiamine catalyzed reactions ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 46, 576.

- A. PULLMAN et B. PULLMAN. « The *cis-trans* isomerization of conjugated polyenes and the occurrence of a hindered *m*-isomer of retinene in the rhodopsin system ». *Proc Nat. Acad. Sciences U.S.*, 1961, 47, 7.
- B. PULLMAN et A. PULLMAN. « Submolecular structure of the nucleic acids ». *Nature*\* 1961, **189**, 725.
- B. PULLMAN et A. PULLMAN. « Aspects de la structure électronique des acides nucléiques » *J. de Chimie Physique*, 1961, p. 904.
- A. PULLMAN. « Sur une relation entre le potentiel d'oxydo-réduction des quinones et les énergies des orbitales moléculaires mises en jeu dans le transport d'électrons » *C. R. Acad. Sci.*, 1961, 253, 1210.
- M. SUARD, G. BERTHIER et B. PULLMAN. « Sur les états électroniques des protéines » *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 52, 254.
- A. M. PERAULT et B. PULLMAN. « Structure électronique et mode d'action des anti-metabolites de l'acide folique ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 52, 266.
- P. J. ELVING et B. PULLMAN. « Mechanisms of organic electrode reactions ». *Adv. Chem. Phys.*, 1960, III, 1.
- A. M. PERAULT, C. VALDEMORO et B. PULLMAN. « Electronic aspects of the mechanism of action of xanthine oxidase ». *J. Theoret. Biol.*, 1961, 2, 180.
- A. VEILLARD, B. PULLMAN, et G. BERTHIER. « Recherches théoriques sur l'anisotropie diamagnétique des molécules conjuguées d'intérêt biologique ». *C. R. Acad. Sci.* 1961, 252, 2321.
- A. VEILLARD et B. PULLMAN. « Calcul par la méthode du champ moléculaire self-consistant de la structure électronique des bases puriques et pyrimidiques fondamentales » *C. R. Acad. Sci.*, 1961, 253, 2277.
- A. VEILLARD et B. PULLMAN. « Sur le déplacement chimique des raies de résonance magnétique nucléaire des protons des hétérocycles aromatiques d'intérêt biochimique ». *C. R. Acad. Sci.*, 1961, 253, 2418.
- H. BERTHOD. « Sur les calculs de certaines intégrales d'échange ». *J. de Chimie Physique* 1961, 58, 719.
- C. VALDEMORO. « Structure électronique et propriétés physicochimiques des N-oxydes aromatiques ». *C. R. Acad. Sci.*, 1961, 253, 277.
- A. GUILBOT, R. CHARBONNIÈRE et R. DRAPTON. « Sur la contribution de Teau à l'organisation des chaînes macromoléculaires de Tamidon ». *Die Starke*, 1961, 13, 204\*
- B. PULLMAN. « Aspects structuraux des effets des radiations sur les substances d'intérêt biologique ». Colloque International, Bruxelles, 1961, sous presse.
- A. PULLMAN et B. PULLMAN. « The band structure of melanine ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 54, 384.
- A. PULLMAN. « On the possibilities of correlating the redox potential of reversible systems to the molecular orbitals involved in the electron transfer. » *J. Theoret. Biol.*, sous presse.
- A. PULLMAN. « Relations entre le potentiel d'oxydo-réduction des systèmes réversibles et les indices caractéristiques de leur structure électronique ». *Tetrahedron*, sous presse.
- A. PULLMAN et B. PULLMAN. « From Quantum Chemistry to Quantum Biochemistry » dans « Horizons in Biochemistry », A. Szent-Gyorgyi dedicatory volume, 6<sup>e</sup> éd. p<sup>er</sup> B. Pullman et M. Kasha, Academic Press, New-York, sous presse.
- A. M. PERAULT. « Some electronic aspects of the mechanism of action of clostridial xanthine deshydrogenase ». *J. Theoret. Biol.*, sous presse.

- G. BERTHIER. « Emploi des méthodes matricielles pour le calcul de la structure électronique des grandes molécules conjuguées ». *Tetrahedron*, sous presse.
- M. SUARD. « Sur les états électroniques des protéines. Introduction de l'interaction des configurations ». *Biochim. Biophys. Acta*, sous presse.
- J. BAUDET, G. BERTHIER et B. PULLMAN. « Recherches théoriques sur la répartition des densités de spin dans les molécules d'intérêt biochimique ». *C. R. Acad. Sci.*, sous presse.
- H. BERTHOD. « Contribution à l'étude de la structure électronique de l'éthylène et de ses homologues supérieurs ». Thèse de Doctorat ès-Sciences, soutenue à la Sorbonne en avril 1961.
- A. M. PERAULT. « Contribution à l'étude des aspects électroniques du mécanisme de fonctionnement de quelques réactions enzymatiques fondamentales ». Thèse de Doctorat ès-Sciences soutenue à la Sorbonne en octobre 1961.
- A. SUREAU. « Contribution à l'étude de la structure électronique des atomes ionisés sur la couche K. Application à l'atome d'aluminium ». Thèse de 3<sup>e</sup> cycle, soutenue à la Sorbonne.

---

*COMPOSITION DU SERVICE*

- M. B. PULLMAN, Professeur à la Faculté des Sciences.  
 M<sup>me</sup> A. PULLMAN, Maître de Recherches au C.N.R.S.  
 M. G. BERTHIER, Maître de Recherches au C.N.R.S.  
 Mme L. SERRE, Professeur à l'École Normale Supérieure de Jeunes Filles de Sèvres.  
 M. R. CHARBONNIÈRE, Chargé de Recherches au C.N.R.S.  
 Mme H. BERTHOD, Chargée de Recherches au C.N.R.S.  
 M<sup>lle</sup> A.-M. PERAULT, Chargée de Recherches au C.N.R.S.  
 M<sup>me</sup> J. BAUDET, Assistante à la Faculté des Sciences.  
 Mme M. SUARD, Agrégée-Préparatrice à l'École Normale Supérieure de Jeunes Filles de Sèvres.  
 M. A. VEILLARD, Attaché-Agrégé au C.N.R.S.  
 M<sup>lle</sup> C. SPANJAARD, Agrégée de l'Université.  
 M<sup>lle</sup> C. VALDEMORO, Chercheur étranger (Espagne).  
 M. V. KUTZELNIGG, Boursier de TOTAN (Allemagne).  
 M. S. DINER, Attaché de Recherches au C.N.R.S.  
 M. A. SUREAU, Boursier du 3<sup>e</sup> Cycle.  
 M<sup>lle</sup> A. CLEMENT, Boursière du 3<sup>e</sup> Cycle.  
 M<sup>me</sup> C. MOREAU, Boursière du 3<sup>e</sup> Cycle.  
 M. R. ASTIC, Collaborateur Technique au C.N.R.S.  
 M<sup>me</sup> L.-M. PILLARD, Aide-Technique de T.E.N.L.A.  
 M<sup>me</sup> M. LANDEZ, Secrétaire.

## SERVICE DE BIOCHIMIE A

Rapport de M<sup>m</sup>e Y. KHOUVINE, Chargde de Service.

Mes collaborateurs étudient, comme les années précédentes, le métabolism<sup>^</sup> des nucléoprotéides, ce qui les conduit souvent k réétude de la synthèse des protéines, et ceux de M. le Professeur Rosenberg poursuivent leurs recherche<sup>^</sup> sur la biochimie cellulaire, en particulier, la biochimie de la cellule cancéreuse\*

En fait, nous cherchons tous à mieux connaitre certains aspects de la bio<sup>\*</sup>chimie cellulaire des tissus normaux, néoplasiques ou en voie de cancérisation, pour déceler des différences de composition et d'activités enzymatiques ou des différences dans le mécanisme de Fapparition et de la disparition des systèm<sup>^</sup> enzymatiques.

### I. — BIOCHIMIE DES NUCLÉOPROTÉIDES

A. — Après avoir injecté <sup>32</sup>P k des rats normaux, MM. D. Szafarz <sup>^</sup> C. E. Sripati ont étudié la composition et le métabolisme des particules qu<sup>^</sup> sortent des noyaux, au cours de l'incubation.

Us ont constaté que ces particules sont riches en ADN, moins riches en ARN et riches également en protéines. Les mesures éle radioactivité (l'ADN ne se marquant pratiquement pas) ont montré qu'il existe deux types d'ARN, l'un trfes actif, i taux de renouvellement rapide et se marquant dës le début de l'incubation, un autre, beaucoup moins actif. L'ARN actif, quittant le noyau pour aller dans le cytoplasme, a des propriétés qui rappellent celles de TARN chromosomique de Mirsky. II est possible qu'il transporte l'information sous le contrôle de TADN.

Poursuivant Tétude de la glycolyse cytoplasmique, en présence des noyaux du foie de rat normal et de Tépithélioma T 8 de Guérin, MM. Szafarz et Sripati ont observé que les phosphorylations oxydatives sont inhibées par les noyaux et que Tintensité des systèmes accepteurs augmente. A Taide de <sup>14</sup> C, ils ont mis en évidence le rôle que TATP joue dans ces réactions. Un équilibre dynamiq<sup>oe</sup> s'établit et la formation d'ADP est augmentée, probablement par Faction d'u<sup>^</sup> kinase.

B. — M. D. Szafarz et M<sup>m</sup>e S. Dugandzic ont continué Tétude du fractiofj' nement chimique du liquide surnageant cytoplasmique que donnent les centfj' fugations k 105.000 g des homogénats de foie normal, de l'épithélioma T 8 »<sup>e</sup> Guérin et de Thépatome ascitique. La distribution des fractions suivant le p<sup>^</sup>

dans \*es tissus cancéreux differe de celle des tissus normaux, surtout aux pH 5,5 et 5,0. Il y a environ deux fois plus de nucléoprotéides précipités h pH 5,5 et 5,0. Pour les tissus cancéreux que pour les tissus normaux et deux fois moins pour la fraction restant soluble k pH 4,5.

La répartition de TARN est également différente dans les sous-fractions des tissus. Il y a deux fois plus d'ARN k pH 5,0 dans les tissus cancéreux que dans les tissus normaux.

Comme on sait que les fractions qui précipitent Jt pH 5,5 et 5,0 jouent un rôle dans la synthèse des protéines, on peut penser que les teneurs plus élevées en protéines et en ARN sont liées à la multiplication rapide des cellules néoplasiques.

C. — M<sup>Ue</sup> L. Hirschbein a terminé non seulement les expériences, mais la fraction pour sa thèse de doctorat ès-Sciences sur les histones du placenta humain. Elle en a étudié la composition, les propriétés physico-chimiques et leur rôle dans le métabolisme nucléaire. Elle a montré que les histones du placenta sont hétérogènes, qu'elles sont formées par plusieurs constituants en équilibre, que cet équilibre est réversible et ne dépend que de la force ionique et des tampons. Elle a séparé les histones en deux grands groupes, classiques : les riches en arginine et riches en lysine, mais a également montré que chacun de ces groupes est complexe. Elle a pu séparer une fraction k pH 6,5 qui s'agrège facilement en histone qui ne précipite plus qu'à pH 9 et qui, vraisemblablement, peut servir de liaison entre les protéines non basiques du noyau et les histones, ou bien jouer un rôle dans le cytoplasme.

M<sup>Ue</sup> L. Hirschbein a étudié le métabolisme nucléaire, avec les noyaux du placenta et avec ceux du leptomélanoblaste T 8 de Guérin, lui a permis d'isoler, après incubation des noyaux ou des fragments de noyaux en présence de <sup>14</sup>C-aminoacides, une fraction radioactive soluble dans HCl 0,2 N, mais dialysable. Il ne semble pas que cette fraction radioactive dialysable soit un précurseur de Thistone puisque celle-ci est tout fait dépourvue de radioactivité. Il reste cependant possible que les conditions expérimentales ne soient pas très favorables à l'incorporation des acides aminés dans les histones ou k une synthèse de Thistone.

Le travail sur le placenta est fort intéressant, non seulement en soi, mais aussi parce que le placenta nous servira de tissu témoin pour les expériences que, dans le cadre de la collaboration de M. le Professeur Lacassagne, nous commençons sur les néoplasiques humains.

D. J. J. Zalta a soutenu sa thèse de Doctorat ès-Sciences sur l'incorporation *in vitro* des acides aminés dans les protéines des microsomes du foie de rat. J'ai déjà donné dans le rapport de 1960 les propriétés caractéristiques du système enzymatique que M. Zalta a trouvé chez les mammifères. Les propriétés de ce système présentent des similitudes avec celles des polypeptides synthétisés à partir d'*Alcaligenes Faecalis* par M. Beljanski. En effet, il permet la synthèse de polypeptides en présence de l'ensemble des acides aminés et des nucléosides triphosphates, en particulier de la guanosine triphosphate (GTP). Permettrait d'expliquer le rôle du GTP dans l'incorporation classique au cours du transfert des acides aminés activés depuis l'ARN soluble aux protéines ribosomales.

## II. — METABOLISME CELLULAIRE

### A. — MÉTABOLISME BIOLOGIQUE DE L'IRRADIATION.

Dans un travail poursuivi en collaboration avec M. Lacassagne, M. A. J. Rosenberg a trouvé que l'irradiation du foie retarde la cancérisation provoquée par le diméthylaminoazobenzène (DAB). Ce résultat indique que, contrairement à ce qu'on a pensé jusqu'ici, l'irradiation provoque dans le foie une modification, qui peut être mise en évidence par un second facteur traumatisant, dans leur cas le DAB. Pour essayer d'élucider le mécanisme de l'effet retardataire du rayonnement sur la cancérisation, M. Rosenberg a entrepris, avec M<sup>lle</sup> A. Ruet, des recherches dans plusieurs directions :

#### 1. — Etude du métabolisme des acides ribo- et desoxyribonucléiques (ARN et ADN) :

- a) sur le foie normal,
- b) sur le foie irradié à 1500 r et 3000 r,
- c) sur le foie de rat nourri au DAB,
- d) sur le foie de rat irradié et nourri au DAB.

#### 2. — Analyse des éléments de l'ARN (rapport purines/pyrimidines) :

Le rapport ARN/ADN est, pour le foie normal, 2,5 — 3,2. Ce rapport ne varie pas avec l'irradiation.

Le DAB, agissant seul, diminue le rapport 1,5 — 2,1 et ceci s'explique surtout par la diminution de l'ARN.

L'action conjuguée du DAB et de l'irradiation réaugmente la valeur de rapport, qui, cependant, n'atteint pas la valeur normale.

Le rapport bases puriques/bases pyrimidiques ne change pas avec l'irradiation (0,9 — 1,1).

Avec le DAB seul, le rapport augmente (environ 1,6); on observe une diminution de l'uracile de 30 % environ, et une légère augmentation de l'adénine.

Ce rapport diminue à nouveau, mais sans atteindre sa valeur normale si l'action du DAB on combine l'irradiation ; le taux d'uracile ne varie pas par rapport à celui obtenu lorsque le DAB est employé seul, mais l'adénine augmente.

### B. — TENEUR EN FLAVINES HYDROSOLUBLES DES DIFFÉRENTES FRACTIONS CELLULAIRES AU COURS DE LA CANCÉRISATION PAR LE DAB.

Dans le cadre du métabolisme des enzymes flaviniques cataboliques M. A. J. Rosenberg et M<sup>me</sup> R. Emanoil-Ravicovitch se sont attachés spécialement à l'étude de l'activité de la xanthine oxydase de détoxication du 2-4 diméthylaminoazobenzène (DAB) dans le foie de rat normal, dans le foie de rat nourri au DAB, dans le foie de rat normal irradié partiellement avec différentes doses de rayons X (entre 200-3000 r) ainsi que dans le foie de rat nourri au DAB après avoir été préalablement irradié.

Dans le cas du foie normal, la détoxication suit la cinétique d'une réaction

de premier ordre. Si le milieu n'est pas renforcé en coenzyme flavinique (CoE), l'activité enzymatique est de 90. En présence de CoE, l'activité enzymatique est de 90. Donc il y a un très faible changement au FAD ajouté.

Dans le cas du foie de rat nourri au DAB, l'activité enzymatique change, s'approche d'une sigmoïde, caractéristique des réactions autocatalytiques. En ajoutant du FAD au bout de deux mois de régime la détotoxication est due à la forte diminution des flavines. On sait que Phydroxylase se trouve dans les microsomes, or cette fraction cellulaire est une des fractions les plus fortement touchées par la diminution flavinique. En renfortant le milieu en FAD, la détotoxication moyenne au bout de deux mois est de 23 %, ce qui dénote qu'au bout de ce temps, la diminution de CoE, s'ajoute à celle de PApoE.

Dans le cas de rat normal partiellement irradié, on constate que si on sacrifie tout de suite, dans les jours suivant l'irradiation (1 & 5 jours), la détotoxication d'environ 35 %. En ajoutant FAD, elle augmente de 11 % tout en restant inférieure à la normale. Ceci est dû au fait que l'irradiation détruit en partie FAD ainsi que PApoE, effet réversible, car ils sont resynthétisés par la suite.

Si on sacrifie 28 jours après l'irradiation, la détotoxication redevient que légèrement plus forte du côté irradié (5 %). On peut considérer donc que l'effet de l'irradiation est négligeable sur le foie de rat soumis à un régime équivalent.

Les résultats obtenus après irradiation à différentes doses (200 r, 1500 r et 3000 r) sont semblables, ce qui veut dire que la dose de rayons X, entre ces limites, n'intervient pas sur ce phénomène.

Que dans le cas de rats irradiés et nourris ensuite au régime à DAB, on constate que la réaction est toujours sigmoïde tandis que l'activité s'approche d'une exponentielle, le temps de latence au premier est primé. Si on sacrifie l'animal après trois semaines de nourriture on constate une grande différence de détotoxication entre le côté irradié et le second, la diminution par rapport à la normale ne dépasse pas 75 % pour le second. En ajoutant du CoE, la détotoxication tend à atteindre la même valeur des deux côtés du foie, tout en restant inférieure à la normale. Après deux mois de nourriture la diminution est de plus en plus marquée des deux côtés (81 % du

du côté non irradié) tout en restant supérieure du côté irradié. Si on ajoute du CoE, les valeurs tendent à s'égaliser des deux côtés, tout en restant inférieures à la normale (diminution de 70 %). On constate que la diminution de la détotoxication pendant les quatre premiers mois de régime est due surtout à une chute brutale du CoE, chute beaucoup plus importante que celle irradiée. L'effet des rayons sur le nucléotide flavinique est dû à la destruction d'un enzyme contribuant à l'hydrolyse de FAD par un enzyme inhibant sa synthèse. (Question non encore éclaircie.) Après la fin de la nourriture au DAB, la baisse en ApoE s'ajoute à celle en CoE, la détotoxication ne se fait plus d'aucun côté.

En résumé, on peut affirmer :

1) L'irradiation, quelle qu'en soit la dose (200-3000 r), n'affecte pas la réaction de détoxication de la cellule hépatique normale.

2) Par contre, dans le cas d'une cellule hépatique au début de la cancérisation (environ 2 mois), l'irradiation a une influence certaine sur la diminution de FAD, diminution qui se trouve freinée, d'où détoxication plus forte du côté irradié.

3) Lorsque la cancérisation est avancée (à partir de 4 mois au DAB), l'irradiation n'a plus aucun effet sur la détoxication, au manque de CoE venant s'ajouter celui d'ApoE.

Parallèlement à ce travail, M. A. J. Rosenberg et M<sup>me</sup> R. Emanoil-Ravicovitch font une étude comparative de la vitesse de formation de FAD à partir de FMN et de ATP, *in vivo* et *in vitro*, dans le foie de rat normal et dans le foie de rat nourri au DAB.

Us s'intéressent aussi, en collaboration avec M<sup>lle</sup> Hérisson et M. Endo, à l'influence de l'hormone thyroïdienne et de l'hydrocortisone sur divers aspects du métabolisme de la cellule hépatique normale, ascitique et cancéreuse.

#### C. — REPARTITION DE LA CATALASE DANS LA CELLULE HÉPATIQUE DU RAT.

M. Rosenberg et M<sup>me</sup> Fourcade ont étudié la répartition de la catalase dans la cellule hépatique du rat normal. À cet effet, ils ont mis au point une méthode de dosage quantitatif de la catalase du foie entier et des différentes fractions cellulaires. Les résultats obtenus indiquent :

1) une teneur globale du foie constante lorsqu'on la rapporte au mg de poids frais et excédant de loin les quantités nécessaires à son action catalasique. Ainsi se pose une fois de plus la question d'une autre fonction, encore inconnue, de l'enzyme.

2) une accumulation notable de la catalase dans les mitochondries moyennes, par rapport aux grandes mitochondries sédimentant avec les noyaux dont on les sépare ultérieurement.

Par ailleurs, M. Rosenberg et M<sup>me</sup> Fourcade se sont attachés au phénomène de la diffusion intracellulaire de la catalase dans les milieux cytoplasmique et mitochondrial. L'accumulation de la catalase dans les mitochondries moyennes est encore plus évidente et sa distribution entre mitochondries et cytoplasme soluble s'effectue suivant un coefficient de partage qui se maintient constant pour chaque type de mitochondries dans le foie normal. Ils se proposent d'appliquer cette étude au foie de rat au cours de la cancérisation par le DAB.

M. Rosenberg et M<sup>me</sup> Fourcade ont déterminé la teneur en eau des mitochondries dont le degré d'hydratation a été jusqu'à présent évalué par la méthode optique du « swelling » et a conduit à des résultats irréguliers. En combinant les techniques de dilution isotopique et de dessiccation, ils ont mis au point une autre méthode : en ajoutant une quantité connue d'adénosine diphosphate marquée en <sup>14</sup>C, et en mesurant sa répartition entre les mitochondries (pénétration et adsorption) et le milieu extramitochondrial et en calculant l'eau totale par dessiccation, ils ont déterminé le pourcentage d'eau intramitochondriale.

apport aux mitochondries fraîches. L'intégrité biologique des mitochondries a été vérifiée par des mesures de phosphorylations oxydatives avec la collaboration de A. Ruet. Il semble que l'aptitude à maintenir un gradient de concentration intérieure-extérieure est également une caractéristique des mitochondries en bon état. Par ailleurs, la pénétration de l'adénosine di-phosphate dans les mitochondries a été mise en évidence.

#### D. — LOCALISATION ET REPARTITION DES ENZYMES.

Par des méthodes très spécifiques, on peut doser un grand nombre d'enzymes dans un homogénat. En faisant varier la tonicité du milieu et le broyage mécanique, on arrive à une extraction fractionnée des enzymes localisés dans des parties différentes de la cellule (Professeur Bucher et Docteur Pette). M. Rosenb'erg a utilisé cette méthode, avec le Dr. Klingenberg, pour établir l'origine de l'adénosine triphosphatase du rat, les méthodes histologiques n'étant pas capables de le faire; La méthode enzymologique semble indiquer que l'hépatome ascitique est d'origine parenchymateuse. On y trouve en effet le cytochrome b<sub>6</sub> qui n'a été décelé dans le cytoplasme au niveau du parenchyme. A une note précédente signalant les enzymes faisant défaut ou du moins étant fortement diminués dans l'hépatome ascitique, on peut ajouter la glycérophosphate deshydrogenase et la Urose-6-phosphatase.

En analysant les organes instantanément, *in-situ* dans l'air liquide, on peut doser également les substrats, les intermédiaires fugaces par les enzymes spécifiques. M. Rosenb'erg a appliqué cette méthode avec le Dr. Hochorst, à l'étude de l'action de la chlorpromazine. Il a trouvé que son action ressemble à celle des glucocorticoïdes, mais en diffère par une forte augmentation du rapport  
Malate  
Oxaloacétate.

#### LISTE DES PUBLICATIONS

##### I. P -

- ZALTA. « Contribution à l'étude de l'incorporation des acides aminés dans les microsomes du foie de rat ». Thèse de doctorat Sciences, soutenue à la Sorbonne le 7 juin 1960.
- ZALTA et M. BELJANSKI. « Synthèse de peptides par des fractions subcellulaires préparées à partir du foie de Rat ». C. R. Acad. Sci., 1961, 253, 567.
- J. HIRSCHBEIN. « Propriétés de sous-fractions obtenues par fractionnement isoelectrique de la fraction cytoplasmique soluble de tissus normaux et cancéreux ». Thèse de doctorat Sciences, soutenue à la Sorbonne le 21 mars 1962.
- S. SRIPATI, S. SZAFARZ et Y. KHOUVINE. « Libération, au cours d'incubations *in vitro*, de particules nucléoprotéiques de noyaux isolés de foie de rat et d'adénocarcinome T 8 de Guérin ». C. R. Acad. Sci., 1961, sous presse.
- D. SZAFARZ et S. DUGANDZIC. « Propriétés des sous-fractions obtenues par fractionnement isoelectrique de la fraction cytoplasmique soluble de tissus normaux et cancéreux ». Bull. Soc. Chim. Mb., sous presse.

- A. FOURCADE et A. J. ROSENBERG. « Quelques données quantitatives nouvelles sur la répartition de la catalase dans la cellule hépatique du Rat ». *Bull. Soc. Chim. bioU* sous presse.
- R. EMANOIL-RAVICOVITCH et A. J. ROSENBERG. « Teneur en flavines hydrosolubles des différentes fractions cellulaires, au cours de la canclrisation par le p-diméthylaminoazobenzène (DAB). *Bull. Soc. Chim. biol.*, sous presse.
- G. DUCET et A. J. ROSENBERG. « Leaf respiration ». *Ann. rev, Plant Physiol.*, sous presse.
- A. J. ROSENBERG. « Biochimie de la cellule cancéreuse ». « Diminution des processus cataboliques dans la cellule neoplasique ». Conférences faites à la Faculté des Sciences de Tunis (Tunisie), de Rabat (Maroc) et à la Faculté de Médecine de l'Université de Marburg (Allemagne).

---

## COMPOSITION DU SERVICE

### I. — Biochimie des nucléoprotéïdes.

- M<sup>mc</sup> Y. KHOUVINE, Directeur de Recherches au C.N.R.S., Directeur du Laboratoire de Biochimie des nucléoprotéïdes à l'École Pratique des Hautes Études.
- M. D. SZAFARZ, Chargé de Recherches au C.N.R.S.
- M. R. SUTRA, Chargé de Recherches au C.N.R.S.
- M. J.-P. ZALTA, Chargé de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>lle</sup> L. HIRSCHBEIN, Attachée de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>lle</sup> R. ROZENCWAJG, Attachée de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>lle</sup> L. KLYSZEJKO, D<sup>r</sup> en Médecine, D\* 4s-Sciences, en mission auprès du C.N.R.S.
- C. E. SRIPATI, Assistant à l'Institut du cancer de Madras, Boursier des Relations culturelles.
- L. BENAROCHE, Boursier de la Ligue nationale française contre le Cancer.
- M<sup>llc</sup> C. KLINGELSMITH, Licenciée (Diplôme d'Études Supérieures).
- M<sup>Ue</sup> J. COMBE, Licenciée (Diplôme d'Études Supérieures).
- M. J.-C. PRAGER, Collaborateur technique au C.N.R.S.
- MU<sup>c</sup> M. MONGIN, Collaborateur technique au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> M.-C. GAUTHIER, Collaborateur technique au C.N.R.S.

### II. — Métabolisme cellulaire.

- M. A. J. ROSENBERG, Professeur à la Faculté des Sciences de Poitiers, Directeur-adjoint à l'École Pratique des Hautes Études.
- M<sup>llc</sup> R. RAVICOVITCH, Attachée de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>llc</sup> A. FOURCADE, Attachée de Recherches au C.N.R.S.

- M<sup>lle</sup> M. SERVOUZE**, Assistante à la Faculty des Sciences de Poitiers.
- M<sup>lle</sup> C. RAMEIX**, Boursière de la Ligue Nationale française contre le Cancer.
- M<sup>lle</sup> C. HERISSON-CAVET**, Boursière de la Mission culturelle française au Maroc.
- M. O. ENDO**, D<sup>r</sup> en Médecine, Assistant à la Faculty de Médecine de Tokyo, Boursier de la Coopération technique.
- M. Y. PONROY**, Licencié es-Sciences.
- M<sup>lle</sup> A. RUET**, Collaborateur technique au C.N.R.S.

## SERVICE DE BIOCHIMIE B

Rapport de M<sup>me</sup> M. GRUNBERG-MANAGO, Chargée de Service.

### I. — STRUCTURE ET SYNTHÈSE ENZYMATIQUE DES RIBOPOLYNUCLÉOTIDES

#### A. — POLYNUCLEOTIDE PHOSPHORYLASE.

i. *Rôle in vivo*. — Dans le cadre des études effectuées pour élucider le rôle de la polynucléotide phosphorylase dans la cellule bactérienne, nous avons montré précédemment, avec M. D. H. Levin, qu'il existe une corrélation entre la synthèse de TARN par la cellule et l'activité de la polynucléotide phosphorylase. En effet, l'utilisation d'un mutant de *E. coli* requérant la tryptophane pour sa croissance (Trypt-), révèle qu'en absence apparente de synthèse protéique (présence de chloramphenicol) l'addition du tryptophane provoque une augmentation, chez les cellules, de l'activité spécifique de la polynucléotide phosphorylase ainsi que de la quantité d'ARN synthétisée. Les deux accroissements sont fonction de la concentration en tryptophane qui peut être remplacé par le 5-méthyltryptophane.

En collaboration avec M. M. N. Thang, avec l'aide de M<sup>lle</sup> J. Réveillot nous avons isolé la polynucléotide phosphorylase *h* partir des cellules incubées en présence de chloramphenicol avec et sans tryptophane.

L'activité de l'enzyme des cellules traitées par le chloramphenicol en présence de tryptophane est toujours plus élevée que celle des cellules traitées en absence de tryptophane et ceci, quel que soit le test utilisé pour mesurer l'activité de la polynucléotide phosphorylase (incorporation de rADP-<sup>14</sup>C dans l'acido-insoluble, phosphorylation de polynucléotides, ou "échange" orthophosphate <sup>32</sup>P avec le P terminal des diphosphates).

Plusieurs hypothèses, présence d'inhibiteurs ou d'activateurs libres, changement d'affinité de l'enzyme pour le substrat, activation de l'enzyme par l'ARN synthétisé en présence de chloramphenicol, ont été éliminées. Il semble plus probable qu'il s'agit d'une synthèse nette de polynucléotide phosphorylé malgré la présence de chloramphenicol, bien que la plupart des autres protéines ne soient pas synthétisées. En effet, nous avons pu montrer, en collaboration avec M. M. N. Thang et M. F. R. Williams, en fractionnant sur colonne DEA les extraits bruts de cellules incubées en présence de chloramphenicol et de tryptophane <sup>14</sup>C que le tryptophane s'incorpore préférentiellement dans certain

Protéines. La polynucléotide phosphorylase se trouve parmi les protéines dans lesquelles le tryptophane est incorporé le plus activement.

La question de savoir comment le méthyltryptophane peut remplacer le tryptophane est actuellement à l'étude.

2. *Mécanisme d'action.* - A l'heure actuelle on n'a que très peu de renseignements sur les mécanismes des réactions de polymérisation de la polynucléotide phosphorylase, aussi des études du mécanisme d'action des enzymes capables de synthétiser des molécules de hauts poids moléculaires présentées un intérêt particulier. L'importance de l'étude du rôle physiologique de ces enzymes - tout d'abord ils sont capables d'assembler des unités différentes, Les propriétés de la polynucléotide phosphorylase semblent être communes à toutes les espèces bactériennes, aussi des études comparatives ont été faites sur la polynucléotide phosphorylase isolée, soit à partir de *E. coli*, soit de *A. viscosus*, ou de *Cl. perfringens*.

a) *antique.* - En collaboration avec M<sup>lle</sup> J. Yon, Laboratoire de Biochimie Physico-chimique Faculté des Sciences Paris, M. P. Dauterive a continué le travail commencé par J. Massoulié sur le rôle des ions Mg<sup>2+</sup> dans la polymérisation. L'ensemble de ses résultats suggère que l'étape limitante pour la formation du trinucleotide à partir de l'ADP et d'un dinucleotide pré-existant implique la présence d'un Mg pour trois nucleotides.

b) *Spécificité.* - Divers analogues de bases diphosphorylées ont été préparés par M. A. M. Michelson du Laboratoire Guinness et testés comme substrats pour la polynucléotide phosphorylase de *Escherichia coli*. On savait que la polynucléotide phosphorylase de *E. coli* peut polymériser aussi bien l'ADP que le CDP, l'UDP, l'UDP et le GDP (sans parler de l'absence d'autres diphosphates). Par contre, il avait été rapporté que la polynucléotide phosphorylase ne pouvait polymériser la polyphosphate. L'enzyme peut cependant polymériser la polyphosphate. La configuration stérique que le donne Br de l'uracile. Plusieurs modifications ont été suggérées pour rendre compte de ces résultats. En collaboration avec M. A. M. Michelson et J. Dondon, nous avons examiné à nouveau si les dérivés halogénés de l'uracile ne pouvaient être polymérisés et nous avons montré que les trois analogues de l'uracile, BrUDP, ClUDP et IUDP polymérisent aussi bien que l'UDP lui-même. La dégradation chimique et enzymatique de ces polymères montre qu'ils sont constitués par des polyphosphoribose, comme les autres polymères de l'ARN. Les dérivés halogénés de l'uracile qui ont été testés et leur étude a été entreprise par M. J. Massoulié dans le laboratoire de J. Fresco (Princeton, USA).

L'intérêt de cette étude provient de ce que les dérivés halogénés de l'uracile sont mutagènes; elle peut donc permettre de mieux comprendre leur action biologique dans le cadre de la théorie de la mutagenèse de Freeze. Les autres analogues préparés par M. A. M. Michelson ont été testés. Il ressort de l'ensemble de cette étude qu'à l'exception du BrUDP, la polynucléotide phosphorylase ne peut polymériser que les analogues qui sont incorporés dans l'ARN *in vivo* chez les bactéries. Certains de ces analogues sont des inhibiteurs et ils le sont alors quel que soit le substrat diphosphate, ce qui est en accord avec

Phypothèse selon laquelle c'est le même enzyme qui agit sur les différents nucléotides. Cependant le GDP a un comportement spécial vis-à-vis des inhibiteurs.

Une polynucléotide phosphorylase a été isolée de *CL perfringens* par M. M. I. Dolin. À l'inverse des préparations de polynucléotide phosphorylase d'*E. coli* ou d'*A. vinelandii*, l'enzyme purifiée ne polymérise apparemment que PADP et est inactif avec PUDP et le CDP, alors que l'extrait brut de cet organisme est actif avec ces diphosphates. L'étude de cet enzyme est poursuivie par M. E. Knight dans mon laboratoire et par M. M. I. Dolin aux États-Unis.

c) *Influence des protéines basiques sur la polymérisation de VADP.* — L'enzyme polynucléotide phosphorylase extraite de *CL perfringens* présente une autre particularité. Cet enzyme n'exige apparemment pas d'amorceur oligonucléotide ou polynucléotide pour la polymérisation de PADP, mais une protéine basique comme la polylysine. L'action de la polylysine peut s'expliquer partiellement par l'abaissement de 30 fois du  $K_s$  pour PADP et l'augmentation du  $V_{iB}$ ; récemment M. M. I. Dolin a obtenu des préparations de *CL Perfringens* qui ont un besoin absolu de certaines protéines basiques pour la polymérisation. M. F. R. Williams et M<sup>U</sup> T. Godefroy ont montré que la polylysine abaissait également le  $K_m$  apparent pour la polymérisation de PADP par l'enzyme préparé à partir de *E. coli* ou *A. vinelandii*, mais seulement à des rapports ADP/ $\wedge$ 8 définis. Le rapport optimum ADP/Mg pour la polymérisation change d'ailleurs en présence de polylysine.

Le mécanisme par lequel les protéines basiques agissent sur la polymérisation de l'ADP est à l'étude.

d) *Synthèse de polymères.* — En collaboration avec M. J. Dondon et M<sup>m</sup> L. Dondon, de nombreux polymères contenant 2 ou 3 bases différentes en proportions variées ont été préparés à partir de mélanges de nucléosides diphosphates variés. L'influence du rapport des diphosphates sur leur composition en base a été étudiée. La proportion des bases dans le polymère ne reflète pas toujours le rapport des diphosphates dans le mélange servant à leur synthèse.

Ces polymères analysés, dont les constantes de sédimentation ont été déterminées au Centre d'Ultracentrifugation du C.N.R.S., servent pour des études physico-chimiques (Wilkins, King's College, Londres; Vorobiev, Institut de Cytologie, Faculté des Sciences, Leningrad; Sadron, Centre de Recherche Macromoléculaire, Strasbourg), des études chimiques (Kotchev, Institut de Chimie des Substances Naturelles, Moscou) et pour les études entreprises par le système de codage des protéines par les acides nucléiques (en collaboration avec le Dr. Crick de Cambridge et son équipe).

## B. — STRUCTURE DES ACIDES NUCLÉIQUES.

1. *ARN Accepteurs d'Amino-Acides (S-ARN).* — Nous avons montré précédemment que l'étude de la phosphorylation des acides ribonucléiques peut apporter des renseignements sur leur structure macromoléculaire. La phosphorylation des acides nucléiques est complètement ou fortement inhibée lorsque les ribopolynucléotides possèdent des structures ordonnées à double chaîne. Nous

avons montré, d'autre part, que tous les acides ribonucléiques accepteurs d'acides testés jusqu'à ce jour sont 70-80 % résistants à la phosphorolyse.

Deux hypothèses pouvaient être formulées pour rendre compte des faits observés : 1°) Les molécules de S-ARN comporteraient toutes à leur extrémité porteuse du groupe 3'hydroxyle libre une région sensible à l'action enzymatique, suivie d'une région résistante. La cause de cette résistance pourrait être, soit l'existence d'une structure secondaire en double hélice, soit la présence d'une base ou d'un nucléoside inhabituel susceptible d'inhiber l'enzyme. On sait que les S-ARN sont très riches en nucléosides inhabituels. 2°) Les préparations de S-ARN renfermeraient deux types de molécules, les unes complètement attachables, les autres complètement résistantes.

Nous avons montré (en collaboration avec M. R. Monier, Marseille) que dans le cas du S-ARN de la levure, c'est la deuxième hypothèse qui est vraie. C'est également le cas du S-ARN de lapin (Singer et Cantoni) et du S-ARN de *E. coli*, comme l'a montré le Dr. Bero de l'Université de Stanford, California lorsqu'il fut invité à l'Institut. La polynucléotide phosphorylase est même incapable d'enlever un seul nucléotide des chaînes résistantes à la phosphorolyse. Après enlèvement des trois nucléotides terminaux, pCpCpA dans le S-ARN, la résistance à la phosphorolyse n'est pas changée.

Après la phosphorolyse, le S-ARN conserve une activité réceptrice vis-à-vis de certains amino-acides.

D'autre part, l'analyse des bases de S-ARN de levure résistants et sensibles montre que l'équivalence entre les rapports molaires adénylique et uridylique, guanylique et cytidylique, observée dans le S-ARN total n'est pas retrouvée dans le S-ARN accepteurs d'acides résistants et sensibles à la polynucléotide phosphorylase.

Ce fait, rapproché des variations d'activité spécifique vis-à-vis de divers amino-acides après la phosphorolyse, suggère que les divers S-ARN spécifiques en l'absence d'offérer les uns des autres assez profondément par leur composition chimique. En collaboration avec M<sup>me</sup> M. L. Lesne ainsi que M. J. et M<sup>me</sup> L. Donlan nous avons étudié l'influence des différents facteurs connus pour modifier la structure secondaire des ARN, sur la phosphorolyse des S-ARN.

La résistance particulière des S-ARN à la phosphorolyse comparée à celle des ARN en général, semble résulter d'une stabilité plus grande de leur structure secondaire. La dénaturation. Le Mg paraît avoir un effet protecteur sur cette structure secondaire.

ARN Synthetise en presence de Chloramphenicol — Il a été montré par deux auteurs qu'un type particulier d'ARN très instable est formé en présence de chloramphenicol, cet ARN étant localisé dans un type de ribosomes particuliers. En collaboration avec M<sup>me</sup> S. Filitti-Wurmser et M. Sagaert du Centre de Recherches sur l'Effet du Chloramphenicol, nous avons repris avec M. Thang sur l'effet du chloramphenicol avec le mutant de *E. coli* (Trypt-) précédemment.

Avantage d'un tel mutant réside dans le fait qu'il y a possibilité de comparer la composition en ribosomes dans trois conditions différentes : cellules en croissance normale, cellules incubées en présence de chloramphenicol seul (sans synthèse de novo d'ARN), et enfin cellules incubées avec chloramphenicol

et tryptophane (synthèse d'ARN sans augmentation de quantité significative de protéines). Ceci permet de dissocier un effet propre au chloramphenicol sur la structure des constituants nucléoprotéiques normaux de la cellule, de son effet sur le processus de synthèse. Les résultats obtenus montrent que le chloramphenicol seul, à la concentration utilisée, n'a pas d'effet notable sur la répartition des constituants nucléoprotéiques de ce mutant. En effet, celle-ci est 1\* même aussi bien pour les cellules normales que pour celles incubées avec le chloramphenicol seul. Par contre, en présence de chloramphenicol et de tryptophane, condition où il y a synthèse *de novo* d'ARN, un nouveau composant 20 S apparaît. Néanmoins, ces particules 20 S ne constituent qu'un pourcentage très faible de l'ensemble des ribosomes et ne peuvent représenter la totalité des ARN synthétisés pendant le traitement au chloramphenicol qui est de 160-180 % de la teneur en ARN des cellules normales avant le traitement. D'autre part, l'incorporation de l'adénine  $^{14}\text{C}$  en présence de chloramphenicol montre que la radioactivité est incorporée dans les différentes particules nucléoprotéiques.

L'étude de la répartition de l'ARN synthétisé en présence de chloramphenicol est actuellement en cours.

#### C. — SYNTHÈSE DES ACIDES RIBONUCLÉIQUES CHEZ LES LEVURES.

Bien que les levures soient très riches en acide ribonucléique, aucun système de synthèse enzymatique *in vitro* de ces substances n'a pu jusqu'à présent être extrait. La connaissance de tels mécanismes est pourtant du plus haut intérêt chez des organismes qui se prêtent si bien à l'expérimentation tant biochimique et physiologique que génétique. C'est pourquoi M. J. Tavlitzi a continué, en collaboration avec M<sup>lles</sup> M. Cousin et B. Mégrot, l'étude de ce problème.

Les résultats qui sont décrits ici n'ont pu être obtenus qu'après une standardisation rigoureuse tant des conditions de culture et d'extraction que des procédés d'isolement, du fait que les systèmes sont instables et que leur activité synthétisante est faible. Cette activité est mesurée par la vitesse d'incorporation de précurseurs marqués au  $^{14}\text{C}$ , les acides adénosine diphosphorique (ADP) et triphosphorique (ATP) dans les polymères nucléotidiques acido-insolubles\*.

La méthode d'isolement utilisée permet de mettre en évidence au moins trois systèmes enzymatiques qui diffèrent tant par leur substrat que par leur localisation.

En effet, le surnageant d'une centrifugation d'une heure à  $100.000 \times g$  de\* extraits d'une levure « petite colonie » renferme :

a) un système qui catalyse l'incorporation de l'ADP et dont la purification par les méthodes habituelles est en cours. L'activité de ce système est inhibée par l'ion phosphate, mais n'est pas inhibée par l'ion pyrophosphate;

b) un système dont le substrat est l'ATP et dont l'activité est stimulée par l'acide ribonucléique soluble.

Le culot de cette même centrifugation contient un système qui catalyse l'incorporation de l'ATP et qui est de nature particulière; son activité n'est pas stimulée par l'acide ribonucléique soluble. Il est à noter que l'activité de ces trois systèmes requiert la présence de l'ion  $\text{Mn}^{++}$  et que le magnésium qui est

habituellement nécessaire pour les réactions de ce genre est id, soit dépourvu d'activité, soit inhibiteur.

C'est le système particulière qui a été confirmé par les fractions pratiquement dépourvues d'activité vis-a-vis de l'AM et dont l'incorporation de l'ATP est très fortement inhibée par la ribonucléase, lorsqu'elle est présente au cours de l'incorporation, soit qu'elle agisse sur l'AM, soit qu'elle détruise un amorceur nécessaire. La désoxynonucléase est également inhibitrice, mais l'inhibition n'est jamais totale.

Les résultats de ces expériences permettent de supposer l'intervention dans la réaction d'ADN et peut-être d'ARN spécifiques jouant le rôle de cofacteurs. Il est à noter à ce sujet que les particules isolées contiennent une forte proportion d'ARN ainsi que de l'ADN.

La question de savoir de quelle nature est le cofacteur de la réaction de la levure a été étudiée. Les premières expériences effectuées avec ces molécules incorporées ne sont pas simplement ajoutées aux mélanges : il s'agit d'une véritable synthèse d'acide polyadénylique, soit d'une synthèse

La solubilisation de ce système est actuellement tentée et son étude sera poursuivie en même temps que celle des autres systèmes mis en évidence. D'autre part, les techniques d'isolement sont maintenant en cours pour qu'il soit possible d'étudier du même point de vue d'autres systèmes certains qui seraient d'autres organismes, ne pourrions-nous pas faire une purification plus poussée. Il n'est pas interdit de penser qu'il existe des polyribonucléotides dont le mécanisme est différent de ceux auxquels il vient d'être question.

Les études entreprises sur le mécanisme de synthèse des acides nucléiques exigent des nucléosides diphosphatés marqués radioactifs et de nombreux analogues de bases, c'est-à-dire qu'une collaboration étroite avec des chimistes organiciens est indispensable. Nous sommes actuellement au point des techniques pour obtenir à grande échelle des dérivés nucléotidiques radioactifs d'une grande pureté.

Les études entreprises sur le mécanisme de synthèse des acides nucléiques exigent des nucléosides diphosphatés marqués radioactifs et de nombreux analogues de bases, c'est-à-dire qu'une collaboration étroite avec des chimistes organiciens est indispensable. Nous sommes actuellement au point des techniques pour obtenir à grande échelle des dérivés nucléotidiques radioactifs d'une grande pureté.

Les études entreprises sur le mécanisme de synthèse des acides nucléiques exigent des nucléosides diphosphatés marqués radioactifs et de nombreux analogues de bases, c'est-à-dire qu'une collaboration étroite avec des chimistes organiciens est indispensable. Nous sommes actuellement au point des techniques pour obtenir à grande échelle des dérivés nucléotidiques radioactifs d'une grande pureté.



Les études entreprises sur le mécanisme de synthèse des acides nucléiques exigent des nucléosides diphosphatés marqués radioactifs et de nombreux analogues de bases, c'est-à-dire qu'une collaboration étroite avec des chimistes organiciens est indispensable. Nous sommes actuellement au point des techniques pour obtenir à grande échelle des dérivés nucléotidiques radioactifs d'une grande pureté.

## II. - MÉTABOLISME INTERMÉDIAIRE

### A. - RÉACTION PHOSPHOROCLASTIQUE DU PYRUVATE.

Mme C. Delavier-Klutchko a réalisé certaines expériences complémentaires concernant l'étude de la réaction phosphoroclastique du pyruvate par *Cl. saccharo-butyricum*.

Elle a constaté que la biotine était non seulement un cofacteur indispensable à l'incorporation du  $^{14}\text{CO}_2$  dans le pyruvate (voir rapport de 1960), mais qu'elle intervenait également dans la dégradation du pyruvate. En effet, l'avidine — protéine qui complexe spécifiquement la biotine — inhibe la vitesse de réduction du néotétrazolium d'environ 50 % (test d'activité utilisé pour suivre la déshydrogénation du pyruvate). L'incubation préalable de la biotine et de l'avidine prévient cette inhibition. Il est probable que la biotine intervient dans la réaction globale au niveau de la décarboxylation du pyruvate et non au stade qui concerne le transport ultérieur de l'hydrogène.

La biotine n'a aucune action sur le système carencé en fer qui est dépourvu d'activité clastique et qui ne peut incorporer le  $^{14}\text{CO}_2$  dans le pyruvate (voir rapports précédents), car même en présence de biotine, ou de biotine et fer, le système carencé est inactif.

Il a été démontré (Rabinowitz, 1960) que les extraits de *CL saccharobutyricum* requièrent un dérivé de la vitamine B<sub>12</sub> pour échanger le  $^{14}\text{CO}_2$  avec le pyruvate. M<sup>me</sup> C. Delavier-Klutchko a recherché l'influence éventuelle de cette vitamine sur les préparations enzymatiques carencées. En effet, le fer intervient dans la synthèse de l'acide S-amino lévulique qui, lui-même, est un intermédiaire dans la formation de la vitamine B<sub>12</sub>; les extraits carencés pourraient donc en être dépourvus. Cependant il n'en est pas ainsi, car l'addition de vitamine B<sub>12</sub> au système carencé est sans effet.

Les résultats obtenus par M<sup>me</sup> C. Delavier-Klutchko au cours de ces dernières années ont apporté des éléments nouveaux concernant le mécanisme encore mal élucidé de la réaction phosphoroclastique du pyruvate, particulièrement 1) la participation de deux cofacteurs :

- le facteur « FCL », de nature ptéridique, qui intervient uniquement dans la réaction clastique;
- la biotine qui est impliquée dans la réaction globale.

2) la mise en évidence, après traitement thermique ou vieillissement du système enzymatique, de deux fractions dont la réunion est nécessaire pour qu'il y ait activité clastique. La fraction obtenue par le vieillissement de l'extrait est capable de réaliser, seule, l'échange entre le  $^{14}\text{CO}_2$  et le pyruvate.

Ces résultats doivent permettre de concevoir de nouvelles hypothèses de travail pour l'étude du mécanisme complexe de la réaction.

#### B. — MÉTABOLISME D'ACETOBACTER XYLINUM.

M. P. Prieur a poursuivi l'étude comparative du métabolisme de *Acetobacter xylinum* ayant poussé sur un milieu comprenant soit le glucose, soit le fructose\* comme unique source de carbone.

Il a montré que la phosphofructokinase, enzyme-clé de la voie d'Embden-Meyerhof est présente dans l'extrait des bactéries ayant crû sur glucose, mais n'existe pas dans l'extrait des « bactéries fructose ».

La recherche des différents enzymes intervenant dans la dégradation des hexoses a permis de dresser le tableau suivant qui, bien qu'incomplet, révèle déjà des différences notables entre les deux types de bactéries :

- sont présents dans les extraits des deux types de bactéries les enzymes vivants : *hexokinase* (phosphorylant fructose et glucose) — *phosphohexoisomerase* — *glucose-6-phosphate deshydrogenase* (spécifique du TPN dans les deux extraits) — *6-phosphogluconique deshydrogenase* (spécifique du TPN dans l'extrait glucose du DPN dans l'extrait fructose) — *gluconokinase*;
- sont absents dans les deux extraits : *pyruvate kinase* et *acétokinase*;
- n'existe que dans l'extrait fructose : *glycokinase*.

Les causes de ces différences (répression par exemple) sont en cours d'étude. Les investigations d'autres enzymes se poursuivent en vue de déterminer les étapes de dégradation des hexoses ainsi que les conditions qui président à l'emprunt de telle ou telle voie: cycle des pentoses, voie des acides uroniques et cycle de Embden-Meyerhof.

### C. — MECANISME DE LA RÉACTION ADRÉNERGIQUE.

Au cours de ses travaux sur les tissus animaux, M. F. Meyer s'est intéressé au mécanisme de la réaction adrénérquie. On sait que l'adrénaline participe à la formation de l'AMP 3,5 cyclique à partir de l'ATP sous l'influence de la cyclase. Mais en présence d'enzymes purifiés, ce nucléotide active la phosphorylase et conduit ainsi à une glycogénolyse que l'adrénaline peut provoquer sur la cellule intacte seulement.

La transformation de l'ATP en AMP cyclique semble comporter la formation de complexes transitoires qui précéderaient l'intervention de l'adrénaline. Ces complexes pourraient représenter les « sites réceptifs » dont l'existence a été supposée par les neurophysiologistes.

L'effort porté par M. F. Meyer à l'étude de la formation de ces complexes et à leur mise en évidence est la conséquence d'une série de travaux qui ont étudié le mécanisme d'action de certains inhibiteurs de la mono-amino-oxydase. Pour ces études il a utilisé l'iproniazide (i-iso-nicotinyl-2-isopropylhydrazide) un puissant inhibiteur de la mono-amino-oxydase et un système biologique dont l'activité *in vitro* dépend quantitativement de la présence d'adrénaline : la glycogénolyse dans les coupes de foie dont Sutherland a montré qu'elle est stimulée quantitativement par l'adrénaline.

Il a ainsi mis en évidence une potentialisation de l'effet de l'adrénaline sur les coupes provenant d'animaux traités préalablement à l'iproniazide. Cette potentialisation est indirecte, puisqu'il ne se produit que dans les tissus d'animaux traités et il n'est pas dû à l'inhibition de la désamination oxydative de l'adrénaline. D'autre part, des incubations effectuées avec des coupes prélevées sur des animaux normaux ne donnent lieu à aucune modification de la réaction adrénérquie.

Il a fait remarquer que l'iproniazide détermine une accumulation d'amine dans le foie et le cerveau. Cette accumulation est due à la rétention de l'augmentation de la réactivité à l'adrénaline. La sérotonine des animaux normaux préincubés avec la sérotonine se comporte vis-à-vis de l'adrénaline de la même façon que des coupes de foie d'animaux traités à l'iproniazide.

niazide. Cet effet indirect de l'iproniazide ou direct de la sérotonine pourrait s'expliquer selon les données théoriques de Belau par la formation de chélates du type (Cyclase-ATP-Mg-Amine) qui pourrait précéder la synthèse d'AMP 3,5 cyclique sous l'action spécifique de l'adrénaline.

Des études pour reproduire la potentialisation par l'adrénaline sur un système isolé sont actuellement en cours. Les résultats observés à l'aide d'une fraction particulière provenant d'un homogénat de foie, en présence de Mg, d'ATP et de sérotonine, suggèrent l'intervention d'une substance qui n'active pas la phosphorylase, mais qui, en présence d'adrénaline, devient rapidement active.

---

### LISTE DES PUBLICATIONS

- M. GRUNBERG-MANAGO. « Polynucléotide phosphorylase », dans *The Enzymes*, Boyer, Lardy et Myrbäck, ed., Academic Press, N.Y., vol. V, p. 257.
- D. LEVIN et M. GRUNBERG-MANAGO. « Studies on the physiological role of polynucleotide phosphorylase in *E. coli ML* ». *Federation Proc.*, 1961, 20, 363.
- M. I. DOLIN, E. GODINIAUX et M. GRUNBERG-MANAGO. « Polynucleotide phosphorylation of *Clostridium perfringens* ». *Bact. Proc.*, 1961, 180.
- A. M. MICHELSON, J. DONDON, M. GRUNBERG-MANAGO. « The action of polynucleotide phosphorylase on 5-halogeno-s'-pyrophosphate ». *Biochim. Biophys. Acta* (sous presse).
- R. MONIER et M. GRUNBERG-MANAGO. « Structure secondaire et phosphorylation & l'acide ribonucléique soluble de levure de boulangerie ». *Acides Ribonucléiques & Poly phosphates, Structure Synthèse et Fonctions*, Colloques Internationaux & C.N.R.S., Strasbourg, 1961 (sous presse).
- M. GRUNBERG-MANAGO. « Mode d'action de la polynucléotide phosphorylase ». *Acides Ribonucléiques et Polyphosphates, Structure, Synthèse et Fonctions*, Colloques Internationaux du C.N.R.S., Strasbourg, 1961 (sous presse).
- F. MEYER. « Étude de l'action adrénergique des inhibiteurs de la mono-amino oxydase ». *C. R. Acad. Sci.*, 1961, 252, 2616.
- F. MEYER. « La signification des inhibiteurs de la mono-amino oxydase pour le métabolisme du glucose ». *Symp. Intern. du Diabète*, Genève, 1962, vol. I.
- F. MEYER, « A propos du mode d'action de l'iproniazide, inhibiteur de la mono-amino oxydase ». *Experientia*, 1961, 17, 563.
- C. DELAVIER-KLUTCHKO. « Rôle du fer dans le métabolisme anaérobie du pyruvate chez *E. coli* et *CL saccharobutyricum* ». Thèse de Doctorat is-Sciences Naturelles, Paris, 1961.
- P. DAUTA. « Contribution à l'étude du mécanisme d'action de la polynucléotide phosphorylase. Rôle du magnésium dans le mécanisme d'action de la polymérisation ». Diplôme d'études Supérieures, Faculté des Sciences, Paris, 1962.
- C. DELAVIER-KLUTCHKO. « Réaction phosphoroclastique du pyruvate : I. Rôle du fer dans la réaction. — II. Mise en évidence de l'intervention d'un cofacteur de nature ptéridique dans la dégradation du pyruvate. — III. Intervention de la biotine » (sous presse).

- M.** N. THANG. « Etude du métabolisme des Nitrates chez *Chlorella pyrenoidosa* à \*obscurité ». I. Assimilation du <sup>14</sup>C-glucose en rapport avec l'utilisation des nitrates. *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 52, 478. — II. Assimilation de l'azote de K<sup>16</sup>NO<sub>3</sub> en présence de glucose. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1961, 52, 495.

---

**COMPOSITION DU SERVICE**

- M<sup>me</sup> M.** GRUNBERG-MANAGO, Directeur de Recherches au C.N.R.S.  
**M.** F. MEYER, Chargé de Recherches au C.N.R.S.  
**M.** J. TAVLITZKI, Chargé de Recherches au C.N.R.S.  
**M.** M. N. THANG, Chargé de Recherches au C.N.R.S.  
**M<sup>me</sup> Q.** DELAVIER-KLUTCHKO, Chargée de Recherches au C.N.R.S.  
**M.** P. PRIEUR, Attaché de Recherches au C.N.R.S.  
**M.** J. MASSOULIE, Stagiaire de Recherches au C.N.R.S., mis à la disposition du Dr Fresco.  
**M<sup>me</sup> p.** DAUTA, Elève à l'École Normale Supérieure de Sévres.  
**M<sup>l</sup>** M. COUSIN, Boursière du 3<sup>e</sup> Cycle.  
**M<sup>lle</sup>** M. L. LESNE, Boursière de la Ligue Nationale contre le Cancer.  
**M<sup>lle</sup>** T. GODEFROY, élève à l'École Normale Supérieure de Sévres.  
**M<sup>me</sup>** L. DONDON, Collaboratrice technique au C.N.R.S.  
**M.** J. DONDON, Collaborateur technique au C.N.R.S.  
**M<sup>lle</sup>** J. REVEILLON, Collaborateur technique au C.N.R.S.  
**M<sup>16</sup>** B. MEGROT, Collaborateur technique au C.N.R.S.  
**M<sup>lle</sup>** I. SOUHLERIS, Chimiste organicienne, Biologie Moléculaire.  
**M<sup>me</sup>** O. SAYAH, Collaborateur technique, Biologie Moléculaire.  
**\*\*\*** D. C. THANG, Collaborateur technique, N.I.H.  
**M.** M. GALVEZ, Collaborateur technique, Biologie Moléculaire (mi-temps).  
**Mn\*** H. COSTINESCO, Secrétaire au C.N.R.S.  
**M.** E. KNIGHT Jr., Boursier N.I.H.  
**M.** F. R. p. WILLIAMS, Boursier N.I.H.

## SERVICE DE PHYSIOLOGIE

Rapport de M. TH. CAHN, Chef de Service.

Ces dernières années MM. Cahn et Houget avaient montré que, chez le Lapin, une grande partie des glucides alimentaires est transformée en lipides pendant l'absorption intestinale, puisqu'avec une alimentation presque exclusivement glucidique, ils ont vu une augmentation importante du transport des lipides et surtout des triglycérides dans le sang, six à sept heures après le début du repas quand la résorption est à son maximum.

Le pouvoir de stockage des glucides étant faible chez les Homéothermes, on conçoit la nécessité de transformation rapide de tout excès des glucides alimentaires en lipides qui, eux, peuvent être stockés en quantités presque illimitées. Mais qu'en advient-il lorsque par un jeûne préalable de 24 heures on a fortement diminué les réserves de glycogène? La réponse à ce problème était d'autant plus intéressante qu'elle permettait de vérifier si le processus de conversion des glucides en lipides réalisé dans la muqueuse intestinale est intégré dans la régulation métabolique générale. La forte élévation des acides gras totaux et surtout des glycérides qui est de règle chez l'animal 7 heures après le début de son repas ne se retrouve plus chez l'animal ayant jeûné le jour précédent; il y a bien une légère augmentation mais d'un ordre de grandeur tout à fait inférieur. Par contre au bout de 24 heures, alors que chez les animaux régulièrement nourris les constituants lipidiques ont à peu près repris leurs valeurs de la veille, on observe qu'chez ceux qui avaient jeûné ces constituants se retrouvent fortement augmentés dépassant même (parfois de 50 % pour les glycérides) leurs valeurs d'avant le jeûne. Seuls les esters de cholestérol, dont le taux sanguin augmente dès le début d'un jeûne, diminuent dès que reprend l'alimentation et ils retrouvent leur valeur normale au bout de 24 heures. Ainsi après un jeûne, l'organisme utilise les glucides que lui apporte la nourriture en premier lieu pour reconstituer ses dépôts beaucoup plus épuisés que d'ordinaire, et c'est pourquoi la transformation habituelle en graisses du surplus de glucides n'apparaît que plus tardivement. Il faut signaler toutefois qu'après un jeûne de 24 heures les animaux n'absorbent pas leur ration à la même vitesse que s'ils sont nourris chaque jour; dans ce cas en 7 heures ils ont ingéré en moyenne 77 % de leur ration alors qu'après si ils ont jeûné la veille leur ingestion n'atteint que 45 %. Le rythme alimentaire ralenti doit évidemment repousser à plus tard l'augmentation de la lipémie et la conversion des sucres en graisses. Et en effet quand nous imposons aux animaux normaux un rythme alimentaire analogue à celui des jeûneurs, nous observons au bout de 24 heures une augmentation de la lipémie mais nettement

PHYSIOLOGIE

inférieure à celle que nous constatons chez les animaux soumis à un jeûne préalable.

Ces résultats montrent que l'intensité des processus intestinaux de con- préalable. Ces résultats montrent que l'intensité des processus de nutrition de

boUque générale de l'organisme. 11 « f integration. ;integration

des processus d'assimilation des a U n j n w ^ 1 . ^ . ^ . ^ r6peteeS ae

Vmie; mais curieusement cette derme\* les especes; elle est constante & # 1 L\* de ^ des deux es ^ En determinant deux fais par jour ia li-émie Y. one :--te avant le detm le ^oivent journallement une U J " \* ^ ^ prefer effet de cette ho«n ^ repas, MM. Cahn et Houget ^ ^ J\_h premiere i j ^ J de la n seu- J« de diminuer la lipemie : 4 ^ a bituelle d'hyperl^ « . \* adde8 lement on ne retrouve pas la vague e mag encor e le ra V\* des anx n » a i e n t aversion des glucides aUmentaires e n ^ ^ ^ n q ue k . : J - J J ^ iras esterifiés du sang a baisse de ao Mj / o gestion. En general ^ ^ ^ l e s . en rien modifié leur rythme ord = e d chez les femelles que eb, les atteint des lipides circulants est plus accrue chez les femelles que la baisse L'hypolipémie s'accroît au cours des premières 24 heures : elle peut se alors chez les femelles en moyenne 60 %, chez les mâles 40 %. Elle peut se maintenir 2 ou 3 jours bien que l'on continue chaque jour les injections de cor- tisonne ... .. Il est surprenant de 7-uc, mais on vou «.rr~... ^ conversions journalières de cortisone, Wiles, la vague d'hyperhpemie due as in ections d 3SS ^ d ^ constater que lorsque l'on interrompt le au; ^ ^ ^ « Urides sanguins remontent en flèche » ut ^ ^ ^ « D ^ ^ juste dans k. premieres heures suivant le d ^ ut ^ ^ ^ « P ^ W i e s'accuse encore pendant quelqu ^ Jour et ^ ^ ^ « P ^ J\* considerables surtout chez les f e ^ de la cortisone do ifetredesoPPO uins, fe ces faits: d'une part que l'action prop\* ^ nuer ^ ^ ^ des ^ s<ig ^ la conversion des sucres en graisses et ^ , d6s 6 quiUbre enf\*\*\*? ^ appa- 14 d'autre part que l'organisme lutte ^ e ^ es 4 -idiques dont 1 ac uon P e m s ^facteur antagoniste de mobilisation des res^ v J ^ ^ en meme tuciP ^ ral t sans contrLe quand cesse ^ ^ ^ 1 de conversion \* - \* d'ordi- ? «e manifeste de nouveau k, P 1 0 ^ ^ plus grande intensite que J«\*Maires en Urides, et peut-etre avec j n F ^ ^ ^ roobuisation nai\* , puisque les depdts de glycogene so«« e les proc ^ J e T M ! Lie due , Ces resultats metient aussi en evidence qu' modi fication de l'organisme de\* reserves et de conversion sont lies a queiqu

1. On wit que la cortisone, tout en produisan t une hyperglycémie, cependant une t une hyperglycémie, forte augmentation des «pôts de glycogène.

à l'acte alimentaire et que cette liaison est influencée par une des hormones de la surrénale : la cortisone.

Sous la direction de MM. Cahn et Houget, M. Zannad a poursuivi l'étude de ce phénomène. En étudiant les variations de la glycémie il constate qu'après 2 ou 3 jours d'injection de cortisone il apparaît une vague d'hyperglycémie très notable, plus forte chez les femelles, 6 à 7 heures après le début du repas. Le lendemain matin, la glycémie a fortement diminué sans toutefois revenir à sa valeur de départ, surtout chez les femelles. On observe ainsi que la glycémie présente une série de dents de scie se détachant sur une ligne ascendante; la pente de cette dernière étant plus accusée chez les femelles. Après cessation des injections les hyperglycémies digestives diminuent rapidement chez les mâles, plus lentement chez les femelles.

Sur les acides gras estérifiés, M. Zannad confirme les résultats précédents : la cortisone provoque tout d'abord une diminution de leur taux dans le sang; secondairement on observe une intensification du transport des lipides sanguins qui prend des proportions beaucoup plus importantes chez les femelles. Encore dans ces expériences les valeurs maximales de la lipémie s'observent 24 à 48 heures après l'arrêt des injections.

Ainsi l'administration répétée de cortisone amène une hyperglycémie et une hyperlipémie importante, c'est-à-dire les mêmes phénomènes que Ton observe dans le diabète. Comme dans cet état, les variations maximales s'observent dans la période postprandiale. On peut donc parler d'un état diabétique cortisonique qui toutefois se distingue nettement du diabète vrai puisque ces perturbations sont réversibles, elles cessent en effet quelques jours après l'arrêt des injections. La distinction est encore plus nette puisque, comme le montre M. Zannad, le jeûne empêche l'hyperglycémie et l'hyperlipémie cortisoniques. Et pourtant aussitôt que Ton réalimente l'animal, et même si on a cessé les injections de cortisone depuis un à trois jours, on assiste à une montée glycémique et lipémique au moment de l'absorption digestive. Tous ces résultats mettent nettement en évidence les liens étroits entre ces troubles métaboliques et l'acte alimentaire.

Un autre sujet d'études a été abordé au laboratoire. On sait que certains anesthésiques, comme l'éther et le chloroforme, modifient la régulation du glucose sanguin et produisent une hyperglycémie. Cet effet est attribué aux réactions émotionnelles et doit être rattaché aussi à la diminution de l'apport d'oxygène au début de l'anesthésie. Avec d'autres anesthésiques on n'observe pas de modification de la valeur glycémique, c'est le cas du Nembutal. Un tel résultat ne permet toutefois pas d'éliminer une influence possible sur les mécanismes de la régulation du glucose sanguin; pour en être sûr, il faut étudier si ces composés modifient les courbes hypo- et hyperglycémiques que Ton observe après administration d'agents physiologiques. C'est ce qu'a étudié M<sup>lle</sup> Frangi en recherchant sur le Lapin si le Nembutal aux doses calmantes modifie la courbe de rhyoglycémie insulaire et de l'hyperglycémie adrénalinique.

Des résultats qu'elle a obtenus il ressort que le Nembutal, qui par lui-même ne modifie pas la valeur de la glycémie, perturbe cependant les processus de sa

régulation, d'une part en réduisant l'adrénaline-secrétion, d'autre part en affaiblissant les propriétés hyperglycémiantes de l'adrénaline.

Un lapin rendu anémique par des saignées répétées présente une hyperlipémie importante qui paraît inhibée par l'administration d'insuline. Pour savoir si cet effet de l'insuline sur la circulation des lipides est un effet direct ou s'il s'agit d'un effet indirect corrigeant un trouble éventuel du métabolisme des sucres consécutif à l'anémie, M<sup>lle</sup> George a soumis les animaux avant et pendant la période des saignées à une série d'épreuves (tolérance au glucose, à l'adrénaline, à l'insuline) en suivant à la fois la glycémie et les progrès de l'anémie et de la lipémie. On sait que la saignée produit rapidement un changement de la circulation des glucides. Aussitôt après la saignée, le glucose plasmatique s'élève aux environs de 200 mg % ; il revient à la normale au bout de quatre à cinq heures et par des saignées successives il peut atteindre 400 mg %. Avant les saignées, des doses d'insuline d'une unité par kg administrées après un jeûne de 16 heures provoquent des hypoglycémies très importantes ; le retour à la normale demande en général plus de 6 heures. Au contraire, chez les animaux anémiés par saignées, la baisse du glucose sanguin est moins accusée et le retour à la normale est beaucoup plus rapide. Il existe donc une diminution de l'effet de l'insuline et cette diminution est d'autant plus nette que les animaux présentent une anémie plus importante avec une lipémie plus élevée.

---

#### LISTE DES PUBLICATIONS

- Th.** CAHN et J. HOUGET. « Etudes de la lipémie du Lapin et des facteurs qui la conditionnent. Influence de l'alimentation après un jeûne de 24 heures ». *C. R. Acad. Sci.*, 1961, 252, 3646.
- Th.** CAHN et J. HOUGET. « Etudes de la lipémie du Lapin et des facteurs qui la conditionnent. Influence de la cortisone ». *C. R. Acad. Sci.*, 1961, 253, 1009.
- M.** M. ZANNAD. « Action sur la glycémie et les acides gras estérifiés du plasma de Lapin d'injections répétées de cortisone. Différences dues au sexe ». Diplôme d'Etudes Supérieures, Paris, 1961.
- N.** FRANGL. « Influence du nembutal sur quelques-uns des aspects de la régulation glycémique chez le Lapin ». Diplôme d'Etudes Supérieures, Paris, 1961.
- M.** GEORGE. « Résistance à l'insuline dans l'anémie par saignées chez le Lapin ». *J. de Physiol.*, 1961, 53, 350.
- O.** LARTIGUE, en collaboration avec R. LATARJET et E. ESTIENNE. « Protection chimique élective de l'intestin chez des souris irradiées à doses supralétales de Rayons X ». *C. R. Acad. Sci.*, 1961, 252, 948.
- M.** LOURAU. « Action d'une irradiation générale sur les échanges d'eau entre le sang et la cavité gastrique pendant l'absorption du glucose ». *Experientia*, 1961, 17, 422.
- M.** LOURAU. « Cinétique de l'absorption d'une dose unique de glucose par l'intestin de cobayes irradiés totalement par les Rayons X ». *Sc. Physiol.*, 1961, 15, 309.
-

*COMPOSITION DU SERVICE*

M. Th. CAHN, Directeur de Recherches au C.N.R.S.  
M. J. HOUGET, Directeur de Recherches au C.N.R.S.  
M. R. AGID\*, Maitre de Recherches au C.N.R.S.  
M. L. KEPINOV, Maitre de Recherches en retraite.  
M<sup>me</sup> M. LOURAU, Chargée de Recherches au C.N.R.S.  
M<sup>\*e</sup> O. GALLIEN-LARTIGUE, Chargée de Recherches au C.N.R.S.  
M<sup>lle</sup> M. GEORGE\*, Boursière du 3<sup>e</sup> Cycle.  
M. R. VALENCIA\*.  
M<sup>me</sup> G. WEISS, Collaborates technique au C.N.R.S.  
M. M. ZANNAD (Diplôme d'fitudes Supérieures).  
M<sup>lle</sup> N. FRANGI (Diplôme d'fitudes Supérieures).  
M<sup>l\*</sup> G. IFFLY (Diplôme d'fitudes Supérieures).  
M. G. BIDAULT (Diplôme d'fitudes Supérieures).  
M. M. BERTHEAU (Diplôme d'Etudes Supérieures).

---

• M. Agid et M<sup>Ue</sup> George ont quitté le Service en mai 1961, M. Agid ayant été nommé professeur à la Faculty des Sciences de Toulouse et M<sup>lle</sup> George, chef de travaux à la même faculté. M. Valencia, au retour de son service militaire, est actuellement au service de nutrition du C.N.R.S.  
\* Bellevue.

## SERVICE DE GENETIQUE

Rapport de M. BORIS EPHRUSSI, Chef de Service.

### I. — MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

M. Y. Yotsuyanagi a poursuivi, en collaboration avec l'Institut du Cancer, l'étude au microscope électronique de la levure, dans le but de préciser les rapports entre la structure du chondriome et les propriétés génétiques et physiologiques de cet organisme.

<sup>10</sup> *Variation de l'ultrastructure du chondriome au cours de la croissance.* — Au cours du cycle de la croissance aérobie en présence de concentrations élevées de glucose, il existe un parallélisme entre la modification de l'ultrastructure du chondriome et celles des paramètres métaboliques. Ces modifications reflètent les variations de l'ampleur de l'effet inhibiteur de la fermentation aérobie au cours du cycle de croissance.

<sup>2°</sup> *Etude comparée des chondriomes des levures normales et des mutants à déficience respiratoire.* — Les chondriomes des mutants végétatifs Pp- et doubles Pp- présentent une anomalie caractéristique de l'ultrastructure des mitochondries tandis que les chondriomes des mutants ségrégants P<sub>5</sub>p+ et P<sub>7</sub>p+ ne diffèrent pas de ceux des levures normales à la fin de la croissance exponentielle. On peut donc penser que la mutation cytoplasmique p<sup>+</sup> → p~ détermine directement l'anomalie du chondriome des mutants p- et que le chondriome des mutants p<sup>+</sup> représente un chondriome de même nature que celui des levures normales, mais dont le développement est inachevé à cause de la déficience respiratoire.

<sup>3°</sup> *Changements morphologiques au cours de l'adaptation respiratoire.* — La levure normale ayant perdu, à la suite de la culture anaérobie, les enzymes respiratoires, la capacité respiratoire ne présente qu'un petit nombre de mitochondries à peine reconnaissables et dépourvues de cristae. En présence d'oxygène, les mitochondries de forme spéciale, qui diffèrent nettement des mitochondries de la levure aérobie, se transforment très rapidement en mitochondries normales. Ce processus s'accomplit en quelques heures, parallèlement à la révolution du Q<sub>02</sub> en utilisant des analogues d'acides aminés, il est possible d'inhiber la synthèse des enzymes respiratoires sans inhiber pour autant la formation de la structure mitochondriale.

## II. — STRUCTURE FINE DU GENE

MM. Mousseau et Rossignol ont continué, sous la direction de M. Rizet, l'étude de séries de mutants *k* ascospores blanches chez le champignon *Ascobolus immersus*.

M. Mousseau a montré que les deux sous-unités constituant le segment chromosomique correspondant à la série qu'il étudie, possédaient toutes les propriétés de rinité définie antérieurement : le polaron. Il a montré également que le croisement intéressant deux sites appartenant à Tun et à Pautre de ces polérons conduisait à des fréquences très variables de recombinaisons réciproques (crossing-over).

M. Rossignol a recherché des recombinaisons non-réciproques qui sont, non plus sauvages, mais double-mutantes ; des tétrades contenant de tels recombinants existent, mais leur fréquence est apparemment différente de celle des tétrades contenant des recombinaisons sauvages.

---

### LISTE DES PUBLICATIONS

- Y. YOTSUYANAGI. « Etudes sur le chondriome de la levure. I. Variation de l'ultra-structure du chondriome au cours du cycle de la croissance aérobie ». *J. Ultrastructure Res.*, sous presse.
- Y. YOTSUYANAGI. « Etudes sur le chondriome de la levure. II. Chondriomes des mutants à déficience respiratoire ». *J. Ultrastructure Res.*, sous presse.

---

### COMPOSITION DU SERVICE

- M. B. EPHRUSSI, Professeur à la Faculté des Sciences.  
M. G. RIZET, Professeur à la Faculté des Sciences.  
M. J.-L. ROSSIGNOL, Assistant à la Faculté des Sciences.  
M. J. MOUSSEAU, Chef de Travaux à la Faculté des Sciences.  
M. Y. YOTSUYANAGI, Attaché de Recherches au C.N.R.S.  
M<sup>me</sup> S. CHEVAIS, Ingénieur C.N.R.S.

## Rapport de M<sup>lle</sup> NINE CHOUCROUN, Directeur de Laboratoire.

Nos recherches ont été poursuivies dans les deux directions qui intéressent l'activité de mon laboratoire :

I. *Etude des propriétés biologiques du constituant lipopolysaccharidique antigénique* que nous avons isolé du bacille tuberculeux.

II. *Etude de l'électrisation superficielle d'éléments figures vivants*, au moyen de nos dispositifs d'électrophorèse qui permettent la séparation fractionnée des éléments chargés et la détermination de la grandeur de leur charge par l'observation microscopique.

### I. — *Etude des propriétés du constituant lipopolysaccharidique.*

Je rappelle que le lipopolysaccharide, désigné sous le symbole Pmko, est le seul constituant connu, isolé du bacille de Koch, jouant un rôle actif dans les deux effets spécifiques importants d'hypersensibilité et de résistance acquise provoqués par le corps bacillaire tout entier. Cet antigène lipopolysaccharidique ne provoque pas lui seul le développement de l'hypersensibilité tuberculique; il lui faut le concours d'une tuberculo-protéine, mais il est essentiel pour que l'allergie tuberculique se développe. Je rappelle également que le polysaccharide, séparé de ce constituant par une hydrolyse alcaline, est un antigène-haptène sérologiquement actif qui a la propriété de précipiter les anticorps polysaccharidiques qui se forment au cours de l'infection par le bacille de Koch. Cette réaction sérologique est toujours le seul test de précipitation directe que nous ayons en Tuberculose.

La découverte paradoxale du concours nécessaire d'un lipopolysaccharide pour que l'hypersensibilité *k* des protéines (comme la tuberculine) se développe, incitait à rechercher la réponse de l'organisme infecté à l'inoculation intradermique de ce constituant lipidique.

Nous avons pu ainsi mettre en évidence une hypersensibilité de type " retardée ", spécifiquement liée au contact préalable de l'organisme avec le bacille de Koch, et distincte de l'hypersensibilité tuberculique. L'existence d'une hypersensibilité de type tuberculique *k* un constituant bactérien non protéinique n'avait jamais été signalée.

Grâce aux émulsions fines et stables dans la peau physiologique, que nous avons réussi à obtenir de ce constituant lipidique directement insoluble dans l'eau, nous avons pu entreprendre l'étude comparative des réactions intradermiques au lipopolysaccharide Pmko et à la tuberculine.

Les résultats de cette étude qui a porté sur plusieurs centaines de sujets tuberculeux, & des stades différents de la maladie, ont montré que les intensités des réactions intradermiques provoquées chez le même sujet, par chacun de ces antigènes, sont souvent différentes, plus fortes pour la tuberculine ou pour le Pmko suivant les cas. Ces différences individuelles de sensibilité  $k$  Tun ou  $k$  l'autre de ces antigènes ne pouvaient s'interpréter qu'en admettant l'existence d'une hypersensibilité au Pmko distincte de l'hypersensibilité tuberculinique. Et les premières observations relatives aux sujets tuberculeux révélaient en effet qu'une intensité prédominante de Tune ou de l'autre de ces hypersensibilités, accompagnaient généralement des formes différentes de la maladie, et dans une même forme, des étapes différentes.

L'étude approfondie du dossier clinique de chaque sujet nous a permis de saisir une relation remarquable entre l'intensité des allergies décelées par ces réactions intradermiques, et les conditions anatomo- et physio-pathologiques

Les résultats obtenus dans le cas des tuberculoses pulmonaires, qui ont été classées en s'appuyant essentiellement sur les caractères évolutifs de la maladie et sur son ancienneté (classification suggérée au Dr. Kourilsky par l'analyse minutieuse des résultats fournis par les tests intradermiques) ont montré :

1° Que le pourcentage des sujets réagissant plus fortement au Pmko qu'à la tuberculine va en croissant depuis les formes les plus graves jusqu'aux formes les moins graves de la maladie, tandis que l'inverse se produit pour les sujets réagissant plus fortement à la tuberculine qu'au Pmko;

2° Que le pourcentage des sujets hyperallergiques au lipopolysaccharide est d'autant plus élevé que la forme de tuberculose est de moindre gravité, tandis que le pourcentage des sujets hyperallergiques à la tuberculine est, lui, d'autant plus élevé que la forme de tuberculose est de plus grande gravité.

Tous ces résultats semblent bien indiquer que l'aptitude de l'organisme  $k$  développer une réaction au lipopolysaccharide Pmko, d'intensité forte et supérieure  $k$  celle de l'hypersensibilité tuberculinique, doit être liée aux processus qui déterminent l'évolution favorable de la maladie. Il est raisonnable de penser que le développement de cette hypersensibilité pourrait être lié au mécanisme de la résistance à l'infection tuberculeuse. Alors que la dissociation des deux phénomènes d'hypersensibilité tuberculinique et de résistance acquise, dissociation entrevue dans les travaux pionniers d'Alfred Boquet, a été parfaitement démontrée par les remarquables expériences de Opie et Freund, il serait satisfaisant pour l'esprit de pouvoir relier cette hypersensibilité au lipopolysaccharide, si longtemps insoupçonnée, avec les processus de l'immunité.

Quoi qu'il en soit, en dehors de l'intérêt spéculatif lié  $k$  la mise en évidence d'une hypersensibilité spécifique, de type " retardée ",  $k$  un constituant bactériel non protéinique, ces recherches ont apporté la démonstration que le lipopolysaccharide Pmko est capable, au même titre que la tuberculine, de déceler l'hypersensibilité développée par le bacille de Koch.

La propriété de ce lipopolysaccharide d'avoir une constitution mieux définie que celle des tuberculines les plus purifiées, le fait qu'il permet la préparation d'émulsions d'une grande stabilité dont l'activité est aisément dosable *in vitro*,

et ne s'altère pas avec le temps, soulignent les avantages de commodité et de précision que présenterait l'utilisation de cet antigène dans le dépistage systématique d'une hypersensibilité spécifique au contact préalable de l'organisme avec le bacille de Koch.

Le wit, farf tor le litatohsaccharide Pmko dans VitabUssement de la resistance acquise, dont il doit être l'un des facteurs, et le fait que ce constituant ne provoque pas à lui seul le développement de l'hypersensibilité tuberculique, a permis son utilisation dans des expériences d'essai de vaccination de Bovides contre la Tuberculose. On comprend l'intérêt fondamental d'une vaccination n'entraînant pas, comme le BCG, le développement de l'allergie tuberculique, dont l'existence est encore le seul test de discrimination entre les animaux tuberculeux

et X r u s i v e s d'immunisation avec l'Upopcharide Pmko (poursuivies en collaboration avec les laboratoires de recherches de l'École Vétérinaire de Maisons-Alfort) comportant le BCG comme contrôle d'immunité, ont montré que, dans les expériences réalisées, les déficiences décrites par l'école française pour que l'immunité

Par le BCG se manifeste :

1° la vaccination par le B.C.G. ne protège pas complètement les Bovides contre le développement de l'infection tuberculeuse;

2° le degré de protection confère par le B.C.G. est tout à fait comparable, sinon supérieur à celui confère par le B.C.G. dans les mêmes conditions d'expérimentation.

La brutalité de l'épreuve infectante par voie nasale, nous avons constaté, dans des conditions où les animaux « immunisés » seraient infectés par les voies naturelles de contamination.

Une nouvelle expérience comportant 20 animaux « préparés » est en cours. Ces Bovides sont continuellement transférés dans une étable infectée où ils seront mis au contact de bêtes tuberculeuses.

Il semble raisonnable d'espérer que cette expérience dans les conditions

Polysaccharide Pmko, que nous avons vu se manifester, au même titre que celui du B.C.G., dans nos essais antérieurs de vaccination.

## II. — Étude de l'électrisation superficielle

- 1° des spermatozoïdes;
- 2° de cellules tumorales.

Je rapp  
adaptés à l

qui assure la Constance du Ph des milieux soumis à l'électrophorèse.  
Le dispositif macroscopique élevé, avantage évident pour la

utilisés, sont particulièrement adaptés à leur principe (original) connu, permettant l'emploi de champs électriques élevés, ce qui empêche les opérations qui peuvent empêcher l'alté-

ration des milieux biologiques, et aussi pour la séparation fractionnée des particules chargées de mobilités différentes, mais cependant voisines. Le dispositif microscopique est encore actuellement le seul permettant des mesures faciles, correctes et précises de l'électrisation superficielle des éléments chargés.

*Utilité de l'électrisation superficielle des spermatozoïdes*, d'origine animale ou humaine, nous a déjà permis d'infirmer les résultats des auteurs qui ont cru observer, et séparer par le champ électrique, des spermatozoïdes de lapins chargés de signes opposés. Avec nos conditions correctes d'observation, nous avons toujours constaté que les spermatozoïdes sont tous chargés négativement.

Nous pensons que ces auteurs ont fait une séparation des spermatozoïdes selon l'importance de leur charge électrique, comme nous l'avons fait dans le passé pour certaines bactéries, en particulier pour le bacille tuberculeux. Dans ce dernier cas, nous avons pu établir que la charge électrique était un caractère spécifique des populations d'hérédité définie, liée à la virulence, les populations à répartition statistique de charges élevées étant les moins virulentes.

La séparation des spermatozoïdes en éléments dits positifs et en éléments négatifs aurait conduit les auteurs de ces expériences à obtenir, par insémination artificielle des lapins, des portées à prédominance mâle avec les spermatozoïdes dits positifs; des portées à prédominance femelle avec les éléments négatifs.

En raison du phénomène connu de contre osmose qui peut ramener les éléments les moins chargés vers l'électrode qui les chasse, il faudrait conclure, en admettant que les résultats de l'insémination étaient statistiquement valables, que les spermatozoïdes les plus chargés sont des spermatozoïdes femelles et que les moins chargés sont des spermatozoïdes mâles.

Nous avons pensé que l'insémination artificielle des Bovidés, qui se fait à grande échelle, pouvait nous offrir un moyen de vérifier cette hypothèse par l'utilisation des documents accumulés dans ce domaine, relatifs à des donneurs dont les semences sont conservées.

Nous pensons sélectionner les taureaux dont la descendance présenterait une prédominance statistiquement valable de l'un ou de l'autre sexe; étudier l'électrisation superficielle des semences actives, conservées, de ces taureaux; et voir si une relation existe entre la répartition statistique des électrisations de leurs spermatozoïdes et la prédominance mâle ou femelle de leur descendance. Nous avons eu la désagréable surprise de constater que, seule, la descendance femelle était enregistrée avec précision.

Nous avons alors fixé, en collaboration avec le Dr. M. Parez, Professeur à l'École Nationale Vétérinaire, et avec le concours de l'U.N.C.E.I.A., un projet de travail consistant à étudier, du point de vue statistique, la totalité de la descendance de taureaux pendant une période donnée. Pour que cette étude soit statistiquement valable, on doit appliquer à la descendance de 20 taureaux avec une moyenne de 500 produits par taureau. Ce premier stade nous permettrait de reconnaître s'il existe des taureaux dont la descendance montre une prédominance de produits de l'un des deux sexes.

Ce travail, confié à un collaborateur technique de Maisons-Alfort qui contrôle sur place les naissances prévues, est en cours depuis plusieurs mois.

Dans un deuxième stade, les spermatozoïdes des taureaux dont la descendance montre une prédominance de mâles ou de femelles, seraient étudiés du point de vue de la répartition statistique de leur électrisation. Si cette étude «véla» une relation entre la grandeur de cette charge et la prédominance d'une descendance de l'un des deux sexes, on pourrait alors envisager une séparation des spermatozoïdes selon leur charge, comme nous l'avons fait pour les bactéries.

L'insemination de ces populations de spermatozoïdes sélectionnés par électrophorèse permettrait de vérifier si le traitement  $V f B \& \wedge Z \wedge J ?$  altère, et surtout si les produits de l'insemination des populations chargées par l'un des sexes les produits de l'insemination des populations les moins chargées, une prépondérance de l'autre sexe.

Dans le cas possible où ces conditions se trouveraient réalisées, on pourrait aboutir, en influençant la descendance des Bovides, à déterminer la prépondérance du sexe de ces animaux dans un sens hautement utile pour l'économie nationale.

l'importance de la charge électrique des cellules cancéreuses. P. M. M. \* \* \* tumeurs d'ascite de souris (sarcome 180 ou carcinome d'Erhch) nous a permis d'observer que des différences de charge accompagnent des différences morphologiques. Depuis ces observations que nous avons signalées en 1953, certains auteurs ont pensé eux aussi à étudier la charge de cellules tumorales, en relation avec la malignité de ces cellules.

En collaboration avec M. Barski, nous étudions actuellement la charge électrique de souches de cellules hautement ou faiblement chargées d'une lignée de cellules provenant du tissu nonnal 7 qui, à la suite de leur adaptation *in vitro*, ont subi à des degrés différents une malignisation.

À partir de cultures mixtes de l'une de ces souches hautement cancéreuse,

l'adaptation superficielle de ces populations de cellules à l'hérédité déficiente, et leur malignité aisément décelable expérimentalement.

80 « essentiels de nos activités, soulignent l'intérêt de l'approche rapprochée, dans un avenir prochain, ou nous symbolisons par le symbole P, l'importance de la charge électrique (électrostatique) sous son aspect hypersensibilité. « m » antigène standard pour 1 « X » tampan.

tu berculeux.

*COMPOSITION DU LABORATOIRE*

**M<sup>lle</sup> N. CHOUCROUN, Directeur de Recherches au C.N.R.S.**

**M<sup>me</sup> J. BAZIN, Collaborateur technique au C.N.R.S.**

**MUe N. BENYAMINE, Collaborateur technique au C.N.R.S.**

**M<sup>lle</sup> J. FAURE, Collaborateur technique au C.N.R.S.**

## PROFESSEURS EN VISITE

... M. J. Platt, professeur de Physique à la Faculté de Chicago, a séjourné à l'Institut de Biologie Physico-Chimique du 18 avril au 24 mai 1961.

Il y a donné deux conférences : la première sur « Les propriétés électroniques géométriques des molécules dans les états excités »; la seconde sur « le rôle des complexes moléculaires dans les transferts d'énergie ».

Le Professeur Platt s'est étendu particulièrement sur l'intervention d'un complexe par transfert de charge trimoléculaire dans la photosynthèse, un caroténoïde servant de lien entre le donneur et l'accepteur d'électron dans les structures orientées hautement organisées, telles que les chloroplastes.

M. Michael Kasha, Directeur de l'Institut de Biophysique moléculaire de Tallahassee (Floride) a passé un mois à l'Institut de Biologie, du 8 juin au 8 juillet 1961. Pendant son séjour, il a donné deux conférences ayant pour thèmes, l'une, « The molecular exciton model applied to hydrogen-bonded dimers », l'autre, « Optical properties of nucleotides ». Au cours de diverses discussions, M. Kasha a précisé les notions d'état exciton et d'état de semi-conduction et traité du renforcement de l'état triplet par l'agrégation de la chlorophylle.

... Le Dr. Paul Berg, professeur de Biochimie à l'Université Stanford de Palo Alto (Californie), est resté à l'Institut de Biologie du 27 juin au 27 août 1960. Il y a donné une conférence sur « The question of specificity in protein and nucleic acid synthesis ».

## TABLE DES MATURES

COMPOSITION DU CONSEIL D'ADMINISTRATION	5
COMPOSITION DU COMITE DE DIRECTION	6
SERVICE DE CHIMIE MACROMOLéCULAIRE, rapport de M <sup>*e</sup> A. DOBRY- DUCLAUX.	7
SERVICE DE BIOPHYSIQUE, rapport de M R. WURMSER	10
SERVICE DE BIOCHIMIE THéORIQUE, rapport de M. B. PULLMAN	17
SERVICE DE BIOCHIMIE A, rapport de M <sup>me</sup> Y. KHOUVINE	24
SERVICE DE BIOCHIMIE B, rapport de M <sup>me</sup> M. GRUNBERG-MANAGO	3*
SERVICE DE PHYSIOLOGIE, rapport de M Th. CAHN	4*
SERVICE DE GÉNÉTIQUE, rapport de M. B. EPHRUSSI	47
LABORATOIRE de M <sup>lle</sup> N. CHOUCROUN	49
PROFESSEURS EN VISITE	55

FONDATION EDMOND DE ROTHSCHILD  
POUR LE DEVELOPPEMENT DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

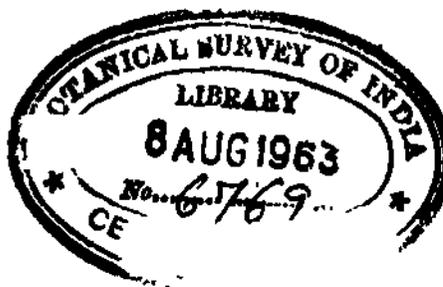
---

# INSTITUT DE BIOLOGIE PHYSICO-CHIMIQUE

RAPPORTS  
SUR LES TRAVAUX EFFECTUES

AU COURS DE L'ANNÉE

1962



13, RUE PIERRE-CURIE  
PARIS-V

## CONSEIL D'ADMINISTRATION

### *Président :*

**M. FRANCIS PERRIN**, Membre de l'Institut, Professeur au Collège de France, Haut-Commissaire à l'Energie Atomique.

### *Vice-Présidents :*

**M. G. CHAMPETIER**, Membre de l'Institut, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris.

**\*\* A. DE GRAMONT**, Membre de l'Institut, Président de l'Institut d'Optique. (f)

### *Secrétaire Général :*

**M. R. WURMSER**, Professeur honoraire à la Faculté des Sciences de Paris.

### *Trisadier :*

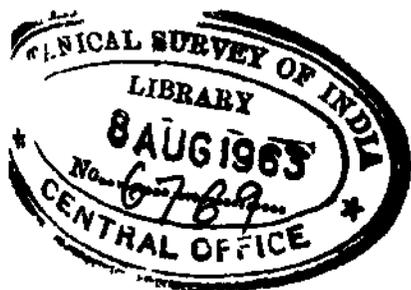
**\*\* EDMOND DE ROTHSCHILD.**

**M. E. AUBEL**, Professeur honoraire à la Faculté des Sciences de Paris.  
**P. AUGER**, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris.  
**E. BAUER**, Professeur honoraire à la Faculté des Sciences de Paris.  
**L. BINET**, Membre de l'Institut, Doyen de la Faculté de Médecine de Paris.  
**T. CAHN**, Directeur de l'École des Hautes Études, Directeur de Recherches au C.N.R.S.  
**R. COURRIER**, Secrétaire Perpétuel de l'Académie des Sciences, Professeur au Collège de France.  
**J. DUCLAUX**, Membre de l'Institut, Professeur honoraire au Collège de France.  
**B. EPHRUSSI**, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris.  
**R. FABRE**, Membre de l'Institut, Doyen honoraire de la Faculté de Pharmacie de Paris.  
**L. FAGE**, Membre de l'Institut, Professeur honoraire au Muséum National d'Histoire Naturelle.  
**P. FLEURY**, Professeur honoraire à la Faculté de Pharmacie de Paris.  
**M. FONTAINE**, Membre de l'Institut, Professeur au Muséum National d'Histoire Naturelle.  
**R. HEIM**, Membre de l'Institut, Directeur du Muséum National d'Histoire Naturelle.

- A. KIRRMANN, Professeur à la Faculty des Sciences de Paris, Directeur-adjoint de Pficole Normale Supérieure.
- R. LATARJET, Directeur de l'Institut du Radium.
- E. LEDERER, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris.
- A. LWOFF, F.R.S., Professeur à la Facultd des Sciences de Paris, Chef de Service à Tlnstitut Pasteur.
- J. PARROD, Professeur à la Faculté des Sciences de Strasbourg.
- B. PULLMAN, Professeur à la Faculty des Sciences de Paris.
- J. ROCHE, Professeur au College de France, Recteur de l'UniversitS de Paris.
- M\*e A. DE ROTHSCHILD.
- Lord ROTHSCHILD, F.R.S., Professeur à l'UniversitS de Cambridge.
- MM. L. SACHS, Trésorier honoraire.
- E. TERROINE, Professeur honoraire à la Faculté des Sciences de Strasbourg, Directeur du Centre de Recherches sur la nutrition au C.N.R.S.
- J. TREFOUEL, Membre de Tlnstitut, Directeur de Tlnstitut Pasteur.

#### COMITfi DE DIRECTION

MM. E. AUBEL, T. CAHN, G. CHAMPETIER, J. DUCLAUX, B. EPHRUSSI,  
A. DE GRAMONT, R. HEIM, E. LEDERER, FRANCIS PERRIN, B. PULLMAN,  
J. TREFOUEL, R. WURMSER.



## SERVICE DE CHIMIE MACROMOLECULAIRE

Rapport de M<sup>TM</sup> A. DOBRY-DUCLAUX, Chef de Laboratoire.

Comme dans les années précédentes, les sujets traités au laboratoire se divisent en deux groupes :

### I. — *CONSTITUTION CHIMIQUE DES CENTRES ACTIFS DES ENZYMES*

i) Il y a deux ans, M<sup>me</sup> A. Dobry-Duclaux a montré que l'action inhibitrice du sel de Roussin sur une série d'enzymes pouvait s'expliquer par sa fixation sur plusieurs groupes basiques du centre actif, groupes très rapprochés les uns des autres. Parmi les divers modes d'inhibition, attribuables à cette fixation, on peut aussi envisager, dans certains cas, la possibilité d'une destruction du centre actif. En effet, si le centre est constitué par un chélate, dont les ligands sont des groupes basiques liés à un métal indispensable à l'activité enzymatique, le sel de Roussin peut entrer en compétition avec ce métal, en le chassant du centre actif, pour former lui-même des combinaisons peu dissociées avec les ligands correspondants. M<sup>me</sup> A. Dobry-Duclaux a donc entrepris une étude de l'action du sel de Roussin sur les chélates, dont les donneurs ont été soit l'imidazole, soit l'éthyldiamine, correspondant aux donneurs naturels, l'histidine ou la lysine. Elle a montré que le sel de Roussin est capable de s'ajouter aux chélates sans provoquer leur destruction, à des pH correspondant à la zone d'activité de la plupart des enzymes. L'inhibition de cette activité due à ce complexe ne peut être attribuée à la destruction du centre actif par suite du déplacement du métal par le sel de Roussin. Les fonctions azotées basiques réagissent avec le sel de Roussin aussi bien à l'état libre qu'à l'état chélate. Dans les deux cas, les produits de la réaction sont peu solubles. Cette insolubilité nous laisse prévoir que si ces fonctions se trouvent dans le centre actif d'une enzyme, le sel de Roussin provoque un blocage de ce centre, indépendamment de l'état dans lequel se trouvent ces fonctions.

2) On admet généralement que dans une réaction enzymatique réversible, les deux substances  $S_x$  et  $S_2$  qui subissent la transformation selon le schéma



se fixent sur les mêmes groupes chimiques du centre actif en formant un complexe intermédiaire enzyme-substrat. Cette hypothèse n'a jamais été vérifiée. D'ailleurs, très peu de réactions enzymatiques ont été étudiées dans les deux sens et jamais de ce point de vue.

Or M<sup>me</sup> A. Dobry-Duclaux a remarqué que cette hypothèse n'est pas toujours

exacte : un inhibiteur qui, pour une enzyme donnée, était compétitif avec le substrat  $S_x$  ne l'était pas avec le substrat  $S_2$ . Ceci indique que les deux substances  $S_x$  et  $S_2$  se fixent sur des groupes chimiques différents du centre actif. Cette observation a incité M<sup>me</sup> A. Dobry-Duclaux à entreprendre une étude générale de ce point de vue, qui est en cours. Jusqu'à présent, elle a pu confirmer son observation de la non-identité de lieu de fixation du substrat dans les deux sens opposés pour les enzymes suivantes : les lactate-, isocitrate- et alcool deshydrogénases, la fumarase.

## II. — CHIMIE PHYSIQUE DES COLLOIDES IONISES

1) La théorie moderne des poly électrolytes explique les propriétés des solutions des colloïdes par leur nature électrochimique, en particulier par la répartition des ions compensateurs dans la couche double. Or, pour pouvoir calculer dans chaque cas cette répartition, surtout en présence d'autres électrolytes, il faut connaître les conditions limites, c'est-à-dire la concentration des ions  $k$  une grande distance de la micelle; autrement dit, la composition du liquide intermicellaire. L'isolement expérimental de ce liquide n'est possible qu'à l'aide d'une membrane semiperméable. Malgré la simplicité du procédé de l'ultrafiltration les expérimentateurs n'ont guère employé cette méthode et ils ont considéré a priori le liquide en équilibre comme différent du liquide intermicellaire. De sorte que toutes les applications des théories modernes aux cas concrets se heurtent à l'impossibilité d'effectuer les calculs numériques, une grandeur fondamentale étant inconnue.

Il s'agissait donc en premier lieu de démontrer que le liquide en équilibre est effectivement identique au liquide intermicellaire. Plusieurs travaux expérimentaux et théoriques effectués dans ce but ont été décrits dans les rapports précédents. Cette année, M<sup>me</sup> A. Dobry-Duclaux, en collaboration avec M<sup>me</sup> A. Ulinska, a entrepris cette démonstration sur un colloïde bien défini, l'acide polyacrylique. Elles ont montré que la composition de l'ultra-filtrat, pour une solution donnée, est toujours la même, indépendante de la concentration en colloïde, fait fondamental qui échappe aux théories modernes. Cette composition est donc une grandeur invariable et est celle du liquide à une distance infinie de la micelle. Les calculs numériques par les théories modernes deviennent ainsi possibles.

2) Le second problème qui a été traité dans ce laboratoire concerne un certain nombre de phénomènes liés à l'état colloïdal. Un de ces phénomènes est la coagulation ou la floculation. Il est très général et se produit aussi bien en solutions aqueuses qu'organiques, et avec des colloïdes ionisés ou dépourvus de charges. Les explications de ce phénomène ont été différentes selon qu'on avait affaire aux uns ou aux autres. Or, dans tous les cas, le phénomène est le même et consiste dans une séparation du solvant et du corps dissous. On ne voit aucune raison pour qu'il n'y ait pas de solutions générales, les théories actuelles n'envisageant qu' des solutions partielles et contradictoires.

M. J. Duclaux et M<sup>me</sup> Ch. Cohn ont attaqué le problème par la mesure de la pression osmotique. Cette méthode, proposée par des biologistes, tels que J. Loeb, a été très peu employée. Certaines écoles étrangères semblent lui être hostiles. Dans tous les cas, l'addition d'un agent floculant diminue progressivement 1\*

Pression osmotique et la floculation survient quand celle-ci devient nulle. Cette floculation peut, suivant le cas, être réversible ou irréversible. Ainsi la cause du phénomène est toujours la même et elle est facile à comprendre : une pression osmotique ne peut tomber au dessous de zéro, car alors le corps dissous se sépare nécessairement.

Le problème devient ainsi un cas particulier d'un autre, beaucoup plus général : Pourquoi un corps est-il soluble dans un liquide et insoluble dans un autre ? La théorie seule peut répondre à cette question, car toutes les expériences ont été faites et le matériel expérimental est surabondant.

Un cas particulier de ce phénomène général est la floculation des colloïdes anisés. Une loi déjà ancienne est souvent citée comme réglant la floculation de ces corps, celle de Schulze-Hardy. Elle accorde une importance prépondérante à la valence des ions floculants. Nous avons douté de sa validité générale et nous avons trouvé effectivement un cas contradictoire particulièrement net : un sel colloïdal de chrome, préparé dans les conditions convenables, est absolument insensible aux ions divalents ou trivalents, bien qu'il appartienne au groupe des corps qui doivent obéir à la règle de Schulze-Hardy. Ainsi, cette règle ne fait qu'indiquer une tendance et les limites de sa validité doivent être précisées.

---

#### LISTE DES PUBLICATIONS

- A- DOBRY-DUCLAUX et A. ULINSKA. « Sur le liquide intermicellaire et le volume exclu dans les solutions colloïdales. » *J. Chim. Phys.*, sous presse.
- A. DOBRY-DUCLAUX. « Sur la constitution chimique des centres actifs de certaines enzymes. V. Action de sels de Roussin sur les chélates. » *Biochim. Biophys. Acta*, sous presse.
- DUCLAUX et Ch. COHN. « Constitution des solutions colloïdales. V. Pression osmotique et floculation. » *J. Chim. Phys.*, 1962, 59, 36.
- J- DUCLAUX et Ch. COHN. « Théorie des colloïdes. Valence des ions compensateurs. » *J. Chim. Phys.*, 1962 ; 59, 603.

---

#### COMPOSITION DU SERVICE

M<sup>me</sup> A. DOBRY-DUCLAUX, Directeur de Recherches au C.N.R.S.  
 M. Jacques DUCLAUX.  
 M<sup>me</sup> Ch. COHN, Chargée de Recherches au C.N.R.S.  
 M<sup>lle</sup> N. DAUMAS, Collaborateur technique au C.N.R.S.  
 M<sup>me</sup> A. ULINSKA, Professeur à l'Université de Torun (Pologne).

## SERVICE DE BIOPHYSIQUE

Rapport de M. RENÉ WURMSER, Chef de Service.

### I. — *PROTÉINES DES SÉRUMS HUMAINS*

Comme cela a déjà été mentionné dans le rapport de Tan dernier, la méthode thermodynamique que nous avons introduite dans l'étude génétique de l'isohémagglutination est maintenant appliquée dans certains centres de transfusion. En particulier les travaux de Ch. Salmon sur les génotypes rares et sur les mutations chez les leucémiques démontrent que la méthode est loin d'avoir donné tout ce qu'on peut en attendre. Indépendamment de leur intérêt propre, ces travaux qui imposent des mesures de contrôle sur des sérums normaux de génotype connu, ont apporté des confirmations supplémentaires aux données énergétiques que nous avons établies.

Mais on connaît encore peu de choses sur les différences de structure que ces données ont fait découvrir parmi les agglutinines normales spécifiques à l'égard d'un même antigène. Une étude physico-chimique très poussée de ces agglutinines, portant en particulier sur la comparaison des molécules hybrides et homozygotes, devrait fournir des informations sur le mécanisme de leur biosynthèse. Ce travail\* qui a été entrepris par M<sup>me</sup> Filitti-Wurmser, progresse difficilement en raison de la labilité des agglutinines quand elles sont hautement purifiées.

Dans le cadre de ces recherches, l'emploi de Télélectrophorèse à élution continue a permis à M<sup>me</sup> Jacquot de montrer l'existence de nouvelles différences entre isoagglutinines naturelles et immunes.

Les recherches sur les macroglobulines ont été poursuivies par M<sup>me</sup> Filitti-Wurmser en collaboration avec L. Hartmann. L'effort a porté principalement sur les techniques de séparation et sur les mesures de coefficient de sédimentation dans les mélanges.

L'intérêt des macroglobulines en génétique et en pathologie rend utile de pouvoir séparer ces protéines  $k$  partir de petites quantités de sérum d'un même individu. On peut y parvenir par « centrifugation sur solvant piège ». Le procédé consiste à pratiquer des ultracentrifugations en introduisant au fond du tube une solution tampon de densité supérieure & celle de la solution protéique et dans laquelle viennent s'accumuler les molécules les plus lourdes. L'ensemble des macroglobulines étant ainsi séparées, on peut achever leur fractionnement en profitant des différences de solubilité.

Afin d'éliminer certaines difficultés dans l'interprétation des diagrammes d'ultracentrifugation, M<sup>me</sup> Filitti-Wurmser a étudié l'influence de la présence

des globulines et de Talbumine sur la sédimentation des macroglobulines et, réciproquement, l'influence de la présence des macroglobulines sur la sédimentation des globulines. Les effets observés ont été expliqués en tenant compte : 1° des différences de viscosité entre les deux espèces protéiques; 2° du fait que la protéine la plus légère se déplace derrière la frontière de la protéine lourde dans un milieu dépourvu de cette dernière.

L'ensemble des déterminations effectuées sur les  $\gamma$  globulines et macroglobulines permet d'établir une distinction entre une augmentation de protéines normales ou immunes et l'apparition de constituants, liés à un trouble de la biosynthèse. Le fait est particulièrement probant pour les protéines de la maladie de Kahler et de Waldenström. Dans chacune de ces deux maladies, les protéines normales sont différentes les unes des autres. Par exemple les macroglobulines ont des poids moléculaires variant de 75.000 à 1.500.000. Les données biochimiques actuelles ne permettent pas de choisir entre une origine génétique ou acquise de ces déviations de la biosynthèse protéique.

## II. — ENZYMOLOGIE

Les recherches dirigées par M<sup>me</sup> F. Labeyrie ont toujours pour objet le mécanisme de la catalyse par les lacticodéshydrogénases de la levure.

1. D-lacticodéshydrogénase : Rappelons que les travaux antérieurs avaient suggéré que deux cofacteurs dissociables, le zinc et la flavine adénine dinucléotide (FAD), sont nécessaires pour que l'enzyme atteigne sa pleine activité.

En ce qui concerne le zinc, son rôle était rendu probable parce qu'il est le seul ion qui, à basse concentration, peut réactiver rapidement et complètement l'enzyme inactivé par le versène. On pouvait toutefois penser que cet effet était dû à la formation d'un complexe enzyme-versène. M. Iwatsubo et M<sup>lle</sup> Curdel ont montré l'exactitude de la première explication. Un traitement acide de l'enzyme fournit un apoenzyme inactif qui peut être totalement réactivé par addition simultanée de FAD et de zinc.

M<sup>lle</sup> Curdel a étendu son étude de la fixation de certains métaux divalents, à la place de  $Zn^{++}$ . Elle a déterminé d'une part la stabilité des complexes formés (constantes de dissociation  $K_d$ ), d'autre part les propriétés enzymatiques de ces complexes (constante de Michaelis  $K_M$ , vitesse maximale  $V_m$ ). Le tableau suivant donne les résultats obtenus :

	Zn	Co	Mn	Ni	Cd	
$K_d$ .....	6	20	100	45	13	pM
$K_p^*$ .....	1,8	0,15	0,12			mM
$V_m$ .....	100	40	20		00	

Ces valeurs ne dépendent pas de la façon dont a été préparé l'enzyme sans exception, que ce soit par le versène ou par précipitation en milieu acide. Ces données expérimentales mettent en évidence un parallélisme dans les variations de  $K_M$  et  $V_m$ . La nature du métal influence donc principalement la vitesse de la réaction limitant le processus enzymatique global.

2. L-lactico-déshydrogénase : M. Baudras a continué l'étude de cet enzyme à partir duquel il était parvenu à préparer un apoenzyme hautement réactivable par l'addition de flavine mononucléotide (FMN). Les propriétés comparées de l'enzyme non traité et de l'enzyme reconstitué montrent une grande similitude à l'exception d'un point: la stabilité du complexe flavoenzyme. Celle-ci étant plus faible pour l'enzyme reconstitué que pour l'enzyme non traité, il devient possible d'aborder toute une série d'études qui ne pourraient être faites sur ce dernier. En particulier une série d'expériences parallèles faites par MM. Iwatsubo et Baudras a) observation fluorimétrique de la teneur en FMN libre, b) détermination enzymatique de la teneur en complexe FMN-protéine, ont permis de mettre en évidence l'existence d'une interaction positive entre les fixations de la flavine et du substrat sur l'enzyme.

### III. — ASSOCIATION DES GLOBINES A L'HEME

Le travail de M. Banerjee s'est développé comme il était prévu. Rappelons qu'il s'agit d'une étude sur la liaison hème-globine dans la méthémoglobine et la méthmyoglobine. M. Banerjee a pu montrer la réversibilité de cette association. On peut donc, dans ce cas, appliquer les lois thermodynamiques découlant des réactions d'équilibre et déterminer des constantes énergétiques.

La méthode est basée sur l'observation que certains corps (ligants) ayant un fort pouvoir complexant vis-à-vis de l'hème réagissent avec l'hémoprotéine et qu'il s'établit des équilibres couplés entre l'hème et la globine d'une part, et l'hème et le ligant d'autre part. Connaissant la constante d'équilibre de la réaction hème-ligant, on calcule, d'après les données expérimentales, celle qui correspond à l'équilibre hème-globine.

Cette constante a une valeur élevée. A pH 7, la réaction d'un dimère d'hème avec 2 molécules de globine correspond à une variation d'énergie libre de  $\Delta G^{\circ} = -21$  Kcal. environ. L'énergie de la liaison hème-globine est différente suivant l'état d'ionisation de l'hème. En outre la charge nette de la partie protéine influence l'équilibre. Des mesures effectuées à différents pH ont permis de calculer deux constantes d'équilibre correspondant respectivement à la méthmyoglobine acide et la méthmyoglobine ionisée, ainsi que l'énergie de l'effet produit par la charge nette.

Dans la méthémoglobine, la présence de quatre groupes prosthétiques laisse supposer des interactions entre les quatre groupes fixateurs de l'hème sur l'apoprotéine. L'intérêt doit se porter sur les quatre constantes d'association intrinsèques plutôt que sur la constante d'association globale.

M. Banerjee a obtenu une évaluation approximative des constantes intrinsèques correspondant à la fixation du premier et du quatrième groupe prosthétique dans la méthémoglobine. Les quatre constantes intrinsèques ne sont pas égales, ce qui montre l'existence des interactions entre les sites récepteurs. Le sens et l'étendue de ces interactions rappellent celles observées lors de l'oxygénation de l'hémoglobine.

## IV. — POTENTIELS D'OXYDORÉDUCTION

Les potentiels d'oxydoréduction des systèmes intervenant en biologie ont été longtemps l'objet principal des recherches de ce service. Bien que depuis 1945 une orientation nouvelle ait été prise, la question n'a jamais cessé de nous intéresser. Dans le Rapport sur les travaux effectués en 1960, nous avons mentionné une nouvelle détermination du potentiel d'oxydoréduction du système lactate-Pyruvate pour lequel existait une incertitude de quelques dizaines de millivolts. Nous avons repris avec M. Banerjee une autre détermination importante, celle des potentiels d'oxydoréduction des systèmes alanine ↔ pyruvate d'ammonium et valine ↔ α-cétoisovalérate d'ammonium. Si les mesures électrométriques que nous avons, M<sup>m</sup>e Filitti-Wurmser et moi-même, effectuées en 1939 sur ce dernier système, paraissaient satisfaisantes, il n'en était pas de même en ce qui concerne l'équilibre. Les expériences de longue durée alors nécessaires pour obtenir l'équilibre étaient rendues incertaines par l'instabilité du pyruvate en présence d'une préparation enzymatique insuffisamment purifiée. Nous nous sommes servis cette fois d'une D-aminoacide oxydase cristallisée, préparée par M. Iwatsubo. En appelant R le rapport [aminoacide]/[ion cétonique] [NH<sub>4</sub><sup>+</sup>], le potentiel E<sub>H</sub> du système par rapport à l'électrode normale d'hydrogène est

$$E_H = E^\circ - 0,03 \log R - 0,03 \log C + 0,06 \log (H^+)$$

C représente le rapport des coefficients d'activité. On a trouvé pour E<sup>o</sup> + 0,06 V (H ↔) à pH 7, à 30°, la valeur — 0,128 V, qui est très proche de celle que Ton peut calculer à partir de diverses données existant dans la littérature.

## V. — PHOTOSYNTHESE

Le groupe dirigé par M. Pierre Joliot a continué ses recherches sur la photosynthèse de *Clorella pyrenoidosa*. M. Delosme, utilisant la technique de dosage de l'oxygène dissous, mise au point au laboratoire, a achevé un travail dont les conclusions sont les suivantes : La respiration ne présente aucune variation notable de vitesse dans les secondes qui suivent l'arrêt de la photosynthèse. La vitesse de photosynthèse ne dépend pas de la concentration d'oxygène dans le milieu, à l'exclusion toutefois de l'anaérobiose totale. Enfin le rendement quantitatif maximum varie avec la longueur d'onde, comme l'avaient trouvé Emerson et Arnold. Il présente un maximum absolu de 1/8 molécule d'oxygène par quantum absorbé avec deux zones de décroissance pour les longueurs d'onde inférieures à 590 mμ et supérieures à 660 mμ.

Ces résultats confirment en somme des faits importants déjà observés par d'autres dans des conditions différentes. Mais l'étude tout à fait originale du complexe précurseur d'oxygène mis précédemment en évidence par M. Pierre Joliot est poursuivie activement. La technique ampérométrique a été améliorée, ce qui rend possible une détermination précise de la cinétique d'induction et par conséquent de la concentration d'équilibre du complexe, en fonction de la longueur d'onde.

Ces résultats préliminaires cadrent bien avec Tidée, aujourd'hui admise, de

l'existence de deux réactions photochimiques distinctes sensibilisées par des pigments différents.

Enfin, en vue de recherches indiquées dans le Rapport précédent, M. Morin a achevé le montage destiné à la mesure de l'intensité de fluorescence dans les premiers instants de l'illumination, ce qui nécessite un démasquage extrêmement rapide du faisceau.

---

### LISTE DES PUBLICATIONS

- R. BANERJEE. « Study of Hematin-Globin linkage. Determinations of equilibrium constants ». *Biochim. Biophys. Res. Com.*, 1952, 8, 114.
- R. BANERJEE. « Complexes entre métalloporphyrines et imidazoles substitués; l'histidylhistidine et le pilocarpinate ». *J. Chim. Phys.*, 1962, 943.
- R. BANERJEE. « Étude thermodynamique de l'association hème-globine. I. Equilibre de dissociation de la méthémoglobine ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 64, 368.
- R. BANERJEE. « Étude thermodynamique de l'association hème-globine. II. Méthémoglobine ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 64, 385.
- R. BANERJEE et R. WURMSER. « Potentiels d'oxydo-réduction des systèmes aianine pyruvate d'ammonium et valine α — cetoisovérate d'ammonium ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 59, 216.
- A. CURDEL. « D-lactico-déshydrogénase de la levure anaérobie. Fixation des métaux sur l'apoenzyme ». *C. R. Acad. Sc.*, 1962, 254, 4092.
- A. BAUDRAS. « Flavocytochrome b<sub>2</sub> of baker's yeast. Dissociation of flavin and reconstitution of lactic dehydrogenase activity ». *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 1962, 7, 3<sup>10</sup>.
- R. DELOSME. « Étude du rendement quantique de la photosynthèse et de sa variation avec la longueur d'onde de la lumière ». Thèse de Biologie physicochimique, Faculté des Sciences, Paris, 1962.
- S. FILITTI-WURMSER et L. HARTMANN. « Séparation des macroglobulines des sérums humains par ultracentrifugation sur solvant piège (barrière de densité) ». *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1962, 44, 725.
- S. FILITTI-WURMSER et L. HARTMANN. « Études physicochimiques des macroglobulines purifiées et des sérums humains normaux et pathologiques ». *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1962, 44, 919.
- M. IWATSUBO et A. CURDEL. « D-lactico-déshydrogénase from anaerobic yeast. Reversible dissociation of FAD and Zn by acid treatment of the holoenzyme ». *Biochim. Biophys. Res. Com.*, 1962, 6, 385.
- Y. JACQUOT-ARMAND. « Étude électrophorétique des isohémagglutinines humaines ». *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1962, 44, 47.
- Y. JACQUOT-ARMAND. « Isolement d'une macroglobuline OL<sub>1</sub> (α<sub>x</sub>M) dans le sérum de Rat normal ». *C. R. Acad. Sc.*
- R. WURMSER. « Albert Szent-Gyorgyi and Modern Biochemistry », in *Horizons & Biochemistry*.
-

*COMPOSITION DE SERVICE*

- M. RENÉ WURMSER, Professeur honoraire à la Faculty des Sciences.  
 M<sup>me</sup> s. FILITTI-WURMSER, Directeur de Laboratoire de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> Y. JACQUOT-ARMAND, Chargée de Recherches au C.N.R.S.  
 Mme p. LABEYRIE, Maître de Recherches au C.N.R.S.  
 M. PIERRE JOLIOT, Chargé de Recherches au C.N.R.S.  
 M. R. BANERJEE, Chargé de Recherches au C.N.R.S.  
 M. M. IWATSUBO, Chargé de Recherches au C.N.R.S.  
 M. M. SZYLIT, Attaché de Recherches au C.N.R.S.  
 M. R. DELOSME, Attaché de Recherches au C.N.R.S.  
 M<sup>Ue</sup> A. CURDEL, Attaché de Recherches au C.N.R.S.  
 M. A. BAUDRAS, Attaché de Recherches au C.N.R.S.  
 M. R. CHABAUD, Assistant à la Faculté des Sciences.  
 M. PH. MORIN, Attaché de Recherches au C.N.R.S.  
 M. R. CASSOLY, Boursier de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique.
- M<sup>ne</sup> N. NASLIN, Chimiste adjointe au C.N.R.S.  
 M<sup>ne</sup> D. WAECKERLfi, Secrétaire au C.N.R.S.  
 M. L. SAGAERT, Ingénieur-Physicien au C.N.R.S.  
 M<sup>Ue</sup> C. GALLfi, Ingénieur-Physicien au C.N.R.S.  
 M<sup>me</sup> j. ZALTA, Physicienne adjointe au C.N.R.S.  
 M<sup>Ue</sup> C. BOURGEOIS, Biologiste adjointe au C.N.R.S.  
 M<sup>me</sup> M. DELOSME, Biologiste adjointe au C.N.R.S.  
 M<sup>me</sup> J. BOTTAGISIO, Aide physicien au C.N.R.S.  
 M. A. SPYRIDAKIS, CoUaborateur Technique (à la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique).
- M<sup>ne</sup> J. LE FEUVRE, Chimiste adjointe au C.N.R.S.  
 M<sup>me</sup> S. LAROCHE, Chimiste adjointe au C.N.R.S.

*Professeurs invités :*

- M. H. EDELHOCH, National Institute of Health, Bethesda.  
 M. PH. FEIGELSON, Columbia University.

## SERVICE DE BIOCHIMIE THEORIQUE

Rapport de M. BERNARD PULLMAN, Chef de Service.

### I. — STRUCTURE ÉLECTRONIQUE DES ACIDES NUCLÉIQUES

Tout comme pour les expérimentateurs, les acides nucléiques sont pour les biochimistes théoriciens une source inépuisable de problèmes et de découvertes. L'approfondissement de nos connaissances sur les caractéristiques électroniques de la structure de ces composants fondamentaux de la matière vivante reste au centre de nos préoccupations. Pendant l'année écoulée nous nous sommes surtout préoccupés des aspects de cette structure liés aux problèmes des mutations et de la carcinogénèse.

Déjà dans le rapport précédent nous avons indiqué de quelle façon la détermination des indices de structure électronique des bases puriques et pyrimidiques des acides nucléiques permettait de prévoir ou d'interpréter, selon le cas, le site et le mode d'action de différents types d'agents mutagènes. Il s'agissait là en particulier d'agents dont le lieu d'action est très localisé, se situant sur un atome ou  $k$  la rigueur, sur un groupe d'atomes déterminés : agents alcoylants, attaquant préférentiellement N<sub>7</sub> de la guanine, le formaldéhyde, attaquant surtout le groupe NH<sub>2</sub> de l'adénine, l'acide nitreux, provoquant préférentiellement l'oxydation de la guanine etc. Les recherches présentes ont eu pour objet, d'une part, le mécanisme des mutations spontanées et, d'autre part, l'action d'agents mutagènes aromatiques dont le mode d'interaction avec les acides nucléiques est différent de celui des agents précités.

Ainsi A. et B. Pullman ont étudié les probabilités des mutations spontanées dues à la possibilité d'existence des bases puriques et pyrimidiques dans leur forme tautomère rare. En effet, si ces bases existent essentiellement sous la forme lactam et amine (résultats qui s'accordent avec les calculs quantiques sur la stabilité relative des différentes formes tautomères possibles), il est néanmoins admis, d'après une suggestion originale de Watson et Crick, que les mutations spontanées pourraient avoir pour origine l'intervention des formes tautomères rares (lactim ou imine). La présence d'une forme rare peut provoquer un couplage par liaisons hydrogène, avec une base complémentaire inhabituelle et conduire à une transmission héréditaire d'un ordre perturbé de la séquence des paires purine-pyrimidine. Du point de vue théorique il peut être intéressant de rechercher laquelle des bases puriques ou pyrimidiques des acides nucléiques présente la plus grande probabilité d'exister dans une forme tautomère rare. Or le facteur variable essentiel responsable de la tendance relative de ces bases  $k$  à exister sous une

telle forme est la variation de l'énergie de résonance accompagnant la transformation tautomère. Les calculs explicites de ces énergies montrent que la base ayant la plus grande tendance à exister dans une forme tautomère rare est la cytosine qui doit donc être considérée comme ayant la plus grande probabilité d'être impliquée dans les mutations spontanées. Vient ensuite la guanine. La probabilité de l'existence dans une forme rare de l'adénine et surtout de l'uracile est nettement plus petite. Cet état de choses est peut-être en relation avec le rôle prédominant de l'uracile dans le « code génétique ».

Le même principe a également été appliqué à l'étude des mutations induites par des analogues des bases puriques et pyrimidiques (2-aminopurine, 5-bromouracile).

D'autre part, B. Pullman a recherché quels étaient les facteurs électroniques susceptibles d'être responsables de l'activité mutagène des aminoacridines. Ces composés aromatiques agissent probablement en s'intercalant « en sandwich » entre des paires successives de bases puriques-pyrimidiques complémentaires. Leur interaction avec les acides nucléiques met en jeu probablement des forces de Polarisation comportant des composants du type transfert de charges, interaction dipôle-dipôles induits et Van der Waals. Les caractéristiques électroniques intervenant dans ces composantes ont été évaluées et une corrélation établie entre le Pouvoir mutagène et la charge de l'azote du noyau de l'acridine. Le problème se rattache aux travaux de A. et de B. Pullman sur la solubilisation des hydrocarbures cancérigènes par les purines, qui comporte la formation de complexes analogues. Le rôle important joué dans l'établissement de ces complexes par le pouvoir donneur d'électrons des purines, mis en évidence par les auteurs précités, a été confirmé par Boyland.

## II. — STRUCTURE ÉLECTRONIQUE DES PROTÉINES

Poursuivant les travaux antérieurs de Suard, Berthier et Pullman sur l'existence possible et l'emplacement des bandes d'énergie dans les protéines, M<sup>me</sup> Suard a apporté divers perfectionnements techniques aux résultats précédemment obtenus. En premier lieu, elle a introduit dans les calculs l'interaction de configurations, perfectionnement souhaitable étant donné la longueur des liaisons hydrogène. En second lieu, elle a introduit explicitement dans le calcul la participation de l'orbitale 2p de l'hydrogène dans la délocalisation électronique. L'effet de cet ensemble de perfectionnements a été restreint indiquant par la caractéristique satisfaisant des résultats initiaux. On peut donc considérer dans l'ensemble que le modèle adopté correspond à l'existence probable dans les protéines de quatre bandes d'énergie dont trois sont entièrement pleines et une complètement vide. L'énergie d'excitation pour le transfert d'un électron de la plus haute bande pleine à la plus basse bande vide est légèrement supérieure à 5 ev.

### III. — MÉCANISME D'ACTION DES HYDROCARBURES CANCÉROGÈNES

En développant dans une direction nouvelle ses travaux sur le mécanisme d'action des agents chimiques cancérigènes, M<sup>me</sup> A. Pullman a commencé une série de

recherches sur les modalités probables de Interaction même de ces agents et en particulier des hydrocarbures aromatiques avec les récepteurs cellulaires, siège le plus probable des phénomènes conduisant à la cancérisation. Comme première étape dans cette recherche, elle a soumis à un examen critique un certain nombre de théories que Ton peut peut-être appeler « physiques » pour les distinguer des théories essentiellement « chimiques » considérées précédemment (la distinction étant surtout utilitaire, beaucoup plus que fondamentale), proposées récemment par des chercheurs anglais et ayant pour objet les interactions protéines-hydrocarbures cancérogènes.

Deux de ces théories ont été particulièrement examinées :

1) La théorie de R. Mason qui postule que la carcinogenèse pourrait être due à l'existence d'un transfert d'électrons de la plus haute bande pleine des protéines sur une orbitale moléculaire libre de l'hydrocarbure. La conception est absolument gratuite, encore s'agissait-il de montrer qu'elle est incorrecte. En effet, la théorie de Mason comportait une corrélation entre l'existence d'un pouvoir cancérogène et la présence dans les composés cancérogènes d'une énergie

TABLEAU I. — Résultats de A. et B. Pullman relatifs à la théorie de Mason<sup>1</sup>.

Composé	Energie de transition dans la zone active de Mason		Pouvoir cancérogène <sup>e</sup>
	en eV	en kcal	
1, 2, 3, 4-Dibenzphénanthrène . . . . .	—	1-334	+
1, 2, 5, 6-Dibenzphénanthrène . . . . .	1.100, 1.152	—	+
1,2, 3,4-Dibenzpyrine . . . . .	—	—	—
3,4,9, 10-Dibenzpyrène . . . . .	—	—	—
1, 2, 6, 7-Dibenzpyrène . . . . .	1.100	1.296	—
2', 3'-Naphtho-3, 4-pyrène . . . . .	—	—	—
1, 2, 7, 8-Dibenznaphtacène . . . . .	—	—	—
1, 2, 9,10-Dibenznaphtacène . . . . .	1.161	1-33 <sup>1</sup>	—
1, 2, 3,4-Dibenznaphtacène . . . . .	1.102	—	—
2, 3, 7, 8-Dibenzphénanthrène . . . . .	1.109	—	—
2, 3, 5, 6-Dibenzphénanthrène . . . . .	—	—	—
1, 2-Benzpyrène . . . . .	—	1-317	—
2, 3, 8, 9-Dibenzpérylene . . . . .	IMS	1.263	—
1, 2-Benznaphtacène . . . . .	1.172	—	—
2', 1'-Anthra-i, 2-anthracène . . . . .	" 3 5	1.299	—
1', 2'-Anthra-i, 2-anthracène . . . . .	1*152	1.318	—
4, 5,10,11-di (1', 2'-naphtochrysène) . . . . .	1.178	1-343	—
3,4, 9,10-di (2', 3'-naphtopyrène) . . . . .	—	—	++++
Naphtodianthrène . . . . .	1.177	—	—
3', 2'-Phénanthra-3, 4-pyrène . . . . .	1.157	1.276	—
1,2, 3,4, 5,6-Tribenzanthracène . . . . .	1.160	—	—
2', 3'-Phénanthra-i, 2-anthracène . . . . .	1.170	1.298	—

1. Selon la théorie de Mason tous les composés ayant une énergie de transition dans la zone active devraient être cancérogènes et tous ceux qui n'en ont pas devraient être inactifs.

d'excitation entre la plus haute orbitale occupée et une orbitale libre d; une valeur comprise entre 1,10 - 1,18 p ou 1,248 - 1,348 Y- Cette corrélation était proposée par Mason sur la base d'une étude de 22 hydrocarbures polybenzéniques. Outre une critique de fond de certains postulats physiques de la théorie de Mason, A- et B. Pullman ont pu montrer par l'étude de 22 hydrocarbures polybenzéniques complémentaires que la prétendue corrélation n'existait, en fait, pas (tableau i).  
 j a) La théorie de Birks qui, elle, postule que la carcinogénèse pourrait être due à un transfert d'énergie par résonance entre le noyau tryptophane des protéines et l'hydrocarbure cancérigène. La conception est, tout, comme h<sup>^</sup> précède, gratuite mais là aussi il fallait encore \* \* \* ^ - V & ^ r " £ £ ?ans ce cas également, la théorie avait pour base une corrélation f\*J£«££ du pouvoir cancérigène et la valeur d'une intégrale J<sub>v</sub> du type de 1 £ \* \* \* Pöster, mesurant le recouvrement du spectre de fluorescence du tryptophane avec la

TABLEAU II. - Résultats de A. Puttman et H. Berthod relatifs à l'étude de Birks

Composé	J <sub>1</sub>	Pouvoir cancérigène
3-Benzanthracène	2.000	+
5, 6-Dibenzphénanthrène	1.380	+
3, 4-Dibenzphénanthrène	1.200	+
9, 10-Dibenzpyrène	160	++++
170		-
Naphtacène	600	-
350		-
6-Dibenzphénanthrène	3.400	-
8-Dibenzphénanthrène	2.100	-
3i 5, 6-Dibenzphénanthrène	4.100	-
Pérylène	3.800	-
2-Benznaphtacène	1.350	-
2, 6, 7-Dibenzpyrène	5.900	-
3, 4, 6, 7-Dibenzpyrène	8.400	-
3-Naphto-3,4-pyrène	4.200	-
1>thranthrène	4.100	-
3i 4, 5, 6-Tribenzanthracène	6.500	-
7, 8-Dibenznaphtacène	3.700	-
9, 10-Dibenznaphtacène	10.000	-
3, 4-Benzpentaphène	4.500	-
Anthracène, 2-anthracène	8.300	-
3, 8, 9-Dibenzpérylène	4.600	-
4, 9, 10-di (2', 3'-naphto)-pyrène	3.000	-
5, 6-benzacridine	3.600	-
Méthyl-5, 6-benzacridine	3.800	-
10-Diméthyl-5, 6-benzacridine	3.400	+++
10-E)iméthyl-7, 8-benzacridine	3.300	++
10-Diméthyl-7, 8-benzacridine		

1. Selon la théorie de Birks tous les composés avec J<sub>1</sub> > 2.000 sont considérés comme actifs et tous les composés avec J<sub>1</sub> < 2.000 devraient être inactifs.

bande d'absorption de plus grande longueur d'onde de Hydrocarbure. La démonstration de la corrélation par Birks comportait l'étude de 17 hydrocarbures. M<sup>mes</sup> A. Pullman et H. Berthod ont étendu cette étude à 21 nouvelles substances et cette extension a démontré qu'aucune corrélation du genre postulé par Birks n'existait en réalité (Tableau II).

#### IV. — FACTEURS ELECTRONIQUES DANS L'EVOLUTION BIOCHIMIQUE

Le développement prodigieux récent de nos connaissances sur la structure des acides nucléiques et des protéines, sur les mécanismes présidant à la biosynthèse de ces importants constituants cellulaires (et des autres) et aussi peut-être la perspective des voyages interplanétaires ont eu pour conséquence de susciter un grand intérêt pour les problèmes de révolution biochimique. Il s'agit là de révolution prébiologique, autrement dit de la synthèse et la sélection des constituants fondamentaux de la matière vivante.

A. et B. Pullman ont mis en évidence le rôle primordial de la délocalisation électronique comme un des facteurs directeurs de cette évolution. Partant de la constatation que la grosse majorité des constituants cellulaires fondamentaux, jouant un rôle actif dans les phénomènes de la vie (acides nucléiques, protéines, phosphates riches en énergie, porphyrines, ptéridines, quinones, caroténoïdes, rétinènes et pratiquement tous les coenzymes) sont formés de systèmes organiques conjugués, riches en électrons  $\pi$ , ils ont avancé la proposition selon laquelle le choix évolutionnaire de ces composés en tant que vecteurs de la vie était dû aux phénomènes de délocalisation électronique dont ces substances sont les sièges. En effet, cette délocalisation procure à ces molécules deux avantages qui ont pu être décisifs dans ce choix. En premier lieu, leur *stabilisation énergétique* par résonance représente un allègement inespéré du coût énergétique des réactions de biosynthèse. Parmi les manifestations particulièrement frappantes de ce facteur on peut considérer, par exemple, la multiplicité des fonctions des porphyrines et peut-être aussi le rôle privilégié joué en biochimie par l'adénine. A cette stabilisation thermodynamique, il faut ajouter une stabilisation parallèle vis-à-vis de l'effet des radiations ionisantes et ultraviolettes.

En deuxième lieu, la délocalisation électronique confère aux substances biologiques dans lesquelles elle se produit un certain nombre d'avantages fonctionnels particulièrement importants pour le mécanisme des transformations métaboliques. Le rôle de ce facteur est manifeste dans le choix quasi-exclusif des molécules organiques conjuguées en tant que coenzymes dans les réactions biochimiques.

Une étude plus approfondie du problème montre le rôle particulièrement important pour la manifestation maximum de ces différents types d'avantages la présence dans les biomolécules conjuguées d'hétéroatomes disposant de paires électroniques libres sur leur couche de valence, comme c'est le cas, en particulier de l'oxygène et de l'azote, et aussi du phosphore et du soufre. Cette démonstration explique le choix évolutionnaire des systèmes hétérocycliques contenant ces éléments dans l'élaboration des substances ayant une utilité biochimique.



deux, un mécanisme de polymérisation par union des carbones 4 et 7 de l'indole — 5,6 — quinone.

M<sup>lle</sup> A. M. Pérault a montré que le mécanisme de fonctionnement de la xanthine déshydrogénase pouvait être interprété selon les mêmes principes que celui de la xanthine oxydase étudiée précédemment.

A. Veillard a poursuivi des recherches sur l'utilisation de la résonance nucléaire magnétique pour l'étude de la structure électronique des molécules biochimiques.

M<sup>lle</sup> C. Valdemoro a étudié la structure électronique d'un grand nombre des N -oxydes aromatiques dont certains ont un important rôle biochimique.

G. Berthier a poursuivi ses recherches sur une méthode de calcul la moins empirique possible et cependant utilisable dans le cas de grandes molécules et aussi sur l'emploi des méthodes matricielles en chimie quantique.

W. Kutzelnigg a effectué des recherches sur des orbitales naturelles des systèmes de deux électrons.

M<sup>me</sup> Baudet, en collaboration avec G. Berthier, a mis au point une méthode perfectionnée pour le calcul itératif des orbitales moléculaires self-consistantes pour des états & couches'incomplètes, ainsi qu'une méthode perfectionnée pour le calcul des densités de spin.

Parmi les activités diverses du service, on peut encore citer :

1) La préparation par A. et B. Pullman d'un ouvrage (environ 850 pages) « Quantum Biochemistry ». Publié par Wiley's Interscience Division, cet ouvrage doit paraître en mai 1963 ;

2) Torganisation par B. Pullman, sous les auspices de TOTAN, d'une ficole d'été de Biologie Moléculaire qui doit se tenir en septembre 1963 à Ravello, en Italie. L'ficole doit être suivie d'un Colloque de trois jours sur « Les aspects électroniques de la Biochimie ».

---

### LISTE DES PUBLICATIONS

A. PULLMAN. « On the possibilities of correlating the redox potential of reversible systems to the molecular orbitals involved in the electron transfer ». *J. Theoret. Biol.*, 1962, 2, 259.

A. PULLMAN. « Relations entre le potentiel d'oxydo-réduction des systèmes réversibles et les indices caractéristiques de leur structure Electronique ». *Tetrahedron*, sous presse.

A. PULLMAN et B. PULLMAN. « From Quantum Chemistry to Quantum Biochemistry J dans « Horizons in Biochemistry », A. Szent-Györgyi Dedicatory Volume, édité par B. Pullman et M. Kasha, Academic Press, New-York, 1962.

A. M. PERAULT. « Some electronic aspects of the mechanism of action of clostridial xanthine dehydrogenase ». *J. Theoret. Biol.*, 1962, 2, 263.

G. BERTHIER. « Emploi des méthodes matricielles pour le calcul de la structure électronique des grandes molécules conjuguées ». *Tetrahedron*, sous presse.

M. SUARD. « Sur les états électroniques des protéines. Introduction de l'interaction des configurations ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 59, 227.

- J- BAUDET, G. BERTHIER et B. PULLMAN. « Recherches théoriques sur la repartition des densités de spin dans les molécules d'intérêt biochimique ». *C. R. Acad. Sci.*, 1962, 254, 762.
- M. SQUARD. « Sur les états électroniques des protéines. Participation de l'atome d'hydrogène des liaisons hydrogène à la conjugaison entre chaînes polypeptidiques ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 64, 400.
- PULLMAN et B. PULLMAN. « La tautomérie des bases puriques et pyrimidiques et la fréquence des mutations ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1962, 64, 403.
- PULLMAN et B. PULLMAN. « Electron transfer and carcinogenesis ». *Nature*, 1962, 193, 228.
- M. PERAULT et B. PULLMAN. « Electronic aspects of enzymatic acetyl transfer reactions ». *Biochim. Biophys. Acta*, sous presse.
- PULLMAN. « Sur la biogenèse des indolines ». *Biochim. Biophys. Acta*, sous presse.
- VEILLARD. « Le déplacement chimique en résonance magnétique nucléaire dans les hétérocycles aromatiques d'intérêt biochimique ». *J. de Chimie-Physique*, 1962, 59, 1056.
- PULLMAN. « A quantum-mechanical investigation of pyridoxal-dependent reactions ». Communication présentée au Symposium International sur les aspects biologiques « chimiques de l'action du pyridoxal, Rome, octobre 1962, sous presse.
- PULLMAN. « The specific reactivity of chlorins towards an electrophilic attack on the methine bridges ». *J. Amer. Chem. Soc.*, sous presse.
- PULLMAN. « Charge density, chemical reactivity and basicity of purine ». *Tetrahedron Letters*, sous presse.
- PULLMAN et A. PULLMAN. « Electronic delocalization and biochemical evolution ». *Nature*, 1962, 196, 37.
- PULLMAN et H. BERTHOD. « Excitation transfer and carcinogenesis ». *Biochim. Biophys. Acta*, sous presse.
- PULLMAN. « Structure électronique, effet mutogène et aptitude à former des complexes « en sandwich » des aminoacridines ». *C. R. Acad. Sci.*, 1962, 255, 3255.
- VEILLARD et B. PULLMAN. « Études par la méthode du champ moléculaire self-consistent de la structure électronique des bases puriques et pyrimidiques d'intérêt biochimique ». *J. Theoret. Biol.*, sous presse.
- AUTZELNIGG. « Zur Verwendung der vollständigen Laguerre-funktionen der quantumchemischen Rechnung ». *Theoretica Chimica Acta*, sous presse.
- AUMEMORO. « Estudio teórico de los Nitrogeno-óxidos ». Thèse de Doctorat en Sciences, soutenue à l'Université de Madrid en octobre 1962.

---

### COMPOSITION DU SERVICE

- M. B. PULLMAN, Professeur à la Faculté des Sciences.
- Mme A. PULLMAN, Directeur de Recherches au C.N.R.S.
- M. G. BERTHIER, Maître de Recherches au C.N.R.S.
- Mlle J. SERRE, Professeur à l'École Normale Supérieure de Jeunes Filles de Sévres.
- M. T. YONEZAWA, Professeur à l'Université de Kyoto (Japon).

- M. S. GIBAJA, Professeur à l'Université de Lima (Pérou).  
M<sup>me</sup> H. BERTHOD, Chargte de Recherches au C.N.R.S.  
M<sup>lle</sup> A. M. PERAULT, Chargée de Recherches au C.N.R.S.  
M<sup>me</sup> J. BAUDET, Assistante à la Faculté des Sciences.  
M<sup>me</sup> M. SUARD, Agrégée-Préparatrice à l'École Normale Supérieure de Jeunes Filles de Sèvres.  
M. A. VEILLARD, Agrégé-Préparateur à l'École Normale Supérieure.  
M<sup>Ue</sup> C. VALDEMORO, Chercheur Stranger (Espagne).  
M. W. KUTZELNIGG, Boursier de l'OTAN (Allemagne).  
M. S. DINER, Attaché de Recherches au C.N.R.S.  
M. A. SUREAU, Attaché de Recherches au C.N.R.S.  
M<sup>lle</sup> A. CLÉMENT, Stagiaire de Recherches au C.N.R.S.  
M<sup>me</sup> C. MOREAU, Boursière du 3<sup>e</sup> Cycle.  
M<sup>lle</sup> C. CAILLY, Boursière du Comité « Cancer et Leucémie ».  
M<sup>me</sup> M. J. MANTIONNE, Boursière du Comité « Cancer et Leucémie ».  
M. P. MILLIFI, élève de l'École Normale Supérieure.  
M. J. P. MALRIEUX, élève de l'École Normale Supérieure.  
M. B. LIVY, élève de l'École Normale Supérieure.  
M. R. ASTIC, Collaborateur technique.  
M<sup>me</sup> P. FRANCOIS, Collaborateur technique.  
M<sup>me</sup> M. LANDEZ, Secrétaire.

## SERVICE DE BIOCHIMIE A

Rapport de M<sup>TM</sup> Y. KHOUVINE, Chargée de Service.

Mes collaborateurs continuent à étudier le métabolisme des nucléoprotéides « ceux de M. le Professeur Rosenberg, la biochimie de la cancération.

### I. — BIOCHIMIE DES NUCUOPROT&DES

A. — M. C. E. Sripati étudie les relations nucléocytoplasmiques des cellules « foie normal, d'ascites et de l'épithélioma T8 de Guérin. En particulier, il a cherché à savoir si le noyau est, en un certain sens, autonome pour ses réactions de glycolyse, ou s'il a besoin du cytoplasme, véritable réservoir d'enzymes glycolytiques.

Il a d'abord mis au point une méthode de préparation lui donnant des noyaux, non seulement paraissant purs, mais ne possédant plus les activités enzymatiques caractéristiques des mitochondries, par exemple, de la cytochrome oxydase ou de la succinodeshydrogenase. En outre, il a constaté que l'ATPase des noyaux, généralement activée par Mg<sup>++</sup>, ne Test pas par le dinitrophénol, activant bien connu de l'ATPase des mitochondries. Les noyaux ont conservé les divers enzymes glycolytiques, mais ils ne possèdent pas d'hexokinase. Les noyaux obtenus par Sripati peuvent donc être considérés comme purs et intacts.

Avec M. D. Szafarz, il a montré que ces noyaux, ajoutés à un liquide cytoplasmique, provenant de centrifugations à 105.000 g, inhibent la glycolyse anaérobie du glucose, mais activent celle de l'ATP. Ceci est dû à une diminution de l'ATP, conduisant à la diminution de l'activité de l'ATPase, donc à l'impossibilité d'utiliser le glucose, ce qui a été prouvé par la diminution d'ATP aux lieux d'incubation. D'autre part, l'ATPase étant inhibée par du fluorure, on ne peut la rendre responsable de la diminution de l'ATP. Sripati et Szafarz ont étudié les vitesses de phosphorylation dans le noyau, le cytoplasme et le cytosol en présence de noyaux, en présence et en absence d'AMP. Ils ont étudié les échanges en présence d'AMP-C<sup>14</sup> et à séparer les nucléotides par chromatographie. Us ont constaté que l'AMP est rapidement phosphorylé en ATP, plus lentement, en adénosine et en hypoxanthine, par réaction kinasique du type  $ATP + AMP \rightarrow 2 ADP$ . Us en concluent que le noyau seul, capable de glycolyser les sucres phosphorylés en présence d'ATP, peut être produit aux dépens de l'ADP et de l'AMP, par l'inter-

médiaire des myokinases nucléaires. L'AMP peut provenir du cytoplasme puisqu'U peut traverser la membrane nucléaire. Il est probablement le facteur limitant de cette réaction.

Poursuivant l'étude des particules qui sortent du noyau pendant l'incubation à 37° C, MM. Sripathi et Szafarz déterminent la composition en bases de TARN, ADN et protéines de deux types de particules nucléaires : celles qu'on obtient par broyage mécanique et celles qui sortent des noyaux au cours de l'incubation à 37° C, à partir des cellules de foie normal et de celles de Fépithélioma T8 de Guérin, ces dernières étant dans un état de division très active.

Us ont montré que les particules obtenues mécaniquement sont pauvres en ADN et en ARN, mais riches en protéines et que les rapports ARN/ADN = 0,2. Les particules obtenues après incubation sont relativement riches en ADN et les rapports ARN/ADN = 0,06. Ces différences se retrouvent aussi bien avec les cellules normales hépatiques qu'avec les cellules néoplasiques de Tépithélioma T8-

B. — Pour étudier les relations nucléocytoplasmiques dans la synthèse d'un ARN viral, synthétisé dans le noyau, mais qui participe à la synthèse des protéines cytoplasmiques, M. J.-P. Zalta et M<sup>lle</sup> R. Rozenchwajg ont commencé par la mise au point d'une méthode de préparation de noyaux purs à partir de cellules d'ascites d'Erhlich et de Thépatome de Zajdela, noyaux particulièrement difficiles à préparer.

En utilisant deux agents tensio-actifs, Tun qui élimine les contaminations dues aux particules cytoplasmiques, Tautre qui rend la membrane nucléate fragile, ils ont obtenu des noyaux dont la pureté a été contrôlée au microscope électronique par M<sup>lle</sup> Carasso et M. Favart. Avec ces noyaux, d'une grande pureté, M. J.-P. Zalta étudie, en collaboration avec M. Huppert, la synthèse de l'ARN dans des noyaux de cellules d'ascite d'Erhlich, infectées par un virus. Ils ont pu obtenir une synthèse d'ARN viral, mise en évidence par l'augmentation du pouvoir infectieux. Ils se proposent, ensuite, d'étudier la synthèse de la protéine virale ainsi que le rôle joué par le système enzymatique différent du système classique et dont M. J.-P. Zalta a montré l'existence dans les ribosomes.

Avec M<sup>lle</sup> R. Rozenchwajg, M. J.-P. Zalta étudie l'incorporation des acides aminés dans les protéines nucléaires et dans les fragments des noyaux de cellules d'ascite préparés à l'aide d'agents tensio-actifs.

Avec M<sup>lle</sup> J. Combe, M<sup>lle</sup> L. Hirschbein a montré, à partir des fragments de noyaux de Tépithélioma T8, qu'on peut isoler, après incubation en présence d'acides aminés marqués, une fraction radioactive soluble dans HCL 0,2 N. Mais cette fraction n'est pas une véritable histone, car elle est dialysable. Elle est cependant, de nature protéique, ou tout au moins, polypeptidique. Elle contient de nombreux acides aminés, en particulier, les acides bibasiques. Les noyaux de l'épithélioma se comportent donc comme ceux du placenta humain. Cependant, contrairement à plusieurs auteurs, nous n'avons pu montrer qu'une histone de tissu cancéreux échange ses acides aminés contre des acides marqués, alors qu'une histone de tissu normal ne le fait pas. Pour nous, une histone de tissu normal se comporte tout à fait comme une histone néoplasique. Il est vrai que les histones sont toujours dialysées avant que leur radioactivité soit mesurée, alors qu'elles ne le sont pas dans les travaux étrangers. La question de l'activité biologique des histones n'est donc pas encore résolue.

M. L. Benaroché continue à purifier des histones de placenta humain et d'épithélioma par adsorption sur Sephadex et par électrophorèses sur gel d'amidon et sur Sephadex. Il cherche à obtenir des histones homogènes, ne donnant qu'un seul constituant à l'électrophorèse ou par analyse des groupements N terminaux. D a déjà préparé certaines fractions qui semblent homogènes et va commencer les analyses.

D. — Sur des cultures d'*Escherichia coli* en milieu synthétique, M. R. Sutra étudie l'action de la chlorpromazine à des concentrations variant de  $2 \cdot 10^{-5}$  à  $5 \cdot 10^{-5}$  M. Entre ces limites, la chlorpromazine provoque un retard de croissance sans modifier le temps moyen du développement d'une génération (1 h. 35 m), en phase exponentielle. A la concentration de  $6 \cdot 10^{-5}$ , la culture est complètement inhibée.

M. Sutra a cherché à élucider le mode d'action de la chlorpromazine sur les acides nucléiques d'*E. coli*, en particulier à l'aide d'acide orotique marqué par  $^{14}C$ , à la concentration de  $6 \cdot 10^{-5}$  M. Il a constaté que cet acide n'est pas incorporé dans les cellules, aux erreurs d'expériences près, et ne convient donc pas à des mesures de renouvellement de l'ARN.

M. Sutra a également utilisé l'adénine- $^{14}C$  comme précurseur et constate qu'elle n'a aucun effet sur la croissance de la culture, tout en étant incorporée, surtout dans la phase de latence. Cette incorporation est plus lente dans la phase exponentielle. Enfin, elle est plus faible en présence de chlorpromazine.

## II. - METABOLISME CELLULAIRE

A. - M. A.-J. Rosenberg, M<sup>TM</sup> R. Emanoil-Ravicovitch et M<sup>TM</sup> C. H<sup>TM</sup> érisson-  
C ont poursuivi leurs recherches sur le métabolisme flavinique et la détoxification pendant la période précancéreuse, en mettant des rats à des régimes carencés en flavines, en protéines et en leur ajoutant du jaune d'œuf. Par les flavines au cours de la détoxication les a conduits à étudier l'enzyme flavinique, l'azobenzène réductase.

En régime standard équilibré, la réaction de détoxication est du 1<sup>er</sup> ordre. En régime cancérigène, la courbe se rapproche d'une sigmoïde. Après 4 mois de régime, le taux de flavines du rat ayant beaucoup baissé. Après 4 mois de régime, la diminution de l'apoenzyme s'ajoute à celle du DAB.

Pour cette étude comparative des différents régimes, on a étudié la détoxication au cours de la période de latence, la carence en flavines et en protéines; toutefois, la carence en flavines et en protéines, donne seul, surtout sur la diminution de l'apoenzyme.

Les effets qu'ils ont observés correspondent à des transformations histologiques, comme le montrent des examens pratiqués par exemple dans le service de M. le Professeur A. Lacassagne.

M. A. J. Rosenberg, M. R. Emanoil-Ravicovitch et M. C. H. ont étudié l'influence de l'hydrocortisone et de l'azobenzène réductase, montrant que l'hydrocortisone augmente le

taux de flavines totales et le taux de l'azobenzène réductase tandis que l'hormone thyroïdienne n'agit pas sur le taux de flavines ni sur la réaction enzymatique.

B. — M. A.-J. Rosenberg, M<sup>lle</sup> C. Rameix et M. A. Endo ont étudié les variations d'activité de quelques enzymes pendant la cancérisation et les carences en flavines et en protéines : l'aldolase, la glycéraldéhyde phosphate déshydrogénase, la 3-phosphokinase, la lactico-déshydrogénase, la glycérophosphate déshydrogénase, l'enzyme malique, la malico-déshydrogénase, la glutamate-pyruvate transaminase et la glutamate-oxalacétate transaminase. Us ont donc étudié quelques enzymes de la glycolyse et du cycle de Krebs et 2 transaminases. Les dosages ont été faits en suivant la variation du DPN ou du TPN, soit parce que ces substances sont les co-facteurs des enzymes étudiés, soit parce qu'on fait un couplage avec une réaction catalysée par une déshydrogénase dont le co-facteur est le DPN.

Us ont observé que les variations enzymatiques se placent toujours entre les valeurs qu'on trouve pour l'état normal et celles qu'on trouve pour l'état cancéreux et précèdent les lésions histologiques observées dans le service de M. le Professeur A. Lacassagne.

Comme pour l'étude de la détoxification, les comparaisons ont été faites entre un régime normal, équilibré, un régime carencé en flavines et en protéines et ce dernier régime additionné de jaune de beurre. Us ont montré que l'activité des enzymes du foie varie dès qu'on modifie le régime normal, mais qu'après 6 jours, les effets sont imputables au DAB ou (et) à la carence protéique. L'activité des enzymes du métabolisme glucidique augmente avec les trois types de régime, alors que les transaminases diminuent ou même disparaissent dans la cellule tumorale. Pour qu'elles diminuent, au cours de la carence seule, il faut maintenir les rats 8 mois au régime carencé.

M. A.-J. Rosenberg, M<sup>me</sup> A. Fourcade et M<sup>lle</sup> A. Ruet ont mis au point une technique de préparation, contrôlée au microscope électronique, qui permet d'obtenir des mitochondries de petite taille (M) et de grande taille (G) dont on a étudié quelques propriétés biochimiques. Les phosphorylations oxydatives sont différentes entre les deux types et le quotient respiratoire du type G est le double de celui du type M. En outre, les agents de gonflement, actifs sur M, sont sans action sur G. Ceci tend à montrer que le type G correspond à un état de gonflement plus grand que celui de M ou à une étape différente dans le «turn over» mitochondrial.

Continuant leur étude de la teneur en eau des mitochondries, mais cette fois-ci en présence de saccharose-C<sup>14</sup>, ils ont mis en évidence un effet inhibiteur du saccharose, même à l'état de traces, sur l'effet stabilisateur de l'ADP.

Enfin, par des méthodes cinétiques, ils ont montré que les mitochondries subissent une lésion irréversible dans la solution de Ringer. P/O diminue par gonflement progressif des mitochondries, on aboutit à un nouvel état d'équilibre libre.

---

#### LISTE DES PUBLICATIONS

- L. HIRSCHBEIN. « Recherches sur les histones du placenta humain ». Thèse de Doctorat ès-Sciences soutenue le 21 mars 1962, à Paris.

- L. HIRSCHBEIN, R. ROZENCWAJG et Y. KHOUVINE. « Effet des histones sur Incorporation des acides aminés dans les protéines des particules nucléates ». *C. R. Acad. bet.*, 1962, 225, 273.
- J.-P. ZALTA, R. ROZENCWAJG, N. CARASSO et P. FAVART. « Isolement d'une fraction de noyaux cellulaires dont la pureté est contrôlée au microscope électronique ». *c. K. Acad. Scf.*, 1962, 255, 412.
- D. SZAFARZ et S. DUGANZIC. « Propriétés de sous-fractions obtenues par fractionnement isoélectrique du liquide cytoplasmique de tissus normaux et cancéreux ». *mu. HOC. Chim. Biol.*, 1962, 44, 435.
- A. FOURCADE et A.-J. ROSENBERG. « Quelques données quantitatives nouvelles sur La r6partition de la catalase dans la cellule hépatique ». *Bull. Soc. Chtm.Btol.*, 1902,4\*, 471.
- A. FOURCADE, D. SZAFARZ et A.-J. ROSENBERG. « Teneur en eau des mitochondries du foie de rat ». *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1962, 44, 683.
- \*• EMANOIL-RAVICOVITCH. « Teneur en flavines hydrosolubles des di J<sup>6</sup>rentes /TM ^ " 8 cellulaires au cours de la cancérisation par le p-diméthylaminoazobenzene (UA» ; •. *Bull. Soc. Chim. Biol*, 1962, 44, 219.
- \*• EMANOIL-RAVICOVITCH, C. HERISSON-CAVET et A.-J. ROSENBERG. « Effet de L,ura- diation sur la d6toxication du p-diméthylaminoazobenzène (DAB) par le toie ae m au cours de la cancérisation ». *Bull. Soc. Chim. Biol*, 1962,44, 867.
- J- COMBE. « Recherches sur les histones de l'épithélioma T8 de Guerin ... Diplome d'Htudes Supérieures (ENSET).
- <sup>c</sup> - DUCASSE. « Teneur en acides nucléiques des particules subnucléaires ... Diplome d'fitudes Supdrieures (ENSET).
- <sup>y</sup> - KHOUVINE a fait un rapport sur les propriétés physico-chimiques d» h<sup>istones à</sup> Varsovie et deux conférences al'Université de Salonique sur la Biosyn<sup>^</sup> e j<sup>es pro-</sup> t6ines et sur le Metabolisme des acides nucléiques des cellules normales et <sup>r</sup> s.
- M<sup>t</sup> ROSENBERG a fait des conférences de Biochimie à la Faculté des Sciences de Rabat, II a et6 invite au Statistical Institute de Calcutta comme «visiting<sup>TM</sup> J ^ y ^ ^ Plusieures conférences, a organise le laboratoire de biochimie<sup>^</sup> p<sup>h</sup> s • J ^ J J ^ | rences a Bubaneswar, Madras, Bangalore, Bombay, Poona, Delh. et Benares sur Biochimie des cellules normales, précancéreuses et néoplasiques.

## COMPOSITION DU SERVICE

### I. — Biochimie des nucléoprotéides.

- M- y. KHOUVINE, Directeur scientifique<sup>^</sup> au C.N.R.S., Directeur de Labo- ratoire à l'fitude pratique des Hautes Etudes.
- M. D. SZAFARZ, Chargé de Recherches au C.N.R.b.
- M. R. SUTRA, Chargé de Recherches au CN&S. <sup>ux à l'École</sup>
- M. J.-P. ZALTA, Chargé de Recherches au C.N.R.S., Chet ae trava <sup>pratique des Hautes Études.</sup>
- MUe L. HIRSCHBEIN, Attachée de Recherches au C.N.K.s.
- M>e L. ROZENCWAJG, Attaché de Recherches au C.N.K.&.

- M<sup>lle</sup> J. COMBE, Licenciée (Diplôme d'Études Supérieures).  
 M<sup>me</sup> c. DUCASSE, Licenciée (Diplôme d'Études Supérieures).  
 M. C. E. SRIPATI, Assistant à l'Institut du Cancer de Madras.  
 M. M. DANA, Interne en Médecine.  
 M. J. OKUDA, Maître de conférences à la Faculté de Médecine de Nagoya.  
 M. L. BENAROCHE, Boursier de la Ligue nationale française contre le Cancer.  
 M. J.-C. PRAGER, Collaborateur technique au C.N.R.S.  
 M<sup>m\*</sup> M. MILET, Collaborateur technique au C.N.R.S.  
 M<sup>m\*</sup> M.-C. GAUTHIER, Collaborateur technique au C.N.R.S.

## II. — *Métabolisme cellulaire.*

- M. A.-J. ROSENBERG, Professeur à la Faculté des Sciences de Poitiers,  
 Directeur-adjoint à l'École pratique des Hautes Études.  
 M. O. ENDO, Docteur en médecine, Assistant à la Faculté de médecine de  
 Tokyo.  
 M<sup>me</sup> R. RAVICOVITCH, Attachée de Recherches au C.N.R.S.  
 M<sup>me</sup> A. FOURCADE, Attachée de Recherches au C.N.R.S.  
 M<sup>lle</sup> C. RAMEIX, Boursière de la Ligue nationale française contre le Cancer.  
 M<sup>lle</sup> C. HERISSON-CAVET, Boursière de la Mission culturelle française au  
 Maroc.  
 M<sup>lle</sup> A. RUET, Collaborateur technique au C.N.R.S.

## SERVICE DE BIOCHIMIE B

Rapport de M<sup>e</sup> M. GRUNBERG-MANAGO, Chargée de Service.

### I. — STRUCTURE ET SYNTHÈSE ENZYMATIQUE DES RIBOPOLYNUCLÉOTIDES

Les recherches poursuivies font partie d'un programme à long terme qui porte sur l'étude des divers mécanismes de la biosynthèse des polyribonucléotides, leur structure physico-chimique et leur fonction dans la cellule vivante. Nous avons particulièrement étudié les questions suivantes :

- a) Code génétique et biosynthèse des protéines,
- b) Mécanisme d'action de la polynucléotide phosphorylase,
- c) Rôle des amino acides dans la synthèse de TARN par la cellule bactérienne et effet des analogues d'acides aminés (en particulier méthyltryptophane),
- d) Synthèse des polyribonucléotides chez la levure.

#### A. — LE CODE GÉNÉTIQUE ET LA BIOSYNTHÈSE DES PROTÉINES.

Il paraît maintenant établi que la séquence des amino acides d'une protéine donnée est déterminée par la séquence des nucléotides d'une partie définie de la chaîne nucléique. Le problème de la séquence exacte et du nombre de bases qui déterminent les places qu'occupent les vingt acides aminés trouvés dans les protéines est connu sous le nom de « problème du Code ».

Un système *in vitro*, composé en particulier de ribosomes de *E. coli*, de SARN et d'acides aminés, catalyse l'incorporation des amino acides dans les protéines. Cette incorporation est stimulée par certains ARN, comme les AKIN « J » - « plan ». L'utilisation de ce système a permis à Matthaei et Nirenberg de faire une découverte fondamentale : lorsque l'ARN est remplacé par un homopolymère synthétique, tel que l'acide polyuridylique « P<sup>0</sup>U » (P<sup>0</sup> = P<sup>0</sup>U, T<sup>0</sup>Zrl partiellement phosphorylé), le système incorpore plus que la phénylalanine, apparemment l'exclusion de tout autre acide aminé ; le composé synthétisé est de la polyphénylalanine. Cette découverte met au point un moyen relativement simple pour aborder le problème du code et déterminer la composition en bases des unités de codage pour chaque amino acide.

Par la suite, des homopolymères et des copolymères contenant deux ou trois

bases différentes en proportions variées ont été préparés par la polynucléotide phosphorylase et essayés pour l'incorporation des différents amino acides ; dans la plupart des cas, une des bases des copolymères était l'uracile. Le rapport entre la stimulation de l'acide aminé et celui de la phénylalanine est comparé au rapport entre les quantités de triplets UUU pris comme standard et des autres triplets possibles. Dans ces expériences, on suppose que chaque acide aminé est codé par un triplet. Le calcul de la fréquence des triplets est fondé sur le postulat que les nucléotides sont distribués au hasard dans les polymères et Ton a souvent admis que la proportion de bases dans les polymères était la même que la proportion des nucléosides diphosphates correspondants utilisés pour leur préparation. Nous avons montré, en collaboration avec le Dr. Bretscher du laboratoire du Dr. Crick (Cambridge, Angleterre) et avec l'aide de M. et M<sup>me</sup> Dondon, que l'hypothèse selon laquelle la composition en bases des polymères est la même que celle du mélange réactionnel *k* partir duquel ils sont formés n'est pas vérifiée dans beaucoup de cas et que la composition de certaines unités de codage déterminée par différents chercheurs pourrait, par conséquent, être incorrecte. De plus, il était généralement admis que les différents peptides peuvent être tous aussi facilement obtenus et qu'un seul triplet est lu (UUU dans le cas du standard). Nous avons montré que la stimulation de l'incorporation d'un acide aminé par le poly U n'est pas limitée & la phénylalanine, mais que des quantités variables de leucine (10-25 % dans nos différentes expériences) sont toujours incorporées. Nous avons prouvé que cette incorporation de la leucine n'était due ni à une impureté dans la C<sup>14</sup>-leucine, ni à une impureté dans le poly U. L'hydrolyse d'un poly U « montre que les impuretés totales de C, A, G ou I sont inférieures à 1 % ; de plus » aucun poly U n'incorpore de sérine ou de proline (qui sont codées par un poly UC), ni d'isoleucine (codée par le poly UA), ni de valine (codée par le poly tJG ou UI). Nous pensons donc qu'il est possible dans certains cas, que la stimulation observée puisse être causée par d'autres triplets que ceux auxquels on a attribué un rôle dans le codage.

Une des caractéristiques du code, tel qu'il avait été déterminé jusqu'ici par les autres auteurs, était que toutes les séquences contenaient des U. Cependant cela semble peu vraisemblable car Ton aurait alors une très forte proportion de U dans le messenger hypothétique, ce qui amènerait à prévoir une composition A/p élevée pour TADN. Nos expériences avec des poly CA (copolymères composés d'unités d'acide cytidylique et adénylique) ont montré qu'il n'était pas nécessaire que les triplets contiennent des U, car nous avons trouvé que le polymère CA obtenu permet l'incorporation de proline et de petites quantités de thréonine & d'histidine. Nous pouvons donc conclure de nos expériences que tous les triplets ne contiennent pas nécessairement de U et que les correspondances entre les acides aminés donnés et des triplets peuvent être erronées lorsqu'elles sont fondées sur des incorporations de faible amplitude.

Certaines données semblent indiquer que le code n'est pas lu à cheval et qu'il est lu à partir d'une extrémité fixe du « modèle » polyribonucléotidique. Nous ne connaissons pas la direction de cette lecture et cette question est sans aucun doute d'une importance primordiale.

Des expériences préliminaires, effectuées en collaboration avec M. Dondon avec des polymères « Blocks » (polymères préparés avec la polynucléotide phosphorylase et purifiés par le Dr. Monier sur colonne de Hershey) commentent

ou finissant par une longue séquence d'adde polyuridylique, tels que pCpCpC<sub>2</sub>.... PUpUpU ou pUpUpU....pCpCpC suggèrent que la lecture commence au résidu nudéosidique, car seuls les pCpCpC....pUpUpU sont actifs pour l'incorporation de la phénylalanine. Cependant, en collaboration avec le Dr. Michelson, nous avons montré que les polymères estérifiés par le PO<sub>4</sub> au résidu nudéosidique en 3', tels que pUpU....Up sont aussi actifs que le poly U non esterifié en ce qui concerne la stimulation de l'incorporation de la phénylalanine. Ce n'est donc pas le groupe hydroxyl libre du nucléoside terminal qui détermine le sens de la lecture. Par contre, l'efficacité d'un poly U quant à l'incorporation de la phénylalanine est diminuée de moitié si le nucléoside uridylique terminal est remplacé par un autre groupement chimique.

B. - MECANISME D'ACTION DE LA POLYNUCLEOTIDE PHOSPHORYLASE.

I. Enzyme d'*Azotobacter* ou de *E. coli*. - La polynucleotide phosphorylase semble appartenir à un groupe d'enzymes catalysant la synthèse de polynucleotides dont la composition n'est guère affectée par la nature de l'amorceur ajouté. Le mécanisme selon lequel s'effectue l'amorçage par les oligonucleotides n'est pas connu. Nous avons réussi récemment à isoler d'*A. m. nelandii* et de *E. coli* des préparations de polynucleotide phosphorylase qui requiert, dans certaines conditions, de façon absolue, un amorceur pour la polymérisation des nucléosides diphosphates. Utilisant ces préparations purifiées, nous avons entrepris une étude sur le mode d'action des amorceurs (polynucleotides et oligonucleotides).

Les résultats des études cinétiques effectuées en collaboration avec M<sup>lle</sup> Code-S et M<sup>lle</sup> Yon paraissent en accord avec l'hypothèse selon laquelle la polynucleotide phosphorylase d'*Azotobacter* est l'ADP libre et non l'ADP-Mg.

Divers facteurs peuvent influencer sur la phase de latence observée lors de la polymérisation (Mg<sup>++</sup>, polylysine et oligonucleotides). L'étude de l'influence de ces facteurs sur la conformation de l'enzyme est en cours.

Des études ont également été poursuivies sur le mécanisme de la polymérisation qui se fait par étapes, l'attaque commençant au résidu nudéosidique de la mère. On sait que les oligonucleotides composés de 2 à 5 nucléosides ne sont pas phosphorylés si le résidu nudéosidique terminal est lié à un résidu PO<sub>4</sub> en 3'. Nous avons montré, en collaboration avec M<sup>lle</sup> Code-S et Dr. Michelson, qu'il y a phosphorylation, malgré la présence du groupe PO<sub>4</sub> en 3', si l'on utilise des oligonucleotides contenant un nombre d'oligonucleotides égales ou supérieures à 10. L'influence des nucléosides terminaux des polymères sur la capacité de phosphorylation a également été étudiée.

D'autre part, nous avons trouvé que les ARN ou les acides polyadénylés. Cette inhibition est compétitive, mais peut être levée par addition d'une certaine concentration en sel.

L'ARN n'a pas d'action sur la polymérisation. Ce phénomène est à l'étude.

M<sup>me</sup> Belzeska, sous la direction du Dr. Michelson a mis au point une méthode simplifiée et plus efficace de purification de la phosphotransférase et de la pyrimidine nucléoside phosphorylase que celle décrite par d'autres auteurs. La phosphotransférase transfère le phosphate à la position 5' du nucléoside accepteur, tandis que la nucléoside phosphorylase catalyse la réaction suivante :



M<sup>me</sup> Belzeska a étudié le mécanisme d'action et la spécificité de ces enzymes qui seront utilisés afin d'obtenir des dérivés radioactifs pour nos études sur le mécanisme de synthèse des ribopolynucléotides et, en particulier, l'examen des vitesses de synthèse de l'uridine-5' phosphate à partir de l'uridine par la phosphotransférase en utilisant comme donneurs divers phosphates monoalkyl et monaryls, \* montré qu'en général l'efficacité de la phosphorylation est étroitement liée à la réactivité chimique du donneur phosphate et qu'elle est fonction des charges positives de l'atome de phosphore. Le phosphoramidate est également un donneur très efficace, bien qu'il ne soit ni un dérivé O-alkyl ni aryl.

2. *Séparation de la polynucléotide phosphorylase chez CL perfringens en deux composants.* — Nous avons isolé précédemment, en collaboration avec M. Dolif une polynucléotide phosphorylase d'une bactérie anaérobie, *Clostridium perfringens*, qui différait en beaucoup de propriétés des enzymes décrits jusqu'à présent. L'enzyme purifié est actif avec le GDP, mais ne polymérise pas le CDP ou TUDP et d'autre part, la phosphorylation de l'acide polyadénylique ou de l'acide polyuridylique est très faible, alors que ces deux réactions ont lieu en présence d'extraits bruts. Avec le Dr. Knight, nous avons isolé, à partir des extraits de *CL perfringens* une autre fraction qui, elle, polymérise TUDP, le CDP, TADP et le GDP et phosphoryle les différents polymères. Nous étudions actuellement ces deux enzymes en collaboration avec le Dr. Fitt. Le premier possède une autre particularité : la polymérisation de l'enzyme purifié est stimulée très fortement par la polylysine. Dans les extraits bruts, la synthèse du polyadénylate est stimulée par un polypeptide, l'effet étant accompagné d'une diminution de la constante de Michaelis apparente sur TADP.

### C. — RÔLE DES AMINO ACIDES ET DE LEURS ANALOGUES DANS LA SYNTHÈSE DE L'ARN.

Il a été montré, dans une souche de *E. coli* requérant le tryptophane, qu'il y avait une relation entre la synthèse de l'ARN et l'activité de la polynucléotide phosphorylase : en absence de synthèse protéique (présence de chloramphénicol) elles sont Tune et l'autre fonction du tryptophane ajouté au milieu. Les résultats obtenus en collaboration avec M. Thang et le Dr. Williams et avec Mme Réveillon, indiquent que, malgré la présence de chloramphénicol, les protéines peuvent être synthétisées *de novo*; la polynucléotide phosphorylase paraît être une de ces protéines. Le tryptophane peut être remplacé par le 5-méthyltryptophane ou par le 5-hydroxytryptophane. Ces derniers résultats pourraient s'expliquer, soit par l'incorporation de ces analogues dans les protéines, en particulier dans la polynucléotide phosphorylase où ils remplacent le tryptophane sans changement d'activité de l'enzyme, soit par l'induction de ces

analogues de la formation de la tryptophane synthétose dans ce mutant qui normalement en est dépourvu. Les expériences sur l'incorporation de  $14C$ -L<sub>1</sub> dans les protéines, en présence de méthyltryptophane et de chloramphenicol éliminent cette dernière hypothèse.

L'action des amino acides et de leurs analogues sur la synthèse de l'ARN n'est pas encore claire, bien que quelques hypothèses aient été proposées pour en rendre compte. En collaboration avec M. Thang, nous avons trouvé que tous les analogues du tryptophane permettent la synthèse de l'ARN chez le mutant tryptophane<sup>-</sup> mais à condition que les cellules se trouvent en présence de chloramphenicol. Cette synthèse est fonction de la concentration en chloramphenicol.

D. — SYNTHÈSE DE L'ARN CHEZ LA LEVURE.

M. Tavitzi, en collaboration avec M<sup>me</sup> Cousin et avec l'aide de M<sup>me</sup> Talou, a continué ses études sur la synthèse des ribopolynucléotides chez les levures. Appelons que les extraits obtenus à partir de cellules de levure contiennent au moins trois systèmes qui catalysent l'incorporation des nucléotides di- et triphosphates dans les préapites acido-insolubles. Deux de ces systèmes sont solubles et catalysent respectivement l'incorporation de l'ADP et de l'ATP, la dernière étant stimulée par le SARN. Le troisième, de nature particulière, catalyse l'incorporation des triphosphates. L'étude du polymère synthétisé indique qu'il s'agit probablement d'une ARN P<sup>1</sup>. L'étude de la purification et la localisation des enzymes est actuellement en cours.

II. - MÉTABOLISME INTERMÉDIAIRE

A. — SYSTÈME ENZYMATIQUE RÉCEPTEUR DE L'ADRÉNALINE.

Au cours d'expériences effectuées parallèlement sur des cellules d'ascites provenant d'un hépatome, M. Meyer a étudié les conditions d'activation de la phosphorylase du glycogène. Il a obtenu, à partir des cellules cancéreuses, des cellules qui sont dépourvues de glycogène, ne catalysent ni la synthèse ni la dégradation de cette substance. Des expériences préliminaires suggèrent que les cellules d'ascites sont dépourvues de phosphorylase kinase, enzyme catalysant la phosphorylation de la phosphorylase inactive. En outre, l'activité de la cyclase, qui catalyse la formation d'AMP-3'-cydique, est très faible dans les cellules d'ascites. Cet enzyme n'est ni activé par l'adrénaline, ni inhibé par l'acétylcholine, comme c'est le cas pour les cellules normales. La cellule d'ascite est ainsi dépourvue de l'enzyme pour le système des substances régulatrices du système neurovégétatif.

B. - MÉTABOLISME D'ACETOBACTER XYLINUM.

L'étude comparative du métabolisme de *Acetobacter xylinum* sur un milieu semi-synthétique comprenant soit le glucose, soit le fructose comme

unique source de carbone a été poursuivie par M. Prieur : d'une part, par la mise en évidence des activités enzymatiques pouvant être impliquées dans les trois grands cycles de dégradation des hexoses, d'autre part, par la recherche des causes susceptibles de provoquer les différences d'équipement enzymatique constatées entre chaque type de bactéries.

Il a été possible d'éliminer l'hypothèse d'une sélection de mutants (présents dans la souche-stock) lors de la croissance sur milieu « glucose » ou « fructose ».

Les bactéries « glucose » possèdent tous les enzymes de la voie Embden-Meyerhof et peuvent, par conséquent, dégrader glucose et fructose en acide pyruvique. Par contre trois des principaux enzymes de la voie des uronates lui font défaut (UDPG-déshydrogénase; 6-phosphogluconique déshydrogénase et glucoses-phosphate déshydrogénase).

Les bactéries « fructose » ne peuvent dégrader les hexoses par la voie Embden-Meyerhof par suite de l'absence de phosphofructokinase. Par contre elles possèdent tous les enzymes de la voie des uronates.

L'étude de l'équipement enzymatique d'extraits de bactéries ayant poussé sur fructose puis mises en présence de glucose est en cours. Les premiers résultats montrent que, si la respiration des intermédiaires phosphorylés de la voie Embden-Meyerhof rapproche fortement cet extrait bactérien de l'extract « glucose », la phosphofructokinase ne reparait pas, interdisant toute dégradation par cette voie.

### LISTE DES PUBLICATIONS

- A. M. MICHELSON, J. DONDON et M. GRUNBERG-MANAGO. « The action of polynucleotide phosphorylase on 5-halogeno-s'-pyrophosphate ». *Biochim. Biophys. Acta* **55**, 529 (1962).
- R. MONIER et M. GRUNBERG-MANAGO. « Structure secondaire et phosphorylation de l'acide ribonucléique soluble de la levure de boulangerie ». *Acides Ribonucléiques et Polyphosphates*, Coll. Intern. CNRS, Strasbourg, 1961, p. 163 (1962).
- M. GRUNBERG-MANAGO. « Mode d'action de la polynucléotide phosphorylase ». *Acides Ribonucléiques et Polyphosphates*, Coll. Intern. CNRS, Strasbourg, 1961, p. 295 (1962).
- M. GRUNBERG-MANAGO. « Enzymatic synthesis of nucleic acids ». *Ann. Rev. Biochem.* **31**, 301 (1962).
- M. GRUNBERG-MANAGO. « Polynucleotide phosphorylase ». *Progress in Nucleic Acid Research* (J. N. Davidson et W. E. Cohn, eds.) Academic Press Inc., N. Y. (sous presse).
- M. GRUNBERG-MANAGO. « Enzymatic synthesis of nucleic acids ». *Progress in Biophysics* (J. A. V. Butler ed.) Pergamon Press, Oxford, (sous presse).
- M. BRETSCHER et M. GRUNBERG-MANAGO. « Polyribonucleotide-directed protein synthesis in an *E. coli* cell-free system ». *Nature*, **195**, 283, (1962).
- E. KNIGHT, Jr., P. S. FITT et M. GRUNBERG-MANAGO. « Separation of *Clostridium perfringens* polynucleotide phosphorylase into two components ». *Biochem. Res. Comm.* (sous presse).
- J. TAVLÍTZKI. « Problèmes de codage dans la spécification des protéines par les acides nucléiques, les faits et leur interprétation ». *Bull. Soc. Chim. Biol.* **44**, 697 (1962)-

- M. COUSIN. « Contribution à l'étude des systèmes de synthèse de nucléotides adénosiniques ». Thèse de 3<sup>e</sup> Cycle, Faculté des Sciences, Paris 1962.
- T. GOOEKROY. « Etude clinique de la polymérisation de l'ADP-glycophosphorylase ». Diplôme d'Etudes Supérieures, Faculté des Sciences, Paris, 1963.
- A. M. MICHELSON et W. E. COHN. « Cytidine pseudouridine and the configuration of pseudouridine ». *Biochemistry*, 1, 490 (1962).
- A. M. MICHELSON. « Aspects of the chemistry of nucleotides and oligonucleotides ». *Ribonucleïques et Polyphosphates*, Coll. Intern. CNRS, 1961, p. 39-49.
- A. M. MICHELSON. « X-chromicity of oligo- and polynucleotides », *M Biophys. Acta*, 55, 841 (1962).
- A. M. MICHELSON and F. W. WOOD. « Synthesis of some nucleotide anhydrides ». *Biochemistry*, 1, 1171 (1962).

---

COMPOSITION DU SERVICE

- M<sup>me</sup> GRUNBERG-MANAGO, Directeur de Recherches au C.N.R.S.
- M. A. M. MICHELSON, Directeur de Recherches, Biologie Moléculaire
- M. C. DELAVIER-KLUTCHKO, Chargé de Recherches au C.N.R.S.,  
laboratoire du Dr. Stadtman, Bethesda (USA).
- M. F. MEYER, Chargé de Recherches au C.N.R.S.
- M. J. TAVLITZKI, Chargé de Recherches au C.N.R.S.
- M. M. N. THANG, Chargé de Recherches au C.N.R.S.
- M. J. MASSOULIE, Attaché de Recherches au C.N.R.S.
- M. P. PRIEUR, Attaché de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> M. COUSIN, Boursière du C.E.A.
- M. J. DAUTA, Assistant à la Faculté des Sciences,
- M<sup>me</sup> p. DAUTA, Agrégée préparatrice à l'E.N.S.
- M<sup>me</sup> T. GODEFROY, Elève de l'E.N.S. de Evres.
- M<sup>me</sup> M. L. LESNE, Boursière Ligue Nationale Française contre le Cancer.
- M. J. DONDON, Collaborateur Technique C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> L. DONDON, Collaboratrice Technique C.N.R.S. (mi-temps).
- M. M. GALVEZ, Collaborateur Technique C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> C. MONNY, Collaboratrice Technique C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> j. REVEILLON, Collaboratrice Technique C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> B. TALOU, Collaboratrice Technique C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> D. C. THANG, Collaboratrice Technique, Biologie Moléculaire.
- M<sup>me</sup> o. SAYAH, Collaboratrice Technique, Biologie Moléculaire.
- M<sup>me</sup> H. COSTINESCO, Traductrice au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> K. BELZESKA, Boursière des Affaires Etrangères.
- M. P. S. FITT, Boursier Philippe Foundation.
- M. E. KNIGHT Jr., Boursier N.L.H.
- M<sup>me</sup> E. MERY, Boursière des Affaires Etrangères.
- M. F. R. p. WILLIAMS, Boursier N.L.H.

## SERVICE DE PHYSIOLOGIE

Rapport de M. TH. CAHN, Chef de Service.

Les recherches physiologiques et pathologiques des derniers vingt ans ont fait ressortir la grande importance du métabolisme des lipides et de ses troubles dans le fonctionnement des organismes supérieurs. MM. Cahn et Houget ont montré, il y a quelques années, que chez le lapin une grande partie des glucides alimentaires est transformée en lipides déjà au cours de la traversée de la paroi intestinale. Ce processus doit se faire chez tous les Herbivores et aussi chez les Carnivores dont la nourriture comprend un fort pourcentage d'hydrates de carbone.

Par quels mécanismes ce processus de conversion des glucides alimentaires en lipides se trouve-t-il intégré dans l'activité métabolique de l'organisme et quels sont les agents mis en oeuvre ? L'insuline facilite l'entrée du glucose dans les tissus et elle stimule la transformation des glucides en lipides ; elle est donc vraisemblablement associée à ce processus. Un ensemble de données de la bibliographie fait penser que les hormones de la corticale des glandes surrénales jouent aussi un rôle dans cette transformation. C'est une d'elles, la cortisone, qui a été étudiée au laboratoire. Les recherches sont faites sur des lapins mâles et femelles\* nourris et à jeun, auxquels on injecte quotidiennement pendant 5 jours 1 mg par kg de cortisone. Pendant toute la durée de l'expérience qui comporte quelques jours témoins avant et après la période des injections, on suit le rythme alimentaire des animaux, les taux sanguins du glucose et des acides gras estérifiés ainsi que l'excrétion azotée; on mesure constamment les échanges gazeux des animaux. Les effets observés varient d'intensité d'un animal à l'autre. Les modifications de la composition sanguine sont en général plus importantes chez les femelles que chez les mâles. Les indications qui suivent veulent donner une idée générale des effets observés.

La cortisone stimule l'appétit des animaux; ceux qui mangeaient très peu avant les injections peuvent doubler leur absorption alimentaire. Elle provoque aussi plus ou moins rapidement une ascension glycémique qui s'accuse de jour en jour et est surtout forte pendant la résorption alimentaire. On observe 6 à 7 heures après le début de la prise de nourriture quotidienne, des pointes glycémiques d'un niveau de plus en plus élevé. Le lendemain matin, malgré l'entrée en jeu des mécanismes régulateurs, la glycémie arrive de moins en moins à revenir à son niveau normal. Ces hyperglycémies s'accompagnent de glucosuries. Après la cessation des injections, ces hyperglycémies postprandiales persistent pendant deux à trois jours, puis rapidement la glycémie redevient normale et



faites jusqu'aujourd'hui ne nous permettent pas de répondre définitivement sur ces problèmes métaboliques si importants pour un fonctionnement normal de l'organisme.

Partant de l'hypothèse que l'anémie radioinduite pouvait être due à une auto-immunisation, M<sup>me</sup> Lourau a recherché un autoanticorps chez des animaux irradiés (méthode de Coombs et test à la broméline) et examiné si des hématies irradiées *in vitro* deviennent antigéniques. Les premiers résultats ne sont pas en faveur de l'existence d'une réaction spécifique, mais plutôt d'une modification de la surface des hématies, *in vivo* comme *in vitro*.

---

#### COMPOSITION DE SERVICE

- M. Th. CAHN, Directeur de Recherches au C.N.R.S.
- M. J. HOUGET, Directeur de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> M. LOURAU, Charge de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> G. WEISS, Collaborateur technique au C.N.R.S.
- M<sup>lle</sup> A. FAUVEAU, Collaborateur technique au C.N.R.S.
- M<sup>lle</sup> G. IFFLY, Travailleur libre.
- M. G. BIDAULT, Travailleur libre.
- M. M. BERTHEAU, Travailleur libre.
- M. G. CREPAT, Travailleur libre.

## Rapport de M\*» NINE CHOUCROUN, Directeur de Laboratoire.

Nos recherches se sont poursuivies dans les deux directions indiquées dans les rapports précédents :

I. *fade des propriétés biologiques du Hpopolysaccharide antigénique Pmko* que nous avons isolé du bacille tuberculeux.

II. *Etude de l'électrisation superficielle d'éléments (leucocytes et cellules tumorales) au moyen de nos électrodes* (dont le principe assure la constance du Ph des milieux soumis à l'électrophorèse).

1. *Etude comparative des épreuves intradermiques au Pmko et à la tuberculine en fonction de l'état des pièces d'excrétion de sujets tuberculeux.*

J'ai déjà signalé comment la découverte paradoxale du rôle essentiel joué par le constituant lipopolysaccharidique Pmko dans le processus tuberculique nous a amenés à mettre en évidence une hypersensibilité de type « retardée » à ce constituant bactérien non protéique.

L'existence de cette hypersensibilité spécifiquement liée au contact préalable de l'organisme avec le bacille de Koch, distincte de l'hypersensibilité tuberculique et révélée par l'épreuve intradermique au lipopolysaccharide Pmko, nous a permis de faire une étude comparative des intensités des réactions intrader-

miques à la tuberculine et au Pmko, chez des sujets tuberculeux ou non, simultanément à ces deux épreuves.

Je rappelle que cette étude a montré, par exemple, que chez les sujets tuberculeux (495 sur 702) dont chaque cas particulier a été soigné par une technique nouvelle, que l'intensité relative de ces deux réactions

action de l'ancienneté et du caractère évolutif de la « réaction » inflammatoires. Les tuberculoses aiguës, caseifiantes et exfoliatives de la tuberculine de croissants, s'accompagnent généralement de l'intensité relative du lipopolysaccharide Pmko, nettement supérieure à celle des réactions tuberculiques.

En outre, les tuberculoses évoluant à un stade tardif, les réactions à la tuberculine sont généralement plus fortes que celles à la Pmko. C'est ainsi qu'il a été constaté que chez les sujets tuberculeux, les réactions à la tuberculine sont généralement plus fortes que celles à la Pmko, et que chez les sujets non tuberculeux, les réactions à la Pmko sont généralement plus fortes que celles à la tuberculine. Ces constatations ont été confirmées par une étude comparative des intensités des réactions intradermiques à la tuberculine et au Pmko, chez des sujets tuberculeux ou non, simultanément à ces deux épreuves.

Pmko d'intensité prédominante, et celui des réactions fortes *h* cet antigène, étaient respectivement aussi élevés que 79 et 40 % contre 8 et 4 % pour les réactions tuberculoniques.

L'ancienneté de la maladie qui témoigne d'une résistance certaine à l'infection tuberculeuse se révélait ainsi un facteur prépondérant pour le développement et le maintien de l'hypersensibilité au lipopolysaccharide Pmko. Le fait que cette hypersensibilité est d'autant plus intense et permanente que la tuberculose s'éloigne davantage de sa phase aiguë pour évoluer dans un sens favorable, semblait bien indiquer que cette hypersensibilité au Pmko, longtemps insoupçonnée, devait être liée aux processus de résistance de l'organisme contre l'infection tuberculeuse.

Nous avons perisé, ainsi que je l'ai indiqué dans un de mes précédents rapports, qu'il pourrait être intéressant de mettre à l'épreuve ces conclusions dans le cas de tuberculeux pulmonaires devant subir une exérèse, en confrontant l'état des pièces prélevées avec les résultats des deux épreuves intradermiques faites simultanément quelques jours avant l'opération. Cette recherche a été entreprise en collaboration avec le Dr. Gresland et le Dr. Kourilsky, et grandement facilitée par l'aimable assentiment de M. Georges Canetti de mettre à notre disposition les examens pathologiques et bactériologiques faits par lui-même et M. Grosset à l'Institut Pasteur sur les pièces d'exérèse des malades opérés à la Fondation Foch, dans le Service du Dr. Hertzog. Elle est maintenant terminée et a porté sur 80 sujets.

On pouvait logiquement penser que la richesse en bacilles d'une part, la présence ou l'absence de caséum d'autre part, auraient une certaine incidence sur l'intensité des réactions observées. Nous avons constaté que ces deux facteurs étaient sans influence apparente sur les prédominances d'intensité de l'une ou de l'autre de ces hypersensibilités distinctes, révélées par ces réactions intradermiques.

Par contre, nous avons pu saisir une corrélation précise entre un facteur anatomique, la sclérose inflammatoire, et le développement d'une hypersensibilité au Pmko d'intensité prédominante. Nous avons constaté que la prédominance de l'hypersensibilité au Pmko croît avec l'importance de la sclérose, et d'autre part, que les scléroses qui accompagnent une hypersensibilité au Pmko d'intensité prédominante, se développent surtout dans les tuberculoses de longue durée. La relation essentielle qui s'était dégagée de notre étude clinique entre l'intensité relative de la réaction au Pmko et l'ancienneté de la maladie se trouve ici confirmée. De plus, le fait que la présence de fibrose est généralement associée à une prédominance de l'hypersensibilité au Pmko, semble bien indiquer que le développement de cette hypersensibilité accompagne un processus évolutif qui a toujours été considéré comme favorable.

Nous avons également constaté que le pourcentage des réactions d'intensité prédominante au Pmko s'accroît en fonction de l'ancienneté de la maladie, et qu'il est beaucoup plus élevé (77 %) dans le groupe des rechutes datant de plus de deux ans, que dans celui où la dernière poussée évolutive est relativement récente (moins de deux ans) où il atteint seulement la valeur de 43 %. Ces résultats confirment l'influence de l'ancienneté de la maladie et celle du contexte évolutif.

de la tuberculose sur le développement de l'hypersensibilité au Pmko, révélées par l'étude des tuberculeux en Clinique.

Ainsi, l'analyse des résultats fournis par les intensités des réactions intradermiques au Pmko et à la tuberculine observées chez les malades opérés, en fonction de l'état des pièces d'exérèse et des observations cliniques (approfondies) relatives à chaque sujet, a pleinement confirmé les conclusions tirées de notre étude clinique. Ces conclusions ont même été renforcées par la corrélation remarquable qui s'est dégagée de cette étude, entre la présence de scléroses étendues et contestables, toujours considérées comme un processus de évolution favorable, et le développement d'une hypersensibilité au Pmko d'intensité prédominante.

L'expérience d'essai de vaccination de Bovidés contre la Tuberculose avec le lipopolysaccharide Pmko se poursuit dans les conditions décrites dans notre précédent rapport. Ces Bovidés sont actuellement dans une ferme infectée du Loiret, en contact de bêtes tuberculeuses. L'ensemble des animaux « immunisés », des animaux contrôle et des animaux tuberculeux seront prochainement soumis à l'épreuve du test tuberculinique.

n. — *Étude de l'électrisation superficielle des spermatozoïdes* d'origine bovine. Poursuit dans le sens indiqué dans notre précédent rapport. Nous cherchons actuellement à réaliser une séparation des spermatozoïdes, selon leur charge, dans des conditions où ils ne seraient pas altérés par le traitement trophorétique.

Étude de la charge électrique de souches de cellules hautement ou faiblement malignes. Cette étude est toujours poursuivie en collaboration avec M. Barski, de l'hôpital de la Pitié. Les résultats obtenus jusqu'ici semblent indiquer que la répartition des électrisations est différente pour des souches de malignités différentes. Une séparation des cellules selon leur charge semble possible.

---

#### LISTE DES PUBLICATIONS

N. CHOUCROUN, en collaboration avec R. KOURILSKY et P. GRKLAND. « Étude comparative des épreuves intradermiques à la tuberculine et au lipopolysaccharide Pmko, en fonction de l'état des pièces d'exérèse de sujets tuberculeux ». (sous presse);

---

#### COMPOSITION DU LABORATOIRE

Mlle N. CHOUCROUN, Directeur de Recherches au C.N.R.S.

Mme J. BAZIN, Collaboratrice technique au C.N.R.S.

Mlle N. BENYAMINE, Collaborateur technique au C.N.R.S.

## PROFESSEURS EN VISITE

Au cours de l'année 1962, l'Institut de Biologie Physico-Chimique a reçu, pour des séjours de diverses durées, les personnalités suivantes :

Le Dr. K. Hummel, professeur à l'Hygien-Institut de Freiburg in BrisaU (Allemagne) ;

M. R. Fuoss, professeur à Yale University (U.S.A.);

M. H. Tamiya, professeur au Tokugawa Institute for Biological Research de Tokyo ;

Le Dr. M. Rippa, de l'Istituto di Fisiologia generale de Ferrare ;

Le Dr. E. Racker, du Public Health Institute of the City of New-York;

M. G. W. Plautt, professeur à l'Universit\* d'Utah (U.S.A.) ;

M. G. del Re, professeur à l'Institut de Chimie théorique de Naples;

M. S. Gibaja, professeur à l'Université de Lima;

M. T. Yonezawa, professeur à l'Université de Kyoto;

M. P. Feigelson, professeur à Columbia University (U.S.A.);

Le Dr. H. Edelhoich, du National Institute of Health de Bethesda (U.S.A), Assoc prof, à Georgetown University.

## TABLE DES MATIÈRES

COMPOSITION <i>DU</i> CONSEIL D'ADMINISTRATION. . . . .	5
<b>C</b> OMPOSITION DU COMITÉ DE DIRECTION. . . . .	6
<b>S</b> ERVICE DE CHIMIE MACROMOLÉCULAIRE, rapport de M <sup>m</sup> e A. DOBRY- DUCLAUX. . . . .	7
<b>S</b> ERVICE DE BIOPHYSIQUE, rapport de M. R. WURMSER. . . . .	10
<b>S</b> ERVICE DE BIOCHIMIE THÉORIQUE, rapport de M. B. PULLMAN. . . . .	16
<b>S</b> ERVICE DE BIOCHIMIE A, rapport de M <sup>m</sup> e Y. KHOUVINE. . . . .	25
<b>S</b> ERVICE DE BIOCHIMIE B, rapport de M <sup>TM</sup> M. GRUNBERG-MANAGO. . . . .	31
<b>S</b> ERVICE DE PHYSIOLOGIE, rapport de M. Th. CAHN. . . . .	34
<b>L</b> ABORATOIRE DE M <sup>m</sup> e N. CHOUKROUN. . . . .	41
<b>P</b> ROFESSEURS EN VISITE. . . . .	44

FONDATION EDMOND DE ROTHSCHILD  
POUR LE DÉVELOPPEMENT DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

---

INSTITUT DE BIOLOGIE  
PHYSICO-CHIMIQUE

RAPPORTS  
SUR LES TRAVAUX EFFECTUÉS

AU COURS DE L'ANNÉE

**1963**

13, RUB PIERRE-CURIE  
PARIS-V«

## CONSEIL D'ADMINISTRATION

### *Président :*

- to. FRANCIS PERRIN, Membre de l'Institut, Professeur au Collège de France, Haut-Ummissaire & l'finergie Atomique.

### *Vice-Présidents :*

- to. G. CHAMPETIER, Membre de l'Institut, Professeur à la Faculty des Sciences de Paris.
- to. E. TERROINE, Professeur honoraire à la Faculté des Sciences de Strasbourg. Directeur du Centre de Recherches sur la nutrition au C.N.R.S.

### *Secrétaire Général :*

- M- R. WURMSER, Professeur honoraire & la Faculti des Sciences de Paris.

.. A partir du i«\* octobre 1963 :

- M- B. PULLMAN, Professeur à la Facultf des Sciences de Paris.

### *Trésarier :*

^ EDMOND DE ROTHSCHILD.

- ^ to. E. AUBEL, Professeur honoraire à la Facult6 des Sciences de Paris.
- P. AUGER, Professeur k la Faculté des Sciences de Paris.
- E. BAUER, Professeur honoraire a la Faculty des Sciences de Paris (f).
- L. BINET, Membre de l'Institut, Do\en honoraire de la Faculte de Medecine de Paris.
- TH. CAHN, Directeur à Tficole des Hautes Etudes, Directeur de Recherches au C.N.R.S.
- R. COURRIER, Secrétaire Perp6tuel de l'Académie des Sciences de Paris.
- J. DUCLAUX, Membre de l'Institut, Professeur honoraire au Collège de France.
- B. EPHRUSSI, Professeur à la Facult6 des Sciences de Paris.
- R- FABRE, Membre de Tlnstitut, Doyen honoraire de la Faculté de Pharmacie de Paris.
- L. FAGE, Membre de Tlnstitut, Professeur honoraire au Muséum National d'Histoire Naturelle.
- P. FLEURY, Professeur honoraire à la Faculté de Pharmacie de Paris.
- M. FONTAINE, Membre de l'Institut, Professeur au Museum National d'His-toirc Naturelle.

MM. R. HEIM, Membre de l'Institut, Directeur du Muséum National d'Histoire Naturelle.

A. KIRMANN, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris, Directeur-adjoint de l'École Normale Supérieure.

R. LATARJET, Directeur de l'Institut du Radium.

E. LEDERER, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris.

A. LWOFF, F.R.S., Professeur à la Faculté des Sciences de Paris, Chef de Service à l'Institut Pasteur.

J. PARROD, Professeur à la Faculté des Sciences de Strasbourg.

B. PULLMAN, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris.

J. ROCHE, Membre de l'Institut, Professeur au Collège de France, Recteur de l'Université de Paris.

M<sup>me</sup> A. DE ROTHSCHILD.

Lord ROTHSCHILD, F.R.S., Professeur à l'Université de Cambridge.

MM. L. SACHS, Trésorier honoraire.

J. TREFOUEL, Membre de l'Institut, Directeur de l'Institut Pasteur.

### COMITÉ DE DIRECTION

MM. E. AUBEL, TH. CAHN, G. CHAMPETIER, J. DUCLAUX, B. EPHRUSSI,  
R. HEIM, E. LEDERER, FRANCIS PERRIN, B. PULLMAN, E. DE ROTHSCHILD,  
E. TERROINE, J. TREFOUEL, R. WURMSER.

## INTRODUCTION

Depuis quelque temps, l'Institut de Biologie Physico-Chimique subit une série de transformations internes qui ont été rendues nécessaires par l'évolution rapide de l'ensemble des disciplines de la biologie fondamentale. Ainsi, il y a quelques années, était institué le Service de Biochimie Quantitative, et l'année passée a vu l'installation d'un Service de Physiologie Microbienne. Dirigé par notre collègue François Gros, ce nouveau service doit accroître l'importance au sein de notre Institut de ce domaine capital qu'il est usuel aujourd'hui d'appeler biologie moléculaire. Qu'il me soit permis de souhaiter la bienvenue dans notre Institut et dans ces pages à cette nouvelle équipe et à son Chef

Cette transformation de notre Maison, nous la devons en grande partie à la clairvoyance et à l'action énergique et continue de M. le Professeur Wurmser qui a assumé la direction de l'Institut depuis 1958. Au moment où il devient Administrateur Honoraire et où j'ai l'honneur de succéder au poste d'Administrateur, je suis sûr de traduire les sentiments du Conseil d'Administration et de tous les travailleurs de l'Institut en exprimant notre sincère et profonde reconnaissance pour ce qu'il a fait pour le développement et le rayonnement de cette Maison, sans oublier la série de réalisations matérielles dont il a pris l'initiative ; en particulier la construction de la salle des séminaires et de la cafétéria, qui contribuent efficacement au bien-être des chercheurs et par là à l'accroissement du rendement de leurs travaux.

La période de transition et de transformation n'est pas terminée. De ma part, je ferai de mon mieux pour poursuivre en collaboration avec notre Comité de Direction et notre Conseil d'Administration l'entreprise de sorte que notre Institut, tout en gardant sa personnalité propre et unique au monde, participe le plus efficacement possible à la grande et merveilleuse aventure de la biologie moderne.

B. PULLMAN.

## SERVICE DE BIOPHYSIQUE

Rapport de M<sup>e</sup> FILITTI-WURMSER, Chargée de Service.

### I. — *PROTEINES DES SERUMS HUMAINS*

Les travaux antérieurs sur les isohémagglutinines ont fait cette année l'objet de plusieurs exposés d'ensemble et d'une discussion d'ordre statistique. On en trouvera Vindication dans la liste des publications. Us confirment l'interprétation que nous avons donnée des relations trouvées, *k* Pintérieur du groupe des isoagglutinines de même spécificité, entre leurs propriétés physicochimiques et le génotype des sujets dont elles proviennent.

L'étude des lieux et des modalités de biosynthèse des diverses protéines circulantes reste la ligne génératrice de nos recherches.

Certaines anomalies pathologiques peuvent apporter des informations sur la question. Un travail, entrepris avec l'équipe dirigée par M. Hartmann *k* la Faculté de Médecine, a pour objet la recherche de corrélations entre les proportions de diverses globulines anormales.

Incidemment, des résultats nouveaux ont été obtenus dans l'étude d'un anticorps de leptospirose Australis. Ce travail a permis de montrer la nature macromoléculaire de l'anticorps. Une ultracentrifugation analytique du sérum *k* été effectuée dans une cellule *k* double compartiment afin d'appauvrir le compartiment axial en protéine lourde et en enrichir le compartiment périphérique. Les contenus des deux compartiments étaient soumis à des immunoelectrophorèses et à des agglutinations-lyses vis *k* vis des leptospires.

D'autre part, une électrophorèse *k* flux continu des protéines du sérum séparait les constituants de mobilité gamma et ceux de mobilité alpha 2. Après relargage et redissolution, les deux fractions étaient soumises à l'ultracentrifugation sur solvant piège, pour purifier les macroglobulines. La purification était contrôlée par ultracentrifugation analytique et immunoelectrophorèse. L'ensemble des expériences établit l'existence d'un anticorps macromoléculaire et portant le déterminisme antigénique  $p_v$ . Ce résultat a été enfin confirmé par la méthode des anticorps fluorescents.

### II. — *ENZYMOLOGIE*

Comme les années précédentes, les recherches de M<sup>me</sup> F. Labeyrie et de ses collaborateurs ont porté sur le mode d'action des lacticoxydohydrogénases de la levure. Elles comportent essentiellement :

a) la purification des différentes lactico-deshydrogénases présentes dans les levures cultivées en anaérobiose à partir de souches normales et de souches mutées,

b) la caractérisation des configurations des centres actifs des divers enzymes et l'étude chimique de la partie protéique comprenant : l'hydrolyse ménagée des enzymes à l'aide de diverses peptidases, le fractionnement des hydrolysats par chromatographie, la comparaison des peptides formés par les différents enzymes et l'analyse séquentielle des peptides remarquables.

i. *D-lactico-deshydrogénase (D-LDH)*. — Cet enzyme contient deux cofacteurs dissociables, le zinc qui a fait notamment l'objet de travaux décrits dans le rapport de Tan dernier, et la flavine adénine-dinucléotide (FAD). M. Iwatsubo a déterminé le potentiel d'oxydoréduction de ce groupe prosthétique. La méthode a consisté dans l'étude spectrophotométrique de l'équilibre des formes réduite et oxydée de l'enzyme avec le système D-lactate-pyruvate. Le spectre différentiel de la D-LDH fait apparaître avec un léger déplacement les deux pics caractéristiques de la flavine, à 385 mμ et à 455 mμ. Quand on ajoute une solution d'enzyme une quantité de D-lactate un peu plus grande que celle de l'oxygène dissous, l'absorption à 450 mμ diminue instantanément. Si l'on ajoute alors du pyruvate, l'absorption augmente immédiatement. La réaction est complètement réversible.

L'équilibre peut être écrit :



$F^H$  et  $F$  étant respectivement l'enzyme oxydé et réduit,  $L$  le lactate et  $P$ , le Pyruvate. En effet, on trouve que le logarithme du rapport

$$\frac{(F^H)(P)}{(F)(L)}$$

augmente de 1 pour un accroissement  $\Delta pH = 1$ . Le potentiel de demi-réduction de la D-LDH est calculé à partir du potentiel du système D-lactate-pyruvate et trouvé égal à  $-0,78$  volts à  $pH = 7$ .

Un intérêt de ces résultats est dans la comparaison avec les valeurs trouvées pour d'autres flavoprotéines et dans l'interprétation qui devra en être donnée en termes de mode de liaison du groupe prosthétique à la protéine.

Une autre détermination effectuée sur la D-lactico-deshydrogénase est celle de son poids moléculaire. M. Iwatsubo et M<sup>lle</sup> Curdel ont employé une méthode applicable aux enzymes non purifiés. Elle est basée sur les propriétés des tamis moléculaires, c'est-à-dire, sur le fait que les petites molécules diffusent dans l'eau d'imbibition de certains gels, alors que les molécules plus grandes n'y passent pas pour des raisons stériques. Il a été trouvé une relation entre les flux de dilution de quatre protéines de poids moléculaire connu et les valeurs de ces poids moléculaires. La position de la D-LDH sur cette courbe d'étalonnage correspond à un poids moléculaire de 103 000, résultat reproductible à  $\pm 100$  près.

2. *L-lacticoxydohydrogénase (flavocytochrome b<sub>2</sub>)*. — Une hydrolyse tryptique exhaustive a conduit à la séparation d'un noyau résistant, portant tout le thème de l'enzyme dans le rapport d'un hème par unité protéique de 12000.

La préparation de cette petite hémoprotéine et de l'apohémoprotéine totale a rendu possible la recherche d'une interaction entre flavine et hème, comme il en existe entre flavine et lactate, d'après les travaux rapportés par Tan dernier. On est, en effet, à même de comparer les propriétés de l'hème en présence ou en l'absence de la flavine fixée à l'enzyme. Les résultats obtenus jusqu'ici ne sont pas en faveur d'une interaction flavine-hème.

### III. — ASSOCIATION DES GLOBINES A L'HÈME

L'étude poursuivie par M. Banerjee depuis quelques années a pour but de rechercher les relations existant entre la fonction physiologique de l'hémoglobine et ses caractéristiques physico-chimiques. Ces recherches sont tout particulièrement orientées sur la liaison hème-globine. On étudie d'une part le rôle de cette liaison dans l'architecture de la molécule, et, d'autre part, l'effet éventuellement produit sur l'énergie de cette liaison par de petites modifications de caractère connu provoquées dans la partie protéique.

1. *Rôle de l'hème dans la cohésion interne de l'hémoglobine*. — Ayant précédemment montré la réversibilité de l'association hème-globine dans la méthémoglobine, M. Banerjee a pu étudier une des conséquences de la dissociation de l'hème sur l'état de la protéine. Rappelons que cette dissociation se fait en milieu neutre, et qu'elle est, par suite, extrêmement restreinte, étant donné la valeur élevée de l'énergie libre d'association. Il a donc été nécessaire d'avoir recours à un ligand protéique ayant une forte affinité pour l'hème. Une apoprotéine a pu être ainsi libérée et isolée.

Diverses techniques, dont un test thermodynamique classique dit de « dilution », montrent que la présence des groupes héminiques est indispensable pour que les quatre chaînes peptidiques restent associées comme elles le sont dans la molécule d'hémoglobine. Une fois l'hème dissocié, la molécule perd sa cohésion. Puisqu'il est connu que les groupes prosthétiques ne participent pas directement à la liaison des chaînes entre elles, la dissociation de l'hème doit entraîner la perte d'une complémentarité de structures par suite d'un changement de conformation plus ou moins généralisé.

2. *Effet du blocage des groupes sulfhydryques accessibles (chaîne 3) sur l'équilibre des liaisons hème-globine*. — MM. Cassoly et Banerjee ont entrepris un travail dont les premiers résultats montrent que la fixation de parachloromercuribenzoate (PCMB) sur les groupes thiols libres de l'hémoglobine ne modifie pas sensiblement l'égalité des quatre groupes prosthétiques. Dans les mêmes conditions (blocage des groupes thiols), il est bien connu que l'interaction relative et l'équilibre d'oxygénation est supprimée. Diverses techniques plus raffinées, dont la mise au point est en cours, doivent permettre de confirmer ces résultats.

Afin de mieux apprécier un rôle éventuel des groupes thiols, tant dans l'équilibre d'oxygénation que dans l'équilibre hème-globine, MM. Cassoly et Banerjee

ont commencé à étudier une hémoprotéine k chaine unique, la myoglobine de thon, qui contient un groupe thiol à la différence des myoglobines de mammi-

#### IV. — PHOTOSYNTH&SE

Le groupe dirigé par M. P. Joliot a poursuivi ses recherches sur la photosynthese de *Chhrella Pyrenoidosa*.

1. i. La technique de dosage ampérométrique de Toxygène a &é considérablement améliorée sur le plan de la sensibility et de la rapidité de réponse. Il est possible actuellement de déceler des productions d'oxygène de l'ordre de  $10^6$  de la concentration de la chlorophylle, ce qui a permis d'entreprendre des études cinétiques très fines portant sur l'effet d'éclats lumineux de très courte durée. Un dispositif de mesure de la fluorescence a été adjoint k l'appareil ampérométrique ; il rend possibles les mesures simultanées des variations de rendement de fluorescence et de vitesse d'émission d'oxygène.

2. Les travaux exposés dans la thèse de doctorat de M. Joliot ont été repris en relation avec la théorie moderne de la photosynth&e oil Ton suppose l'existence de deux réactions photochimiques distinctes, sensibilisées par des pigments différents.

Les résultats obtenus ont entièrement confirmé le bien fondé de cette conception. Le précurseur, responsable du jet d'oxygène qui s'observe au début de la période d'illumination, est détruit par Tune des réactions photochimiques et transformé par l'autre.

A l'état stationnaire, la concentration d'équilibre de ce précurseur dépend de la longueur d'onde, et elle est déterminée par le rapport des constantes de vitesse des deux réactions photochimiques. Les variations de ce rapport, suivant qu'il est mesuré dans la bande d'absorption de la chlorophylle A, ou dans celle de la chlorophylle B, font supposer que la réaction de destruction du précurseur qu'oxygène est sensibilisée par des pigments comprenant la chlorophylle B et que sa formation est sensibilisée par des pigments essentiellement constitués par la chlorophylle A.

M. Morin a entrepris l'étude de la fluorescence au début de la période d'illumination pour de très fortes intensités lumineuses. Les cinétiques observées dans ces conditions étant très rapides, il a été nécessaire de construire un dispositif établissant l'illumination des algues en un temps nettement inférieur à  $10^{-6}$  sec.; le dispositif utilise qui comprend une carabine 22 long rifle permettant d'obtenir des temps d'ouverture du faisceau, inférieurs k  $3/100$  de seconde. Alors, qu'aux faibles intensités lumineuses, la montée initiale de fluorescence est déterminée par des constantes de vitesse thermiques et photochimiques, aux fortes intensités, la cinétique n'est déterminée que par des constantes de vitesse photochimiques. Ces cinétiques sont alors identiques à celles observées en présence de certains inhibiteurs connus pour découpler la réaction photog. unique libérant Toxygène des réactions thermiques qui l'accompagnent. On pense que les cinétiques observées en très fortes lumières ou en présence d'inhibiteurs dépendent que de constantes de vitesse photochimiques, elles ne sont

pas du premier ordre. Un certain nombre d'interprétations ont été proposées pour expliquer cette particularité.

Le travail de M. Morin a donc permis d'isoler la réaction photochimique responsable de la production d'oxygène de l'ensemble des réactions thermiques et photochimiques impliquées dans le processus photosynthétique. Il a fait l'objet d'une publication au Journal de Chimie Physique (actuellement sous presse). Il est, pour le moment, repris par M. Delosme qui a déjà apporté un certain nombre d'améliorations techniques.

M<sup>me</sup> Joliot a entrepris un travail portant sur l'étude des relations entre la vitesse de Rémission d'oxygène et la concentration des complexes précurseurs d'oxygène.

## V. — DIVERS

M<sup>me</sup> Filitti-Wurmser a apporté, par des déterminations de poids moléculaires une contribution  $k$  de nouvelles recherches entreprises par MM. Roche, Bessis, Fine et Autran sur l'hémoglobine d'*Arenicola marina*.

Deux méthodes ont été employées :

1. la méthode de l'approche de l'équilibre a fourni comme valeur du poids moléculaire  $M = 2\,900\,000 \pm 54\,000$  à  $pH = 7,3$  ;

2. les mesures indépendantes du coefficient de sédimentation et du coefficient de diffusion ont été effectuées. Les résultats  $S_{20W}^{\circ} = 54 \pm 0,5 \cdot 10^{-18}$  et  $D_{20W}^{\circ} = 1,66 \pm 0,15 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ sec.}^{-1}$  donnent une valeur de  $M$  égale à  $3\,027\,000 \pm 360\,000$ , par conséquent, tout est cohérent avec la première détermination. On peut conclure des autres recherches effectuées sur le pigment que, lorsque celui-ci est altéré, il apparaît comme constitué par 12 subunités.

## CONFÉRENCES ET COLLOQUES

M. Wurmser a donné 6 conférences à Tokyo, Osaka, Hakata, Wakayama et Kyoto.

M<sup>me</sup> Filitti-Wurmser a donné 4 conférences à Tokyo, Osaka, Wakayama et Kyoto.

MM. Baudras, Iwatsubo et M<sup>lle</sup> Curdel ont présenté des communications à la Réunion Commune de la Société de Biochimie et de la Société de Chimie Biologique.

Mmes Labeyrie, Jacquot-Armand et M<sup>lles</sup> Naslin, Curdel, MM. Iwatsubo et Baudras ont présenté des communications au Colloque de Biologie Moléculaire.

## LISTE DES PUBLICATIONS

- <sup>s</sup>- FILITTI-WURMSER, Y. JACQUOT-ARMAND et R. WURMSER. « On the theory of fixation of isohémagglutinins on the erythrocytes. » *Bull. Math. Biophys.* 1963, 24, 3<sup>6</sup>i-
8. FURRI-WURMSER. « Relations entre les gènes ABO et les isohémagglutinines ». Symposium du 16<sup>e</sup> Congrès Médical Osaka.
- M. IWATSUBO. « Potentiel d'oxydoréduction de la D-2-Hydroxyacide («>>ptieur) oxydo-rtductase de la levure anaérobic » *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 77, 568-570.
- to. IWATSUBO et F. LABEYRIE. « D-Lactico-deshydrogénase de la levure, anaérobic Inactivation par la quinacrine, protection par le substrat et la flavme adenine dinu-deotide ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 59, 614-623.
- <sup>^</sup> IWATSUBO et A. CURDEL. « Détermination relative du poids moléculaire d'en-zymes non purifiés par la méthode du tamis moléculaire ». *C. R. Acad. Act.*, 1903,
- J- ROCHE, S. FILITTI-WURMSER, J. M. FINE et R. AUTRAN. « Nouvelles recherches sur l'étude au microscope électronique de l'hémoglobine (érythrocytine) d'*Aren-cok marina* L. et sa dissociation ». *Compt. R. Soc. Bwl*, 1903, <sup>157</sup>. M>9- . . . .
- \* WURMSER. « Aspects quantitatifs de l'isohémagglutination ». in : L'antigenicite, P. 5, Editions Flammarion. Paris.
- <sup>R</sup>- WURMSER. « Étude thermodynamique des isohémagglutinines humaines ». Sympo-sium du 16<sup>e</sup> Congrès Médical Osaka.
- <sup>R</sup>- WURMSER. \* Synthèses protéiques et maladies moléculaires ». *Am. Biol. Chn.*, 1963. - <sup>21</sup> « <sup>12</sup>3-
- J- WURMSER. « Jean Perrin et la Biologie ». *Jour. CHm. Phys.*, 1963, <>, 605.
- \* WURMSER. « Photochimie de la chlorophylle et mécanisme de la photosynthèse ». <sup>Pr</sup>oc. Intern. Congress. Biochem. Moscou, 1963.

## COMPOSITION DU SERVICE

- M. R. WURMSER, Professeur honoraire à la Faculté des Sciences.
- M<sup>e</sup> S. FILITTI-WURMSER, Directeur de Laboratoire de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>e</sup> p. LABEYRIE, Maître de Recherches au C.N.R.S.
- M. R. BANERJEE, Maître de Recherches au C.N.R.S.
- M. P. JOLIOT, Charge de Recherches au C.N.R.S.
- M. M. IWATSUBO, Chargé de Recherches au C.N.R.S.
- M.R. DELOSME, Attaché de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>e</sup> A. CURDEL, Attaché de Recherches au C.N.R.S.
- M. A. BAUDRAS, Attaché de Recherches au C.N.R.S.
- M. R. CHABAUD, Assistant à la Faculté des Sciences.
- M<sup>e</sup> A. JOLIOT, Attachée de Recherches au C.N.R.S.
- to. C. GENTOU, Attach\* de Recherches au C.N.R.S.
- to. R. CASSOLY, Boursier de la D.G.R.S.T.

M. J. ROQUEFORT, Boursier de la D.G.R.S.T.  
M<sup>lle</sup> A. DI FRANCO, Attaché de Recherches à la D.G.R.S.T.  
M. A. ISOMOTO, Attaché de Recherches de la D.G.R.S.T.  
M<sup>lle</sup> O. GROUDINSKY, Stagiaire au C.N.R.S.  
M<sup>lle</sup> L. NASLIN, Chimiste adjointe au C.N.R.S.  
M<sup>me</sup> C. DEPRETTE, Biologiste adjointe au C.N.R.S.  
M<sup>me</sup> M. DELOSME, Biologiste adjointe au C.N.R.S.  
M. A. SPYRIDAKIS, Chimiste adjoint au C.N.R.S.

*Personnel technique de la Station d'Ultracentrifugation (C.N.R.S.) :*

M. L. SAGAERT, Ingénieur-physicien ; M<sup>lle</sup> C. GALLFI, Ingénieur-physicien ; M<sup>me</sup> S. LAROCHE ; M<sup>me</sup> J. LE FEUVRE ; M. G. ADDA ; M<sup>lle</sup> DRIFIMY ; M<sup>lle</sup> S. MAZAUD ; M. A. EVENO.

## SERVICE DE BIOCHIMIE THÉORIQUE

Rapport de M. BERNARD PULLMAN, Chef de Service.

### I. - STRUCTURE & ELECTRONIQUE DES PROTÉINES

En collaboration avec le Dr Del Re de l'Institut de Physique Théorique de l'Université de Naples et du Professeur Yonezawa de l'Université de Kyoto (Japon), nous avons mené à bien une étude d'ensemble ayant pour objet la détermination de la structure électronique de tous les acides aminés entrant dans la constitution des protéines. La grande majorité de ces acides comportant des radicaux saturés, il s'agissait dans ce travail essentiellement de la détermination des niveaux d'énergie et des fonctions d'onde correspondant à la distribution des électrons de ces composés (les données analogues associées aux électrons des fractions aromatiques de certains de ces acides ont déjà été évaluées antérieurement). La méthode utilisée pour cette étude des électrons  $\pi$  a été établie par Del Re et représente une application aux systèmes saturés d'un procédé analogue à la méthode des orbitales moléculaires dans l'approximation de Huckel. Le travail lui-même est un premier exemple d'application des méthodes de la Chimie Quantique aux systèmes biochimiques saturés.

Ont été déterminés, en particulier, les distributions des charges électriques des formes neutre, dipolaire, cationique et anionique des vingt acides  $\alpha$ -aminés des protéines. Ces résultats, susceptibles de nombreuses applications ont été mis en corrélation, en particulier, avec les déplacements  $\delta$  observés en résonance nucléaire magnétique dans différents solvants par plusieurs groupes de chercheurs. Un parallélisme général existe entre les valeurs des déplacements chimiques ( $\delta_H$ ) et celles des déplacements chimiques des hydrogènes ( $Q_H$ ) ou des carbones porteurs; de ces hydrogènes ( $Q_C$ ). Les résultats peuvent en fait être représentés par l'équation générale.

$$S_H = -A Q_0 - B Q_C + C,$$

La méthode des moindres carrés conduisant aux valeurs  $A = 9,7$ ,  $B = 133,93$ ,  $C = 9,67$  pour les données relatives aux solutions alcalines et acides. Ce résultat est en accord avec la théorie générale la contribution de  $Q_C$  à la valeur de déplacement chimique est plus importante que celle de  $Q_0$ .

Les recherches ont également été poursuivies sur des caractéristiques macroscopiques des protéines, en particulier sur la question controversée de l'aptitude de ces macromolécules à fonctionner comme des semi-conducteurs. Dans les calculs effectués jusqu'ici sur ce sujet, tels ceux effectués dans les années

récentes dans notre laboratoire par M<sup>me</sup> Suard, la conjugaison à l'échelle macromoléculaire était attribuée aux possibilités de délocalisation électronique à travers les liaisons hydrogène susceptibles de se former entre les groupements peptidiques. B. Pullman a observé qu'au point de vue de telles recherches, le cas de la polyglycine est particulier. En effet, la présence de deux hydrogènes sur le carbone alpha de la glycine permet de considérer cet acide aminé comme un système  $\pi$ , hyperconjugaison du groupe  $\text{CH}_2$  servant de pont entre les électrons mobiles des fonctions amines et carboxyles. La polyglycine peut donc être traitée comme un système  $\pi$ : unique et constitue ainsi le cas le plus favorable pour la manifestation (et reévaluation) de bandes d'énergie éventuelles. Les calculs effectués dans cette hypothèse conduisent à attribuer une valeur d'environ 7 eV à la largeur de la transition entre la plus haute bande de valence  $n$  et la plus basse bande de conduction. Ce résultat va à l'encontre de l'attribution d'une semi-conductivité électronique intrinsèque appréciable à une protéine correspondant au modèle adopté.

## II. — STRUCTURE ÉLECTRONIQUE DES ACIDES NUCLEIQUES

Les recherches effectuées durant l'année 1963 sur la structure électronique des acides nucléiques sont de trois sortes correspondant respectivement à : 1) l'accumulation de renseignements supplémentaires sur les propriétés électroniques des bases puriques et pyrimidiques, 2) le perfectionnement de la description du mode d'interaction des bases complémentaires à travers les liaisons hydrogène et 3) l'établissement des caractéristiques des bandes d'énergie éventuelle résultant de l'interaction à l'échelle macromoléculaire des paires de bases superposées.

Prenant comme point de départ les calculs self-consistent de Veillard et Pullman sur la répartition des charges électriques dans les bases puriques et pyrimidiques des acides nucléiques, M<sup>mes</sup> Berthod et Pullman ont évalué les valeurs et les directions des moments dipolaires et de certains moments de transition de ces composés. Dans la réévaluation des moments dipolaires il a été tenu compte, naturellement, à la fois des systèmes d'électrons  $n$  et  $\pi$ , les moments associés à ces derniers systèmes étant évalués par une application de la méthode de Del Re. Un accord satisfaisant avec l'expérience a été obtenu pour des moments connus (purine, adénine, uracile), et la prédiction a été faite que ces moments doivent être plus élevés pour la cytosine et la guanine que pour l'adénine et la thymine. Ce résultat est important à la fois pour la stabilité interne des acides nucléiques et pour l'interaction du type « en sandwich » entre ces acides et les substances aromatiques. En effet, la valeur de ces moments joue un rôle important dans la détermination de la grandeur des interactions Van der Waals-London susceptibles de mettre en jeu ces différents composés. Le résultat précité apporte donc une confirmation complémentaire de notre prédiction antérieure sur le rôle privilégié que devrait jouer la paire guanine-cytosine dans de telles situations. En revanche, en ce qui concerne les moments de transition, ce résultat a montré la nécessité d'études plus perfectionnées. De telles études sont en cours actuellement.

M<sup>me</sup> Pullman a effectué des recherches sur le modèle de la liaison hydro-

gene impliquant la participation de l'orbitale ap, vide de cet atome \*£ la transmission des effets de conjugaison entre deux systemes | >> e a f <sup>la transmis-</sup> <sup>miné des</sup> <sup>dre de</sup> <sup>un β</sup> <sup>iro-</sup>

l'interaction de deux systemes conjuges a travers une i . j 6 j. es \*e\* utilisé pour l'fude des paires complémentents des bases des acides nucieiqu et les conclusions comparées à celles des travaux anteneurs 'énergie dans les M. Ladik a fudie la possibilité d'existence des ^ - ^ dans les acides homopolynudéotides construits a l'aide des bases ^ nuclécs. nudéiques, par recouvrement des nuages ^ctroruques des ^ J ^ ^ La meme etude a 6t6 effective pour l'ensmb \*^J£TM£\* de ces résultats complémentaires superposées. Une extrapolation P ^ J S e dm ces acides a«x acides nucléiques eux-memes V ^ ^ ^ ^ S ^ L a d'environ d'une serie de bandes d'énerg.e ^ " P ^ ^ X T a s S e bande libre, en accord a.s-3 ev. entre la plus haute bande ^ P ^ ^ t o e S e s relatives a la semi-apparent assez satisfaisant avec des donndes experiment conductivity de ces acides.

### III. - MUTAGENESE ET CARCINOGENESE

**Des recherches sur les apats ^ c u ^ ^ ^ ^ ^ t** vies, essentiellement par M« Pullman, « ! « \* « £ ^ Tradiations (ultra- 'es mutations spontanées aux mutations P ^ r i m L u e s diverses. L'accent violettésouionisantes)ou induites par des s u b s ^ J J ^ ^ J " ^ , des muta- » « f m U sur la possibilité qu'ont TM TM \* S ^ £ \* Z m i k l e entre les bases en tions en augmentant les probabilités de couplages « ^ , 0 ^ e e r c s ou gur 3 e 9 £ 0 R S . J g i s s a n t , p a r e x e m p l e , s u r l ' e q u i l i b r e e n t r e ^ ^ ^ n ^ d r o l y s e d e s l i a i s o n s t a n t e s d e d i s s o c i a t i o n a c i d e o u e n c o r e s u r l a r a c i u » l'effet ^ d i f K r e n t s glycosidiques. L'étude a fourni des indication' P ^ c ^ U f possible. Ainsi, par » s e n t s p r e t e i t s s u r c e s d i f f e r e n t s f a c t e u r s d e m u t a t i o n ^ p d u e à l' a c t i o n d > u n e ^ m p l e , l a t h é ^ r i e p r é v o i t q u e ^ c i t a t i o n \* \* J 2 S l a p r o b a b i l i t é d' e x i s - ^ d i a t i o n u l t r a v i o l e t t e d o i t a c c r o i t r e d' u n e f a ? o n g é n e r a ^ e t , p a r t a n t , ^ c e d e t o u t e s l e s b a s e s d a n s u n e f o r m e ^ J - f ^ S o n p l u s s é l e c t i v e d o i t | f r é q u e n c e d e s c o u p l a g e s e r r o n f e a l o r s q u' u n e s t U e p a r f e s r a d i a t i o n s i o n i - r e s e n e r a c e p o i n t d e v u e l o r s d' u n e i o n i s a t i o n P ^ o T M l u ~ d a u x p y r i m i d i n e s ^ n t e s . L e s p r o b a b i l i t é s r e l a t i v e s d e m u t a t i o n s J \* ^ " a u D P 6 D , d e s s > t u r b é s s u r l a l i a i s o n s - 6 , o n t é t é é t u d i é e s d j ^ g . T M ^ D e m é m e s , d e s c \* l e u l s e x p l i c i t e s s u r l a s t r u c t u r e é l e c t r o n . q u e d e s d e n v e s a c o m p t e d e l' a u g m ^ f ^ i c u l i e r d e s d é r i v é s a l c o y l é s e n N 7 d e t a ^ ^ S j S a l c o y l é s p a r r u p t u r e J \* 0 » d e l a f a c i l i t é d e ' d e p u r i n a t i o n d e s a a d e ^ ^ J ^ d e 3 3 d i p o s i - \* e l a l i a i s o n g l y c o s i d i q u e d e l a g u a n n e d u t a i l a e l e s d i f f é r e n t s c a s , a u n i v e a u

...ation qu'il subit. L'ensemble de ... D'autre part, B. Pullman a étudié la structure électronique de différentes

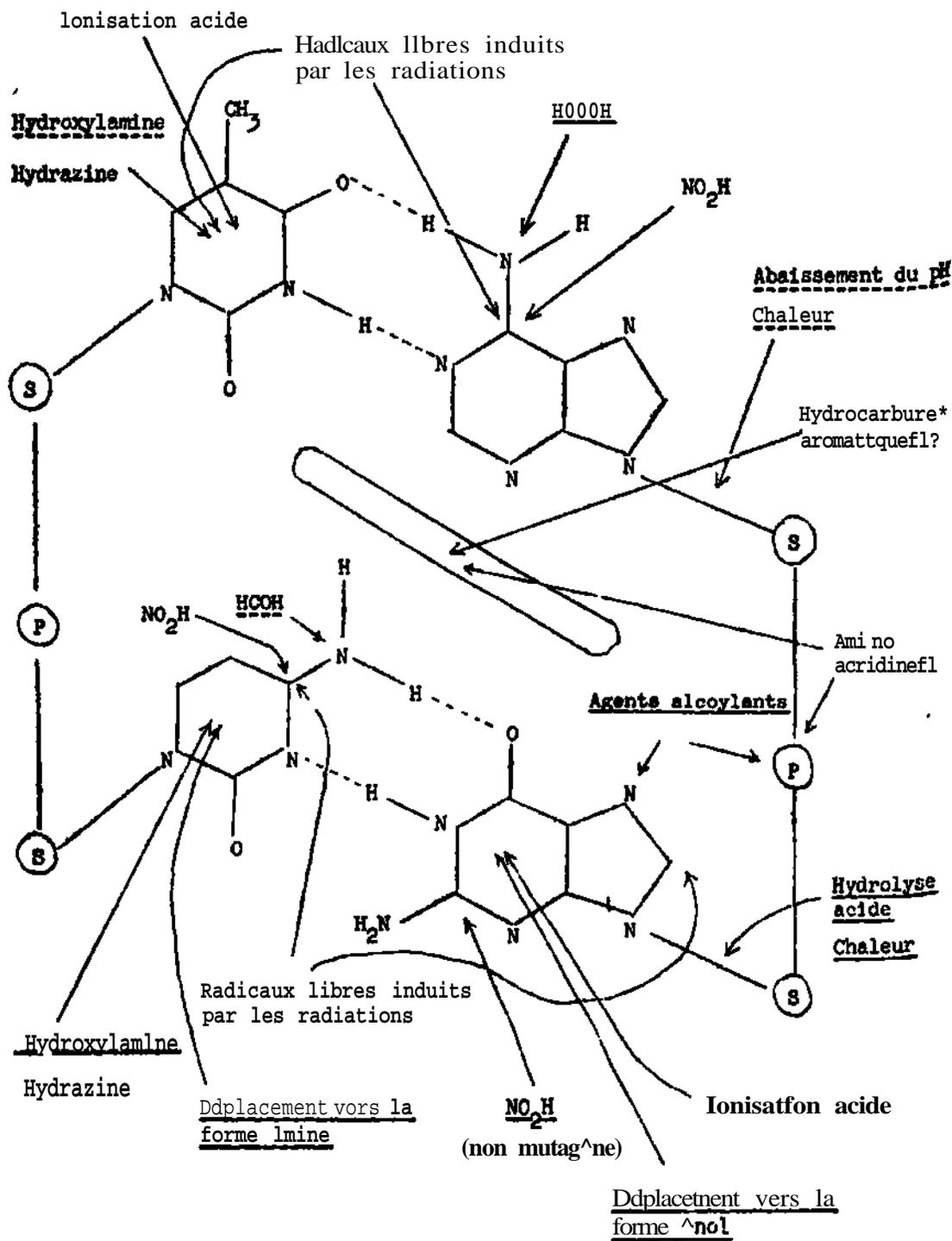


FIG. 1. — Les principaux si&ges d'action des agents mutagines sur TADN.

Paires de bases provenant d'un couplage erroné dû à la présence d'une base sous une forme tautomère rare. Cette étude permet de prévoir, par exemple, les modifications de réactivité chimique susceptibles d'être provoquées par de tels couplages erronés.

En ce qui concerne les problèmes de la carcinogenèse, nos travaux de cette année ont encore été centrés dans une large mesure sur le problème crucial du mécanisme et de la signification des interactions s'opérant ou pouvant s'opérer entre les substances cancérigènes et les polymères biologiques fondamentaux (acides nucléiques et protéines). Tout d'abord nous avons été obligés de continuer notre travail de critique des théories qui postulent l'implication, dans la carcinogenèse, des facteurs de transfert de charges. J'ai déjà rendu compte dans un rapport de notre critique de deux telles théories, celles de Mason et de Birbaumer en 1963 a vu la naissance d'une autre théorie du même genre, proposée par Lusky et Nash et qui postule, essentiellement, que les cancérigènes doivent être à la fois bons donneurs et bons accepteurs d'électrons. Rien n'est plus facile que de démontrer le caractère complètement erroné de cette proposition. Il faut d'évaluer les données correspondantes. Par exemple nous avons évalué le pouvoir donneur et accepteur d'électrons pour tous les hydrocarbures aromatiques au point de vue de leur activité cancérigène. Les résultats sont résumés dans le tableau I où ces composés sont classés dans l'ordre de leur pouvoir donneur et accepteur croissant. Il est évident que la proposition d'Allison et Nash n'a aucun fondement. Toute une série de critiques plus fondamentales ont également été opposées à leur théorie.

D'autre part, à l'occasion du Colloque International sur la Théorie Quantique des Polynucléotides et Polypeptides, qui s'est tenu à l'Université de Stanford en Californie en mars 1963, A et B. Pullman ont effectué une mise au point générale sur le problème de la signification possible dans la carcinogenèse des interactions entre les cancérigènes d'une part et les protéines ou les acides nucléiques d'autre part. Il résulte de notre avis de l'étude de l'ensemble des données théoriques et expérimentales disponibles, que les interactions chimiques avec les protéines, du type de celles observées par l'école de Madison (Heidelberger, Millers et leurs collaborateurs) sont les seules qui, actuellement, offrent une corrélation satisfaisante avec les exigences de la théorie et, en même temps, sont les seules qui paraissent, au point de vue expérimental, être liées d'une façon directe et quantitative au phénomène de la cancérisation chimique. Certes, après les découvertes récentes presque tous les groupes de substances cancérigènes paraissent interagir aussi directement avec les acides nucléiques, certains même d'une façon prononcée, et nous avons nous-mêmes fourni une analyse au niveau électronique, du mécanisme de ces interactions. Toutefois, ces fractions paraissent dans la plupart des cas être dépourvues de spécificité vis-à-vis des substances actives, ou sans relation avec la grandeur de l'activité.

Cette situation pose un problème difficile mais fondamental. La cancérisation est probablement le plus probablement une perturbation de l'appareil génétique, la perturbation de l'action du cancérigène sur les acides nucléiques doit nécessairement faire partie du processus de la cancérisation. L'analyse précise suggère que la majorité des cas, en particulier pour les substances aromatiques, un mécanisme d'action indirecte, par l'intermédiaire du complexe protéine-cancé-

TABLEAU I. — *Lepouvoir donneur (ou accepteur) d\*électrons des hydrocarbures aromatiques, mesuré par la valeur du coefficient | k | de son orbitale moléculaire la plus haute occupée (ou la plus Basse libre).*

Composé	M	Activity canc&ogine
Benzine . . . . .	I	—
Triphényline . . . . .	0,684	—
Naphtalène . . . . .	0,618	—
Phinanthrène . . . . .	0,605	—
3, 4-Benzphénanthrène . . . . .	0,566	+
1, 2, 6, 7-Dibenzpyrène . . . . .	0,555	—
1, 2, 5, 6-Dibenzphénanthrène . . . . .	0,550	+
Coronène . . . . .	0,539	—
3, 4, 5, 6-Dibenzphénanthrène . . . . .	0,535	—
1, 2, 3, 4-Dibenzphénanthrène . . . . .	0,532	+
Chrysène . . . . .	0,520	—
Picène . . . . .	0,501	—
1, 2, 3, 4-Dibenzanthracène . . . . .	0,499	—
1, 2-Benzpyrène . . . . .	0,497	—
1, 2, 7, 8-Dibenzanthracène . . . . .	0,492	+
1, 2, 5, 6-Dibenzanthracène . . . . .	0,473	++
Pyrène . . . . .	0,455	—
1, 2-Benzanthracène . . . . .	0,452	±
1, 2-Benzpéryline . . . . .	0,439	—
Pentaphène . . . . .	0,437	—
2, 3, 5, 6-Dibenzphénanthrène . . . . .	0,419	—
Anthracène . . . . .	0,414	—
2, 3, 7, 8-Dibenzphénanthrine . . . . .	0,405	—
1, 2, 3, 4-Dibenzpyrène . . . . .	0,398	++
4, 5, 10, 11-Di (1, 2'-Naphtho)-Chrysène . . . . .	0,383	—
3, 4-Benzpyrène . . . . .	0,371	+++
1, 2, 9, 10-Dibenznaphtacène . . . . .	0,361	—
1, 2'-Anthra-1, 2-Anthracène . . . . .	0,360	—
1, 2, 7, 8-Dibenznaphtacène . . . . .	0,358	—
1, 2, 3, 4-Dibenznaphtacène . . . . .	0,356	—
2, 3, 8, 9-Dibenzpérylène . . . . .	0,356	—
2, 1'-Anthra-1, 2-Anthracène . . . . .	0,348	—
Pérylène . . . . .	0,347	—
3, 4, 9, 10-Dibenzpyrine . . . . .	0,342	+++
1, 2-Benznaphtacène . . . . .	0,327	—
3, 4, 8, 9-Dibenzpyrène . . . . .	0,303	+++
2', 3'-Naphtho-3, 4-Pyrène . . . . .	0,303	—
Naphtacène . . . . .	0,295	—
Anthanthrène . . . . .	0,291	—
3, 4, 9, 10-Di (2', 3'-Naphtho)-Pyrine . . . . .	0,273	—
Pentacène . . . . .	0,220	—
Naphthodianthrine . . . . .	0,177	—

rogene, qui serait alors le veritable cancérogène. Nous poursuivons activement des recherches dans ce domaine. Un rapport sur ce proÛ«ed«terê, presenté par B. Pullman au Colloque International sur les Aspects Moleculaires de la Mutagenese et la Carcinogenese qui doit se tenir à Oak Ridge en avnl 1964.

IV. - ASPECTS ELECTRONIQUES DES REACTIONS METABOLIQUES  
PROBLEMES DE PHARMACOLOGIE

Ont &e etudiees en particulier les réactions de transfert enzymatique des groupes me''thyles et les réactions d'oxydation.

M''e Pérault et B. Pullman ont établi que l'emplacement, et la \* \* TM 2 la fa-ilité de démé-  
0- et N-méthylations des molécules conjuguées sont \* \* terminée essentielle-  
ment par la charge électronique des atomes de O et N et que la relation oxydative des dérivés alcoolés correspondants  
\*ent par la charge positive nette de l'atome de O ou N  
gru? alcyle. Ces résultats indiquent que le mécanisme de transfert enzy-  
matique des groupes méthyles est donc régi par des facteurs » " \* « " » » ~  
que les études antérieures des mêmes auteurs ont mis en évidence comme jou-  
vernant le mécanisme de transfert des groupes monocarbonés par l'coenzyme  
^ l'acide folique ou des groupes bicarbonés par les acétyltransférases

Le problème particulièrement difficile des aspects \* \* « % \* £ \* £ ^  
t'ons d'oxydation et surtout d'hydroxylation méUohque, a été ^ " " ^ ^  
beaucoup de soin par M. Diner qui s'est fixé pour but d'étudier oe probléme  
dans son ensemble. Son travail a donc comporté l'exécution d'un vaste ^ V de  
df calculs sur un ensemble très diversifié ^ " ^ S j S T ? ^ S u e s  
Actions, que ce soient des constituants naturels de l'oxydation méta-  
d'utilité pharmacologique. Il apparaît que les réactions d'nytl du foie sont  
-H4UC observées inLo ou a l'aide des fractions microsomales r^tat fonda-  
\*fficales à interpréter sur la base des propriétés ^ \* ^ " " ! ^ J L % £ ^  
^ntal des molécules hydroxylées. Par contre, ^ ^ ^ ^ ^ ^ L X ^ -  
la «on s'interprètent aillent a l'aide des caractéristiques " g S T S S ^ t o  
J<\* interatq^iques ou des paires électroniques libres de l'atome d'azote, le  
sens molécule a l'état excité ou dans l'ion i-^oxy-L-L^L-S-S-L e5 inter-  
sens de l'hypothèse expérimentale d'une hydroxylation... vient l'oxygène moléculaire, avec formation initiale d'un epoxyde ou d'un N-oxyde.  
N^c Plus ces résultats théoriques éclairent ie m<\* \* TM » — transformé en radi-  
an, laissant penser que, l'oxygène moléculaire n'y - ^ à hydroxyler est  
^x libres hydroxyle ou perhydroxyle, mais que la molécule  
P^tturbée sous l'effet d'un catalyseur. -ffprtiifea sur les

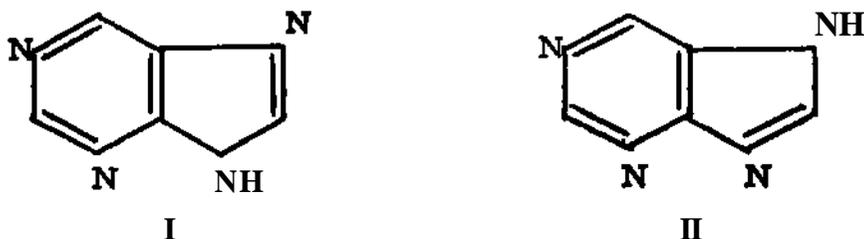
Par ailleurs des études préliminaires ont également ^ f ^ ^ ' /  
^a \*eurs électroniques intervenant dans les réactions de conjugaison métebohque  
^ParticuUer dans les réactions de glucuromdation et dans les réactions

me ^ r S m à n a indiqu. la signification de \* \* \* rents résultats  
pour Elucidation de certains aspects électroniques de la P^cologie. Les  
travaux ^ on de l'acti-  
vité bac nte des dérivés

de la phénothiazine, de l'activité psychomimétique des antagonistes de la sérotonine, de l'action antitumorale des antimétabolites de l'acide folique, dans l'interprétation des acétylations, des méthylation, des réductions et des conjugaisons métaboliques d'un certain nombre de produits pharmacologiques importants.

## V. — DIVERS

Veillard et Pullman ont étudié les facteurs responsables de l'incorporation sélective de certaines bases puriques dans les analogues de la vitamine B<sub>12</sub>. Partant des résultats cristallographiques indiquant que la liaison adénine-ribose se fait dans cette molécule par l'intermédiaire de l'atome N<sub>7</sub> au lieu de l'atome N<sub>9</sub> de l'acide adénylique habituel et que, par conséquent, la liaison de coordinance avec l'atome de cobalt implique N<sub>9</sub>, ces auteurs ont émis l'hypothèse que la possibilité d'incorporation d'une base purique dans le squelette de la vitamine B<sub>12</sub> pourrait être liée à la facilité de conversion de la forme tautomère usuelle du squelette purique (qui est la forme I) en la forme tautomère rare II, donc à la différence de stabilité entre ces deux formes. Le système des liaisons localisées étant le même dans les deux formes, la différence de stabilité est représentée

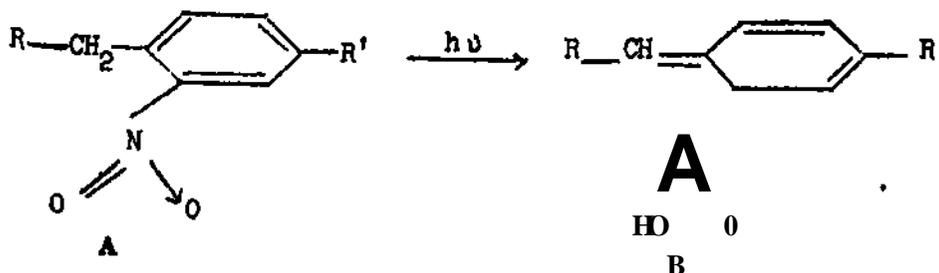


par la différence des énergies de résonance pour le système d'électrons  $\pi$ . Le calcul explicite de ces énergies pour les deux formes tautomères de bases puriques dont les possibilités d'incorporation dans la vitamine B<sub>12</sub> ont été étudiées expérimentalement confirme dans l'ensemble l'hypothèse de Veillard et Pullman.

Grâce à certains travaux expérimentaux récents de Duchesne et ses collaborateurs, B. Pullman a pu examiner le problème des facteurs responsables de la radiorésistance des solides organiques conjugués. Ce dernier auteur a mis en évidence auparavant l'existence d'une corrélation entre une telle radiorésistance et la valeur de l'énergie de résonance par électron  $\pi$  de la molécule conjuguée. Deux savants russes Voevodskii et Molin ont proposé plus récemment l'existence d'une corrélation semblable entre la radiorésistance et la position du premier singulet excité des molécules en question. Or il est évident que les deux corrélations ne sauraient être valables ensemble que dans les composés dans lesquels une corrélation interne existe entre l'énergie de résonance par électron  $\pi$  et la position du premier singulet excité. Les études effectuées par Duchesne et ses collaborateurs sur des composés judicieusement choisis dans lesquels cette corrélation interne n'est pas conservée, montrent que seule est valable la corrélation mettant en jeu l'énergie de résonance.

Mlle Valdemoro et B. Pullman ont étudié les facteurs responsables des pro-

Plusieurs photochromes de plusieurs groupes de substances organiques et, en particulier, les orfAo-nitrotoluènes. L'existence de photochromie est attribuée dans ce groupe de molécules à la production d'une forme tautomère sous l'effet de l'irradiation, par déplacement d'un hydrogène relativement mobile. Ainsi par exemple dans le cas des orf/w-nitrotoluènes, la forme A incolore se transforme sous l'effet de l'irradiation en la forme B colorée. La disparition de l'irradiation s'accompagne d'une transformation de la forme B en la forme A, donc de la disparition de la couleur.



Il est en vue de certaines applications possibles des substances photochromes dans la défense contre les effets destructeurs d'une irradiation puissante, un problème particulièrement important concerne la durée de la persistance possible de la forme colorée après la cessation de l'irradiation. Les travaux de M<sup>Uc</sup> Valdemoro et B. Pullman ont permis d'établir une règle quantitative rattachant la vitesse de la décoloration, donc du retour à la forme tautomère primitive, à la différence d'énergie de résonance entre les deux formes. D'une manière générale, l'énergie de résonance de la forme A est toujours supérieure à celle de la forme B (ce qui en est de même pour son énergie de transition au premier état excité). La règle précitée montre que la vitesse de décoloration est proportionnelle à l'énergie de résonance de la forme A par rapport à la forme B. Les auteurs ont également étudié d'une manière très détaillée l'influence de divers types de substituants sur cet équilibre tautomère.

Par ailleurs, toute une série de travaux de caractère technique ont été effectués par différents travailleurs du laboratoire en relation avec le perfectionnement des méthodes de la chimie quantique que nous utilisons et certains de ces perfectionnements ont été appliqués à l'étude de la structure électronique de molécules simples. Il convient de signaler dans ce domaine en particulier les travaux de M. Berthier sur l'étude des systèmes à couches électroniques incomplètes, étude qui rencontre de grandes difficultés pratiques. En l'absence du champ self-consistent, celles-ci proviennent du fait que chaque peptide d'orbitales contenu dans la fonction d'onde totale est défini par une équation Hartree-Fock différente. De nombreux procédés ont été proposés pour tourner ces difficultés, mais peu ont reçu des applications effectives. M. Berthier et M. Baudet ont introduit un certain nombre de modifications dans la technique de la méthode de densité, de manière à la rendre utilisable pour la détermination des orbitales moléculaires des composés de ce genre et l'aide d'ordinateurs électroniques. Par exemple, ils ont calculé les premiers états électroniques du benzyle en minimisant non seulement l'énergie de l'état fondamental, mais aussi celle des deux premiers doublets excités et celle du premier quadru-

plet. Les résultats ainsi obtenus donnent une interprétation satisfaisante des spectres électroniques et E.P.R. de ce radical.

Dans ce domaine de recherche de chimie théorique, M. Kutzelnigg a apporté une contribution importante à la résolution du problème de deux électrons en mécanique quantique par détermination directe des orbitales naturelles; M<sup>me</sup>B Serre et Le Goff ont étudié la structure électronique de NO<sub>2</sub> et de N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> \ MM. Veillard et Del Re ont étudié l'hybridation dans les cycloparaffines et MM. Berthier et Sureau ont effectué des recherches sur l'ionisation des atomes en couches internes.

---

### LISTE DES PUBLICATIONS

- A. PULLMAN. « Relations entre le potentiel d'oxydo-réduction des systèmes réversibles et les indices caractéristiques de leur structure électronique ». *Tetrahedron*, 1963, 1<sup>^</sup> suppl. 2, 441.
- G. BERTHIER, J. BAUDET et M. SUARD. « Emploi des méthodes matricielles pour l' calcul de la structure électronique des grandes molécules conjuguées ». *Tetrahedron*\* 1963, 19, suppl. 2, 1.
- A.-M. PERAULT et B. PULLMAN. « Electronic Aspects of enzymatic acetyl transfer reactions ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 66, 86.
- B. PULLMAN. « Sur la biogenèse des mélanines ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 66, 164\*
- B. PULLMAN. « A quantum mechanical investigation of pyridoxal dependent reactions ». *Comptes Rendus du Symposium on Chemical and Biological Aspects of Pyridoxal Catalysis*, (Rome, oct. 1962), Pergamon Press, Oxford, 1963, p. 103.
- A. PULLMAN. « On the specific reactivity of chlorins towards an electrophilic attack of the methene bridges ». *7. Amer. Chem. Soc.*, 1963, 85, 366.
- B. PULLMAN. « Charge density, chemical reactivity and basicity of purine ». *Tetrahedron Letters*, 1963, 4, 231.
- A. PULLMAN et H. BERTHOD. « Excitation transfer and carcinogenesis ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 66, 277.
- A. VEILLARD et B. PULLMAN, « Etude par la méthode du champ moléculaire self-consistant de la structure électronique des bases puriques et pyrimidiques d'intérêt biologique chimique ». *J. Theoret. Biol.*, 1963, 4, 37.
- W. KUTZELNIGG. « Zur Verwendung der vollständigen Laguerre Funktionen bei quantenchemischen Rechnungen, *Theoret. Chim. Acta*, 1963, 1, 257.
- G. DEL RE, B. PULLMAN and T. YONEZAWA, « Electronic structure of the  $\alpha$ -amino acids of proteins. I — Charge distribution and proton chemical shifts ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 75, 153.
- A. PULLMAN et B. PULLMAN. « On the mechanism of ultraviolet induced mutations ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 75, 269.
- A. PULLMAN. « Sur Interaction de deux systèmes conjugués à travers une liaison hydrogène ». *C. R. Acad. Sci.*, 1963, 256, 5435.
- A. VEILLARD et B. PULLMAN. « Sur Incorporation des bases puriques dans les analogues de la vitamine B<sub>12</sub> ». *C. R. Acad. Sci.* 1963, 257, 291.

- A. PULLMAN.** « Aspects de la structure Electronique de nouveaux types de composés cancérogènes aromatiques ». *C. R. Acad. Sc.*, 1963, **257**, 288.
- A. M. PERAULT et B. PULLMAN.** « Aspects Electroniques des transferts enzymatiques des groupes méthyles ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 75, 1.
- W. KUZZELNIGG.** Die Lösung des quantenmechanischen Zwei-Elektronenproblems durch unmittelbare Bestimmung der natürlichen Einelektronenfunktionen. I. Theorie ». *Theoret. Chim. Acta.*, 1963, 1, 327.
- **KUZZELNIGG.** « Résolution du problème à 2 Electrons en mécanique quantique par détermination directe des orbitales naturelles. II. Application aux états fondamentaux de Thulium et des ions isoélectroniques ». *Theoret. Chim. Acta*, 1963, 1, 343.
- B. PULLMAN.** « Les bandes d'énergie et la structure Electronique de la polyglycine ». *C. R. Acad. Sc.*, 1963, 257, 2488.
- A. PULLMAN.** « Electron delocalization through hydrogen bonds in proteins ». Communication faite au Symposium International sur la Théorie Quantique des Polypeptides et des Polynucleotides, Stanford University, avril 1963, *Biopolymers Symposia*, 1964, 1, 29.
- B. PULLMAN.** « Well — and mis — coupled purine-pyrimidine pairs ». *Israel Journal of Chemistry*, sous presse.
- B. PULLMAN.** « Radioresistance of solid conjugated molecules ». Comptes Rendus du Symposium International: «Electronic Aspects of Biochemistry», Ravello, sept. 1963, Academic Press, sous presse.
- S. DINNER.** « Electronic aspects of biochemical hydroxylation ». Comptes Rendus du Symposium International: «Electronic Aspects of Biochemistry», Ravello, sept. 1963, Academic Press, sous presse.
- A. PULLMAN.** « The theory of chemical carcinogenesis and the problem of hydrocarbon-Protein interaction ». Communication faite au Symposium International sur la Théorie Quantique des Polypeptides et des Polynucleotides, Stanford University, avril 1963, *Biopolymers Symposia*, 1964, 1, 47.
- B. PULLMAN.** « Aspects of the electronic structure of the nucleic acids in relation to the theories of mutagenesis and carcinogenesis ». Communication faite au Symposium International sur la Théorie Quantique des Polypeptides et des Polynucleotides, Stanford University, avril 1963. *Biopolymers Symposia*, 1964, 1, 141.
- A. PULLMAN.** « Molecular aspects of mutations ». Comptes Rendus du Symposium international « Electronic Aspects of Biochemistry », Ravello, sept. 1963, Academic Press, sous presse.
- B. PULLMAN.** « Electronic Aspects of Pharmacology ». Comptes Rendus du Symposium International « Electronic Aspects of Biochemistry », Ravello, sept. 1963, Academic Press, sous presse.
- J. LADIK.** « Quantum mechanical calculations of the electronic structure of DNA ». Comptes Rendus du Symposium International « Electronic Aspects of Biochemistry », Ravello, sept. 1963, Academic Press, sous presse.
- **BATHOD et A. PULLMAN.** « Moments dipolaires et moments de transition des bases puriques et pyrimidiques d'intérêt biologique ». *C. R. Acad. Sc.*, 1963, **257**, 2738.
- B. AUDET et G. BERTHIER.** « Configurations électroniques incomplètes. III. — Les premiers niveaux d'énergie du radical benzyle ». *J. de Chim. Phys.*, 1963, 60, 1161.
- A. VETTER et G. DEL RE.** « Hybridization in cyclobutane and cyclopropane ». *Theoret. Chim. Acta*, 1964, 2, 55.

- A. SUREAU et G. BERTHIER. « Recherches théoriques sur l'ionisation des atomes en couche interne. I. Étude des ions Al par la méthode du champ self-consistent. » *J. de Physique*, 1963, 24, 672.
- B. PULLMAN et A. PULLMAN. « Quantum Biochemistry ». Wiley's Interscience Division, New-York 1963, 868 pages.
- B. PULLMAN. « La Biochimie Electronique ». Que sais-je?, Presses Universitaires de France, 1963.

---

### COMPOSITION DU SERVICE

- M. B. PULLMAN, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris.
- M<sup>me</sup> A. PULLMAN, Directeur Scientifique au C.N.R.S.
- M. G. BERTHIER, Maître de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> J. SERRE, Professeur à l'École Normale Supérieure de Jeunes Filles de Sèvres.
- M. T. YONEZAWA, Professeur à l'Université de Kyoto (Japon).
- M. R. COLLIN, Boursier du Public Health Service (U.S.A.).
- M. A. ESPINOSA, Professeur à l'Université de Santiago (Chili).
- M<sup>me</sup> H. BERTHOD, Chargée de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> A.-M. PERAULT, Chargée de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> J. BAUDET, Assistante à la Faculté des Sciences.
- M<sup>me</sup> C. GIESSNER-PRETTRE, Chargée de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> M. SUARD, Agrégée-Préparatrice à l'École Normale Supérieure de Jeunes Filles de Sèvres.
- M. A. VEILLARD, Agrégé-Préparateur à l'École Normale Supérieure.
- M<sup>lle</sup> C. VALDEMORO, Chercheur Stranger (Espagne).
- M. W. KUTZELNIGG, Boursier de l'OTAN (Allemagne).
- M. S. DINER, Attaché de Recherches au C.N.R.S.
- M. A. SUREAU, Attaché de Recherches au C.N.R.S.
- M. P. CLAVERIE, Ancien élève de l'École Polytechnique.
- M. M. ROSSI, Chercheur Stranger (Italie).
- M. F. SCHNEIDER, Stagiaire de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>lle</sup> C. CAILLY, Boursière du Comité « Cancer et Leucémie ».
- M<sup>me</sup> M. J. MANTIONNE, Boursière du Comité « Cancer et Leucémie ».
- M. P. MILLIE, Élève de l'École Normale Supérieure.
- M. J. P. MALRIEU, élève de l'École Normale Supérieure.
- M. B. LIVY, élève de l'École Normale Supérieure.
- M<sup>me</sup> C. HUMMEL, élève de l'École Normale Supérieure de Jeunes Filles de Sèvres.
- M<sup>me</sup> E. KOCHANSKI, Boursière du 3<sup>e</sup> cycle.
- M. R. ASTIC, Collaborateur technique.
- M<sup>me</sup> P. FRANCOIS, Collaborateur technique.
- M<sup>me</sup> M. LANDEZ, Secrétaire.

## SERVICE DE BIOCHIMIE A

Rapport de M<sup>TM</sup> y. KHOUVINE, Chargte de Service.

Nous avons, cette année, approfondi le mécanisme de la biosynthèse des protéines par les noyaux entiers ou délatés, les particules de Sripati et les ribosomes. Nous avons, également, poursuivi l'étude de la glycolyse aérobie des noyaux, en relation avec celle du cytoplasme. Comme tissus, nous avons choisi le foie normal de Rat, le foie en régénération et les cellules de l'hépatome ascitique de Zajdela. Nous avons aussi continué l'étude de la détoxification du foie de Rat, après ingestion de jeûne de beurre ainsi que la mise au point des méthodes d'obtention de mitochondries pures et intactes.

M. C. E. Sripati a étudié le métabolisme des particules qui sortent des noyaux au cours de l'incubation, en marquant d'abord les cellules entières de l'hépatome ascitique avec  $^{32}\text{P}$ , l'acide orotique  $^{14}\text{C}$  et avec des acides aminés enticement marqués par  $^{14}\text{C}$ . Le marquage est fait pendant 5 à 30 minutes. Les particules se marquent pas pendant les 5 premières minutes, puis le surnageant se marque enfin, après 30 minutes les radioéléments sont incorporés par les particules. Les teneurs en ADN, ARN et protéines, prouvent que les radioéléments sont incorporés par ce qu'on appelle la chromatine nucléaire. Le reste reste intact à l'intérieur, comme le montrent les microphotographies électroniques, et c'est lui qui fixe rapidement les radioéléments.

Le métabolisme des particules a été également étudié avec les mêmes précurseurs *in vitro* après leur isolement. L'incorporation des acides aminés est beaucoup plus lente que dans les cellules entières et TAMP est retrouvé, après 20 minutes, dans une fraction acido-insoluble. L'étude enzymatique doit élucider le rôle des polymérase dans ces systèmes.

C. E. Sripati a, en outre, cherché si la glycolyse anaérobie nucléaire suit le cycle des pentosesphosphates. Pour cela, il a incubé des noyaux de foie normal en présence de  $^{14}\text{C}$ -glucose et de  $^6\text{C}$ -glucose, en mesurant la radioactivité du  $\text{CO}_2$  dégagé pendant l'incubation. Il a observé que la radioactivité du  $\text{CO}_2$  est beaucoup plus grande quand le substrat est le  $^{14}\text{C}$ -glucose. Ceci prouve que le métabolisme glucidique du noyau se fait aussi par utilisation du cycle des pentosesphosphates. Mais, comme dans le cycle de Meyerhof, l'utilisation du glucose-6-phosphate est meilleure que celle du glucose et les noyaux ne peuvent pas effectuer la glycolyse anaérobie cytoplasmique si le substrat est du glucose et si c'est du glucose-6-phosphate. L'interprétation de ces résultats est la même que celle qui a été déjà proposée et qui fait jouer un rôle à TAMP dans la formation d'ATP.

L'étude enzymatique a montré que l'addition de glutathion oxydé favorise l'action de la glucose-6-deshydrogénase et de la 6-phospho-gluconate-deshydrogénase qui dépendent de TPN, en acceptant les électrons de DPNH ou, directement, ceux de TPNH, à condition qu'il y ait des traces de TPNH dans le milieu.

L'ensemble des résultats de M. Sripati fera l'objet d'une thèse de doctorat ès-sciences d'état.

MM. J. Okuda et D. Szafarz, pour étudier la synthèse des protéines par les noyaux de foie, ont d'abord comparé plusieurs méthodes de préparation avant de choisir celle qui utilise les tensio-actifs avec laquelle ils ont obtenu rapidement et avec de bons rendements des noyaux purs. Ils ont ensuite broyé ces noyaux et séparé 5 fractions par centrifugation. L'incorporation des acides aminés se fait surtout dans les 3 fractions les plus lourdes qui contiennent, ensemble, 96 % de TADN et 82 % de TARN nucléates. Ils ont étudié quelques propriétés de ces fractions, en particulier l'action de la DNase, de la RNase et de l'ATP. La DNase inhibe 75 % de l'incorporation, la RNase est sans action et l'ATP qui est sans action sur le système normal, réactive un peu les fractions qui ont été traitées par la DNase. La fraction qui ne sédimente pas à 105 000 g contient un inhibiteur de l'incorporation. Cet inhibiteur est relativement stable, n'étant inactif qu'après 10 minutes de chauffage à 100° et n'est pas dialysable. Il existe aussi dans la fraction soluble du cytoplasme. Son action paraît fort intéressante et son étude sera continuée.

MM. J. Okuda et D. Szafarz ont également étudié l'incorporation des acides aminés, en particulier celle de la lysine -<sup>14</sup>C dans les particules de Sripati qui sortent des noyaux au cours de l'incubation à 37° dans le tampon TRIS, avec le foie normal et le foie en régénération de Rat. Ils ont observé que les particules des deux types de foie contiennent 2,5 fois plus de protéines basiques du type histone que de protéines acides et que l'incorporation est plus faible dans les protéines basiques que dans les protéines acides. Mais le turn-over des histones est 6 fois plus grand dans le foie en régénération que dans le foie normal, ce résultat laisse croire que les histones synthétisées pendant la mitose sont stockées dans les cellules au repos pour y contrôler, plus tard, les synthèses.

M. Szafarz, cherchant à élucider le mécanisme de la cancérisation par le DAB, a commencé l'étude de la formation de complexes entre le DAB et quelques protéines telles que les histones, les protamines et le sérumalbumine. La fixation du DAB sur les protéines peut être suivie au spectrophotomètre par les variations du rapport des densités optiques à 410 et à 452 mμ. La variation est plus grande avec les histones qu'avec les albumines. De plus, Talcool® dissocie le complexe DAB-sérumalbumine et ne dissocie pas le complexe DAB-histone.

M<sup>lle</sup> R. Rozencwajg et M. J.-P. Zalta continuent à étudier l'incorporation des acides aminés marqués dans les protéines des noyaux des cellules de tumeur ascitique de Zajdela. Après avoir obtenu les noyaux entiers à l'aide de tensio-actifs anioniques, ils les ont éclatés mécaniquement et centrifugés à faible vitesse. Le culot est surtout formé de nucléoles et de chromatine et l'incorporation active les acides aminés. À l'aide de ces fragments nucléaires, ils ont déterminé le rôle des protéines basiques du type histone dans l'incorporation. Après traitement acide, l'incorporation augmente nettement, bien que la composition

sition des fragments ait été beaucoup modifiée. En effet HQ a disso<sup>\*</sup> environ 50 % des protéines, 30 % de l'ARN et 15 % de l'ADN, les propriétés des fragments nucléaires ne change pas, comme l'ont prouvé les déterminations des conditions optimales de Incorporation, *in vitro* de la concentration du pH, de la concentration en inhibitions et des stimulations. C'est ainsi que la RNase reste sans action, que la DNase, à forte concentration, inhibe de 30 % l'incorporation, que le chloramphénicol l'inhibe de 70 % et la puromycine de 25 %, tandis que l'addition des 4 nucléotides même exogènes, stimule l'incorporation. Selon le type de tissu nucléaire de foie, de cellules ascitiques, ARN « messenger » de foie, la stimulation varie de 70 à 300 %.

T. M. J. P. Zalta, en collaboration avec M. Rozencwajg, J. de la L. Montagnier, poursuivent l'étude des systèmes de synthèse de l'ARN viral du virus de l'encephalomyélite du Rat.

**Pilules d'ascite d'Ehrlich.**  
En collaboration avec M. Boer, M. Zalta et M. Lamm, par le chloramphénicol, de l'incorporation des acides nucléiques dans les ribosomes de foie de Rat. Us poursuivent également l'étude de l'action des tonneaux et de la structure des ribosomes de foie de Rat, après traitement par des tensio-actifs.

M. A. Boer, voulant déterminer le rôle de l'ARN dans la synthèse des protéines des ribosomes, a cherché, d'une part à bloquer l'ARN « messenger » endogène par l'Actinomycine et, d'autre part à stimuler l'incorporation des acides aminés par une fraction d'ARN. L'inhibition par l'Actinomycine a été étudiée *in vitro*, à l'aide de <sup>32</sup>P; elle a montré qu'à côté de l'incorporation dans les séquences finales du s-ARN, la synthèse d'une fraction de 8 bases de cellules est inhibée. Par sa composition en bases qui est caractéristique de cet ARN, son marquage, cet ARN pourrait être un ARN « messenger » de cellules. Sent la synthèse de cet ARN qui rend compte de la faible (20 à 30 %) et de plus, inconstante. Cette étude portant sur l'incorporation *in vitro* par les ARN, elle se fait, pour la fraction Jon 8-S dont la composition en bases est voisine de celle de la chlorpromazine.

M. R. Sutra a continué ses recherches sur l'influence de la chlorpromazine sur l'incorporation de l'adénine 8-C par l'ARN. On observe des retards de l'ordre de 2 à 3 fois à des concentrations variant de 2.10<sup>-6</sup> à 3.10<sup>-5</sup> M. L'absence et une diminution de la synthèse de l'ARN d'*E. coli*, en présence de chlorpromazine, de suivre la synthèse de l'ARN d'*E. coli*, en présence de chlorpromazine.

M. A.-J. Rosenberg et Mme Fourcade ont continué l'étude des propriétés des mitochondries qu'ils ont mises au point. Ils ont isolé deux types différents dont l'un, G, est plus gonflé que l'autre, M, qui doivent correspondre à une étape différente du développement ou à un stade différent du turn-over mitochondrial.

M. A.-J. Rosenberg et M. Emanoil-Ravicovitch ont achevé l'étude du métabolisme des glucides dans les cellules normales, néoplasiques ou cancéreuses du rat. Les animaux ont été soumis à un régime B: diméthyl-<sup>1168</sup> « en protéines, additionné ou non de jaune de beurre [V\*

minoazobenzène). La précancérisation a surtout retenu leur attention. Us ont étudié les variations du taux des flavines, des nucléotides flaviniques, le rôle de la DAB-réductase dans la détoxification du foie et le rôle des hormones.

Us ont montré que la diminution du taux des flavines est caractéristique des cellules néoplasiques. Au cours de la cancerisation ce taux varie, dans les cellules normales, même lorsqu'elles sont voisines des nodules cancéreux. Ils ont, également, montré que la cancerisation modifie, non seulement le taux global des flavines, mais qu'elle agit préférentiellement sur certains nucléotides et que le taux de flavines diminue surtout dans les microsomes et dans les noyaux cellulaires, alors qu'il varie peu dans les mitochondries et le liquide surnageant.

Le rôle des flavines peut également être mis en évidence par l'étude de la detoxification du foie par la DAB-réductase dont le coenzyme est FAD. Après avoir montré que cet enzyme est localisé sur les membranes ergastoplasmiques, ils ont prouvé, par une étude cinétique, que la disparition de FAD, au cours de la cancerisation, provoque une diminution de l'activité enzymatique qui, après 4 mois de régime, a complètement disparu. Le rôle de la DAB-réductase et celui de FAD est également mis en évidence dans l'action des rayons X. Au début de la cancerisation, l'irradiation empêche la diminution de FAD, ce qui conserve à la DAB-réductase son pouvoir de détoxification, mais après 4 mois de régime cancéreux en flavines, en protéines et additionné de DAB, l'irradiation n'a plus aucun effet.

Enfin, M. A.-J. Rosenberg et M<sup>me</sup> Emanoil-Ravicovitch ont étudié l'action de l'hydrocortisone et de l'hormone thyroïdienne sur le taux des flavines et sur l'activité de la DAB-réductase. L'hydrocortisone augmente le taux de FAD et l'activité de la DAB-réductase, tandis que l'action de l'hormone thyroïdienne est négligeable.

L'ensemble de ces recherches doit être réuni par M<sup>me</sup> Emanoil-Ravicovitch dans une thèse de doctorat ès-sciences qu'elle soutiendra cette année, apportant une contribution très importante à l'étude de la précancérisation et de la cancerisation par le jaune de beurre.

---

#### LISTE DES PUBLICATIONS

- M.-T. HUBERT, P. FAVARD, N. CARASSO, R. ROZENCWAJG et J.-P. ZALTA. « Mithochondrial isolation of cell nuclei from rat liver ». *J. de microscopie*, 1963, 1, 435.
- J.-P. ZALTA, R. ROZENCWAJG, M. BREUGNON et J. HUPPERT. « Synthèse du RNA infectieux du virus EMC par des noyaux de cellules d'ascite de Souris ». *C. R. Acad. Sci.* 1963, 256, 2471.
- J. OKUDA, D. SZAFARZ et Y. KHOUVINE. « Comparaison entre les protéines basiques et acides d'une fraction isolée de foie de Rat normal et en régénération ». *C. R. Acad. Sci.* 1963, 257, 2904.
- R. EMANOIL-RAVICOVITCH et C. HERRISON-CAVET. « Influence du p-diméthylaminoazobenzène (DAB) et de la carence des flavines et des protéines sur la réaction de détoxification du cancérigène par le foie de Rat ». *Bull. Soc. Chém. Biol.* 1963, 45, 613.

- A. F.** FOURCADE, D. SZAFARZ et A. RUET. « Phosphorylations oxydatives et activity respiratoire de mitochondries de foie de Rat ». *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1963, 45, 951.
- R. B.** EMANOIL-RAVICOVITCH et C. HERISSON-CAVET. « Localisation de la diméthylamino-enzyme-reductase dans les fractions particulières submicrosomiques ». *Bull. Soc. Chim. biol.* 1963, 45, 989.
- L. K.** KLYSZEJKI, S. de MENDE et Y. KHOUVINE. « Désoxyribonucléoprotéides du pancréas de Bœuf. III. Fractionnement des histones ». *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1963, 45, in.
- C. E.** SRIPATI et D. SZAFARZ. « Rôle régulateur de TAMP dans la glycolyse du noyau cellulaire ». Réunion des biochimistes allemands, suisses et français à Strasbourg « 19-20 sept. 1963.
- C. E.** SRIPATI. « Effet de divers solvants délipidants sur le rendement de TARN dans la technique de Schneider ». Réunion des biochimistes allemands suisses et français à Strasbourg le 19-20 sept. 1963.

---

### COMPOSITION DU SERVICE

- Mme Y. KHOUVINE, Directeur scientifique au C.N.R.S., Directeur de Laboratoire à l'école pratique des Hautes Etudes.
- M. A.-J. ROSENBERG, Professeur à la Faculté des Sciences de Poitiers, Directeur-adjoint à l'école pratique des Hautes Etudes.
- M. J.-P. ZALTA, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences de Toulouse, Chef de Travaux à l'Ecole pratique des Hautes Etudes.
- M. le Docteur E. LOZA, Professeur agrégé à la Faculty de médecine de Lodz.
- M. A. BOER, Chargé de Recherches au C.N.R.S.
- M. R. SUTRA, Chargé de Recherches au C.N.R.S.
- M. D. SZAFARZ, Chargé de Recherches au C.N.R.S.
- M. J. OKUDA, Maître de Conférences à la Faculty de Médecine de Nagoya.
- M. H. OYANAGI, Boursier du Gouvernement français.
- M. C. E. SRIPATI, Assistant à l'Institut du Cancer de Madras.
- M<sup>me</sup> c. HERISSON-CAVET, Boursière de la Ligue nationale française contre le cancer.
- M. L. BENAROCHE, Boursier de la Ligue nationale contre le cancer.
- M<sup>\*e</sup> A. FOURCADE, Attaché de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> R. EMANOIL-RAVICOVITCH, Attaché de Recherches au C.N.R.S.
- M. J.-C. PRAGER, Collaborateur technique au C.N.R.S.
- M<sup>^e</sup> c. GAUTHIER, Collaborateur technique au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> M. MILET, Collaborateur technique au C.N.R.S.
- M<sup>lle</sup> J. FEINBERG, Collaborateur technique au C.N.R.S.
- M<sup>lle</sup> A. RUET, Collaborateur technique au C.N.R.S.

## SERVICE DE BIOCHIMIE B

Rapport de M<sup>TM</sup> M. GRUNBERG-MANAGO, Chargée de Service.

Nous avons poursuivi l'étude des mécanismes de la biosynthèse des polyribonucléotides, de leur structure physico-chimique et de leur rôle dans la synthèse des protéines, en nous attachant plus particulièrement aux points suivants :

A) Transfert de l'information et nature du code génétique.

B) Étude des propriétés physico-chimiques des polynucléotides renfermant des bases atypiques.

C) Mécanisme de synthèse enzymatique des ribopolynucléotides.

a) Polynucléotide phosphorylase.

b) Synthèse de TARN chez les levures.

D) Dégradation des acides ribonucléiques.

E) Rôle du chloramphénicol et des analogues d'acides aminés dans la synthèse des ARN et des protéines.

### A. — TRANSFERT DE L'INFORMATION ET NATURE DU CODE GÉNÉTIQUE.

En collaboration avec M. Michelson et avec l'aide de M. et M<sup>me</sup> Dondoj<sup>1</sup>, nous avons plus spécialement étudié l'effet de la substitution à la position 5 du noyau uracile par différents groupes (chlore, brome, iode, fluor, méthyl, hydroxyle, ribose) sur le pouvoir qu'ont les polymères de stimuler l'incorporation des acides aminés dans un système isolé de *E. coli*. Ceci afin de préciser le mécanisme des mutations et des modifications phénotypiques qui se produisent à la suite de l'incorporation des analogues de bases dans TADN ou TARN.

Nous avons trouvé que les polynucléotides substitués — et, contrairement à ce qui avait été trouvé précédemment par d'autres auteurs, le polyphosphoryl-U et le poly méthyl-U — sont plus ou moins actifs pour l'incorporation de la Phe-nylalanine. Les conditions de pH et de température sont cependant critiques pour l'efficacité du poly FU à stimuler l'incorporation de la phénylalanine. En effet, contrairement à ce qui a été rapporté, le poly pseudo-U est inactif pour la synthèse de la polyphénylalanine, mais cela peut s'expliquer par sa structure secondaire; la température de fusion de ce polymère est de l'ordre de 60° et il est vraisemblable que sa structure secondaire empêche de former des complexes avec le codon complémentaire du s-A<sup>de</sup>. Ceci est confirmé par le fait que le copolymère (U, pseudo-U) qui ne p<sup>ossède</sup>

Pas de structure ordonnée dans les conditions expérimentales, stimule l'incorporation de la phénylalanine.

L'ordre d'efficacité des polymères est le suivant: U, I > Br > C1, F J C H. <sup>forte</sup>  
 De plus, nous avons montré que l'acide P<sup>o</sup> W »<sup>TM</sup> ^ ^ ^ ^ \*  
 ment incorporation de la leucine, de V ^ ^ ^ } ^ ' ^ ^ ^ U<sup>k</sup>  
 un degré moindre, celle de la sérine (codon assigné UUC), ^ S ^ S <sup>serine</sup>  
 FU hydroxy-U et methyl-U sont totalement inactifs en ce qui concerne la

et  
 S h ^ I e poly BrU puisse coder pour la sérine et jouer le rôle de la cytosine  
 \*erait en accord avec le mécanisme des mutations induites V » des bases analogues  
 (Postule par Watson et Crick et par Freese), mécanisme qui fait intervenir les  
 formes tautomères rares des bases (comme la forme ^ . ^ i ^ ^ ^ p r o -  
 JrU devrait s'apparier normalement, comme le U, avec 1 adénine m « f P  
 bilité d'un couplage avec la guanine n'est pas f ^ J ^ ^ ^ re, ineffi-  
 cache du poly FU vis-a-vis de la sérine est un « sul m ut f ^ e ^ du ^  
 que le fluorouracile ne peut jouer le rôle d'un C dans j<sup>c</sup> care J difi tions phe<sup>pro</sup>  
 Par l'ARN. Or, c'est ainsi qu'ont été jusqu'ici expliquées les modifications

atypiques causées par le FU. comporter comme un  
 . Le pouvoir du BrU de coder pour l'isoleucine et de j « comp rme éol.  
 J semble difficile à expliquer en invoquant la stabilisation de sa u > UUC  
 ^ous avons vérifié que le codon pour l'isoleucine est bien UUA e ^ ou. Nous  
 \* UUU. Nous avons alors étudié l'effet de la bromuracilone & h c ^ t --ur la  
 ^avons trouvé que l'acide polybromocytidylique code P<sup>lus</sup> f, ^ t ue ^ truc-  
 froline que le poly C lui-même, ce qui s'explique peut-être \*\*\*\*\* fi r Q code  
 »re du poly BrC est moins ordonnée que celle du P ^ ^ g P ^ nactif par  
 Element pour la thréonine (CAA ou CCA) alors que 1 e j j ^ ^ parti q ue,  
 J'ont le poly BrC est inactif pour l'histidine (CCA), la lysine,  
 ^alanine, la valine et l'arginine. k r m ees peuvent jouer le rôle

Ces résultats suggèrent que les P ^ ^ ^ d a n s d e u x, mais jamais  
**C f e s i s E S J ^ R** le poly BrC est ^ pour  
 la (AAA).

Une hypothèse a été proposée pour rendre compte de ces résultats; il faut  
 ^rquer que le poly BrU code mieux pour 1 \* J » ^ J " J ^ le C. Le fait  
 ^ est-il possible que le BrU remplace le A p i " ^ ^ % ^ A est le même  
 1<sup>Ue</sup> le poly BrU soit inactif pour la tyrosine - dont c  
 g\* Pour l'isoleucine - et le BrC pour l'isoleucine - d o n \* k ^ ^ ^ ou  
 J même que pour la thréonine - indique que le comp> orten le avec ses ^ 1. ^  
 BrC tant que A pourrait dépendre de rapported ^ le ^ ^ ^ ^  
 J? le triplet complémentaire du f ^ ' g ^ g A dans la même position  
 J ^ nine et le codon pour l'isoleucine ont chacun un ^ nine - ^ isoleucine  
 ^ le triplet. Ceci est en « ^ ^ , t a ^ S t £ T d l'acide nitreux  
 r ont été observés dans la protéine du W j a p -- difi on 8 v n o typiques  
 7 système utilise offre donc un moyen d'étude des mo s chimiq ues des  
 ! donne la possibilité d'établir une comparaison avec les base  
 mutations.

B. — ETUDE DES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES DES POLYNUCUSOTIDES  
RENFERMANT DES BASES ATYPIQUES.

M. Michelson et M. Pochon ont synthétisé différents analogues de purines et de pyrimidines et les ont convertis en nucléoside-5' dicitriphosphates qui servent de substrats pour la polynucléotide phosphorylase et TARN polymérase. L'introduction de substituants d'un type donné modifie considérablement la structure électronique de la base et permet d'étudier d'une manière plus précise l'influence de ces structures sur les propriétés des polymères.

Afin d'étudier, en collaboration avec M. Douzou et M. Hélène, les diverses formes tautomériques de la cytosine, M. Pochon et M. Michelson ont synthétisé divers composés substitués de cette base : 3 méthyl, 1-3 diméthyl, 1,3 N<sup>6</sup> triméthyl, 1 méthyl, 3 méthyl N<sup>6</sup>, acétyl, 3 méthyl N<sup>6</sup> benzoyl cytosine. Les deux bandes d'absorption de ce dernier composé étant proches, un nouveau substituant a été introduit afin de les écarter : 3 méthyl 5-bromo N<sup>6</sup> benzoyl cytosine.

Il était intéressant d'établir une relation entre le comportement biologique et les propriétés physico-chimiques de polymères formés d'analogues de bases. Dans ce but, M. Michelson et M. Massoulié ont entrepris l'étude des stabilities comparées des complexes hélicoïdaux formés par les acides polyuridyliques 5 halogénés et le poly A. Les résultats ont fourni des renseignements importants sur les facteurs ayant une influence sur la stabilité de la double hélice de l'AD<sup>+</sup> (liaison hydrogène, effet d'empilement, facteurs stériques).

D'autre part, M. Massoulié a également poursuivi ses travaux sur les CO<sup>+</sup> complexes entre poly A et poly U et en particulier a cherché à déterminer l'influence du pH, ce qui a permis de mettre en évidence la formation d'un nouveau complexe non décrit jusqu'ici.

L'acide polypseudouridylique et l'acide poly-5-hydroxyuridylique ont été synthétisés par M. Pochon et M. W. E. Cohn à partir des nucléosides pyrophosphates correspondants, par la polynucléotide phosphorylase. Des études physico-chimiques ont été effectuées sur ces polymères, notamment, détermination des pK<sub>a</sub>, courbes de chauffage, courbes de mélange. M. Pochon a pu ainsi montrer que ces polymères forment, avec l'acide polyadénylique, des hélices à trois brins. L'acide polypseudouridylique possède une structure propre très stable, comme cela a déjà été mentionné ci-dessus, puisque celle-ci disparaît seulement à 60°. M. Michelson a effectué des études similaires sur les analogues des acides polycytidyliques et polyadényliques.

Un autre point important concerne l'interprétation des mécanismes de transcription par désamination de la guanine. Aussi M. Michelson, avec l'aide de Mile Monny, a-t-il entrepris l'étude de l'acide polyxanthylique. Contrairement au poly I et au poly G, cet acide ne forme pas de complexes hélicoïdaux avec le poly C. Par contre, il en forme avec le poly A et le poly U. Néanmoins, le polymère est totalement inactif dans le système de synthèse *in vitro* des protéines et ne favorise pas l'incorporation de la phénylalanine (codon, UUU) ni de la lysine (codon, AAA).

Enfin, M. Massoulié, en collaboration avec M. Michelson, a cherché à mettre au point des méthodes enzymatiques permettant d'éliminer sélectivement les

ridus indus dans les boucles externes des complexes imparfaits entre un homopolynucléotide et un copolynucléotide. Le modèle choisi a été le poly I et le Poly (C, U) et l'enzyme utilisé est une endonucléase sans spécificité vis-à-vis des bases (voir plus loin), mais dont l'efficacité dépend de la structure secondaire des polymères. L'utilisation de cet enzyme pourrait apporter des données sur la structure des s-ARN spécifiques pour les acides aminés. Aussi M. Fochon et M. Michelson étudient-ils actuellement des méthodes pour purifier les s-ARN spécifiques.

C. — MECANISME DE SYNTHÈSE ENZYMATIQUE.

a) *Polynucleotide phosphorylase*, - Avec M. Williams et l'aide de M<sup>me</sup> Thang, nous avons mis au point une méthode de purification de la polynucléotide phosphorylase, isolée à partir d'*E. coli*, ce qui permet d'obtenir, avec de bons rendements, un enzyme purifié 300 à 600 fois (environ dix fois plus actif que ceux qui ont été décrits précédemment) et qui est pratiquement libre de nucléases, d'acides nucléiques, de phosphatases et de kinases. Cette préparation peut donc être utilisée pour étudier la séquence des bases nucléotidiques dans les ARN et effectivement employée par M<sup>me</sup> Singer et M. Fraenkel-Conrat pour une étude sur la séquence de bases de l'ARN du TMV. Cette préparation purifiée convient pour les études sur le mécanisme d'action de l'enzyme. Cette polynucléotide phosphorylase ne présente pas de phase de latence pour la polymérisation de l'ADP et de l'UDP, dans les conditions optimales; de plus, la synthèse de poly A s'effectue de façon continue et non à partir d'un éventuel polynucléotide contaminant l'enzyme. Cependant, dans de nombreuses conditions particulières certaines conditions physiques et l'urée peuvent provoquer un retard ou inhiber la polymérisation de l'ADP ou de l'UDP. Leur rôle suggère qu'ils n'agissent pas sur un site spécifique de l'enzyme, mais qu'ils affectent un changement de structure non spécifique. La phase de latence peut être supprimée par l'addition d'oligonucléotides au groupe hydroxyle terminal libre, ou après traitement par l'urée. L'effet de ces oligonucléotides sur la structure de l'enzyme est actuellement à l'étude.

La polynucléotide phosphorylase de *M. lysodeiktuus* a également été purifiée par M<sup>lle</sup> Godefroy. A ce sujet, cet enzyme a un besoin en l'enzyme pour la polymérisation de l'ADP par ces deux enzymes confirme leur effet, les résultats obtenus en collaboration avec M<sup>lle</sup> Yon et M<sup>lle</sup> Godefroy montrent que pour l'enzyme, les lois classiques de la cinétique enzymatique et que ses véritables substrats sont l'ADP et l'UDP, et non le complexe ADP-Mg. La liaison de l'ADP et celle du Mg sont interdépendantes. Nous avons pu clarifier ces relations en exprimant les résultats en fonction du complexe ADP-Mg, et non en fonction de l'ADP seul.

D'autre part, les études de l'enzyme extrait de *Cl. perfringens*, et en particulier les méthodes de purification de cet enzyme ont été poursuivies par M. Fitt.

b) *Synthèse de VARN chez les levures.* — M. Tavlitzki et M<sup>lle</sup> Cousin ont continué l'étude systématique des enzymes de la levure qui catalysent la synthèse des polyribonucléotides.

Le système de nature particulière dont il a été question dans les rapports précédents a pu être localisé. En effet, l'activité d'incorporation de l'ATP, non stimulé par le s-ARN, qui le caractérise, est associée aux ribosomes. Par ailleurs, des renseignements ont été obtenus en ce qui concerne l'intervention éventuelle de l'ADN ou de TARN dans les réactions de synthèse. Le fait que la DNase ne soit pas inhibitrice et que l'actinomycine D soit dépourvue d'activité rend peu probable la participation de l'ADN à la réaction. Par contre, la RNase est inhibitrice dans des conditions où elle est inactive sur le produit de la réaction. Ceci suggère qu'il s'agit d'un système dans lequel TARN pourrait jouer le rôle d'un amorceur.

L'activité d'incorporation de l'ADP, qui a été mise en évidence dans U\* fractions non-sédimentables, s'accompagne d'une activité phosphorolytique. L'isolement par chromatographie des produits de dégradation de l'acide polyadénylique permet de constater que la substance principalement formée est l'ADP. Ceci indique que Ton pourrait avoir affaire à un enzyme se rapprochant d'une polynucléotide phosphorylase.

Des recherches ont également été effectuées à l'aide de fragments de mitochondries préparées dans le laboratoire de M. Slonimski, à partir de cellules & levure à respiration normale et de cellules « petite colonie ». Il a été constaté que ces fragments catalysent l'incorporation de l'ATP et, plus faiblement, celle de l'ADP, dans des précipités acido-insolubles. L'incorporation de l'ATP est inhibée par la RNase ainsi que par la DNase et l'actinomycine D. Elle est stimulée par l'addition d'ADN et cette stimulation est nettement plus forte lorsque l'on utilise des fragments de mitochondries isolées à partir de cellules « petite colonie ». Il semble donc que les mitochondries possèdent au moins un système de synthèse de TARN et que l'ADN intervient dans la réaction.

Enfin, M. Tavlitzki et M<sup>lle</sup> Cousin ont étendu leurs recherches à d'autres souches de levure, ce qui leur a permis de constater que les enzymes qu'ils étudient y sont également présents.

#### D. — DEGRADATION DES ACIDES RIBONUCLÉIQUES.

a) *Phosphodiesterase de venin de serpent.* — M<sup>lle</sup> Cousin a étudié l'influence de la structure secondaire des polyribonucléotides sur leur dégradation par la phosphodiesterase de venin de serpent purifiée. Elle a constaté que tous les polymères susceptibles de s'associer par des liens hydrogène (apparition d'une structure ordonnée) sont — à un degré plus ou moins élevé — résistants à l'action de la phosphodiesterase de venin de serpent. Par contre, les polymères dépourvus de structure secondaire sont rapidement dégradés. Dans les conditions utilisées, le s-ARN et l'ARN ribosomal de levure ne sont dégradés que très partiellement par l'enzyme. Ceci est en accord avec ce que Ton sait de la structure

**hélicoïdale** du s-ARN et suggère que l'ARN ribosomal présente également des régions dont la structure est ordonnée.

b) *Enzymes de E. coli*. — M. Michelson, avec l'aide de M<sup>lle</sup> Monny, a isolé deux diestérases *k* partir de *E. coli*. Toutes deux sont des endonucléases et clivent l'ARN et les polyribonucléotides en donnant des nucléosides 2', 3' phosphates adéniques. Ces enzymes diffèrent toutefois par leur comportement chromatographique sur les colonnes de DEAE et par leur besoin en Mg. Us clivent préférentiellement les polynucléotides n'ayant pas de liens hydrogène et pourront vraisemblablement être utilisés pour hydrolyser les résidus des nucléotides dans les ARN non engagés dans la structure hélicoïdale.

E. — RÔLE DU CHLORAMPHÉNICOL ET DES ANALOGUES D'AMINO-ACIDES  
DANS LA SYNTHÈSE DES ARN ET DES PROTÉINES.

En collaboration avec M. Thang et M. Williams et avec Taide de M<sup>lle</sup> Raveillon nous avons montré précédemment, en utilisant un mutant d'*E. coli* (tryptophane-) que la synthèse de certaines protéines n'est pas inhibée par le chloramphénicol *k* faible concentration et qu'il s'agissait bien de synthèse préférentielle de certaines protéines et non d'une synthèse résiduelle de l'ensemble des protéines. Dans les mêmes conditions, la polynucléotide phosphorylase peut être synthétisée *de novo*. C'est la première fois que Ton met en évidence une préférence préférentielle de certaines protéines enzymatiques (polynucléotide phosphorylase, ARN polymérase, etc..) en présence de chloramphénicol. Les autres cas connus jusqu'ici concernent les protéines des membranes et certains peptides. Ces résultats posent le problème du mécanisme d'action du chloramphénicol dans la synthèse des protéines. La synthèse de la polynucléotide phosphorylase est également constatée chez ce même mutant lorsque le tryptophane est remplacé par le 5-méthyltryptophane, à condition que le chloramphénicol soit présent *k* faible concentration. La présence simultanée du chloramphénicol et du 5-méthyltryptophane ne provoque cependant pas de dégradation de protéines pré-existantes.

M. Thang a alors envisagé la possibilité d'incorporation dans les protéines du 5-méthyltryptophane qui était considéré jusqu'ici présent comme ne pouvant être incorporé. Des expériences de culture du mutant tryptophane-, en présence de tryptophane et de H<sup>3</sup>-5-méthyltryptophane, *k* des concentrations variées, ont montré qu'il y a incorporation du 5-méthyltryptophane dans les protéines à 95° C non solubles).

Chez le même mutant, M. Thang a montré que la synthèse de l'ARN, en présence de 5-méthyltryptophane (au lieu de tryptophane) requiert aussi la présence du chloramphénicol. L'action du 5-méthyltryptophane ne se observe que chez les mutants qui requièrent le tryptophane pour la synthèse de l'ARN. Il s'agit d'une action propre *k* l'analogue, et non d'une libération de tryptophane provenant d'une dégradation des protéines, car la présence de 5-méthyltryptophane et de chloramphénicol ne permet aucune synthèse d'ARN chez le mutant de *E. coli* (thréonine- et leucine").

Plus récemment, M. Thang a constaté que la présence de chloramphénicol est également requise pour la synthèse de l'ARN chez un autre mutant

(phénylalanine~), en présence des analogues thiénylalanine et parafluophénylalanine dont on sait qu'ils peuvent être incorporés dans les protéines à la place de la phénylalanine. Les résultats semblent indiquer un rôle direct du chloramphénicol dans la synthèse de TARN, indépendant de son activité inhibitrice dans la synthèse des protéines.

#### F. — TRANSFORMATIONS CHEZ USTILAGO.

M. Tavlitzki, avec l'aide de M<sup>me</sup> Talou, a entrepris l'étude des phénomènes de transformation qui ont été observés par le Professeur Nozeran chez *Ustilago*\*. Cet organisme se présente habituellement sous forme mycélienne, mais donne naissance de façon sporadique à des formes unicellulaires, formes « levures » qui se reproduisent comme telles et fournissent des clones stables. Les cellules qui constituent ces clones ont la propriété d'induire la transformation totale du mycélium en formes levures, qui à leur tour possèdent la même propriété. Avant d'aborder l'étude biochimique de ces phénomènes, il a paru utile de préciser les besoins nutritifs des deux types cellulaires. M. Tavlitzki a pu élaborer des milieux de culture définis pour les deux formes d'*Ustilago*. Il a alors constaté que la prolifération du mycélium s'effectue dans un milieu ne contenant que du glucose et du sulfate d'ammonium, alors que les cellules de levure qui en sont issues requièrent en outre l'arginine et la lysine, et cela de façon spécifique\*. Les milieux ainsi définis ont facilité l'étude des modalités de la transformation et des facteurs qui y interviennent.

Le stade suivant a consisté à mettre au point une méthode d'étude quantitative de la transformation. Ceci a pu être réalisé dans des conditions telles que les résultats sont obtenus rapidement et de façon très reproductible : il suffit de mettre le mycélium pendant quelques heures en suspension dans un milieu où s'est effectuée la multiplication des levures, pour observer l'apparition de cellules transformées dont le nombre est fonction de la concentration en milieu transformant. L'un des problèmes qui se pose maintenant est de déterminer la nature de la (ou des) substance(s) en cause. Les premières expériences réalisées dans ce sens ont permis à M. Tavlitzki de constater qu'il s'agit vraisemblablement d'un seul facteur et que l'on pourrait avoir affaire à une molécule relativement petite.

#### G. — MÉTABOLISME DE ACETOBACTER XYLINUM.

L'étude comparative du métabolisme de *Acetobacter xylinum* ayant pu être effectuée sur milieu synthétique comprenant, soit le fructose, soit le glucose, comme source de carbone, a permis à M. Prieur de démontrer :

— que les bactéries entretenues sur fructose (« F ») dégradent les hexoses par la mise en jeu de réactions impliquées dans le cycle des pentoses, avec possibilité de dérivation du métabolisme par la voie des uronates;

— que les bactéries entretenues sur glucose (« G ») dégradent le glucose et le fructose dans la proportion de 60 % par la voie Embden-Meyerhof et de 40 % par oxydation en acide gluconique.

L'étude des activités enzymatiques des bactéries poussées sur glucose ou sur fructose a permis de classer les enzymes dont l'activité dépend des conditions de culture en trois groupes :

<sup>x)</sup> *la phosphofructokinase* : cet enzyme est présent dans les bactéries « G » et persiste pendant au moins cinq générations lorsque ces bactéries sont repiquées dans un milieu fructose. Absent des bactéries « F », l'enzyme ne reparait pas lorsque l'on repasse en milieu glucosé.

<sup>z)</sup> *groupe de la phosphoglucomutase* : il comprend, outre cet enzyme, la glucose-6-phosphate deshydrogénase, la 6-phosphogluconique deshydrogénase et la glycérokinase. Ces enzymes sont présents dans les bactéries « F » et persistent quand on passe du fructose au glucose. Bien qu'absentes des bactéries entretenues sur glucose, leurs activités apparaissent lorsque ces dernières sont repiquées dans un milieu fructose.

<sup>3)</sup> *groupe de VUDPG-deshydrogénase* : il comprend également la fructose deshydrogénase. Présents dans les bactéries « F », leur activité disparaît après passage sur milieu glucose et reparait lorsque les bactéries « G » sont repiquées sur milieu fructose.

Il a été vérifié que la population est homogène en ce qui concerne le comportement des bactéries quant à leur croissance sur les deux sucres.

Le mécanisme de régulation de l'activité ou de la formation des enzymes de *Xylinum* en fonction du milieu de culture est à l'étude.

#### H. — RECHERCHES SUR LE MODE D'ACTION DE L'INSULINE.

Meyer s'est attaché à mettre au point un système d'incorporation des acides aminés dans les Protéines en utilisant les fibroblastes et les fibres musculaires. L'insuline stimule cette incorporation.

Meyer étudie actuellement les causes de cette stimulation en utilisant certains inhibiteurs tels que l'actinomycine et la puromycine.

---

Toutes les publications relatives aux travaux de mon service ont été rédigées avec l'aide de M<sup>me</sup> Costinesco qui s'est plus particulièrement occupée de leur traduction en français ou en anglais. M<sup>me</sup> Costinesco assure en outre l'administration bilingue de mon service avec l'aide de M<sup>me</sup> Guillermic.

---

## LISTE DES PUBLICATIONS

- M. GRUNBERG-MANAGO. « Polynucléotide Phosphorylase », *Progress in Nucleic Acid Research* (Davidson et Cohn, ed.), Academic Press Inc., N. Y., I, p. 93 (1963).
- M. GRUNBERG-MANAGO. « Enzymatic synthesis of nucleic acids ». *Progress in Biophysics* (Butler, ed.) Pergamon Press, Oxford, 13, p. 175 (1963).
- E. KNIGHT Jr., P. S. FITT et M. GRUNBERG-MANAGO. « Separation of *Clostridium perfringens* polynucleotide phosphorylase into two components ». *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1963, 10, 488.
- C. DELAVIER-KLUTCHKO. « Réaction phosphoroclastique du pyruvate par *Clostridium saccharobutyricum* : Rôle du fer dans la réaction ». *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1963, 45, 957-
- C. DELAVIER-KLUTCHKO. « Reaction phosphoroclastique du pyruvate par *Clostridium saccharobutyricum* : Mise en Evidence de l'intervention d'un cofacteur de nature protéique dans la dégradation du pyruvate ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 78, 569-
- F. R. WILLIAMS, T. GODEFROY, E. MERY, J. YON et M. GRUNBERG-MANAGO. « Détermination du vrai substrat de la polynucléotide phosphorylase dans la polymérisation de PADP ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 80, 349.
- M. GRUNBERG-MANAGO et A. M. MICHELSON. « Stimulation of amino acid incorporation by polynucleotide analogues ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 80, 431.
- M. COUSIN. « Influence de la structure secondaire des polyribonucleotides sur la dégradation par la phosphodiesterase de venin de serpent ». *Bull. Soc. Chim. Biol.* 1963, 45, 1363.
- R. LETTERS et A. M. MICHELSON. « Synthèse des dérivés de la cytidine-5' phosphate et des adénosine-5' pyrophosphates ». *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1963, 45, 1353.
- D. H. LEVIN, M. N. THANG et M. GRUNBERG-MANAGO. « *In vivo* synthesis of polynucleotide phosphorylase in *E. coli*. I. — Effect of amino acids in chloramphenicol inhibited system. » *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 76, 558.
- M. N. THANG, F. R. WILLIAMS et M. GRUNBERG-MANAGO. « Synthèse *in vivo* de polynucléotide phosphorylase chez *E. coli*. II. — Synthèse de novo de la polynucléotide phosphorylase en présence de chloramphenicol ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 76, 572.
- F. POCHON, A. M. MICHELSON, M. GRUNBERG-MANAGO, W. E. COHN et L. DONDON. « Polypseudouridylic acid : synthesis and some physicochemical properties ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 80, 441.
- F. R. WILLIAMS et M. GRUNBERG-MANAGO. « Polynucléotide phosphorylase hautement purifiée à partir de *E. coli* ». *Biochim. Biophys. Acta*, sous presse.
- J. MASSOULIE et A. M. MICHELSON. « Étude physique de polynucléotides contenant des analogues de Turacile ». Communication à la Réunion Commune des Biochimistes Allemands, Suisses et Français (Strasbourg, sept. 1963) p. 38.
- F. POCHON, L. DONDON, M. GRUNBERG-MANAGO, A. M. MICHELSON et W. E. COHN. « Acide polypseudouridylique » Communication à la Réunion Commune des Biochimistes Allemands, Suisses et Français (Strasbourg, sept. 1963) p. 47.
- F. POCHON, A. M. MICHELSON, M. GRUNBERG-MANAGO, L. DONDON et W. E. COHN. « Polypseudouridylic acid : preparation with polynucleotide phosphorylase and some chemical and biochemical properties ». *Fed. Proc.* (sous presse) et International Congress of Biochemistry (sous presse).

- P. PRIEUR. « Influence de la source de carbone utilisée au cours de la croissance sur l'équipement enzymatique de *Acetobacter xylinum*. » Note présentée par M. Duclaux, *R. Acad. Sci.*, 1963, 256, 5660.
- A. MICHELSON. « The Chemistry of Nucleosides and Nucleotides ». Academic Press, 1963 (livre de 620 p.).
- A. INELU, A. M. MICHELSON et J. L. STROMINGER. « Epimerization of thymidine diphosphate glucose in bacterial extracts ». *J. Bact.*, 1963, 86, 246.

---

COMPOSITION DU SERVICE

- M<sup>me</sup> GRUNBERG-MANAGO, Directeur de Recherches au C.N.R.S.
- M. A. M. MICHELSON, Directeur de Recherches au C.N.R.S.
- M. J. TAVLITZKI, Maître de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> C. DELAVIER-KLUTCHKO, Chargée de Recherches au C.N.R.S., actuellement dans le laboratoire du Dr. Stadtman (U.S.A.).
- M. F. MEYER, Chargé de Recherches au C.N.R.S.
- M. F. POCHON, Chargé de Recherches au C.N.R.S.
- M. M. N. THANG, Chargé de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> T. GODEFROY, Attachée de Recherches au C.N.R.S., actuellement dans le laboratoire du Dr. Weber (U.S.A.).
- M. J. MASSOULIE, Attaché de Recherches au C.N.R.S.
- M. P. PRIEUR, Attaché de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>Ue</sup> M. COUSIN, Boursière du C.E.A.
- M. DONDON, Collaborateur Technique, C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> Li DONDON, Collaboratrice Technique, C.N.R.S.
- M. M. GALVEZ, Collaborateur Technique, Comité de Biologie Moléculaire (mi-temps).
- M<sup>me</sup> M. GRAFFE, Collaboratrice Technique, C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> c. MONNY, Collaboratrice Technique, C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> J. RIVEILLON, Collaboratrice Technique, C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> O. SAYAH, Collaboratrice Technique, Comité de Biologie Moléculaire.
- M<sup>me</sup> B. TALOU, Collaboratrice Technique, C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> D<sup>#</sup> C. THANG, Collaboratrice Technique, Comité de Biologie Moléculaire.
- M<sup>me</sup> e H. COSTINESCO, Traductrice au C.N.R.S.
- Mae M. GUILLERMIC, Secrétaire, Comité de Biologie Moléculaire (mi-temps).
- M. P. S. FITT, Boursier Philippe Foundation.
- M. W. GUSCHLBAUER, Boursier Helen Whitney Foundation.
- M<sup>me</sup> J. M. LUCAS, Boursière N.I.H.
- M<sup>me</sup> E. MERY, Boursière des Affaires étrangères, Comité de Biologie Moléculaire.
- M. F. R. p. WILLIAMS, Boursier N.I.H.

## SERVICE DE PHYSIOLOGIE MICROBIENNE

Rapport de M. FRANCOIS GROS, Chef de Service.

### *ETUDE DES PROPRIÉTÉS ET DU RÔLE DES ACIDES RIBONUCLEIQUES DANS LA SYNTHÈSE DES PROTÉINES*

Les recherches entreprises se réclament d'un programme d'étude à long terme sur les propriétés des acides ribonucléiques et leur rôle dans la synthèse des protéines. Toutefois un accent particulier a été mis sur les acides ribonucléiques « messagers », agents de transfert de reformation génétique, et sur les relations existant entre leur métabolisme et les mécanismes de régulation cellulaire.

Une grande partie des recherches en cours ont été commencées dans le Service du Professeur J. Monod & l'Institut Pasteur, avant leur poursuite dans le laboratoire de Physiologie Microbienne à l'Institut de Biologie Physico-Chimique, laboratoire dont l'aménagement et l'équipement ont commencé en août 62 pour s'achever pratiquement en mars 63. Par ailleurs, bon nombre de projets se développent en liaison étroite avec les Services de Biochimie Cellulaire et de Génétique Microbienne de l'Institut Pasteur, ainsi qu'avec le Service de Biochimie B de l'Institut de Biologie.

Les principaux thèmes de recherches et les équipes qui en ont la responsabilité peuvent être classés de la manière suivante :

#### 1. — *Contrôle de la synthèse des ARN messagers chez les micro-organismes*

a) Effets de l'induction de protéines spécifiques sur la synthèse des ARN messagers correspondants. Ce travail est principalement entrepris par <sup>le</sup> D<sup>r</sup> S. Naono avec la participation du D<sup>r</sup> A. Shedlovsky et la collaboration technique de M<sup>lle</sup> J. Rouvière.

b) Contrôle coordonné des synthèses d'ARN par les amino-acides. <sup>Les</sup> responsables de ce travail sont les D<sup>rs</sup> L. Legault et D. Nierlich avec la collaboration technique de M<sup>me</sup> Fagot.

c) Synthèse et fonction des ARN messagers bactériens au cours de l'infection phagique. Responsables de ce travail: D<sup>r</sup> A. Shedlovsky et J. Wyngaarde<sup>1</sup>.

#### 2. — *Métabolisme des ARN messagers et synthèses des protéines.*

a) Renouvellement métabolique des ARN messagers chez *E. coli* <sup>Respon-</sup>  
sable : D<sup>r</sup> R. Soffer.

b) Mode d'attachement des ARN messagers aux particules ribosomiques. Ce travail est effectué sous la responsabilité des D<sup>r</sup> D. et F. Hayes avec la collaboration technique de M<sup>lle</sup> M.-F. Guérin.

3. — *ARN messagers et differentiation.*

a) Chez les erythroblastes aviaires. Responsable de ce travail : D<sup>r</sup> Scherrer avec la collaboration technique de M<sup>lle</sup> L. Voegelin.

b) Dans les spores de *B. subtilis*. Ce travail est entrepris par MM. G. Balassa « G. Contesse avec la collaboration technique de M<sup>r</sup> A. Malhie. M- D. Luzattt doit se joindre à ce groupe.

4. — *Transcription de l'ADN en ARN in vitro.*

Effet des oligonudeotides et des polynucléotides sur l'activité de la RNA Polymérase d'*E. coli*. Transcription des oligonudéotides. Travail effectué par le Dr R. Cukier en collaboration avec les D<sup>r</sup> J.-M. Dubert (Institut Pasteur) et M. Michelson (Institut de Biologie).

DESCRIPTION SCHEMATIQUE DU BILAN PROVISOIRE  
DE L'ANNÉE 1963

I. — ARN MESSAGERS ET CONTRÔLE DE LA SYNTHÈSE DES PROTÉINES.

a) *Inductibilité des ARN messagers.* - Ce travail commencé par le Dr S. Naono en collaboration avec les D<sup>r</sup> G. Attard et F. Jacob a été poursuivi dans mon laboratoire, principalement par le D<sup>r</sup> S. Naono « régulation des biosyntheses proteiques par les produits des gènes (épresseurs) peut s'exercer à deux échelons distincts et non compatibles de Expression génétique : lors de la transcription du matene. Surtout en ARN messagers, ou lors du déchargement de ces ledgers conduit à la genese des liaisons peptidiques. Une des approches pour analyser ce probleme consiste à déterminer si, chez des cellules pour la biosynthèse d'enzymes définies, les ARN correspondants à ces enzymes sont ou non preexistants. Deux systemes ont été étudiés/celui responsable de la synthèse des enzymes impliquées dans la fermentation du galactose et celui qui controle les enzymes des β-galactosidases. Des methodes original ont été développées qui permettent la purification et le dosage des ARN messagers sélectivement produits dans les cultures de bactéries (ADN a été purifié pour le système Lac). Il a été démontré qu'avant l'induction des enzymes dont la synthèse est sous contrôle des operons « Gal » ou « Lac », les cellules ne renferment pas des traces des ARN messagers correspondants. Après induction par un

Cette proportion reflète d'ailleurs la proportion des protéines totales qui constituent les enzymes néoformés par induction. Chez les organismes synthétisant de manière *constitutive* les enzymes sous contrôle d'un opéron donné, les ARN messagers homologues de ces opérons sont détectables en proportions très abondantes, supérieures à celles atteintes après induction de l'homologue bactérien de type sauvage. Les résultats s'interprètent aisément par un contrôle direct des répresseurs sur la transcription des gènes en ARN messagers. De plus par induction de bactéries Lac<sup>+</sup> dans des conditions dites préférentielles (au cours de la diauxie en présence d'un mélange de glucose et de lactose), on peut démontrer une accumulation considérable d'ARN messagers spécifiques de l'opéron Lac, par fractionnement chromatographique sur colonnes de Kieselghur albu\* mine méthylée. Cette méthode se prête à la préparation éventuelle de quantités importantes d'ARN messagers spécifiques d'un opéron donné, et devrait permettre l'étude de son activité biologique dans des systèmes subcellulaires.

On sait qu'hormis la répression par les produits des gènes régulateurs, la cellule dispose d'autres moyens pour abolir l'expression pléiotropique des gènes inclus dans un opéron donné. Il s'agit d'une mutation du site de l'opérateur (mutation o°). Nous avons pu établir que chez les mutants de type o° on n° pouvait déceler, par les techniques d'hybridation, d'ARN messagers complémentaires de l'opéron muté. Par contre, il a été démontré par Beckwith q^c la plupart des mutant o° sont supprimables, résultat impliquant que ces mutants synthétisent les ARN messagers spécifiques de l'opéron considéré. La contradiction apparente entre les résultats de Beckwith et les nôtres conduit à penser que la mutation type o° entraîne la formation d'un messenger dont Tun o°es « codons », voisin de l'origine du site primaire d'attachement des ribosomes\* comporte un « non sens », c'est-à-dire, n'est pas déchiffrable en amino-acid<sup>c</sup> correspondant. De tels messagers « non sens » sont sans doute rapidement détruits-

b) *Coordination des synthèses d'ARN messagers et d'ARN métabolique\*\* stables.* — En dehors des mécanismes assurant une régulation spécifique de & transcription au niveau d'opérons définis, mécanismes mettant en jeu laq b n des répresseurs, la cellule dispose de mécanismes régulateurs très généraux qui intéressent non seulement la production de tous les ARN messagers mais également celle des autres types d'ARN. Ainsi la carence en un amino-acide spécifique chez un organisme auxotrophique pour cet amino-acide, arrête la synthèse de tous les ARN (Gros et Gros, Pardee et Prestidge). Le mécanisme intime < de ce contrôle a fait l'objet d'études récentes par Kurland et Maaloe ainsi que P<sup>a</sup> Stent et Brenner. En absence d'un amino-acide quelconque, l'ARN de transit<sup>t</sup> habituellement combiné à cet amino-acide se trouve « déchargé » et inhibe la RNA polymérase. Le D<sup>r</sup> A. Tissières, lors d'un stage dans notre groupe & l'I<sup>ns</sup> Institut Pasteur, a pu démontrer en effet que l'ARN soluble (s-ARN) non chargé inhibe *in vitro* la transcription de l'ADN de coli par la polymérase tandis qu'un le s-ARN préalablement chargé en présence de tous les amino-acides n'est qu'un très faible inhibiteur. A l'appui de ce mécanisme, M<sup>me</sup> Legault a pu vérifier également que la synthèse de diverses classes d'ARN (ribosomique, transcrit<sup>ert</sup> messenger) faisait l'objet d'un contrôle coordonné par les amino-acides. Ainsi en carence d'un amino-acide, les taux de synthèses des 3 types d'ARN cellulaires sont réduits dans les mêmes proportions. De plus, chez un mutant ay



a été poursuivie par le D<sup>r</sup> R. Soffer dans mon laboratoire. Il avait été démontré que l'ARN messager des bactéries est une molécule *k* vie brève mais on ignorait ce qu'il advenait des atomes constituant la molécule au cours de son renouvellement. L'emploi d'inhibiteurs appropriés (Dinitrophénol, Proflavine) qui bloquent la transcription du DNA *in vitro* par la RNA polymérase, nous a permis de préciser ce point et de déterminer combien de fois un codon présent dans le messenger est « Lu » en moyenne, avant d'être détruit. En présence des inhibiteurs mentionnés l'ARN messager, préalablement marqué par un isotope radioactif\* se décompose en produits acido-solubles. Dans les conditions normales au contraire, les fragments résultant de la dégradation des messagers sont réemployés *k* la synthèse des ARN métaboliquement stables. La synthèse des protéines se poursuit pendant quelques minutes *in vivo* après addition de DNP et le calcul démontre qu'une chaîne de messenger fonctionne de 5 à 10 fois en moyenne avant d'être détruite. Ce n'est donc pas la lecture des unités de codage qui entraîne la destruction mais un autre mécanisme encore inconnu. L'ARN provenant de bactéries ayant perdu *in vivo* leur ARN messager en présence de DNP est incapable de stimuler la synthèse des protéines *in vitro*. Au contraire les ribosomes provenant de bactéries préalablement traitées par le DNP sont parfaitement\* compétents pour la synthèse des protéines dans des systèmes subcellulaires\*

b) *Attachement des ARN messagers aux ribosomes.* — Les D<sup>rs</sup> Donal et Françoise Hayes ont poursuivi les recherches qu'ils avaient commencées à l'Institut Pasteur sur les complexes réversibles d'ARN messagers et d'ARN ribosomiques. L'association des messagers et des ribosomes est la condition indispensable *k* toute synthèse protéique mais on possède peu d'information sur la nature des liaisons unissant ces éléments cellulaires. D. et F. Hayes ont observé qu'en présence d'ions Mg<sup>++</sup> ou de sels *k* concentration élevée, des complexes définis se forment entre ARN messagers d'*E. coli* et ARN ribosomiques libres. C<sup>cc</sup> est révélabl par des expériences de centrifugation en gradient de saccharose\*. Les ARN 16 S et 23 S participent au même degré *k* ce phénomène d'aggrégation\*, d'ailleurs réversible, si la concentration saline est abaissée. Ce mode d'association pourrait bien intervenir dans l'appariement de tous les messagers aux ribosomes. Ainsi les homopolymères radioactifs suivants : poly U, poly C et poly G, forment avec les ARN 23 S et 16 S des aggrégats qui séparent plus rapidement que les subunités ribosomiques elles-mêmes. Le poly A qui est incapable de former des polysomes artificiels avec les ribosomes de *E. coli* (Lipman) et ne fixe probablement qu'un seul ribosome *k* la fois, ne présente pas la propriété de former des complexes avec les ARN 16 S et 23 S libres. L'ARN 23 S a beaucoup plus d'affinité pour les homopolymères que l'ARN 16 S, et l'addition de poly U ou de poly C à l'ARN 23 S purifié, entraîne la formation de complexes nettement visibles en spectrophotométrie U. V. et dont les caractéristiques suggèrent un appariement entre une chaîne de polymères et une ou plusieurs chaînes de 23 S. Il est vraisemblable que ces appariements se font par des liaisons hydrogènes entre polymères et certaines régions de l'ARN 23 S non engagées elles-mêmes dans une structure secondaire.

III. — ARN MESSAGES ET DIFFÉRENTIATION:

L'étude des mécanismes de différenciation est certainement d'importance capitale pour divers secteurs de la Biologie. La découverte des ARN messagers et l'analyse des mécanismes de contrôle chez les microorganismes, encouragent à envisager cette étude à l'échelle moléculaire. Nous avons par l'emploi de deux systèmes biologiques chez *M. luteus*, les modifications de la différenciation sont particulièrement frappantes et se prêtent bien à des études biochimiques :

- a) les érythroblastes aviaires.
- b) les spores bactériennes.

a) *Les érythroblastes*. — Des travaux avaient été entrepris préalablement en collaboration avec le Professeur I. London à l'Institut Pasteur. Ils sont actuellement étendus et poursuivis par le Dr K. Scherrer dans mon laboratoire. On sait que les cellules formatrices d'hémoglobine chez les mammifères sont bien différenciées, contrairement aux cellules hémoglobogènes des mammifères. A priori les érythroblastes d'oiseaux possèdent sur les reticulocytes des mammifères de pouvoir synthétiser des protéines probablement spécifiques de la globine. Dans des expériences récentes, Scherrer a récemment démontré que les érythroblastes synthétisent des ARN à renouvellement rapide dont une fraction peut être considérée comme un facteur de recrutement des ribosomes et dont le reste a les propriétés cinétiques de renouvellement (en présence d'actinomycine B) caractéristiques des ARN messagers. Le Dr Scherrer entreprend de comparer les nombres de sites accepteurs de l'ADN d'érythroblaste, capables de former des hybrides soit avec l'ARN messager partiellement purifié d'érythroblastes marqués *in vivo*, soit avec le produit obtenu en transcrivant l'ADN d'érythroblaste *in vitro* par la polymérase. Le principe de cette expérience étant qu'un nombre de sites très supérieur à celui qui contrôle la synthèse de l'hémoglobine pourraient être présents. Il ressort de ces expériences que le message ARN naturel (marqué *in vivo*) ne représente 1 expression de 0,1 pour cent du génome présent dans cette cellule différenciée, de 1 ordre

J) *Spores de Bacillus subtilis*. — MM. Georg et Tschanz ont étudié le métabolisme des acides ribonucléiques dans les spores en voie de sporulation ou dans des spores en formation. Or, la formation bactérienne des spores est un remarquable exemple de différenciation impliquant une série d'étapes dont le contrôle génétique est très complexe. Wochimik (Aubert) a commencé à en préciser la chronologie de cette différenciation. Il est déjà possible de dire que pendant la sporulation et jusque vers la fin de ce processus, les bactéries augmentent plus de masse synthétisant des ARN, mais qu'elles cessent de synthétiser des protéines. Chez des bactéries âgées d'un renouvellement métabolique intense, la fraction importante de gènes maintenues dans des conditions identiques. Une

tante des ARN synthétisés est représentée par des ARN messagers et des expériences d'hybridation et de chromatographies devraient permettre d'établir si les « messagers » et les protéines, apparaissant aux diverses phases de la sporulation (qui couvre une période d'environ 7 heures), appartiennent à des classes chimiquement différentes.

La spore terminée ne renferme que très peu de ribosomes mais contient une fraction d'ARN dont les constantes de sédimentation 8-10 S diffèrent de celles des ARN ribosomiques, ainsi que TARN de transfert. Dès le début de la germination TARN 10 S disparaît rapidement et Ton assiste à la resynthèse de TARN ribosomique (type 16 S) et des ribosomes.

#### IV. — TRANSCRIPTION DU DNA PAR LA RNA POLYMERASE *in vitro*.

Nous nous intéressons à l'étude de facteurs capables de modifier l'activité de la RNA polymérase *in vitro* et en particulier aux effets des oligo et des polynucléotides sur l'activité de ce système. En collaboration avec J. M. Dubert et M. Michelson, nous avons pu montrer que des oligonucléotides à chaînes très courtes (2-3-4 résidus), qu'ils comportent ou non un résidu 3' hydroxyle substitué par un radical phosphate, stimulent la vitesse de synthèse du RNA à partir du DNA d'*E. coli* en présence de RNA polymérase et des 4 ribosides triphosphates. Des oligonucléotides à longue chaîne (environ 10 résidus) ainsi que la plupart des polynucléotides testés inhibent au contraire fortement la réaction.

M<sup>lle</sup> R. Cukier (en collaboration avec MM. Michelson et Dubert) entreprend une étude plus approfondie de ce phénomène afin de déterminer si les oligonucléotides à longue chaîne ne deviennent inhibiteurs que pour autant qu'ils servent de matrices à l'enzyme. Il ressort d'expériences préliminaires que les oligo-oligonucléotides de structure pU (pUp)<sub>n</sub> chez lesquels n varie de 1 à 5, stimulent la transcription du DNA d'*E. coli* par la polymérase, tandis que le composé de type pApA(p<sup>n</sup>) où n = 8 ou 9, inhibe la réaction. L'incorporation d'ATP<sup>14</sup> en présence de ces divers oligonucléotides commence à s'observer pour n = 5 ; elle est alors du même ordre qu'en présence de poly U. Avec le composé pApA(pU)<sub>n</sub>, où n = 8, la vitesse d'incorporation de C<sup>14</sup> ATP est de 2,5 à 3 fois plus élevée qu'avec le poly U (dans des conditions de saturation par les composés). Des études entreprises avec la série des oligoadénylates pA(pAp)<sub>n</sub>, où n varie de 2 à 8, démontrent que la vitesse d'incorporation de C<sup>14</sup> UTP ne devient détectable qu'à partir de n = 6, et augmente très rapidement quand n atteint 7 ou 8. Le composé pA(P<sup>n</sup>) avec n = 8 est un inhibiteur marqué de la synthèse de RNA en présence de D<sup>32</sup>P d'*E. coli in vitro*.

Il est donc clair que la RNA polymérase, enzyme assurant la transcription des gènes en RNA, est susceptible de copier des segments très courts de polynucléotides, segments dont la longueur correspond sensiblement à 6 ou 7 (oligo A) résidus nucléotidiques. Toutefois l'enzyme copie avec une vitesse nettement supérieure des oligonucléotides dont la longueur comprend 8 résidus.

#### CONCLUSION.

La poursuite de nos études sur les ARN messagers bactériens devrait porter plus spécifiquement vers l'obtention de systèmes de transcription de



- C. WILLSON et F. GROS. « *In vitro* protein synthesis with *E. coli* system ». *Biochim\* Biophys. Ada*, 1964, 80, 478.
- G. ATTARDI, S. NAONO, F. GROS, G. BUTIN et F. JACOB. « Régulation de la transcription DNA-RNA messenger intervenant dans la biosynthèse d'enzymes bactériens et l'expression des fonctions virales du phage ». *C. R. Acad. Sci.*, 1963, 256, 805.
- F. GROS, S. NAONO, C. WOESE et C. WILLSON. « Studies on the general properties of *E. coli* messenger RNA ». Symp. on Informational Macromolecules, 1963, Academic Press, New York.
- C. WOESE, S. NAONO, R. SOFFER et F. GROS. « Studies on the breakdown of messenger RNA ». *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1963, 11, 423.
- A. TISSIERES, S. BOURGEOIS et F. GROS. « Inhibition of RNA polymerase by RNA » *J. Mol. Biol.* 1963, 7, 100.
- F. GROS, J. M. DUBERT, A. TISSIERES, S. BOURGEOIS, M. MICHELSON, R. SOFFER et L. LEGAULT. « On the regulation of the metabolic breakdown and of the synthesis of messenger RNA in bacteria ». Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol., 1963, 28.
- G. ATTARDI, S. NAONO, J. ROUVIERE, F. JACOB et F. GROS. « Production of messenger RNA and regulation of protein synthesis ». Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1963, 28.
- F. GROS, S. NAONO, J. M. DUBERT, G. ATTARDI et F. JACOB. « Mécanismes régulateurs et synthèse des ARN messagers ». Coll. Intern, du C.N.R.S., Marseille, 1963.
- F. GROS. « The genetic code and its translation ». Cellular Control Mechanism and cancer, Amsterdam, 1963.
- G. BALASSA. « Le métabolisme des acides ribonucléiques au cours du cycle sporal & *Bacillus subtilis* ». Coll. Intern, du C.N.R.S., Marseille, 1963.
- D. HAYES, M. F. GUERIN et F. HAYES. « Association of rapidly labelled RNA in solutions of high ionic strength ». Coll. Intern, du C.N.R.S., Marseille, 1963.

---

### COMPOSITION DU SERVICE

- M. FRANCOIS GROS, Directeur de Recherches au C.N.R.S.
- M. DONAL HAYES, Maître de Recherches au C.N.R.S.
- M. SHIRO NAONO, Chargé de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> FRANÇOISE HAYES, Chargée de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> DENISE LUZZATI, Chargée de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> RÉGINE CUKIER, Chargée de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> LUCIENNE LEGAULT, Chargée de Recherches au C.N.R.S.
- M. GEORGES BALASSA, Attaché de Recherches au C.N.R.S.
- M. GÉRARD CONTESSÉ, Boursier de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique.
- M<sup>me</sup> ALEXANDRA SHEDLOVSKY, Boursière de la Délégation Générale \* 1<sup>a</sup> Recherche Scientifique et Technique.
- M. KLAUS SCHERRER, Chargé de Recherches au C.N.R.S.
- M. RICHARD SOFFER, Boursier du N.I.H. (U.S.A.).

**M. JAMES WYNGAARDEN, Boursier du N.I.H. et de Duke University (U.S.A.).**

**M. DONALD NIERLICH, Boursier de la N.S.F. (U.S.A.).**

**M»e JOSETTE ROUVIERE, Biologiste adjointe au C.N.R.S.**

**M"e MARIE-FRANCE GUERIN, Biologiste adjointe au C.N.R.S.**

**M»« ANNIE MALHIE, Biologiste adjointe au C.N.R.S.**

**M™ JACQUELINE FAGOT, Biologiste adjointe au C.N.R.S.**

**M»« LISLOTT VOEGELIN, Technicienne (Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique).**

**M"e GENEVIEVE MASSE, Secrétaire (Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique).**

## SERVICE DE CHIMIE MACROMOLECULAIRE

Rapport de M<sup>TM</sup> A. DOBRY-DUCLAUX, Chef de Laboratoire.

Comme les années précédentes, les sujets traités au laboratoire se divisent en deux groupes :

### I. — CONSTITUTION CHIMIQUE DES CENTRES ACTIFS DES ENZYMES

Dans le rapport de 1962, M<sup>me</sup> Dobry-Duclaux a indiqué qu'elle a trouvé des enzymes pour lesquels la fixation du substrat S et de son produit de réaction S' ne s'effectue pas sur la même fonction chimique du centre actif. Ce résultat en rapport non seulement avec la constitution chimique du centre actif, mais également avec le mécanisme intime de la réaction enzymatique, demande une étude approfondie. Aussi a-t-elle analysé cette année-ci un certain nombre d'enzymes, en portant surtout son attention sur les hydrogénases qui catalysent en présence du coenzyme I ou du coenzyme II, la transformation du groupe -CO du substrat en groupe -CHOH-. M<sup>me</sup> Dobry-Duclaux a pu expliquer la fixation du substrat S et de son produit de réaction S' sur des fonctions chimiques différentes par la présence dans le centre actif d'une fonction « variable », pouvant prendre deux formes, en équilibre suivant la nature du milieu. Cette fonction « variable » ne sert pas uniquement à la fixation des substrats, mais elle participe elle-même à la réaction, en se transformant d'une forme en une autre, et en se régénérant sous l'influence du milieu.

Dans le cas des deshydrogénases étudiées, cette fonction « variable » se présente sous une forme protonisée et non protonisée, dont l'équilibre dépend du pH du milieu. Le substrat S, contenant le groupe carbonyle, se fixerait sur la forme protonisée, laquelle céderait un atome d'hydrogène au substrat et une charge positive au coenzyme; par contre, le substrat S', possédant le groupe -CHOH-, se fixerait sur la forme non protonisée de la fonction « variable » laquelle accepterait un atome d'hydrogène et la charge du coenzyme. Quant au second atome d'hydrogène, impliqué dans la réaction, il provient, comme on le sait, du coenzyme.

D'après les résultats obtenus par M<sup>me</sup> Dobry-Duclaux, la fonction « variable » serait, dans les deshydrogénases étudiées, soit l'imidazole, soit le groupe aminé. L'identification de ces groupes est rendue possible par l'emploi d'un inhibiteur spécifique, le sel de Roussin (voir les rapports des années précédentes), qui se fixe que sur l'une des deux formes, protonisée, des fonctions basiques azotées.



la simple pesantur la force centrifuge qui donne des résultats en quelques heures. Mais ces appareils sont très coûteux et leur emploi est limité.

M. J. Duclaux et M<sup>me</sup> Ch. Cohn ont pensé que des résultats équivalents pouvaient être obtenus plus simplement avec des appareils normaux des laboratoires. En effet, si la solution étudiée est contenue dans un tube vertical scellé et perméable (collodion ou cellophane), la sédimentation et l'ultrafiltration se font en même temps et l'équilibre final est atteint plus rapidement, quelquefois 100 fois plus vite. Mais bien que la mesure soit ainsi rendue possible, elle demande encore plusieurs semaines. Pour accélérer, il faudrait avoir recours en plus à une force centrifuge faible (par exemple 100 fois la pesantur, au lieu de 100 000 fois dans les ultracentrifuges). Cette force peut être obtenue avec n'importe quel centrifugeur de laboratoire, tournant au ralenti. Nous n'avons pas abordé expérimentalement cette étude, l'organisation du laboratoire ne permettant pas de le faire dans de bonnes conditions. Mais un mémoire théorique est en cours d'impression au Journal de Chimie Physique.

A la fin de l'année, M. J. Duclaux et M<sup>me</sup> Ch. Cohn ont repris l'étude de l'osmose et de la pression osmotique par une méthode nouvelle et *a priori* paradoxale, puisqu'elle consiste à faire filtrer un liquide au travers d'une paroi imperméable, constituée par un tube de chlorure de polyvinyle du type commercial. Les résultats qualitatifs sont très satisfaisants, mais nous ne savons pas encore si des mesures exactes seront possibles. De toute manière une contribution sera apportée à la théorie des membranes, qui est un des chapitres les plus obscurs de la biophysique.

---

### LISTE DES PUBLICATIONS

A. DOBRY-DUCLAUX. « Sur la détermination des sites actifs de certains enzymes. V. Réaction du sel de Roussin avec des ch&ates ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 77, \*.

---

### COMPOSITION DU SERVICE

M<sup>me</sup> A. DOBRY-DUCLAUX, Directeur de Recherches au C.N.R.S.

M. JACQUES DUCLAUX.

M<sup>me</sup> CH. COHN, Chargée de Recherches au C.N.R.S.

M<sup>lle</sup> N. DAUMAS, Collaboratrice technique au C.N.R.S.

## SERVICE DE PHYSIOLOGIE

Rapport de M. TH. CAHN, Chef de Service.

Les années précédentes, MM. Cahn et Houget avaient étudié sur le Lapin les modifications que provoquent des injections journalières de doses physiologiques de cortisone sur la circulation des glucides et des lipides. Us ont observé la glycémie pendant les heures suivant la première injection une légère ascension de teneur qui va en s'accusant si Ton poursuit les injections, avec ce caractère particulier de présenter des sommets au cours de la résorption intestinale. Cette ascension persiste un ou deux jours après la cessation des injections et retourne rapidement au niveau normal. Au contraire des variations de la glycémie, celles de la lipémie se font dans des sens opposés : on observe pendant une chute du taux des acides gras estérifiés qui se maintient durant une période fort variable avec les individus, la lipémie monte progressivement et peut atteindre, surtout chez les femelles, des valeurs élevées donnant au plasma un aspect laiteux. La lipémie maximale est atteinte le lendemain ou le surlendemain de la cessation des injections. Elle redescend en deux à trois jours à son niveau initial. La cortisone provoque des modifications importantes dans la circulation des métabolites. Cette modification qui se pose alors, est de savoir s'il s'agit d'un effet direct sur la perméabilité cellulaire comme c'est en fait le cas pour l'insuline, ou s'il s'agit d'une conséquence d'une action plus profonde agissant au niveau des tissus. C'est cet aspect du problème qui a fait le sujet des recherches entreprises cette année.

Quelques auteurs ayant étudié l'action de la cortisone sur les échanges respiratoires ont noté un abaissement du quotient respiratoire ; nous confirmons ce résultat sur le Lapin alimenté, recevant des injections journalières de 1 mg par kg animal de cette hormone. L'adrénaline administrée au Lapin alimenté provoque une chute du quotient respiratoire, mais cette chute est due à une diminution de l'ingestion alimentaire qui oblige l'animal à brûler des graisses de réserve. Au contraire la cortisone stimule l'appétit et les animaux absorbent une plus grande quantité de glucides et on devrait s'attendre à une augmentation du quotient respiratoire. Or l'expérience montre qu'avec des injections quotidiennes de cortisone, le quotient respiratoire reste pendant 48 jours à un niveau relativement bas. Il s'agit d'un changement important dans la combustion des combustibles brûlés par l'animal. Et, pour en connaître l'ampleur, il faut chercher à déterminer avec le maximum de précision la quantité des

divers combustibles brûlés d'abord chez les animaux normaux alimentés, puis chez les mêmes recevant des injections journalières de cortisone. Nous nous sommes efforcés en même temps de chiffrer les quantités de glucides, lipides et protides apportées par l'alimentation, ainsi que leurs coefficients d'utilisation digestive; les transformations que subissent en partie les aliments dans le gros intestin introduisent toutefois une sous-estimation qui peut atteindre 10 pour cent.

Le calcul montre que la cortisone, par la stimulation de l'appétit, peut augmenter l'apport de glucides en moyenne (dix expériences) de 7,8 g par jour alors que la combustion des glucides diminue en moyenne pendant les premières 48 heures, de 10 g par jour. La production calorique restant à peu de choses près la même, la participation des lipides aux combustions augmente considérablement pendant que celle des glucides diminue.

Il faut faire ressortir un autre aspect des perturbations métaboliques qu'évoque la cortisone. Dans des recherches antérieures, MM. Cahn et Houglava ont montré que le Lapin transforme une partie importante des glucides alimentaires en lipides et ceci déjà au cours de l'absorption intestinale; ce processus se traduit par une augmentation du quotient respiratoire. Or ce processus semble aboli ou fortement diminué par la cortisone.

Ainsi la cortisone stimule l'appétit du Lapin et de ce fait augmente l'apport des glucides et en même temps elle entrave fortement les deux mécanismes principaux de lutte contre un afflux excessif de glucides: leur combustion et leur transformation en lipides.

Ce sont ces inhibitions métaboliques qui sont à l'origine des pointes hyperglycémiques postprandiales et de l'accumulation considérable de glycogène dans le foie. C'est l'augmentation compensatrice de la combustion des lipides qui est la cause de la diminution du taux des lipides sanguins dans les premières 48 heures d'action de la cortisone. Ces variations de la circulation des métabolites sont donc consécutives à un changement du métabolisme tissulaire.

Bien que l'on continue les injections de cortisone, l'organisme continue dès le troisième jour à réagir et à mettre en jeu des mécanismes de compensation et l'on constate qu'aux 4<sup>e</sup> et 5<sup>e</sup> jour des injections, alors que l'apport alimentaire des glucides est resté pratiquement le même, leur combustion augmente fortement, de près de 9 g. en moyenne par jour, de sorte que leur participation aux dépenses dépasse même celle de la période normale. La combustion des lipides diminue en conséquence; il ne semble pas que la transformation des glucides en lipides ait repris.

Lorsqu'on cesse les injections, la prise de nourriture diminue légèrement et de ce fait aussi l'apport des glucides, mais la réaction de l'organisme, libéré de la contrainte imposée par la cortisone, fait que la combustion des glucides augmente en moyenne de 9 g par jour de sorte que leur combustion représente 78 pour cent des dépenses et l'on voit, quand l'apport alimentaire est suffisant, réapparaître, et ceci avec une intensité accrue, la transformation des glucides alimentaires en lipides. En trois ou quatre jours tout semble rentrer

1>Ordre,

Nous voyons donc en conclusion, que la cortisone modifie profondément l'activité métabolique de l'organisme: en inhibant directement ou indirectement la combustion des glucides, elle oblige l'organisme à brûler des graisses de réserve.

malgré un apport accru d'aliments et spécialement de glucides; elle s'oppose aussi à la transformation des sucres en graisses. L'organisme privé de ses moyens essentiels de maîtriser l'apport des glucides s'en trouve littéralement débordé. « dans nos expériences le taux du glycogène hépatique dépasse 15 pour cent du Poids frais ! Au bout de deux jours, l'organisme met en œuvre des mécanismes compensateurs et, malgré l'administration de cortisone, la combustion des sucres devient à peu près normale.

Toutefois la synthèse des glucides en lipides ne semble reprendre normale ment qu'après la cessation des injections de cortisone.

Ainsi les profondes modifications métaboliques qu'entraîne la cortisone permettent-elles de comprendre les importantes variations du P<sup>0</sup> et du P<sup>1</sup> de la glycémie et des lipides sanguins : la glycémie monte, et surtout dans la plus leur festive, parce que l'organisme brûle moins de glucose et ne se livre pas à la formation ordinaire en graisses, et voit ses dépôts de glycogène gonflés « maximum incapables bien sûr de stocker les nouveaux sucres. Dès les premières heures d'action de la cortisone parce que la combustion des hydrates de carbone est ralentie fortement; une mobilisation des réserves grasses s'ensuit, elle se voit alors que l'organisme commence à en restreindre la production. Mais la lipémie monte à des valeurs considérables qui seront encore dépassées quand l'organisme retrouve à la cessation des injections de cortisone la faculté de transformer en lipides les quantités anormales de glucides qu'il avait venues.

Mme Lourau, dans son travail sur l'immunité qui suit une irradiation corporelle totale. Elle a constaté qu'une hémagglutinine spécifique d'espèces, ayant le caractère de Propriété d'un anticorps immun, apparaît dans le sang au bout de 5 jours et se maintient pendant 3 mois, mais que, pour l'observer, il est le plus indispensable d'éliminer un inhibiteur.

L'analyse des propriétés de cette hémagglutinine, qui provoque chez l'animal normal, a conduit M. L. à l'auto-immunisation par injection d'antiserum et elle a pu montrer qu'une auto-immunisation ? Pas un phénomène exceptionnel, mais au contraire la réponse normale à la Section d'un sérum hémagglutinant, qu'il soit homogène ou hétérologue. Il est même possible que ce soit la réponse à une hémolyse de qui sera également examiné.

Mme Lourau envisage donc deux mécanismes pour l'auto-immunisation après irradiation : une hémolyse provoquée par l'irradiation et une auto-immunisation antigénique des hématies. Cette hypothèse est basée sur le fait que divers organes des animaux irradiés, d'autre part, à immuniser des animaux contre irradiés *in vitro* par de fortes doses de rayons X.

*LISTE DES PUBLICATIONS*

- Th. CAHN et J. HOUGET. « Mécanismes physiologiques du maintien de l'équilibre pondéral et leurs perturbations conduisant à l'obésité ». *Ada neurovegetativa*, 1963, 2<sup>e</sup>, 501.
- Th. CAHN et J. HOUGET. « Métabolisme matériel ». *Physiologie*, vol. I, pp. 679-766. Flammarion, 1963.
- Th. CAHN. « La vie et l'œuvre d'Étienne Geoffroy Saint-Hilaire ». Presses Universitaires de France, 1962.
- G. BIDAULT. « Effets de la castration sur les glycémie et lipémie du lapin mâle recevant de la cortisone ». Diplôme d'études Supérieures, Faculté des Sciences, Paris.
- M. BERTHEAU. « Action de la cortisone sur les dépenses azotées du Lapin normal et castré ». Diplôme d'études Supérieures, Faculté des Sciences, Paris.
- G. CREPAT. « Effet d'une injection unique de cortisone sur la glycémie et la lipémie de la Lapine. Influence de la dose ». Diplôme d'études Supérieures, Faculté des Sciences, Paris.

---

*COMPOSITION DU SERVICE*

- M. TH. CAHN, Directeur de Recherches au C.N.R.S.  
M. J. HOUGET, Directeur de Recherches au C.N.R.S.  
M<sup>me</sup> M. LOURAU, Chargée de Recherches au C.N.R.S.  
M<sup>me</sup> G. WEISS, Collaboratrice technique au C.N.R.S.  
M<sup>Ue</sup> A. FAUVEAU, Collaboratrice technique au C.N.R.S.  
M. G. BIDAULT, Travailleur libre.  
M. M. BERTHEAU, Travailleur libre.  
M. G. CREPAT, Travailleur libre.



du dioxane, se trouve *k* une étape de T extraction de ce précipité par les solvants organiques usuels, en solution dans du chloroforme additionné de 5 % de méthanol. Nous avons pensé que la méthode ultrasonique de disintégration nous permettrait peut-être de faire une extraction directe, si nous soumettions *k* cette action notre matériel bacillaire, *dans le solvant organique oil le constituant à extraire était soluble*. La connaissance des propriétés physiques et chimiques du Pmko, devait nous permettre de le séparer des autres constituants de la cellule bactérienne, éventuellement libérés et retenus en solution dans le milieu de suspension\*

Cette méthode d'extraction s'est révélée très efficace, et nous a permis d'extraire le Pmko, avec un rendement qui est passé de 1 & 6 environ, pour une masse donnée de bacilles. Le degré de solubilité dans Téter de pétrole, du lipo\* polysaccharide Pmko, que n'a pas ce même constituant du bacille extrait par la méthode d'Anderson, et désigné dans la nomenclature de Lederer et Asselineau sous le nom de « Cires D », a permis de rassembler par centrifugation & grande vitesse, et d'éliminer, tout débris bacillaire colorable par le Ziehl.

Nous avons vérifié que le Pmko ainsi obtenu avait les mêmes propriétés biologiques que notre Pmko original, en ce qui regarde l'activité sérologique des sucres séparés par hydrolyse alcaline, et aussi en ce qui regarde la capacité de déceler avec la même intensité, l'hypersensibilité développée chez les sujets tuberculeux, contre ce constituant lipopolysaccharidique.

Cette nouvelle méthode de préparation, moins laborieuse, plus rapide et plus économique que notre méthode de recherche, d'extraction par Thuile de paraffine fine, permettra sans doute une diffusion plus grande de cet antigène, dont nous avons décrit dans des rapports précédents, la propriété de déceler spécifiquement\* au même titre que la tuberculine, l'hypersensibilité développée par le contact préalable de l'organisme avec le bacille de Koch.

2) *Utilisation du Pmko, comme agent thérapeutique efficace, chez des sujets allergiques, atteints de maladies étrangères à la tuberculose.*

La publication de nos recherches sur les intensités comparées des réactions intradermiques, au Pmko et à la tuberculine, chez des sujets tuberculeux, ou allergiques sans tuberculose clinique, a incité de nombreux cliniciens à utiliser le Pmko dans les cas où une allergie aux constituants du bacille de Koch était soupçonnée. En dehors des phthisiologues français ou étrangers, qui ont tous confirmé les conclusions de notre longue étude qui a mis en évidence une hypersensibilité au lipopolysaccharide Pmko distincte de l'hypersensibilité tuberculeuse. Unique et liée aux facteurs de résistance de l'organisme, des cliniciens allergiques se sont également intéressés à cet antigène, capable de déceler au même titre que la tuberculine, une hypersensibilité au bacille de Koch.

On rencontre fréquemment, dans des affections d'étiologie inconnue, des « allergiques », des sujets réagissant fortement aux constituants du bacille tuberculeux, à la tuberculine en particulier. Bien que le mécanisme de cette réaction soit inexplicé, une thérapeutique de désensibilisation par des doses faibles de tuberculine a souvent été appliquée, entraînant parfois une certaine amélioration.

Nous avons pensé que cette allergie au bacille de Koch, révélée dans certains cas par la tuberculine, pouvait être liée, avec plus de spécificité, au constituant lipopolysaccharidique du bacille tuberculeux. Parmi les recherches poursuivies

dans ce sens, les resultats de l'étude précise faite par le V<sup>A</sup>Henocq, dermatolo-  
giste de l'Hopital de l'Institut Pasteur, semblent P<sup>A</sup> ^ ^ " téressants.

Au cours d'une expérimentation portant jusqu'ici sur " " ^ S J W  
sujets, le Dr Henocq a'pu constater l'efficacite du P « M.n on ^ u ^ n t pour  
la détection d'allergies non révélées par la tuberculine; - " T J ^ 0 ^ que  
gene thérapeutique, bien supportée, et pouvant agir a \* « ^ TM " L ^ doses  
i/Soooo. de mLgrammes'le traitement d f ^ ^ S ^ ^  
appropriées de Pmko a gciéralement entraîne une nette. am ^ 0 ' y w . r'ével&  
'as d'asthmes, de rhumatismes, particulièrement de psoras, qm s etaient  
^fractaires à toute autre thérapeutique. . . . vnirimentale souvent diffi-

Ce travail qui se poursuit avec une precision ^ P ^ ^ tographiques  
Je k réaliser dans le domaine dinique, avec des documente Photog^ j ^  
June grande netteté, devrait permettre de niieux jomprendre. ^ énéralement  
\*\* la persistance d'une hypersensibilité au bacille de Koch, datont g p'olo ie  
d'une primo-infection banale, et d'apporter ainsi quelque darte sur eti g  
confuse de ces affections si complexes.

3) *Experiance d'essai de vaccination des BaviMs* ^ 1 £ ? % . £  
le Upopolysaccharide Pmko, se poursuit dans les ^ dition ^ crt m. \* anima ^  
P ^ dents rapports. Cette expérience qui comprend 20 « TM, \* £ 6 r sera  
«immunises » avec le Pmko et 10 animaux contrôles, comiLencee « . 19 ^ val ^ ation  
arrétée dans quelques semaines par l'abattage de tous les ani ^ £ ^ ^ ^  
Précise des lésions tuberculeuses pr&entes ^ h « % ce S ^ h ^ X c 5 e u s s e s , devrait  
soumis pendant plus de dix-huit mois au contact ^ b etes tubercuie 'es Bovid &  
nous renseigner sur les propriét& immunisantes du Pmko, pour a  
e\*posés à la voie naturelle de contamination.

H- — *Velude de Velectrisation superficielle des spermatozoïdes d'origine bovine,*  
2\* nous sont ' regulierement fournis par, les f<sup>TM</sup>TM £ £ i T i p ^ des  
Pursuit dans le sens indique" dans nos précédents " P P ^ 0 TM ^ ^ oil Us  
Permatozoides selon l'importance de leur charge, dsms a < ~ cond. L'inse-  
ne. ambient pas alteres par le traitement é ^ 1 ^ 0 ^ ? " 6 s " \* ^ de verifier  
" ^ nation des populations selectionnées par électroprorese p - ern  
J l'ur potentiel de feo>ndation a & é maintenu et, dan ^ , cec ^ ne - répondu  
J e insemination des populations les plus chargees. P - g ^ d £ popula-  
anc « significative de Tun des sexes, les produits delinsemi  
^ les moins chargees, une' preponderance' de 1 autre \* n. ^ ^ ^ ^ ^

*Vitude de V'electrisation superficielle de souches de "* ^ ^ ^ a permis  
J n ncheuses, poursuivie en collaboration avec « L - arab ^ pour ^ deux  
r \*\*\* blir, dans des conditions physiologiques très comp ^ e électrique et  
> C K la relation entrevue par certains auteurs entre la cnarg  
sa " ? ali g nité. ^ . T ^ prove naient du tissu  
nil L es deux souches cellulaires utdisées Pa et r \* ; - fr0 par M. Barski,  
^ \* » • ^ \* ^ to \* mm Cs 7 V U ^ \* ^ m £ ^ a ' ladon  
> « x96i. Mais, alors que la souche P2 n'avait gm. ^ assafc ^ ^  
e ^ trypsine, la souche PTT12 avait dans son h « et ^ p ^ ^ ^  
la - ctues par trypsinisation. Cette souche a presciu ^ j au bout de 10  
ignite', produisant régulièrement des tumeurs palpables

& 15 jours, tuant en moins de deux mois les souris C57 BL inoculées par voie sous-cutanée, avec des doses de l'ordre de  $25 \cdot 10^3$  cellules. La souche P2, par contre, n'a commencé à manifester quelque pouvoir cancéreux qu'au bout des 18 premiers mois de culture, sa très faible malignité se traduisant par la production de tumeurs occasionnelles, après inoculation d'une dose de cellules de l'ordre de  $5 \cdot 10^6$ .

Les conditions bien définies de culture de ces deux souches, menées parallèlement dans un milieu identique assuraient un rythme de passage et une *rapidité de croissance* comparables pour chacune des deux souches. Ce dernier caractère était particulièrement souhaitable, pour établir, sans ambiguïté, toute relation possible entre la charge électrique des cellules et leur malignité, certains auteurs ayant cru pouvoir conclure de leurs expériences d'électrophorèse comparée sur des cellules hépatiques adultes, ou en voie de régénération, que l'intensité de la multiplication cellulaire pouvait expliquer, dans tous les cas, une augmentation de la mobilité électrophorétique:

L'étude de l'électrisation superficielle de ces deux souches PTT12 hautement maligne, et P2 faiblement cancéreuse, a été faite avec notre dispositif pour l'observation microscopique de l'électrophorèse. Les cellules ont été mises en suspension dans un milieu tampon phosphaté à pH 7,2, contenant 15 % d'extrane, qui assurait une sédimentation négligeable des cellules pendant la durée des mesures de mobilités. Ces cellules avaient été dispersées, lavées, et mises en suspension dans un tampon phosphaté à pH 7,2, dans des conditions identiques avant d'être remises en suspension dans le milieu au dextrane.

Dans ces conditions d'expérimentation, nous avons trouvé de manière constante, dans plusieurs séries de mesures relatives  $k$  ces deux souches et portées sur une cinquantaine de déterminations de mobilités, que la répartition statistique des mobilités était différente pour les suspensions cellulaires P2 et PTT12. Les mobilités des cellules de la souche hautement maligne PTT12 se répartissaient autour d'une valeur moyenne plus élevée que celle des mobilités des cellules de souche faiblement cancéreuse P2.

Ainsi, nos observations semblent confirmer l'existence d'une relation entre la malignité des cellules et la densité de leur charge électrique superficielle indépendante de la fraction que l'intensité de la multiplication cellulaire peut avoir sur cette électrisation. Ce caractère différentiel d'électrisation, aisément mesurable par l'électrophorèse, devrait permettre la séparation des populations de malignités différentes, coexistant au sein d'une souche sauvage.

---

### LISTE DES PUBLICATIONS

- R. KOURILSKY, N. CHOUCROUN et P. GRESLAND. « Étude des épreuves intradermiques à la tuberculine et au lipopolysaccharide Pmko, en fonction de l'état des Vég d'exercice de sujets tuberculeux ». *Revue de Tuberculose et de Pneumologie*, 1963, 27, W
- G. BARSKI et N. CHOUCROUN. « Vitesses électrophorétiques des cellules pulmonaires de souris ayant acquis *in vitro* des degrés différents de malignité ». *C. R. Acad. Sci.* 1964, 258, 2442.

*COMPOSITION DU LABORATOIRE*

**M<sup>lle</sup> N. CHOUCROUN, Directeur de Recherches au C.N.R.S.;**

**M<sup>lle</sup> J. BAZIN, Collaboratrice technique au C.N.R.S.**

**M<sup>lle</sup> c. SANSON, Collaboratrice technique au C.N.R.S.**

## PROFESSEURS EN VISITE

Au cours de l'année 1963, l'Institut de Biologie Physico-Chimique a reçu pour des séjours de diverses durées, les personnalités suivantes :

M. W. E. COHN, du Laboratoire National d'Oakridge (Tennessee);

M. S. S. COHEN, Professeur *h* l'Université de Pennsylvanie;

M. FRAENKEL-CONRAT, Professeur *k* l'Université de Californie;

M. G. DEL RE, Professeur *k* l'Institut de Chimie Théorique de Naples;

Le docteur J. LADIK, de l'Institut de Chimie de l'Académie des Sciences de Hongrie.

## TABLE DES MATIÈRES

COMPOSITION DU CONSEIL D'ADMINISTRATION. . . . .	5
COMPOSITION DU COMITÉ DE DIRECTION. . . . .	6
INTRODUCTION. . . . .	7
SERVICE DE BIOPHYSIQUE, rapport de M <sup>TM</sup> S. FILITTI-WURMSER, Chargée de Service. . . . .	9
SERVICE DE BIOCHIMIE THÉORIQUE, rapport de M. B. PULLMAN, Chef de Service. . . . .	15
SERVICE DE BIOCHIMIE A, rapport de M <sup>TM</sup> Y. KHOUVINE, Chargée de Service. . . . .	27
SERVICE DE BIOCHIMIE B, rapport de M <sup>m*</sup> M. GRUNBERG-MANAGO, Chargé de Service. . . . .	32
SERVICE DE PHYSIOLOGIE MICROBIENNE, rapport de M. F. GROS, Chef de Service. . . . .	42
SERVICE DE CHIMIE MACROMOLÉCULAIRE, rapport de M <sup>TM</sup> A. DOBRY- DUCLAUX, Chef de Laboratoire. . . . .	52
SERVICE DE PHYSIOLOGIE, rapport de M. Th. CAHN, Chef de Service..	55
LABORATOIRE de M <sup>ll*</sup> N. CHOUCROUN. . . . .	59
PROFESSEURS EN VISITE. . . . .	64

**IMPRIMERIE F. PAILLART  
ABBEVILLE**

**D. 9139-  
Dépôt légal : \*• trimestrs X964.**

FONDATION EDMOND DE ROTHSCHILD  
POUR LE DEVELOPPEMENT DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

---

# INSTITUT DE BIOLOGIE PHYSICO-CHIMIQUE

RAPPORTS  
SUR LES TRAVAUX EFFECTUES

AU COURS DE L'ANNEE

**1964**

13, RUE PIERRE-CURIE  
PARIS-Ve

## CONSEIL D'ADMINISTRATION

### *Président :*

M. FRANCIS PERRIN, Membre de l'Institut, Professeur au Collège de France, Haut-Commissaire à l'énergie Atomique.

### *Vice-Présidents :*

M. G. CHAMPETIER, Membre de l'Institut, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris.  
M. t<sup>P</sup> TERROINE, Professeur honoraire à la Faculté des Sciences de Strasbourg, Directeur du Centre de Recherches sur la Nutrition au C.N.R.S.

### *Secrétaire Général :*

M. B. PULLMAN, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris.

### *Trésorier :*

M. EDMOND DE ROTHSCHILD.

MM. E. AUBEL, Professeur honoraire à la Faculté des Sciences de Paris.

P. AUGER, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris.

M. BINET, Membre de l'Institut, Doyen honoraire de la Faculté de Médecine de Paris.

TH. CAHN, Directeur à l'École des Hautes Études, Directeur scientifique au C. I. S.

R. COURRIER, Secrétaire Perpétuel de l'Académie des Sciences de Paris.

J. DUCLAUX, Membre de l'Institut, Professeur honoraire au Collège de France.

B. EPHRUSSI, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris.

R. FABRE, Membre de l'Institut, Doyen honoraire de la Faculté de Pharmacie de Paris.

L. FAGET, Membre de l'Institut, Professeur honoraire au Muséum National d'Histoire Naturelle.

P. FLEURY, Professeur honoraire à la Faculté de Pharmacie de Paris.

M. FONTAINE, Membre de l'Institut, Professeur au Muséum National d'Histoire

Institut, Directeur du Muséum National d'Histoire

Naturelle.

MM. A. KIRMANN, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris, Directeur-adjoint de l'École Normale Supérieure.

R. LATARJET, Directeur de l'Institut du Radium.

£. LEDERER, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris.

A. LWOFF, F.R.S., Professeur à la Faculté des Sciences de Paris, Chef de Service à l'Institut Pasteur.

J. PARROD, Professeur à la Faculté des Sciences de Strasbourg.

J. ROCHE, Membre de l'Institut, Professeur au Collège de France, Recteur de l'Université de Paris.

M<sup>me</sup> A. DE ROTHSCHILD.

Lord ROTHSCHILD, F.R.S., Professeur à l'Université de Cambridge.

MM. L. SACHS, Trésorier honoraire.

M. J. TONNELAT, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris.

J. TREFOUEL, Membre de l'Institut, Directeur de l'Institut Pasteur.

R. WURMSER, Professeur honoraire à la Faculté des Sciences de Paris.

#### COMITÉ DE DIRECTION

MM. E. AUBEL, TH. CAHN, G. CHAMPETIER, J. DUCLAUX, B. EPHRUSSI,  
R. HEIM, E. LEDERER, FRANCIS PERRIN, B. PULLMAN, E. DE ROTHSCHILD,  
E. TERROINE, J. TREFOUEL, R. WURMSER.

## SERVICE DE BIOPHYSIQUE

Rapport de M<sup>TM</sup> FILITTI-WURMSER, Chargée de Service.

### I. — GLOBULINES DES SCRUMS HUMAINS

En collaboration avec le Professeur L. Hartmann de la Faculté de Médecine, MM. C. Gentou et M. Hofnung, nous avons poursuivi l'étude comparative des macroglobulines des sérums humains normaux et pathologiques. L'objet de ce travail est d'obtenir des informations sur le lieu d'origine et sur les conditions de la synthèse de ces protéines.

Les constantes de sédimentation, les mobilités électrophorétiques et le comportement en immunoelectrophorèse révèlent des différences individuelles dans les anomalies moléculaires des gamma-macroglobulines.

Rappelons que les diagrammes d'ultracentrifugation analytique mettent en évidence dans les sérums humains d'individus normaux trois pics de gradient de concentration, A, G et M dont les constantes de sédimentation, exprimées en unités Svedberg, avoisinent respectivement 4 S, 6 S, 16 S, et qui représentent respectivement  $87 \pm 5 \%$ ,  $10,7 \pm 5 \%$  et  $2,3 \pm 0,7 \%$  de la concentration totale. Ces valeurs relatives rapportées à la concentration normale des protéines sont  $8/1 \pm 4,7$ ,  $1,5 \text{ g/l} \pm 1,5$  et  $1,5 \text{ g/l} \pm 0,7$ . Une maladie, dite de Waldenström, caractérisée par l'apparition dans le sérum de constituants protéiques de grands poids moléculaires. Il a été possible d'étudier 57 de ces sérums. Les constituants de grands poids se répartissent le plus souvent en deux pics  $M_x$  et  $M_2$ , parfois en trois pics  $M_1$ ,  $M_2$  et  $M_3$ , rarement en un seul pic. L'analyse statistique a mis en évidence les points suivants :

a) pour le pic principal  $M_x$  les valeurs de  $S_{20,w}^\circ$  sont comprises entre 15,6 S et 19,3 S avec deux dominantes :  $S_{20,w}^\circ M_1A = 17S$  et  $S_{20,w}^\circ M_2B = 18,3 S$ .

b) pour le second pic de macromolécules  $M_2$  les valeurs de  $S_{20,w}^\circ$  sont comprises entre 22 S et 29 S avec deux dominantes :  $S_{20,w}^\circ M^A = 23,9 S$  et  $S_{20,w}^\circ M_2B = 27,0 S$ .

c) Le troisième pic de macromolécules  $M_3$ , le moins important quantitativement est aussi plus rare et correspond à une constante de sédimentation  $S_{20,w}^\circ$  de l'ordre de 36 S.

d) Le calcul des corrélations entre les concentrations des divers constituants de deux groupes A ou B montre qu'un certain seuil de concentration de  $M_1$  est nécessaire pour qu'apparaisse  $M_2$  et une certaine concentration de  $M_a$  pour qu'apparaisse  $M_3$ .

Selon la microélectrophorèse en milieu liquide et l'immunoélectrophorèse ces constituants  $M_{1V}$ ,  $M_2$  et  $M_3$  sont des gamma globulines de mobilité  $\eta_t$  ou  $Y_t$  portant le déterminant antigénique  $p_{2M}$ . Nous avons séparé les macroglobulines de 15 sérums et comparé les proportions des constituants  $M_{1V}$ ,  $M_2$  et  $M_3$  dans ces préparations avec leurs proportions dans les sérums correspondants. Dans 7 cas, le constituant  $M_3$  est apparu au cours de la purification, dans 3 de ces cas, il représente 1 % de la concentration en protéines, dans 2 cas la proportion de  $M_3$  atteint 13 %, dans 2 autres cas enfin, les valeurs sont intermédiaires.

Ces résultats ne sont pas en faveur d'un équilibre de polymérisation, hypothèse qui pouvait être faite pour expliquer les corrélations trouvées entre les 3 constituants  $M_{1V}$ ,  $M_2$ ,  $M_3$  dans les sérums.

Le travail actuellement en cours montre que, dans certains cas, les constituants  $M_2$  et  $M_3$  résultent d'une association entre les constituants  $M_t$  et l'albumine. On ne peut encore préciser s'il existe entre ces deux protéines une relation antigène-anticorps ou une association type haptoglobine-hémoglobine. Le travail sera poursuivi pour essayer de répondre à cette question et pour rechercher l'origine de la déviation de la biosynthèse protéique qui fait apparaître des grandes quantités de macroglobulines.

Dans la ligne de recherches concernant l'interprétation des données de l'ultracentrifugation, j'ai entrepris l'extension au cas des systèmes ternaires macromoléculaires de la méthode d'Archibald pour la détermination des poids moléculaires.

## II. — ENZYMOLOGIE

*D-lacticoeshydrogénase.* — Les travaux antérieurs du groupe dirigés par M<sup>me</sup> Labeyrie ont établi que cet enzyme a deux groupes prosthétiques dissociables, une flavine adénine dinucléotide (FAD) et un  $Zn^{+2}$  attaché vraisemblablement sur deux imidazoles d'histidine. M<sup>lle</sup> Curdel s'est attachée cette année à l'étude comparative de l'enzyme natif et des  $Co^{+2}$ - et  $Mn^{+2}$ -enzymes formés par addition des cations correspondant à l'enzyme privé de son  $Zn^{+2}$ . Elle a montré que les variations des constantes cinétiques  $K_M$  avec le pH n'étaient pas parallèles dans les deux cas ; pour le Zn-enzyme,  $K_M$  est lié à l'ionisation d'un seul proton alors que pour les  $Co$ - et  $Mn$ -enzymes,  $K_M$  est lié à l'ionisation de deux protons.

En collaboration avec le Professeur Tysarowski de l'Université de Varsovie, invité à travailler quelques semaines à l'Institut de Biologie Physico-Chimique, nous avons étudié l'action des réactifs des groupes -SH et de l'histidine sur la D-LDH. Citons en particulier : le monoiodoacetate, l'iodoacétamide, le parachloromercuribenzoate. Les résultats ont montré que sur l'apoenzyme (enzyme natif privé du  $Zn^{+2}$ ), se trouvent deux groupes accessibles au monoiodoacetate, ces groupes étant masqués par le zinc sur l'enzyme lui-même. Il s'agit de groupes ionisables vers pH 5,5, accessibles sous la forme acide, qui sont vraisemblablement des imidazoles d'histidine. Ces groupes pourraient donc être les deux groupes chélateurs du zinc.

*L-lacticoxydase*. — Rappelons que cet enzyme est obtenu k l'état cristallin en quantité notable; il se prête pour cela aux Etudes par les méthodes Physiques.

Il porte deux groupes prosthétiques organiques différents, un hème *c* et une flavinemononucléotide (FMN); la connaissance du rôle de chacun d'eux dans le transfert d'électrons du substrat k l'accepteur est un des premiers objectifs en vue. L'examen des propriétés de ces groupes prosthétiques k Vital combiné avec la protéine permettra de voir quelles modifications leur confère la fixation k l'enzyme et quelle influence ces modifications apportent k leur réactivité.

M. Baudras, qui avait pu séparer la flavine (sans séparation de Thème) en obtenant l'apo-enzyme correspondant, a cristallisé l'enzyme reconstitué par addition de FMN k celui-ci; sans FMN, l'enzyme ne cristallise pas dans les mêmes conditions; la flavine provoque donc, en se fixant, un profond changement structural.

Par des méthodes de cinétique enzymatique, M. Baudras a étudié l'équilibre de combinaison de FMN k cet apo-enzyme et a mis en évidence l'effet de l'opérateur du substrat L-lactate dans cette fixation.

Parallèlement, M. Iwatsubo a utilisé un montage spectro-fluorométrique qu'il a réalisé pour permettre l'étude des réactions rapides mettant en jeu de très faibles variations de lumière émise ou transmise (voir chapitre xv). Il a étudié ainsi dans différentes conditions : 1) la vitesse de combinaison de la flavine k la protéine; 2) la vitesse de dissociation, après dilution, du complexe flavoprotéique; 3) les équilibres de dissociation. Ces expériences reposent sur le fait que la flavine libre est fluorescente tandis que la flavine fixée k l'enzyme n'est pas du tout fluorescente.

Ces déterminations ont montré que les deux sites de l'unité moléculaire  $180000$  (portant deux hèmes) fixent FMN de façon indépendante avec la même affinité ( $K_d = 6.10^{-9}$  M). Tous les sels, aux très faibles concentrations, augmentent la vitesse de dissociation de la flavine k la protéine; ils augmentent dans les mêmes proportions l'affinité. Ceci suggère la présence de forces de répulsion électrostatique entre FMN et la protéine. Les ions carboxyliques agissent d'une manière particulière en augmentant l'énergie de la liaison et en diminuant la vitesse de dissociation du complexe. Cet effet devient très important avec l'acétate et l'oxalate (respectivement substrat et inhibiteur compétitif).

M. Baudras a, en outre, montré que la flavine est essentielle non seulement à l'activité enzymatique, mais aussi k la réduction de Thème de l'enzyme par le substrat. M. Iwatsubo et M<sup>lle</sup> Di Franco, par des mesures spectrophotométriques de cinétiques rapides, ont pu apporter des informations complémentaires k ce sujet. Ils ont déterminé en effet les vitesses de réduction par l'acide, dans des conditions identiques, d'une part des accepteurs, d'autre part de l'hème et de la flavine de l'enzyme lui-même. Ces réactions évoluent en quelques dixièmes de seconde dans des conditions où elles sont particulièrement lentes (pH acides, basse température). Les résultats ont montré que Thème de l'enzyme est réduit beaucoup plus lentement que la flavine. Les accepteurs sont réduits moins vite que la flavine mais plus rapidement que Thème. On peut conclure de ces données que la réduction des accepteurs est réalisée par un échange d'électrons avec la flavine, Thème ne paraissant y jouer aucun rôle direct. Ceci

contredirait les hypothèses émises dans plusieurs laboratoires étrangers, s'ils s'étendaient aux conditions optimales (pH 7, 30° C); M. Iwatsubo a construit récemment un appareillage spécial pour les cinétiques très rapides; il permettra, nous espérons, de résoudre ce problème.

La question se pose de savoir comment se répartissent les deux électrons apportés par le lactate entre l'hème monoélectronique et la flavine diélectronique. L'hypothèse a été faite par certains chercheurs que la flavine ne serait réduite qu'à l'état semi-quinonique. M. Baudras a montré par titrage de cet enzyme avec le L-lactate en milieu anoxique, que 1,5 mole de lactate (soit trois électrons) provoquent la réduction complète des deux groupes prosthétiques; c'est dire que la flavine passe effectivement à l'état totalement réduit. Dans les conditions où le lactate n'est pas saturant, il s'établit un simple équilibre statistique d'oxydo-réduction entre les formes totalement oxydée et totalement réduite de l'hème et de la flavine. Cet équilibre se réalise effectivement parce que les potentiels de demi-réduction de ces deux groupes prosthétiques, fixés à l'enzyme, sont très voisins. En effet, les déterminations de M. Baudras ont montré respectivement + 34 mv pour l'hème (un électron) et — 18 mv pour la flavine (deux électrons). Le premier est relativement bas pour une hémoprotéine, le deuxième relativement très élevé pour une flavoprotéine; ces conditions favorisent le transfert d'électron de l'un à l'autre avec une perte minimale d'énergie.

### III. — STRUCTURE ET FONCTIONS DE L'HÉMOGLOBINE

Le groupe dirigé par M. Banerjee a poursuivi ses recherches sur la relation entre structure et fonctions de l'hémoglobine. L'accent a été mis, comme l'année dernière, sur l'étude du transfert d'hème. Rappelons qu'il s'agit de la perte de ce groupe prosthétique par l'hémoprotéine au profit d'un « ligand », ce dernier étant choisi de manière à avoir un fort pouvoir complexant vis-à-vis de l'hème. Le ligand utilisé le plus souvent est l'apoprotéine extraite de la myoglobine de cheu-

*Rôle des hèmes dans l'intégrité de la structure tétramère de l'hémoglobine.* Des conclusions intéressantes de ce point de vue ont pu être tirées par M. Banerjee et M<sup>me</sup> Filitti-Wurmser à la suite d'un travail comportant la détermination des poids moléculaires des constituants d'un mélange contenant la méthémoglobine et l'apomyoglobine. Ces mesures, entreprises par la technique d'ultracentrifugation, ont montré que la perte d'hème par la méthémoglobine résulte toujours de la fragmentation de cette molécule, puisqu'il apparaît dans un tel mélange un constituant nouveau, d'un poids moléculaire de 34000, ou, dans certains cas, de 17 000. L'équilibre rapide tétramère  $\rightleftharpoons$  dimère  $\rightleftharpoons$  monomère existant dans une solution de méthémoglobine est donc supprimé à la suite du départ d'hème. Les sous-unités subissent vraisemblablement des changements de conformation entraînant au niveau des surfaces la perte d'une complémentarité indispensable à l'association.

*Recherches des formes d'hémoprotéines partiellement saturées d'hème.* — Le transfert d'hème est un phénomène coopératif, comme l'est le transfert d'oxygène (déoxygénation). En concentrations non-saturantes de l'hème, deux espèces

qui abondent sont celles dont l'équipement hématurique est, soit inexistant, soit au complet. Pourtant, il n'est pas interdit de penser que des formes intermédiaires existent en petites concentrations. Par l'analyse d'une solution de méthémoglobine à moitié dépourvue d'hème, MM. Cassoly et Banerjee ont pu isoler un constituant qui semble répondre à cette description. De nombreuses données, tant spectrophotométriques que d'analyse chimique, tendent à montrer qu'il s'agit d'un tétramère dont deux chaînes seulement sont porteuses d'hème. La courbe d'oxygénation, analogue à celle de la myoglobine, traduit l'absence d'interaction entre les hèmes ainsi qu'une affinité vis-à-vis de l'oxygène supérieure à celle de l'hémoglobine.

La physionomie exceptionnelle de cette molécule en fait un modèle intéressant pour rechercher le mécanisme d'interaction entre les chaînes; « $\ll JJ^* \gg$ » \*ly a entrepris, en collaboration avec M. Iwatsubo, une étude sur ce mécanisme, notamment par la technique de fluorométrie.

Parmi d'autres techniques pouvant servir dans ce type d'études, figure celle des réactions protéine-colorants. MM. Banerjee et Roquefort ont récemment mis au point des modifications techniques visant à améliorer la précision et le rendement.

*Recherches d'autres ligands, agents de transfert d'hème* - V. J. P. & G. J. P. ont étudié le transfert de haute efficacité par sa constante d'association élevée vis-à-vis de l'hème, présente pourtant quelques désavantages; le transfert d'hème par ce ligand est un processus très lent. Puisqu'un tel ligand est un processus très lent. Puisqu'un tel ligand est un processus très lent. Avec quelques ligands de petite taille, la dimension moléculaire du ligand joue un rôle. Vraisemblablement, ce rôle consiste à interdire ou non la formation d'un complexe intermédiaire, l'hème étant enfoui dans « $\ll ? ? \gg$ » de la molécule. La recherche des ligands à la fois à forte affinité pour l'hème et de petites dimensions ne pouvait manquer d'intéresser.

Au cours des travaux menés dans ce but, M. Banerjee a pu découvrir des peptides intéressants. Il s'agit de polypeptides, de poids moléculaire compris entre 3000 et 5500, résultant du raccourcissement de la chaîne de myoglobine par voie enzymatique ou chimique. Tous les trois se lient à l'hème de manière réversible et énergique à l'hème. L'un d'eux, un peptide obtenu par digestion trypsique d'apomyoglobine, a été étudié en détail. La constante de son association à l'hème est environ 100 fois plus élevée que celle du meilleur ligand de petite dimension connu jusqu'à présent, à savoir l'histidine. Cette constante élevée résulte de la grande vitesse de combinaison, comme l'a pu voir M. Banerjee en collaboration avec MM. Wyman et Antonini au cours d'un bref séjour à l'Istituto Regina Elena à Rome. Les deux autres peptides, obtenus par l'action du cyanogène sur la chaîne de myoglobine, et qu'on a préparés en quantité suffisante, sont en cours d'étude.

#### IV - FLUORESCENCE DES PROTÉINES ET MODIFICATIONS STRUCTURALES

Le développement de l'étude fluorométrique des protéines est relativement récent. La fluorescence des protéines est due principalement à celle du trypto-

phane et de la tyrosine. La forme spectrale et le rendement quantique de la fluorescence des protéines sont liés intimement à la structure, la distance & l'orientation des acides aminés aromatiques. En particulier, l'interaction entre des groupes prosthétiques et des acides aminés aromatiques provoque une variation notable de la fluorescence.

Pour étudier ces problèmes, M. Iwatsubo a construit un spectrofluoromètre rapide et sensible. La luminosité très grande du système optique et le faible bruit de fond du détecteur permettent de mesurer une émission très faible de fluorescence.

M. Iwatsubo et M<sup>lle</sup> Di Franco ont étudié les caractères fluorométriques de certaines protéines, en particulier, des hémoprotéines, et ont étudié le mécanisme de l'interaction et du transfert d'énergie entre des groupes prosthétiques et la partie protéique.

*L-lactico-déshydrogénase de la levure (poids moléculaire 180 000).* — Celle-ci porte 7 tryptophanes, 2 FMN et 2 hèmes sur une molécule protéique. Le spectre d'émission de la fluorescence de la partie protéique montre un maximum d'émission à 325 m $\mu$ , déplacé de 25 m $\mu$  vers des longueurs d'ondes plus courtes en comparaison avec celui du tryptophane seul (350 m $\mu$ ). Ceci indique que les tryptophanes sont enfouis dans le milieu hydrophobique des chaînes peptidiques. Si l'on modifie la structure de la protéine par action de l'urée, de l'actif SH ou de pH très acides, etc., le maximum d'émission de fluorescence se trouve à 350 m $\mu$  comme pour le tryptophane seul.

L'intensité de fluorescence de la partie protéique est fortement influencée par la fixation des groupes prosthétiques. Le titrage fluorométrique montre que le rendement quantique  $Q$  égal à 0,3 diminue jusqu'à 0,2 par la fixation de l'hème et ceci diminue encore jusqu'à 0,07 par la fixation de FMN. Réciproquement, la fluorescence en FMN (maximum à 540 m $\mu$ ,  $Q$  égal à 0,26) est éteinte complètement par fixation à l'hémoprotéine.

L'interaction lointaine entre les groupes prosthétiques et les tryptophanes peut être effectuée par le mécanisme de «transfert par résonance», par le changement de la configuration tertiaire de la protéine provoqué par la fixation des groupes prosthétiques.

*Hémoglobine.* — En collaboration avec MM. Banerjee et Cassoly, M<sup>lle</sup> Di Franco et M. Iwatsubo ont étudié fluorométriquement l'interaction de l'apohémoglobine et de l'apomyoglobine avec l'hème.

L'hémoglobine (poids moléculaire 64 000) porte 4 hèmes et 6 tryptophanes (2 sur les chaînes  $\alpha$ , 4 sur les chaînes  $\beta$ ). MM. Banerjee et Cassoly ont trouvé un dérivé de l'hémoglobine portant seulement 2 hèmes sur les 4 chaînes. Le caractère fluorométrique de ce produit est étudié en détail.

Le spectre d'émission de la fluorescence de ce produit est analogue à celui de l'apohémoglobine (maximum d'émission à 335 m $\mu$ ). Cependant, le rendement quantique de fluorescence observé ( $Q$  égal à 0,025 —  $\times 3$ ) est beaucoup plus faible que celui d'un mélange équivalent de l'apohémoglobine et de l'hémoglobine ( $Q$  égal à 0,07).

Si l'on dissocie les 2 hèmes fixés sur ce produit, la fluorescence de l'apohémoglobine augmente jusqu'au niveau de la fluorescence de l'hémoglobine.

native (Q égal  $k$  0,14). Réciproquement, cette fluorescence résiduelle est complètement éteinte par addition stœchiométrique de l'hème aux sites libres de fixation.

Il en résulte que les 2 hèmes fixés sur ce produit peuvent éteindre la fluorescence des tryptophanes des autres chaînes peptidiques.

*Transfert d'énergie électronique par résonance dans des protéines.* — M. Iwasubo et M<sup>11\*</sup> Di Franco ont étudié le mécanisme de transfert d'énergie électronique entre des acides aminés aromatiques et des groupes prosthétiques fixés sur des protéines spécifiques. Us ont excité des protéines  $k$  290 m $\mu$  et ont observé fluorescence caractéristique des groupes prosthétiques qui ne peuvent pas être excités  $k$  cette longueur d'onde  $k$  l'état libre. Les complexes diphosphoryl-désoxy-L-lactate-L-lactate-déshydrogénase de cœur, 1 diméthylamino-naphthalènesulfonate-serum albumine, protoporphyrine-apohémoglobine ont été étudiés. L'efficacité de transfert d'énergie a été mesurée sur le complexe apohémoglobine-protoporphyrine. Après correction des réponses spectrales pour tenir compte du réseau et du photomultiplicateur, les nombres de photons 1) absorbés par les tryptophanes et 2) émis par les protoporphyrines ont été mesurés. Toute l'énergie des photons absorbés est effectivement transférée aux protoporphyrines. Ces résultats sont en excellent accord avec le calcul de Weber effectué selon la théorie de Förster.

## V. — PHOTOSYNTHESE

Le groupe dirigé par M. Joliot a poursuivi ses recherches portant sur la Photosynthèse chez *Chlorella pyrenoidosa*.

L'étude simultanée des variations de l'intensité de la fluorescence de la chlorophylle et de la vitesse d'émission d'oxygène a été reprise en mettant  $k$  profit des améliorations apportées aux techniques. Pendant les premières secondes d'émulsion, on peut distinguer deux phases cinétiques généralement bien isolées :

1) une phase dite d'activation pendant laquelle la vitesse d'émission d'oxygène et la fluorescence croissent simultanément; 2) une seconde phase nettement plus longue pendant laquelle la fluorescence augmente alors que la vitesse d'émission d'oxygène diminue.

On a pu mettre en évidence deux relations linéaires exprimant successivement le parallélisme et la complémentarité des variations de la vitesse d'émission d'oxygène et de l'intensité de fluorescence. Les inhibiteurs spécifiques de l'émission d'oxygène ont pour effet d'augmenter la variation de fluorescence pendant la phase initiale. La seconde phase est au contraire très réduite mais la relation linéaire de complémentarité reste valable. Aux très fortes concentrations d'inhibiteurs, la vitesse d'émission d'oxygène est nulle; seule la première phase reste visible sur les cinétiques de fluorescence. Celles-ci ne sont pas déterminées que par des constantes de vitesse photochimiques mais ne sont pas de forme exponentielle. Les inhibiteurs découplent la réaction photochimique des réactions thermiques permettant la régénération du com-

plexe photochimique. Un certain nombre d'hypothèses peut être proposé pour interpréter ces expériences :

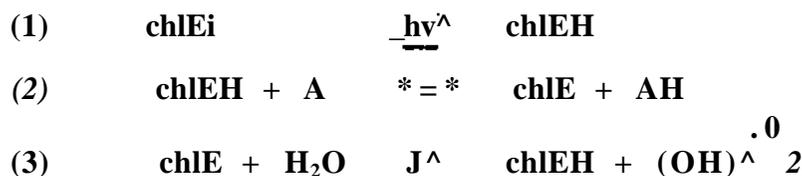
1) la relation de complémentarité suggère que la réaction photochimique et la fluorescence sont deux voies directement concurrentes permettant la dissipation de l'énergie photique; 2) la rapidité de la phase photochimique initiée montre que la concentration des centres photochimiques impliqués doit être très inférieure à la concentration de chlorophylle; 3) l'existence d'une seconde phase cinétique beaucoup plus lente peut s'expliquer en admettant qu'il existe, au début de la période d'illumination, une réserve d'oxydant susceptible de régénérer le complexe photochimique. Le maximum de fluorescence et le minimum de vitesse ne seraient atteints que lorsque cette réserve serait épuisée. Les inhibiteurs de rémission d'oxygène auraient alors pour effet de bloquer cette réaction de régénération. On a pu montrer qu'il existait un équilibre d'oxydo-réduction entre cette réserve d'oxydant et le complexe photochimique.

M<sup>me</sup> Joliot a terminé un travail portant sur l'identification, *k* partir de données cinétiques, des complexes photochimiques intervenant dans le processus photosynthétique.

Il avait été montré précédemment (voir rapports antérieurs) que deux composés interviennent directement dans les réactions d'émission d'oxygène. Un de ces composés (E) peut être dosé en mesurant la quantité d'oxygène formé à la suite d'un éclair électronique de très courte durée et d'intensité saturante. L'autre composé (A), environ dix fois plus concentré, peut être dosé en mesurant la quantité d'oxygène émise à la suite d'une illumination continue de forte intensité (jet d'oxygène). M<sup>me</sup> Joliot a étudié les relations entre la vitesse d'émission d'oxygène et la concentration de ces deux composés. Alors que les fonctions  $V_{O_2} = f(A)$  sont de forme très complexe et variable, la fonction  $V_{O_2} = f(E)$  est indépendante des conditions expérimentales utilisées (température, concentrations d'inhibiteurs, etc.), ce qui suggère que le composé E peut être identifié avec le complexe photochimique. Il faut cependant remarquer que la relation  $V_{O_2} = f(E)$  n'est pas linéaire. La réaction photochimique ne serait donc pas du premier ordre.

L'étude des relations entre les concentrations de E et A mesurées dans des conditions de photosynthèse stationnaire a montré qu'il existait entre les formes oxydée et réduite de ces deux composés un équilibre d'oxydo-réduction dont la constante a pu être mesurée.

Les résultats qui viennent d'être exposés sont tout à fait cohérents avec ceux obtenus par l'étude simultanée des cinétiques de fluorescence et d'émission d'oxygène; l'ensemble de ces faits expérimentaux s'accorde avec le schéma suivant :



oh chlE représente le complexe photochimique actif (non fluorescent), chlE<sup>\*</sup> le complexe photochimique réduit (fluorescent), A le composé permettant &

Ag&iération du complexe photochimique. Après une longue période d'obscurité, le complexe photochimique est sous une forme inactive (chlEi) et doit subir une activation photochimique avant de participer à l'équilibre (2). La deshydrogénation du composé AH est liée à la réduction du gaz carbonique. Ce schéma semble en contradiction avec deux faits expérimentaux relatifs à l'ordre de réaction photochimique. Les réactions photochimiques (1) et (3) sont obligatoirement du premier ordre; or, d'une part, les cinétiques photochimiques de fluorescence observées en présence d'inhibiteurs ne sont pas exponentielles, d'autre part, la vitesse de remise en oxygène n'est pas proportionnelle à la concentration du complexe photochimique E. En fait, on observe que le rapport de la vitesse d'émission d'oxygène  $k$  à la concentration du complexe photochimique augmente à mesure que la concentration du complexe diminue. Ce phénomène a pu être interprété en admettant que le complexe photochimique sous sa forme désactivée (chlEH) n'est plus susceptible de piéger l'énergie photique. L'énergie parvenant à un tel centre peut alors être transférée à nouveau vers un centre photochimique actif. La probabilité pour un centre actif d'absorber un photon augmente donc à mesure que ces centres disparaissent. Une analyse mathématique de cette hypothèse a permis d'obtenir des équations théoriques présentant à la fois qualitativement et quantitativement les différents faits expérimentaux.

---

### LISTE DES PUBLICATIONS

- R- BANERJEE et S. FILITTI-WURMSER. « Rôle des hèmes dans l'intégrité de la structure tertiaire de l'hémoglobine. » *C. R. Acad. Sci.*, 1964, **258**, 6.553-6.556.
- A- CURDEL, F. LABEYRIE et M. IWATSUBO. « Etude d'un métalloenzyme: la D-2-hydroxyacétate (accepteurs) oxydo-réductase de la levure anaérobie. » *Proc. Intern. Congress. Biochem.* New York, 1964.
- b- PILITTI-WURMSER, C. GENTOU et L. HARTMANN. « Existence de deux variétés 17 S ou 18,3 S de YIM et d'une augmentation de globulines 6,6 S sériques dans la maladie de Waldenström. » *Rev. Franç. Etudes Clin. Biol.*, 1964, 9, 398-410.
- L- HARTMANN, S. FILITTI-WURMSER, Y. JACQUOT-ARMAND, M. MAILLOUX, P. HUREZ et R. FAUVERT. « Nature macromoléculaire d'un anticorps de la leptospirose australienne. » *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, **S2**, 249-259.
- A- JOLIOT et P. JOLIOT. « Etude cinétique de la fraction photochimique HWrant Toxygénée au cours de la photosynthèse. » *C. R. Acad. Sci.*, 1964, **258**, 4622.
- P- JOLIOT. « Cinétiques d'induction de la photosynthèse chez *Chlorella pyrenoidosa*. » Communication au Colloque sur la Photosynthèse; Gif-sur-Yvette, 1962. Ed. C.N.R.S., p. 177.
- P- JOLIOT et J. LAVOREL. « Les réactions primaires de la photosynthèse. » *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1964, 46, 1607-1627.
- F- LABEYRIE. « Etude des groupements prosthétiques des enzymes. » *Ann. Biol. Clin.*, 1964, **22**, 19-47.
- \*- LABEYRIE et P. P. SLONIMSKI. « Mode d'action des lacticodeshydrogénases liées aux systèmes flavinique et cytochromique. » Cinquantenaire de la Société de Chimie Biologique, Paris, avril 1964. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1964, 46, 1793-1829.

- P. MORIN. « Étude des cinétiques de fluorescence de la chlorophylle *in vivo* dans les premiers instants qui suivent le début de l'illumination. » *J. Chim. Phys.*, 1964, 61, 674.
- R. WURMSER. « Opening Remarks. » in « Electronic aspects in Biochemistry », Acad. Press., New York, 1964.
- R. WURMSER et R. BANERJEE. « Equilibrium and thermodynamic considerations. » in : *Comprehensive Biochemistry*, vol. 12, M. Florkin et E. H. Stotz, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1964.
- R. WURMSER et R. BANERJEE. « Oxidation-Reduction Potentials. » in : *Comprehensive Biochemistry*, Vol. 12, M. Florkin et E. H. Stotz, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1964.

---

### COMPOSITION DU SERVICE

- M. R. WURMSER, Professeur honoraire à la Faculté des Sciences.  
 M<sup>me</sup> S. FILITTI-WURMSER, Directeur de Laboratoire de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> F. LABEYRIE, Directeur de Recherches au C.N.R.S.
- M. R. BANERJEE, Maître de Recherches au C.N.R.S.
- M. P. JOLIOT, Maître de Recherches au C.N.R.S.
- M. M. IWATSUBO, Chargé de Recherches au C.N.R.S.
- M. R. DELOSME, Attaché de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>lle</sup> A. CURDEL, Attachée de Recherches au C.N.R.S.
- M. A. BAUDRAS, Attaché de Recherches au C.N.R.S.
- M. R. CHABAUD, Assistant à la Faculté des Sciences.
- M<sup>me</sup> A. JOLIOT, Attachée de Recherches au C.N.R.S.
- M. C. GENTOU, Attaché de Recherches au C.N.R.S.
- M. R. CASSOLY, Attaché de Recherches au C.N.R.S.
- M. J. ROQUEFORT, Boursier de la D.G.R.S.T.
- M. M. HOFNUNG, Boursier de la D.G.R.S.T.
- M<sup>\*\*</sup> A. di FRANCO, Attachée de Recherches à la D.G.R.S.T.
- M. A. ISOMOTO, Attaché de Recherches à la D.G.R.S.T.
- M<sup>me</sup> O. GROUDINSKY, Stagiaire au C.N.R.S.
- M<sup>lle</sup> L. NASLIN, Chimiste adjointe au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> C. DEPRETTE, Biologiste adjointe au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> M. DELOSME, Biologiste adjointe au C.N.R.S.
- M. A. SPYRIDAKIS, Chimiste adjoint au C.N.R.S.
- M<sup>lle</sup> F. STETZKOWSKI, Chimiste adjointe au C.N.R.S.
- M<sup>lle</sup> A. ROYER, Chimiste adjointe au C.N.R.S.

*Personnel technique de la Station d'Ultraentrifugation (C.N.R.S.) :*

- M. L. SAGAERT, Ingénieur-physicien; M<sup>ll</sup>\* C. GALLFI, Ingénieur-physicien; M<sup>me</sup> S. LAROCHE; M<sup>ll</sup>\* J. LE FEUVRE; M<sup>me</sup> O. D. REMY; M<sup>me</sup> S. CHAUCHEREAU; M<sup>TM</sup> M. GIRAULT; M<sup>ll</sup>\* C. AUMONT; M<sup>lle</sup> C. KAPPS.

# SERVICE DE BIOCHIMIE THEORIQUE

Rapport de M. BERNARD PULLMAN, Chef de Service.

## I. — PROPRIÉTÉS ÉLECTRONIQUES DES ACIDES NUCLÉIQUES ET DE LEURS CONSTITUANTS

Une partie notable de notre activité en 1964 a encore eu pour objet l'étude de divers aspects de la structure électronique des acides nucléiques et de leurs constituants. En particulier, notre attention s'est centrée sur la détermination aussi précise que possible des grandeurs physicochimiques qui sont susceptibles d'intervenir dans les associations moléculaires impliquant ces biomolécules. En effet, l'étude du mécanisme de telles associations et de la nature des forces mises en jeu paraît être actuellement une des préoccupations essentielles de la biologie moléculaire.

Or, les forces principales susceptibles d'être impliquées dans de telles associations sont *a priori* de trois types principaux : 1) les liaisons hydrogènes; 2) les forces de Van der Waals-London, et 3) les transferts de charges.

Des calculs fondamentaux ayant été effectués au laboratoire l'année précédente sur la représentation quantique de la liaison hydrogène, ce sont les deux premières des forces précitées qui ont retenu surtout notre attention. Or les forces de Van der Waals-London comportent comme on le sait trois composantes principales : les forces électrostatiques, les forces d'induction et les forces de dispersion. La formule générale donnant l'attraction moyenne entre deux molécules dues à ces forces est, schématiquement, je le rappelle :

$$E = - \frac{1}{r^6} \left( \frac{2 \mu_1^2 \mu_2^2}{3 KT} + \mu_1^2 \alpha_2 + \mu_2^2 \alpha_1 + \frac{3}{2} \alpha_1 \alpha_2 \frac{I_1 I_2}{I_1 + I_2} \right)$$

où  $\mu_1, \mu_2$  sont les moments dipolaires,  $\alpha_1, \alpha_2$  les polarisabilités et  $I_1, I_2$  les potentiels d'ionisation des molécules impliquées dans l'association. Quant aux forces de transfert de charges, la stabilisation énergétique de l'état fondamental de l'association par ce mode d'interaction peut être représentée schématiquement par

$$E = \frac{C_1}{ID - E_A + C_2}$$

où  $C_1$  et  $C_2$  sont approximativement des constantes au sein d'une série de molécules différentes;  $ID$  est le potentiel d'ionisation du donneur d'électron et  $E_A$  l'énergie électronique de l'accepteur d'électron.

La détermination de ces différentes forces intermoléculaires nécessite donc la

connaissance des valeurs des moments dipolaires, des potentiels d'ionisation, des affinités électroniques et des polarisabilités des molécules. Or les valeurs expérimentales de ces différentes grandeurs sont pratiquement inconnues dans l'ensemble des biomolécules. D'où l'intérêt particulier des recherches théoriques.

M<sup>meB</sup> Berthod et Pullman ont perfectionné les procédés de détermination théorique des moments dipolaires. Ce perfectionnement a comporté deux éléments. Ainsi, l'année précédente, ces chercheurs ont utilisé la méthode de Del Re pour calculer les composantes du moment dipolaire des purines et pyrimidines biologiques dues à leurs électrons  $a$ . Toutefois la méthode de Del Re a été établie surtout pour les électrons  $a$  des molécules saturées. Les atomes des composés conjugués étant en général dans des états de valence assez différents de ceux des composés saturés, il a paru nécessaire d'adapter le procédé de Del Re de manière à tenir compte de ces variations. Cela a été fait par les auteurs précités, l'élément essentiel du perfectionnement consistant à relier les intégrales coulombiennes aux électronégativités des orbitales (et non plus aux électronégativités globales des atomes) qui sont alors nécessairement différentes selon l'état d'hybridation de l'électron considéré. Parallèlement, des modifications ont également été introduites dans les intégrales de Coulomb des électrons  $n$  afin de reproduire le plus correctement possible les moments dipolaires de composés de référence.

L'ensemble des paramètres ainsi obtenus a alors été utilisé par M<sup>mes</sup> Berthod et Pullman pour le calcul de moments dipolaires d'une vaste série de molécules biologiques et, en particulier, d'un grand nombre de purines et de pyrimidines. L'excellent accord constaté entre la théorie et l'expérience dans les quelques cas où les moments expérimentaux sont connus justifie de considérer comme probablement très sûres les prédictions concernant les moments inconnus.

D'autre part, M<sup>mes</sup> Berthod et Pullman ont également étendu leurs calculs à la détermination des moments des paires des bases complémentaires adénine-thymine et guanine-cytosine des acides nucléiques. Elles ont fait en premier lieu par composition simple des moments de bases et, en second lieu, en tenant compte explicitement de la contribution de la liaison hydrogène à la valeur des moments. Cette dernière contribution peut valoir de 1 à 2 Debyes et est donc loin d'être négligeable. Le résultat essentiel dans ce domaine est la prédiction selon laquelle le moment dipolaire de la paire guanine-cytosine (8,1 D) devrait être beaucoup plus élevé que celui de la paire adénine-thymine (0,9 D).

Parmi les autres résultats des travaux de M<sup>mes</sup> Berthod et Pullman sur le squelette  $a$  des molécules conjuguées, il convient de signaler en particulier leurs calculs sur les énergies des différentes formes tautomères des bases puriques et pyrimidiques des acides nucléiques. Cette application permet d'éviter de faire appel dans ce domaine, comme cela a été fait jusqu'ici, aux valeurs empiriques des énergies de liaison. M<sup>meB</sup> Berthod et Pullman ont montré : 1) que les énergies  $a$  sont nettement plus grandes dans les formes lactam que dans les formes lactim et légèrement plus grandes dans les formes imino que dans les formes amino des bases ; 2) que les énergies  $n$  sont toujours plus fortes dans les formes lactam et amino que dans les formes lactim et imino ; 3) que dans l'ensemble des formes lactam et amino des bases sont leurs formes les plus stables et que 4) de toutes les bases des acides nucléiques la cytosine est celle qui devrait passer le plus facilement dans une forme tautomère rare.

En ce qui concerne les potentiels d'ionisation moléculaire, M<sup>me</sup> Pullman et M. Rossi ont introduit des améliorations très substantielles dans réévaluation de ^ quantités par la méthode du champ moléculaire self-consistant. Us y sont Parvenus par une modification des valeurs des potentiels d'ionisation des états de valence atomiques. De plus, ils ont étendu leurs calculs h l'évaluation des Potentiels d'ionisation des paires libres présentes sur certains hétéroatomes des bases puriques et pyrimidiques. Le procédé fut expérimenté sur une quinzaine d'hétérocycles conjugués simples pour lesquels il a réussi à reproduire d'une façon très satisfaisante les potentiels d'ionisation connus expérimentalement. Appliqué aux bases des acides nucléiques, le procédé a alors conduit k la prédiction des valeurs des potentiels d'ionisation de leurs électrons *n* et des paires libres. On Prevoit: 1) que le premier potentiel d'ionisation de ces bases doit être celui de leurs Electrons *n*; 2) que le potentiel le plus faible doit être celui de la guanine (7,6 ev) et le plus élevé celui de l'uracile (9,0 ev) et 3) que les potentiels d'ionisation des doublets libres situés sur les oxygènes des groupes carbonyles des bases (9,4 — 10,3 ev) doivent être plus faibles que ceux de leurs azotes (c^ 11 ev.)

Les recherches sur les valeurs précises des affinités électroniques des bio-molécules qui s'avèrent difficiles sont en cours. En attendant, des valeurs appro- v e s sont obtenues k l'aide d'une courbe étalon reliant les affinités estimées dans quelques composés de référence à l'énergie de leur plus basse orbitale ^ol^culaire libre ou évaluées & partir des potentiels de réduction polarogra- Phiques & l'aide d'équations semi-empiriques.

B. Pullman a appliqué certains des résultats précédents k l'évaluation de l'ordre relatif des énergies d'activation pour la semiconductivité électronique ^es bases puriques et pyrimidiques des acides nucléiques. Le point de départ ^e cette évaluation est la théorie qui base la semiconductivité des solides molé- culaires organiques sur la formation de porteurs de charges par un mécanisme donneur-accepteur d'électron. Selon cette théorie, l'énergie nécessaire pour créer la séparation des charges h une distance où les interactions coulombiennes sont n^gligeables est donnée par :

$$E = I_c - E_c = I_D - E_A - P_+ - P_- \approx I_D - E_A - *$$

^  $I_c$  est le potentiel d'ionisation du cristal,  $E_c$  l'affinité électronique du cristal, h le potentiel d'ionisation de la molécule-donneur d'électron,  $E_A$  l'affinité élec- tro- nique de la molécule-accepteur d'électron,  $P_+$  et  $P_-$  l'énergie de polarisation d'Ue i la présence, respectivement, d'une charge positive ou d'une charge négative dans le cristal polarisable, ces deux dernières énergies pouvant être consi- derées comme étant égales k la même quantité  $P$ .

La quantité  $I_D - E_A$  apparaît donc comme une grandeur fondamentale dans la ^termination des énergies d'activation pour la semiconductivité, en parti- cipant pour la comparaison de ces énergies au sein d'une série de composés, s ^tant assez constant et oscillant peu autour de la valeur moyenne de 1,6 ev. ^n Valuation a permis de reproduire d'une façon très satisfaisante l'ordre rela- tif des énergies d'activation pour l'ensemble des bases puriques et pyrimidiques ^a acides nucléiques, ce qui constitue un fort argument en faveur du m&a- nisme « donneur-accepteur » de la semiconductivité. Toutefois les valeurs absolues d' ^nergies d'activation théorique sont trop fortes et ce point nécessite une

investigation supplémentaire, fitendu aux acides nucléiques eux-mêmes, ce point de vue permet de prévoir que la semiconductivité de ces polymères biologiques devrait croître avec l'augmentation de la proportion de guanine-cytosine dans leur constitution. Ce résultat est une illustration de plus du caractère plus prononcé des interactions électroniques entre des paires guanine-cytosine qu'entre des paires adénine-thymine dans les acides nucléiques. Cette caractéristique générale, prévue par la théorie depuis longtemps et cela, que Ton considère les interactions par transfert de charges ou celles dues aux forces électrostatiques et de dispersion, peut être considérée comme vérifiée récemment dans une certaine mesure par l'intercalation préférentielle des aminoacridines dans les acides nucléiques entre des paires adénine-thymine adjacentes où la résistance  $k$  une telle pénétration doit donc être moindre.

Dans un domaine un peu différent mais qui concerne également les constituants des acides nucléiques, M<sup>me</sup> Pullman a utilisé la méthode de perturbations pour prévoir l'influence des hétéroatomes et des substituants sur l'équilibre tautomère des purines et des pyrimidines. Il s'agit des équilibres lactam-lactim, amino-imine et de la migration du proton entre N<sub>7</sub> et N<sub>6</sub> des bases puriques. Le problème se pose, en particulier, dans le phénomène des mutations par analogues des bases mais aussi dans certains phénomènes de chélation et dans l'étude de l'incorporation des analogues des bases puriques dans la vitamine B<sub>12</sub>. M<sup>me</sup> Pullman a donné les formules générales permettant de prévoir, par perturbation sur les bases originelles, l'effet de remplacement d'un carbone du cycle par un azote et a indiqué une série de résultats relatifs  $k$  l'effet d'un tel remplacement dans les principales purines et pyrimidines biologiques.

## II. — PHOTODIMERISATION DE LA THYMINE

Bien que ce soit  $k$  une propriété qui comme celles discutées auparavant concerne encore un des constituants des acides nucléiques, son caractère spécial mérite une mention à part. Deux hypothèses existaient à propos du mécanisme de la photodimérisation de la thymine, la réaction probablement la plus importante en photobiologie des acides nucléiques : l'une faisait dépendre ce mécanisme de la polarité de la liaison C<sub>5</sub> — C<sub>6</sub>, l'autre impliquait dans la réaction le premier état triplet. Aucune ne disposait d'arguments réellement persuasifs. En étudiant la structure électronique de la thymine et de tous ses analogues qui ont été expérimentés en vue d'une photodimérisation, M<sup>me</sup> Mantione et B. Pullman ont, d'une part, démontré l'absence de toute relation entre la polarité de la liaison C<sub>5</sub> — C<sub>6</sub> des pyrimidines et leur aptitude à se photodimériser et, d'autre part, apporté de forts arguments en faveur du rôle du premier triplet excité dans cette réaction. Ainsi, Us ont, en premier lieu, montré que dans l'état triplet excité de la thymine la plus forte concentration des électrons découplés se produit sur l'ensemble des carbones 5 et 6 sur lesquels s'effectue la dimérisation. Us ont montré ensuite que le rendement en photodimère pour une série d'analogues de la thymine est parallèle à la valeur de cette concentration. Ainsi, de l'ordre de 1,2 pour la thymine, il n'est plus par exemple que de l'ordre de 1 pour le 5-aminouracile (pour lequel le rendement en photodi-

mere est mediocre), de 0,8 e pour la cytosine (rendement très faible) et descend à 0,6 e dans le 5-nitrouracile qui ne se photodiménse plus.

On peut estimer qu'une telle condition, non seulement confirme l'implication probable du premier triplet excité dans la réaction, mais met en évidence de plus les caractéristiques électroniques de cet état responsable du rendement de la réaction.

### III. - PROPRIÉTÉS ÉLECTRONIQUES DES PROTÉINES ET DE LEURS CONSTITUANTS

Yonezawa Del Re et Pullman ont étendu leurs travaux sur la structure électronique des protéines à l'étude de la dissociation. En considérant que la variation de l'énergie au cours du processus de la dissociation est déterminée essentiellement, d'une part par la variation de

les constantes de

D'autre part, sur l'ensemble des travaux théoriques qui ont eu pour objet le problème de l'existence des bandes d'énergie que soit l'aspect apparent de l'examen critique conduit en fait à la même conclusion générale, à savoir que si l'existence des bandes d'énergie dans les protéines est possible du fait de la transmission de la séparation éner-

point critique

problème de

montré que, quel

l'examen critique

Pour autant qu'elle soit électronique, est extrinsèque.

### IV. - VITAMINES ET COENZYMES

l'inter-  
 nouvelle étude V<sub>g</sub>J<sup>ar</sup> : ^ « \* \* » £ £ quant 1 semble de r/S % £ £ < £ ^  
 groupes attachés aux a 2, 3  
 man ont effectué des calculs explicites sur les nouveaux exemples d'activité antimétabolique fournis par le travail de Zakrzewski et ont effectué une étude critique des deux théories. Ils ont montré que l'ensemble de ces nouveaux résultats d'at-  
 ons des

deux théories précitées et ont proposé des expériences devant permettre de décider entre la valeur de ces deux théories.

Collin et Pullman ont également réétudié certains aspects du mécanisme de fonctionnement de la thiamine en introduisant, d'une part, quelques perfectionnements techniques, en particulier en ce qui concerne les paramètres caractéristiques du soufre, et en tenant compte, d'autre part, de certains résultats très récents concernant les échanges isotopiques (deutérium) dans les composés thiazolium et de leurs spectres de résonance magnétique nucléaire. Les calculs perfectionnés permettent d'obtenir une corrélation linéaire entre les charges électroniques des carbones et le déplacement chimique des protons. Les considérations basées sur cette distribution des charges et l'effet des facteurs électrostatiques permettent de rendre compte du taux d'échange isotopique sur la position C<sub>2</sub> d'un grand nombre de composés thiazolium. L'étude apporte dans l'ensemble une confirmation du mécanisme de Breslow pour le fonctionnement enzymatique de la thiamine.

Veillard et Pullman ont développé les études faites précédemment au laboratoire par M<sup>lle</sup> Spanjard et Pullman sur la structure électronique des ferroporphyrines biologiques, études faites dans l'approximation de la tétracoordination, en introduisant l'effet de l'hexacoordination du métal. Une des modifications les plus importantes mise en évidence par ce développement concerne la nature de la plus basse orbitale moléculaire libre du système. Alors que dans le cas de la tétracoordination cette orbitale, située très bas, est essentiellement une orbitale 3d<sub>z<sup>2</sup></sub> du métal dirigée perpendiculairement au plan du noyau porphyrine, c'est une orbitale essentiellement porphyrine dans le cas de l'hexacoordination. De même, la plus haute orbitale occupée de la ferroporphyrine, tout en étant très haut placée, est dans le cas de l'hexacoordination une orbitale essentiellement porphyrine. Par ailleurs la distribution des charges à laquelle on arrive dans le cas de l'hexacoordination est en accord très satisfaisant avec le principe d'électronneutralité de Pauling.

Veillard et Pullman ont également étudié d'une façon très semblable à celle de leur travail sur les porphyrines certains aspects de la structure électronique de la vitamine B<sub>12</sub>, en particulier les caractéristiques du système central formé par le noyau corrine et l'atome de cobalt. Les auteurs ont montré que ce système hexacoordonné possède une plus basse orbitale libre située relativement très bas et doit donc manifester une affinité électronique appréciable.

Malrieu et Pullman ont effectué une étude très détaillée de l'influence du pliage sur les propriétés électroniques de l'isoalloxazine réduite et de son radical libre obtenu en milieu acide. Il s'agit dans ce travail du pliage le long de l'axe passant par les deux atomes d'azote du cycle central. Parmi les propriétés électroniques sur lesquelles s'est centrée particulièrement l'attention des auteurs était l'énergie de la plus haute orbitale moléculaire de l'isoalloxazine réduite et la distribution des densités de spin dans le radical libre. Les groupements attachés aux azotes du cycle central peuvent prendre chacun, en cas de pliage, deux positions par rapport aux cycles latéraux et il en résulte quatre configurations pliées limites à étudier. On constate qu'à la fois l'énergie de la plus haute orbitale moléculaire occupée et la distribution des densités de spin dans le radical libre sont très sensibles aux modifications de la structure géométrique. La plus haute orbitale occupée qui était antilobaire dans la configuration plane devient

Uante dans les configurations pliées, la molécule restant toutefois un très bon donneur d'électrons dans la majorité de celles-ci. L'étude de la distribution théorique des densités de spin dans les différentes formes pliées du radical libre offre la possibilité d'en déduire, par comparaison avec les résultats expérimentaux, la configuration géométrique la plus probable de ce radical. Les contradictions existant entre les résultats expérimentaux des différents groupes de chercheurs ne permettent pas d'aboutir, en ce moment, à une conclusion définitive dans ce domaine.

La situation est plus nette dans le cas du radical libre dérivé de la phénothiazine et dont la structure électronique, en particulier la distribution des densités de spin, a également été étudiée par Malrieu et Pullman en fonction du pliage de la molécule le long de l'axe passant par les deux hétéroatomes centraux. Dans ce cas les renseignements expérimentaux sur les valeurs des densités de spin étant plus sûrs, les auteurs montrent que leur comparaison avec les densités de spin calculées pour les différentes configurations spatiales du radical phénothiazinique permet de choisir la configuration la plus probable. C'est la configuration pliée dans laquelle le proton attaché à l'azote se trouve placé entre les deux cycles latéraux. Toutefois, en combinant ces renseignements avec ceux provenant de l'étude des potentiels d'oxydation polarographique, les auteurs montrent que dans les dérivés io-substitués de la phénothiazine, le radical aliphatique trop volumineux est placé hors des cycles latéraux. Ces calculs perfectionnés montrent également que la plus haute orbitale moléculaire occupée de la phénothiazine est liante dans toutes ces configurations.

Tout comme les travaux de M<sup>me</sup> Berthod et Pullman ont montré la possibilité d'une étude quantique explicite et quantitative des systèmes *a* de biomolécules, les travaux de Malrieu et Pullman montrent la possibilité d'une étude analogue des systèmes non-plans. Ainsi disparaissent peu à peu certaines restrictions techniques qui limitaient quelque peu le champ d'application possible des méthodes quantiques en biochimie ou biophysique.

## V. — DIVERS

Au cours d'une étude par la méthode de champ moléculaire self-consistant sans contrainte de spin de la structure électronique des carbènes, M. Schneider et M<sup>me</sup> Serre ont examiné en particulier les caractéristiques de structure de l'aminocyanométhylfène, dimère de HCN, considéré par certains auteurs comme ayant probablement joué un rôle important dans révolution biochimique. L'étude a porté à la fois sur la forme biradicalaire de ce composé ( $H_2 N - \overset{\cdot}{C} - C \equiv N$ ) et sur la forme tautomère iminocyanométhane ( $HN = CH - C \equiv N$ ). Les calculs permettent de prévoir que la forme la plus stable de ce composé serait probablement la forme biradicalaire qui est d'ailleurs caractérisée par une énergie de résonance particulièrement élevée, de l'ordre de 90 Kcal/mole contre 10 Kcal/mole pour la forme iminocyanométhane. L'étude de la distribution des densités de spin dans le biradical indique une forte localisation de ces densités, non seulement sur le carbone « bivalent » mais également sur l'azote de la liaison C  $\equiv$  N. Cette situation cadre bien avec la réactivité présumée du dimère

susceptible d'intervenir dans des condensations conduisant par exemple à l'adénine.

B. Pullman a effectué une étude critique de la proposition de Bolton selon laquelle l'existence d'approches moléculaires particulièrement réduites dans les cristaux de certains composés polycarboxylés (e.g. alloxane) serait due à une polarité particulièrement élevée des carbonyles mis en jeu dans ces contacts. Il a montré qu'en réalité les liaisons carbonyles impliquées dans ces contacts rapprochés sont caractérisées surtout par un indice mobile particulièrement élevé, une charge nette positive sur le carbone également très élevée mais, en revanche, par une charge négative relativement très faible sur leur oxygène.

Plusieurs mises au point importantes ont été préparées par certains travailleurs du laboratoire à l'occasion des exposés présentés aux différentes réunions internationales. Ces mises au point contiennent naturellement souvent beaucoup de résultats nouveaux. Ces exposés généraux ont porté sur les mécanismes électroniques de la mutagénèse (A. et B. Pullman, Colloque International de Chimie Quantique, Sanibel Island, Floride, Janvier 1964), sur les mécanismes électroniques dans la carcinogénèse chimique (B. Pullman, Colloque International sur les Aspects Moléculaires de la Carcinogénèse et de la Mutagénèse, Oak Ridge, avril 1964), sur la structure électronique des radicaux libres biologiques (A. Pullman, Colloque International de la Société de Chimie Physique sur la Structure des Radicaux Libres, Bordeaux, mai 1964), sur les complexes de transfert de charges en biochimie (B. Pullman, 6<sup>e</sup> Congrès International de Biochimie, New York, août 1964), sur les aspects électroniques de la biophysique (B. et A. Pullman à l'École Internationale de Biophysique Moléculaire, Squaw Valley, août 1964) et sur les liaisons hydrogène et les bandes d'énergie dans les protéines (A. Pullman à l'École Internationale de Chimie Quantique, Istanbul, septembre 1964).

Par ailleurs, comme chaque année, toute une série de travaux techniques de Chimie Quantique ont été effectués au laboratoire en vue de perfectionner les méthodes mêmes d'étude des structures électroniques. Bien que ces travaux soient d'une importance fondamentale pour nos recherches, leur exposé ne trouve pas sa place dans ce rapport. Signalons seulement l'importante contribution de M. Rossi qui a établi une nouvelle méthode pour la solution des problèmes variationnels dans les procédés LCAO, particulièrement utile pour l'étude d'états triplets, et le développement continu des recherches de M. Berthier sur une méthode self-consistante rationalisée.

---

#### LISTS DES PUBLICATIONS

- A. PULLMAN et B. PULLMAN. «  $\pi$ -Molecular orbitals and the processes of life » dans « Molecular Orbitals in Chemistry, Physics and Biology » (édité par P. O. Löwdin et B. Pullman). Academic Press, New York, 1964, p. 547.
- B. PULLMAN. « Electron density and nucleophilic substitution in the purine ring » *J. Org. Chem.*, 1964, 20, 508.

- o. PULLMAN. « Les complexes de transfert de charges en biochimie ». « Communication présentée au Symposium sur « Les transferts d'énergie dans les systèmes photochimiques » du VI<sup>e</sup> Congrès International de Biochimie, New York, août 1964. *Abstracts*. Vol. X, p. 737. \* \*
- T. YONEZAWA, G. DEL RE et B. PULLMAN. « The electronic structure of the  $\alpha$ -aminoacids of proteins. II. Dissociation constants ». *Bull. Chem. Soc. Japan*, 1964, 37, 985.
- A. PULLMAN. « The influence of heteroatoms and substituents on the tautomeric equilibria in biochemical purines and pyrimidines. I. Azapurines and azapyrimidines ». *Biochim Biophys. Acta*, 1964, 87, 365.
- A. PULLMAN et M. Rossi. « The ionization potential of the  $\pi$  and lone-pair electrons of biochemical purines and pyrimidines ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 88, 211.
- \* COLLIN et B. PULLMAN. « On the mechanism of folic acid reductase inhibition ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 89, 232.
- \* COLLIN et B. PULLMAN. « Some electronic aspects of the mechanism of thiamine action ». *Archives Biochem. Biophys.*, 1964, 108, 375.
- \* PULLMAN. « La polarité de la liaison carbonyle et la structure cristalline de l'alloxane, de l'acide barbiturique anhydre et des composés analogues ». *Acta Cryst.*, 1964, 17, 1074.
- J. P. MALRIEU et B. PULLMAN. « Sur les propriétés électroniques de la phénothiazine et de son radical ». *Theoret. Chim. Acta*, 1964, 2, 293.
- P. MALRIEU et B. PULLMAN. « Configuration spatiale et propriétés électroniques du noyau d'isalloxazine ». *Theoret. Chim. Acta*, 1964, 2, 302.
- \* VEILLARD et B. PULLMAN. « Compléments sur la structure électronique des ferroporphyrines biologiques ». *J. Theoret. Biol.*, sous presse.
- ^ VEILLARD et B. PULLMAN. « Aspects de la structure électronique de la vitamine B<sub>12</sub> et de ses analogues ». *J. Theoret. Biol.*, sous presse.
- J. MANTIONE et B. PULLMAN. « Sur le mécanisme de la photodimérisation de la thymine ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 91, 387.
- \* BERTHOD et A. PULLMAN. « Influence de la liaison hydrogène sur le moment dipolaire des paires purine-pyrimidine des acides nucléiques ». *Compt. Rend.*, 1964, 259, 2711.
- BERTHOD et A. PULLMAN. « The role of the  $\alpha$ -framework in the properties of the biological purines and pyrimidines : dipole moments and tautomeric equilibria ». *Biopolymers*, 1964, 2, 483.
- \* BERTHOD et A. PULLMAN. « Sur le calcul des caractéristiques du squelette de des molécules conjuguées ». *J. de Chimie Physique*, sous presse.
- B. PULLMAN. « Electronic aspects of the interactions between the carcinogens and possible cellular sites of their activity ». *J. Cell, and Comp. Physiol.*, 1964, 64, sup. i, 91. (Exposé fait au Colloque International sur « Molecular Aspects of Mutagenesis and Carcinogenesis », Oak Ridge, avril 1964.)
- B. PULLMAN. « On the complexes of actinomycin with purines and deoxyribonucleic acid ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 88, 440.
- B. PULLMAN. « Sur la semi-conductivité des bases puriques et pyrimidiques des acides nucléiques ». *Compt. Rend.*, 1964, 259, 3101.
- A. VEILLARD et G. DEL RE. « Hybridization in cyclopropane and cubane ». *Theoret. Chim. Acta*, 1964, 2, 55.

- G. BERTHIER, A. VEILLARD et G. DEL RE. « Proton splitting constants and hybridization in aromatic free radicals. » *Physics Letters*, 1964, 8, 313.
- G. BERTHIER. « Self-consistent field methods for open-shell molecules », in « Molecular orbitals in Chemistry, Physics and Biology » (édité par P. O. Lowdin et B. Pullman). Academic Press, New York, 1964, p. 57.
- J. SERRE. « Group theory and the molecular orbital method », in « Molecular orbitals in Chemistry, Physics and Biology », (édité par P. O. Lowdin et B. Pullman), Academic Press, New York, 1964, p. 133.
- C. MOREAU et J. SERRE. « Structure électronique du fluoroacétylène et du chloroacétylène ». *Theoret. Chim. Acta*, 1964, 2, 40.
- J. SERRE. « Fluorures et autres composés des gaz rares. » *Bull. Soc. Chim. Fr.* 1964, p. 671.
- A. PULLMAN. « Propriétés théoriques de radicaux libres d'intérêt biologique ». Exposé fait à la 14<sup>e</sup> réunion annuelle de la Société de Chimie Physique, Bordeaux, mai 1964\* *J. de Chimie Physique*, 1964, 61, 1666.
- A. PULLMAN. « Hydrogen bonding and energy bands in proteins ». Exposé fait à l'École Internationale d'été de Chimie Quantique, Istanbul, sept. 1964, sous presse.
- M. Rossi. « A new method for resolving the LCAO variational problem ». *J. Chem. Phys.* sous presse.
- M. Rossi. « A new method for resolving the LCAO variational problem. The excited states ». *J. Chem. Phys.* sous presse.
- J. P. MALRIEU. « Influence de la non-planarité de quelques composés hétérocyclés aromatiques sur certaines propriétés électroniques ». *J. de Chimie Physique*, sous presse.
- G. BERTHIER, P. MILLIÉ et A. VEILLARD. « Recherches théoriques sur les complexes. I. Une méthode de calcul des orbitales moléculaires dans les complexes des métaux de transition ». *J. de Chimie Physique*, 1965, 62, 8.
- P. MILLIÉ et A. VEILLARD. « Recherches théoriques sur les complexes. II. Complexes cyanés du fer, du cobalt, du nickel et composés analogues ». *J. de Chimie Physique* 1965, 62, 20.
- G. BERTHIER et J. BAUDET. « Structure électronique de radicaux libres apparentés à benzyle ». *J. de Chimie Physique*, sous presse.
- J. SERRE. « Structure électronique de quelques carbènes et nitrènes ». *J. de Chimie Physique*, sous presse.

---

### DIPLOMES ET THESES

- B. LÉVY. « Étude SCF de l'hyperconjugaison dans la molécule de propène ». **Diplôme** d'Études Supérieures.
- F. SCHNEIDER. « Structure électronique de quelques carbènes d'intérêt biologique ». **Thèse** de 3<sup>e</sup> cycle.
- J. P. MALRIEU. « Contribution à l'étude de la structure électronique des molécules aromatiques d'intérêt biochimique comportant un axe de pliage ». **Thèse** de 3<sup>e</sup> cycle.
- P. MILLIÉ. « Étude théorique de complexes de métaux de transition ». **Thèse** de 3<sup>e</sup> cycle.

- M<sup>m</sup>** e FEILLBT-CLBMENT. « Etudes théoriques relatives à l'ionisation en couche interne de l'aluminium et certains métaux de la famille du fer ». Thèse du 3<sup>e</sup> cycle.
- M<sup>m</sup>** « M. SUAHD. « Etude théorique de la délocalisation électronique dans les systèmes Polypeptidiques ». Thèse de Doctorat d'Etat.
- A** • VEILLARD. « Etudes théoriques sur la structure de molécules hétérocycliques d'intérêt biochimique ». Thèse de Doctorat d'Etat.

---

### OUVRAGES

- \* **E** Jérôme Aspects of Biochemistry ». Academic Press, 1964 (Comptes rendus du colloque International tenu à Ravello en sept. 1963, édité par B. Pullman).
- « Molecular orbitals in Chemistry, Physics and Biology », Academic Press, 1964 (Ouvrage collectif, édité par P. O. Löwdin et B. Pullman).
- B. P** ULLMAN. « La biochimie électronique ». Collection « Que sais-je ? » Presses Universitaires de France. Edition Japonaise, 1964.

---

### COMPOSITION DU SERVICE

- M.<sup>o</sup> B. PULLMAN, Professeur à la Faculté des Sciences de Paris.
- M<sup>me</sup> A. PULLMAN, Directeur Scientifique au C.N.R.S.
- M. G. BERTHIER, Directeur de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> J. SERRE, Professeur à l'Ecole Normale Supérieure de Jeunes filles de Sèvres.
- M<sup>me</sup> H. BERTHOD, Chargée de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> C. GIESSNER-PRETTRE, Chargée de Recherches au C.N.R.S.
- M. R. COLLIN, Boursier du Public Health Service (U.S.A.).
- M. A. ESPINOSA, Professeur à l'Université de Santiago (Chili).
- M. J. P. GREEN, Professeur à l'Université de Yale (U.S.A.).
- M. M. ROSSI, Chercheur Stranger (Italie).
- M. A. VAN DE VORST, Chercheur Stranger (Belgique).
- M. H. GEBELEIN, Chercheur Stranger (Allemagne).
- M. M. GILBERT, Chercheur Stranger (Canada).
- M<sup>lle</sup> J. BAUDET, Assistante à la Faculté des Sciences.
- M<sup>me</sup> M. SUARD, Agrégée-Préparatrice à l'Ecole Normale Supérieure de Jeunes Filles de Sèvres.
- M. A. VEILLARD, Agrégé-Préparateur à l'Ecole Normale Supérieure.
- M. S. DINER, Attaché de Recherches au C.N.R.S.
- M. J. P. MALRIEU, Attaché de Recherches au C.N.R.S.
- M. P. CLAVERIE, Stagiaire de Recherches au C.N.R.S.

**M<sup>me</sup> M. J. MANTIONE, Boursi&re du Comitf « Cancer et Leuclmie » de la D.G.R.S.T.**

**M<sup>lle</sup> C. CAILLY, Boursiire du Comit6 « Cancer et Leuc&nie » de la D.G.R.S.T,**

**M<sup>me</sup> J. CAILLET, Boursiire du Comitl « Cancer et Leucfanie » de la D.G.R.S.T.**

**M<sup>Ue</sup> LATAUD, Boursiire du 3« cycle,**

**M<sup>me</sup> E. KOCHANSKI, Boursiire du 3<sup>0</sup> cycle.**

**M. R. ASTIC, Collaborateur technique.**

**M<sup>lle</sup> R. RAHMAT, Collaborateur technique.**

**M. D. PIAZZOLA, Collaborateur technique.**

**M<sup>me</sup> M. LANDEZ, Secretaire.**

## SERVICE DE BIOCHIMIE A

Rapport de M<sup>me</sup> Y. KHOUVINE, Chargée de Service.

Mes collaborateurs ont poursuivi leurs recherches, commencées depuis plusieurs années. M<sup>me</sup> R. Emanoil-Ravicovitch a donné l'ensemble des résultats dans une thèse de Doctorat-ès Sciences dont l'essentiel a été résumé dans le rapport de l'année dernière. M. C. E. Sripati, M<sup>lle</sup> R. Rozenchwajg et M<sup>m</sup> A. Fourcade ont fait progresser leurs de telle façon que Ton peut espérer que \* partie expérimentale de leurs thèses est très avancée.

M. C. E. Sripati a montré que les noyaux des cellules hépatiques de Rat normal ou porteur de l'hépatome ascitique de Zajdela conservent la possibilité de synthétiser, *in vitro*, les acides nucléiques et les protéines. Us possèdent certains systèmes enzymatiques tels que les enzymes de la chaîne glycolytique d'Embden-Meyerhof, excepte l'hexokinase. Il a mis, aussi, en évidence la présence d'une adénylate-kinase et d'un phosphoénol-pyruvate-kinase. Ces enzymes doivent être des constituants nucléaires, étant donné que les préparations de noyaux sont dépourvues de contaminants cytoplasmiques et présentent un haut degré d'intégrité morphologique. Il semble bien que les cellules normales, aussi bien que les cellules néoplasiques, ont l'équipement enzymatique nécessaire pour remplir, indépendamment, plusieurs fonctions, telles que le métabolisme des hydrates de carbone, menant à la synthèse du ribose et des acides aminés, ainsi que l'utilisation de ces métabolites pour la synthèse des acides nucléiques et des protéines. Il a aussi montré que l'ATPase nucléaire, dont la concentration est élevée, est insensible au dinitrophénol, mais que son activité est très augmentée par les ions  $Mg^{++}$ . Le noyau pourrait donc avoir une certaine indépendance métabolique mais, par sa pauvreté en hexokinase, il dépend du cytoplasme pour la phosphorylation du glucose. La régulation par des interactions cyto-plasmiques serait une hypothèse satisfaisante puisque, pour toutes les fractions cellulaires, la synthèse des coenzymes pyrimidiques se fait uniquement dans le noyau.

M<sup>lle</sup> R. Rozenchwajg poursuit l'étude d'un système d'incorporation des acides aminés dans les protéines provenant d'une fraction nucléaire de l'hépatome ascitique de Zajdela, après centrifugation à faible vitesse. Ce système agit sans addition de facteurs solubles ni apport énergétique extérieur. Il possède donc tous les éléments nécessaires à la synthèse protéique. Il ne représente qu'une faible partie de la fraction sédimentable puisque, par oscillation sonique ou par action de tensio-actifs, on peut modifier sa composition et changer sa teneur

en protéines, ADN et ARN, sans changer son pouvoir d'incorporation. M<sup>lle</sup> Rozencwajg a montré également que ce système, après incubation avec des acides aminés, synthétise des substances dont elle a pu isoler, après sonication et digestion tryptique, un complexe soluble trichloracétique.

M. A. Boër, en collaboration avec M<sup>lle</sup> Rozencwajg et M. J.-P. Zalta, a étudié l'inhibition des synthèses protéiques par rActinomycine dans les cellules de l'hépatome ascitique de Zajdela. Cette inhibition, qui est fonction du temps de préincubation, ne dépasse pas 30 à 40 %. Dans les mêmes conditions, 95 % de l'incorporation de P<sup>32</sup> est inhibée.

Si on compare ces résultats à ceux qu'on obtient avec les bactéries, chez lesquelles la synthèse des protéines est complètement bloquée, on peut penser qu'il existe, dans les cellules animales, des ARN « messagers » relativement stables et (ou) que la synthèse des ARN continue en présence d'Actinomycine.

M. Boër, en collaboration avec M<sup>me</sup> L. et M. J. Harel, a suivi l'action de l'Actinomycine D, *in vivo*, sur le renouvellement des ARN des cellules de foie de Rat. Us ont montré que la résistance relative du D-ARN tient, probablement, à sa faible teneur en dGMP, puisque rActinomycine se lie spécifiquement au dGMP de l'ADN. Comme on sait aussi, *in vitro*, que la synthèse sur un ADN à un seul brin est beaucoup moins sensible à rActinomycine que celle qui se fait sur un ADN à 2 brins, il est possible que, dans le foie, une partie de la synthèse de l'ARN « messenger » se fasse sur un ADN à un seul brin, d'autant plus que les proportions d'AMP et d'UMP sont inégales.

Afin de savoir si le métabolisme des acides nucléiques de *E. coli* est modifié par la chlorpromazine, M. R. Sutra a déterminé les conditions les meilleures de l'incorporation de l'adénine-8-C<sup>11</sup> en la dosant dans les acides adényliques et guanyliques de l'ARN et dans l'adénine et la guanine de l'ADN. En répétant ces expériences en présence de chlorpromazine, M. Sutra montrera l'action de cet inhibiteur sur la synthèse des acides nucléiques de *E. coli*.

M. D. Szafarz a poursuivi l'étude de l'inhibiteur dont, avec M. J. Okuda, il a montré l'existence dans la fraction soluble du noyau hépatique du Rat. Ce facteur est de nature protéique, de faible poids moléculaire et migre, à l'électrophorèse, vers la cathode. Ce dernier caractère semble indiquer que l'inhibiteur est une protéine de type basique. *In vitro*, l'incorporation des acides aminés dans les protéines est inhibée. Avec M. T. Matsu'ura, M. D. Szafarz a commencé l'analyse chimique de cette protéine pour en connaître le rapport acides dibasiques/acides dicarboxyliques et cherche à mettre en évidence quelques propriétés caractéristiques de l'inhibition.

D'autre part, M. Szafarz, en collaboration avec M<sup>lle</sup> M. Galy-Fajou, étudie les complexes du diaminoazobenzène avec les protéines. L'affinité du colorant est grande pour les histones, faible pour la sérumalbumine et nulle pour les protéamines et la trypsine. Le complexe avec la sérumalbumine est retenu par un filtre millipore de 0,45 µ et semble être dissocié par la nitrocellulose qui retient le colorant.

Bien que M<sup>lle</sup> L. Klyszejko ait quitté mon laboratoire, elle a pu continuer à la Faculté des Sciences de Lodz, ses recherches sur les nucléoprotéides du pancréas de Boeuf. Elle a mis au point l'isolement des noyaux par l'acide citrique

« I. separation des RNP, DNP et protéines insoluble.. BU a, ensuite, s'j\*»ré Us DOT en protéine., du OTE histone, protéines non bas,q»<s, du W « \* \* " ; lines et en protéines résiduelles. Par électrophorèse, eUe a étudié 1 homogénéité 7 DNP e'' T S B ? £ 2 £ t J S 2 Les ADN sont de type AT, mais contiennent toujours ... Les précautions prises pour préparer des noyaux « purs » et extraire totalement les RNP. Cet uracile appartient donc à un ARN nucléaire de type « messenger », en même temps que l'ADN. M<sup>lle</sup> Klyszejko poursuit diverses fractions qu'elle a obtenues et, si ses fonctions universitaires le lui permettent, viendra quelques mois à Paris.

M A T Rosenbere et M«« A. Fourcade ont montré que des mitochondr-

ont, en outre, une activité respiratoire réduite et ne reagent pas LWlyse de leur équipement enzymatique est en cours.

D'autre part, M. Rosenberg et M- Fourcade ont : m»auj pou Mm e méthode récente de cancérisation par la diéthylmtrosamme. Us en ont vérifié l'efficacité et la spécificité. En suivant l'évolution de l'activité de la catalase et la spécificité de la cancérisation, iU ont observé que la catalase ne disparaît pas au début de la toxication par le colorant.

M<sup>lle</sup> R. Emanoil-Ravicovitch a soutenu sa thèse le 17 octobre, à Paris, exposant ses recherches sur les flavines en général et sur un enzyme flavinique en particulier, la DAB-reductase dans la cellule hépatique normale du Rat, au cours de la cancérisation expérimentale ainsi que dans la cellule hépatique néo-

^ I t u d i e actuellement, avec M. Szafars, " — 1 « \* S' S ^ S le DAB et les fractions sub-cellulaires du \*\* \* » £ T M £ cobran T et ^ uent membranes ergatoplasmiques ont une grande ^ J T . \* £ Z » M«« Ema- ^ r6 le imporLnt dans la précancérisation expérimentale, role que M noa-Ravicovitch avait d'ja souligné dans sa these.

### LISTE DES PUBLICATIONS

- L. these de D-RNA dans le foie de Rat traite par 1 Actinomycine. « Persistance d'une syn- ne. » *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 87, 212.
- A. BOEH, J.-P. ZALTA et R. ROZENCWAJG « ^ ^ ^ A ^ J , cellules ascitiques de poration, » wtro, des acicks aminés dans ta P ^ J j \* \_ 1 f Rat (hepatome de Zajdela). , JP. \* " ^ \*\* £ £ £ » hydrosolubles dans
- R. EMANOIL-RAVICOVITCH « feude du " ^ ^ , < ^ j n T l > i o n t è s Sciences U cellule normale et cancéreuse du foie de Rat. inese
- L. Naturelles, soutenue le 17 octobre 19H- n ^ ^ bonucieoprotéides du pan- KLYSZBIKO, S. DH MNDB et Y. ^ T Z ^ B T S ^ C L M L 196 1 46, cr & s de Boeuf. HI. Fractionnement des histones.

- L. KLYSZEJKO et Y. KHOUVINE. « Noyaux du pancreas de Boeuf isolés dans l'acide citrique. Fractionnement des noyaux. » *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1964, 46, 1228.
- L. KLYSZEJKO et Y. KHOUVINE. « Noyaux du pancreas de Boeuf isolés dans l'acide citrique. Analyse chimique des noyaux et de leurs fractions. Chromatographie des acides désoxyribonucléiques. électrophorèse de la fraction globulines et des désoxyribonucléoprotéides. » *Bull. Soc. Chim. biol.*, sous presse.
- J.-P. ZALTA. « Etude d'un système de synthèse de protéines dans le noyau des cellules ascitiques de Thépato-me de Zajdela. » Gordon Conférence, U.S.A., juillet 1964.

---

### COMPOSITION DU SERVICE

- M<sup>me</sup> Y. KHOUVINE, Directeur scientifique au C.N.R.S., directeur de Laboratoire à l'école Pratique des Hautes études.
- M. A.-J. ROSENBERG, Professeur à la Faculté des Sciences de Poitiers, Directeur-adjoint à l'école Pratique des Hautes Etudes.
- M. J.-P. ZALTA, Maître de Conférences à la Faculté des Sciences de Toulouse, Chef de Travaux à l'école Pratique des Hautes Etudes.
- M. D. SZAFARZ, Maître de Recherches au C.N.R.S.
- M. le Dr. E. LOZA, Professeur agrégé à la Faculté de Médecine de Lodz.
- M. A. BOER, Chargé de Recherches au C.N.R.S.
- M. R. SUTRA, Chargé de Recherches au C.N.R.S.
- M. T. MATSU'URA, Boursier de rA.S.T.E.F.
- M<sup>lle</sup> M. GALY-FAJOU, Boursière de la Ligue Nationale française contre le cancer.
- M. C. E. SRIPATI, Attache de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> R. FIMANOIL-RAVICOVITCH, Attache de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> A. FOURCADE, Attache de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>lle</sup> R. ROZENCWAJG, Attachée de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>lle</sup> M. F. FEINBERG, Collaboratrice technique au C.N.R.S.
- M<sup>lle</sup> M. -F. ISAMBERT, Collaborateur technique au C.N.R.S.
- M<sup>me</sup> M. MILET, Collaborateur technique au C.N.R.S.
- M. J.-C. PRAGER, Collaborateur technique au C.N.R.S.
- M<sup>lle</sup> A. RUET, Collaborateur technique au C.N.R.S.

## SERVICE DE BIOCHIMIE B

Rapport de M<sup>e</sup> M. GRUNBERG-MANAGO, Chargée de Service.

L'étude des mécanismes de la biosynthèse des polyribonucleotides, de leur structure physico-chimique et de leur rôle dans la synthèse des protéines a été Poursuivie. Nous nous sommes cette année plus particulièrement attachés aux Points suivants :

- A) Mécanisme (action de la polynucleotide phosphorylase.
- B) Etude de la structure secondaire et des séquences d'ARN :
  - a) Dégradation de TARN du TMV
  - b) Dégradation du S-ARN.
- C) Rôle du chloramphénicol et des analogues d'acides aminés dans la synthèse des ARN et des protéines.
- D) Etude des propriétés physico-chimiques des polynucleotides contenant des bases atypiques.
- E) Code génétique et biosynthèse des protéines.

### A. — MECANISME D'ACTION DE LA POLYNUCLEOTIDE PHOSPHORYLASE.

Comme nous l'avons mentionné dans notre dernier rapport, nous avons obtenu, en collaboration avec M. Williams et avec l'aide de M<sup>me</sup> Thang, une préparation hautement purifiée de *E. coli* qui nous a permis de pousser plus loin notre étude de la polynucleotide phosphorylase. En effet, alors que pour l'enzyme de *lysodeikticus*, il a été trouvé qu'un amorcéur oligonucleotide à groupe hydroxyle terminal libre était absolument nécessaire et que l'enzyme s'attache sur cet oligonucleotide des unités de mononucleotides, le rôle des oligonucleotides n'a pas encore été clarifié dans le cas de l'enzyme de *E. coli* et de *S. -4. vinelandii*. En particulier, les deux groupes d'oligonucleotides, à hydroxyle libre ou à 3' phosphate, semblent avoir un effet activant, puisqu'ils peuvent induire, et surtout supprimer la phase de latence induite par diverses conditions expérimentales, telles qu'un traitement par Turée, par exemple. Par contre, nous avons trouvé, en collaboration avec M<sup>lle</sup> Lucas, que les oligonucleotides dont le groupe hydroxyle en 3' est libre, protègent l'enzyme contre l'inactivation. Par la chaleur, alors que ceux esterifiés en 3' n'ont aucun effet protecteur. L'étude de M<sup>lle</sup> Lucas a été reprise et continuée par M. Harvey.

Il apparaît donc que les oligonucléotides peuvent avoir deux effets : ceux dont le groupe hydroxyle est libre et qui peuvent servir de point de départ pour de nouvelles chaînes et être incorporés dans les polymères se combinent avec le groupe actif de l'enzyme; ceux dont le groupe hydroxyle est estérifié en 3' (ainsi d'ailleurs que ceux *h* groupe hydroxyle libre) ne se combinent pas au centre actif, mais ont probablement un effet sur la structure tertiaire de Penzyme.

L'action de l'urée est étudiée actuellement en détail par M. Harvey.

Une des applications de la stabilité thermique de la polynucléotide phosphorylase se trouve réalisée dans la synthèse de l'acide polyguanylique d'un poids moléculaire élevé. En effet, la préparation de cet homopolymère s'était jusqu'ici révélée infructueuse, et son obtention, en collaboration avec M. Thang et avec l'aide de M<sup>lle</sup> Graffe, permet de combler le vide des études tant physico-chimiques que biologiques à l'aide du poly G.

La stabilité à la chaleur de la polynucléotide phosphorylase nous a permis également, en collaboration avec M<sup>lle</sup> Lucas, d'étudier le mécanisme selon lequel la polymérisation est inhibée en présence de polymères *k* bases complémentaires de celles des diphosphates. En particulier, l'effet du poly U (acide polyuridylique) sur la polymérisation de l'ADP a pu être étudié à des températures élevées. A 30° le poly U inhibe fortement cette polymérisation alors qu'à 37° l'inhibition est beaucoup plus faible et qu'à 42° elle est presque négligeable.

Ces résultats suggèrent le mécanisme suivant : un adénylate (de 10 à 20 nucléotides) est synthétisé; un complexe se forme entre le poly U et cet adénylate (T<sub>m</sub> = 40°); ce complexe inhibe une synthèse postérieure de poly A. Lorsque la température est suffisamment élevée pour que ce complexe, oligo A + poly U, soit détruit, la synthèse reprend.

L'étude du mécanisme de polymérisation est en cours au moyen d'analogues de diphosphates; elle a été commencée en collaboration avec M. S. S. Cohen\* lors de son séjour à l'Institut au moyen de Tarabinosyl CDP et de désoxy CDP qui sont des inhibiteurs.

D'autre part, M. Thang, avec l'aide de M<sup>me</sup> Thang et en collaboration avec MM. Babinet, Roller et Dubert, du groupe de M. Monod à l'Institut Pasteur, a trouvé que divers métaux peuvent remplacer le Mg<sup>++</sup> dans la polymérisation et la phosphorylation. Certains ne catalysent cependant que l'une des réactions. Ceci donnerait un nouveau moyen d'approche pour l'élucidation du mécanisme d'action de la polynucléotide phosphorylase.

Par ailleurs, M<sup>lle</sup> Mory étudie avec l'enzyme de *M. lysodeikticus* les conditions de synthèse des polymères blocs commençant par une longue séquence différente d'homopolymères donnés qui peuvent être très utiles pour la clarification de l'étude du code génétique.

Enfin, l'effet de la polylysine et des électrolytes sur la polynucléotide phosphorylase de *CL perfringens* a été étudiée en détail par M. Fitt. La polylysine stimule la polymérisation de l'ADP et du GDP, et inhibe celle de l'UDP et du CDP. Tous les électrolytes stimulent également la polymérisation de l'ADP en l'absence de polylysine, mais on observe une phase de latence qui est supprimée par l'addition de polynucléotides ou d'oligonucléotides. Au contraire, en présence de polylysine, la vitesse de la réaction est linéaire dès le début de la polymérisation. La polylysine et les électrolytes diminuent de 10 fois environ le

Ks pour l'ADP, mais la polylysine augmente, de plus, la Vm. La polylysine déplace également l'équilibre de la réaction en se combinant k l'acide polyadénylique formé.

#### B. — ETUDE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE ET DES SEQUENCES D'ARN.

Jusqu'ici présent on ne possède pas de méthodes adéquates permettant d'étudier la séquence des bases dans les ribopolynucléotides. La polynucléotide phosphorylase pourrait être utile pour ce genre d'études. En effet, c'est une exonucléase, attaquant spécifiquement l'extrémité nucléosidique de la chaîne ayant le **groupement hydroxyle libre en position 3'** et le groupement 5' **lié dans la chaîne, et ceci de manière séquentielle**. De plus, aucune spécificité **vis-à-vis de ces bases n'a été observée**. D'autre part, la préparation purifiée que **nous employons** «e contient aucune activité endonucléasique.

a) *Degradation de VARN du TMV.* — En collaboration avec B. Singer et Fraenkel-Conrat, de Berkeley, en visite à l'Institut, nous avons effectué, avec l'aide de M. Dondon, une digestion limitée de TARN du TMV par la Polynucléotide phosphorylase à 0°; celle-ci a libéré un groupe de nucléosides 5' diphosphates, ce qui correspondrait à une attaque de l'extrémité 5' liée à la chaîne. Le fait d'enlever un segment terminal de 20-50 nucléotides ne diminue guère de peu l'infectivité. La replication d'un ARN tronqué, auquel manquaient jusqu'à 30 résidus, a donné une progéniture dont l'ARN, examiné par les mêmes méthodes enzymatiques, ne peut être distingué, en ce qui concerne la séquence formelle de nucléotides, de l'ARN non traité.

L'explication de ce phénomène est actuellement en cours d'étude.

b) *Degradation du S-ARN.* — A l'inverse de tous les autres ARN, le S-ARN, 37°», résiste à la phosphorolyse dans une proportion de 70 %. Nous avons étudié, avec M. Monier, que ceci était dû à la structure secondaire de cet ARN. La stabilité de la polynucléotide phosphorylase à la chaleur nous a permis, avec M. Thang et l'aide de M<sup>lle</sup>\* Réveillon, de montrer que le S-ARN est totalement hydrolysé lorsque l'on élève suffisamment la température (60°) pour tenir sa fusion, confirmant ainsi que la résistance, k 37°, est bien due à la structure secondaire. Cette observation a conduit à une étude sur le mécanisme de la phosphorolyse du S-ARN. Les résultats obtenus sur le S-ARN total ainsi que sur l'ARN spécifique pour la sérine (en collaboration avec M. Zachau de Cologne) ont montré que l'attaque des molécules du S-ARN par la polynucléotide phosphorylase, à 60° et même à une concentration élevée d'enzyme, n'est pas simultanée. Il a été suggéré qu'un rapport molaire enzyme/S-ARN est nécessaire pour qu'il y ait une attaque simultanée de toutes les chaînes du S-ARN. M. Guschlbauer a recherché les conditions d'études de la séquence; en particulier une méthode spectrale permettant l'analyse des bases — y compris les bases rares du S-ARN — a été mise au point.

Un autre enzyme a été isolé du rein de mouton. Ce travail commencé à Göttingen par M<sup>me</sup> Grunberg-Manago et M. Fresco a été continué à Paris par M. Kasai. A l'inverse de la polynucléotide phosphorylase, cet enzyme est une 5'-nucléase; il ne présente pas de spécificité en ce qui concerne les bases, mais n'attaque pas les régions ordonnées des polynucléotides. L'emploi de cet

enzyme peut être utile pour les études sur la structure secondaire et nous sommes en train d'en étudier l'action, en particulier sur le S-ARN. Par ailleurs, cet enzyme peut également être fort utile pour préparer une série d'oligonucléotides 5' terminaux nécessaires à l'étude du code *in vitro*, ainsi qu'à l'étude du mécanisme des différents enzymes jouant un rôle dans les réactions de polymérisation.

C. — RÔLE DU CHLORAMPHÉNICOL ET DES ANALOGUES D'ACIDES AMINÉS  
DANS LA SYNTHÈSE DES ARN ET DES PROTÉINES.

Les études effectuées sur la synthèse des ARN totaux chez les auxotrophes de *E. coli* ont conduit à formuler l'hypothèse selon laquelle les acides aminés jouent dans cette synthèse un rôle régulateur en neutralisant l'effet des répresseurs spécifiques des systèmes formateurs d'ARN. L'idée selon laquelle ces répresseurs seraient des ARN de transfert, non chargés d'acides aminés, a même été avancée. Certaines observations sur l'étude de l'ARN polymérase sont en accord avec l'hypothèse proposée. Toutefois, ce mode de régulation ne rend pas compte des résultats obtenus par M. Thang par l'étude de l'action des analogues d'acides aminés et celle du chloramphénicol sur la synthèse des ARN et des protéines. Des analogues incorporables, comme le p-fluorophényl-alanine, ne peuvent induire la synthèse des ARN qu'en présence de chloramphénicol. D'autres analogues, considérés comme non activables et non attachables à l'ARN de transfert (5-méthyltryptophane) agissent comme inducteurs de la synthèse de l'ARN, mais ceci seulement lorsque le chloramphénicol est présent. Ces observations mettent en lumière le rôle possible du chloramphénicol, soit comme activateur spécifique des systèmes formateurs d'ARN, soit comme stabilisateur de cette synthèse. M. Thang, avec l'aide de M<sup>lle</sup> Réveillon, poursuit donc ses études, d'une part sur le mode d'action du chloramphénicol et des analogues des acides aminés dans la synthèse des protéines spécifiques (et en particulier les protéines ribosomales), et d'autre part sur l'incorporabilité de certains analogues considérés comme non incorporables.

D. — ÉTUDE DES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUES  
DES POLYNUCLÉOTIDES CONTENANT DES BASES ATYPIQUES.

MM. Michelson et Pochon ont poursuivi, en collaboration avec MM. Douzou et Hélène, l'étude des diverses formes tautomériques de la cytosine, et ont synthétisé de nouveaux composés substitués de cette base. Ce travail préliminaire a conduit à l'étude du transfert d'énergie entre les deux bases, l'uracilique, l'autre pyrimidique, d'un dinucléotide. Ce transfert d'énergie est difficile à mettre en évidence, car lorsque l'on excite la base uracilique, on excite également la base pyrimidique. D'autre part l'intensité de fluorescence et de phosphorescence est faible. L'intensité du transfert d'énergie pour un dinucléotide contenant l'adénine et la cytosine varie suivant le type de liaison internucléotidique. Des oligonucléotides contenant des analogues de la cytosine seront prochainement synthétisés afin d'avoir des données supplémentaires sur ce problème.

D'autre part, parallèlement à la préparation de nombreux polynucléotides

formés d'analogues de bases qui ont été examinés dans le système protéique. M. Michelson a poursuivi les études physico-chimiques de ces dérivés, avec l'aide de M<sup>U</sup>e Monny et de deux étudiants du 3<sup>e</sup> cycle, MM. Favre et Henry.

M. Massoulié a continué son étude, par absorption optique, de la dissociation thermique du complexe poly (A + U + U). Il a pu mettre en évidence deux longueurs d'ondes pour lesquelles l'absorption de l'un des complexes formés, mais non celle de l'autre, diffère de l'absorption optique des polymères séparés. Cette observation est utilisée pour étudier les complexes poly (A + U) et poly (A + U + U), et l'interprétation des résultats est confirmée par la réaction du formol avec ces systèmes.

#### E. — CODE GÉNÉTIQUE ET BIOSYNTHESE DES PROTÉINES.

En collaboration avec M. Michelson, avec l'aide de M. et M<sup>me</sup> Dondon, nous avons poursuivi l'étude du mécanisme de l'association entre le codon de l'ARN messager et l'anti-codon du S-ARN; en particulier, nous avons cherché à savoir si l'appariement de ces bases se fait selon le modèle de Watson et Crick, en introduisant divers substituants dans les bases, ce qui modifie leur structure électronique et par conséquent la stabilité de leur appariement avec les bases complémentaires. Les analogues de l'adénine ont été formés par substitution d'un hydrogène du groupe amine par un groupe hydroxyméthyl, méthyl ou hydroxyméthyl; les analogues de l'uracile par substitution de groupes iodure, bromure, hydroxyl, fluor, méthyl ou ribose. L'influence d'autres agents externes, tels que température, pH, concentration en Mg, streptomycine, etc... a également été étudiée, ainsi que l'effet de introduction de bases non-sens dans les polymères et de modifications du résidu nucléosidique.

L'ensemble des résultats peut, pour le moment, se résumer ainsi :

Dans la plupart des cas, le lien entre le messager et le S-ARN se fait bien P« appariement des bases suivant le modèle classique de Watson et Crick. (cet appariement classique est mis en évidence par la capacité des analogues substitués à remplacer l'uracile et par le remplacement de la guanine par l'hydropoxanthine. De plus, les études sur l'effet du pH et de la température sur l'incorporation de la phényl-alanine en présence de poly FU, indiquent que les facteurs influençant la stabilité des appariements spécifiques des bases affectent complètement l'incorporation. Lorsque l'appariement des bases est complètement perturbé (par exemple méthyl U), l'analogue est non-fonctionnel. Par ailleurs, l'interférence de l'appariement par la substitution d'un H dans le groupement -NH<sup>2</sup> de l'adénine, par un groupement alkyl, rend l'adénine non-fonctionnelle.

Cependant, les résultats obtenus avec divers analogues indiquent qu'une certaine tolérance est permise : d'autres types de liens peuvent exister entre toutes les bases du codon ne soient pas nécessaires. Pour la formation du complexe si la stabilité des liaisons est augmentée, ce qui peut amener des cas de **polyvalence** (un même codon codant pour plusieurs acides aminés) dans le cas de poly U, il y a non seulement incorporation de proline, mais également l'incorporation de leucine et de sérine; en présence de poly BrC, il y a incorporation de proline, mais également de thréonine.

D'autre part, certains ions, des solvants, et surtout la streptomycine, aug-

mentent les ambiguïtés et indiquent que les ribosomes jouent un rôle très important dans la spécificité des liens S-ARN — ARN messenger.

L'introduction de bases non-sens produit un dommage qui varie suivant la nature du non-sens introduit. Enfin, un léger changement à l'extrémité du nucléoside peut affecter profondément la capacité qu'a le polymère de favoriser une incorporation d'acide aminé, ce qui suggère que la lecture ne commence pas au milieu de la chaîne. Les causes profondes des ambiguïtés sont à l'étude en collaboration avec M. McLaughlin, et cette étude semble importante tant pour la compréhension du mécanisme de transcription qu'en ce qui concerne la confiance que l'on peut accorder aux unités de codage telles qu'elles sont déterminées dans le système *in vitro*.

Tous les polymères nécessaires à cette étude ont été préparés par M<sup>me</sup> Dondon et M<sup>lle</sup> Graffe.

#### F. — TRANSFORMATIONS CHEZ *Ustilago*.

M. Tavlitzki et M<sup>me</sup> Talou ont continué l'étude des phénomènes qui conduisent à la production de formes levures à partir d'*Ustilago*. Après avoir élaboré une méthode d'étude quantitative de la transformation, ils se sont attachés à mettre au point une technique qui permette de disposer de quantités suffisantes de facteur transformant. Une série d'expériences leur a permis de constater que l'on peut obtenir des préparations actives lorsqu'on laisse proliférer les levures dans des milieux complexes ou dans des milieux définis dont on peut sans inconvénient abaisser la concentration en sels. Ils ont finalement fixé leur choix sur la technique qui consiste à mettre les levures en suspension pendant quelques jours dans de l'eau distillée, technique dont l'avantage est de fournir des préparations dépourvues des constituants des milieux de culture et des produits du métabolisme.

Ayant observé que la substance en cause est thermostable, qu'elle dialyse et qu'elle n'est pas adsorbée par le charbon, M. Tavlitzki et M<sup>me</sup> Talou ont mis au point une méthode d'isolement qui utilise ces propriétés. Ils ont constaté ensuite que l'activité transformante accompagne le matériel qui fournit des réactions positives pour les liaisons peptidiques, au cours de passages successifs sur colonnes de Sephadex et de Dowex, et le matériel donnant une réponse à la ninhydrine lors des chromatographies sur papier. Les résultats obtenus au cours de cette étude, mis en parallèle avec l'observation selon laquelle la papaine inactive le facteur transformant, suggèrent que ce dernier pourrait être constitué en tout ou en partie d'une substance de nature polypeptidique dont le poids moléculaire serait supérieur ou égal à cinq mille. Il faudra cependant attendre que la purification du facteur soit plus avancée pour pouvoir l'affirmer.\*

#### G. — PHÉNOMÈNES D'INDUCTION ET DE REPRESSION ENZYMATIQUES CHEZ *Acetobacter xylinum*.

M. Prieur a montré que le fructose et le glucose utilisés comme sources de carbone par une souche d'*Acetobacter xylinum* y provoquent, chacun en ce qui le concerne, la formation d'un équipement enzymatique qui se traduit par un

métabolisme glucidique différent. Rappelons que la bactérie qui a utilisé le fructose (type « F ») dégrade les glucides par le cycle des pentoses, tandis que la bactérie qui a utilisé le glucose (type « G ») métabolise les sucres par la voie Embden-Meyerhof.

Lorsque chacun des types bactériens « F » et « G » est mis en présence du glucide qui induit l'autre type, on s'aperçoit que certaines activités enzymatiques apparaissent, tandis que d'autres disparaissent. Ainsi :

— le fait de mettre le type « G » à proliférer dans un milieu à base de fructose y provoque l'apparition de toutes les activités enzymatiques qui lui faisaient défaut par rapport à « F » (fructose kinase, phosphoglucomutase, glucose-6-phosphate deshydrogénase, 6-phosphogluconique deshydrogénase, glycérokinase, UDPG-deshydrogénase). Lorsque cette même expérience est effectuée dans des conditions de non-prolifération, on constate en outre la disparition de la 6-phosphofructokinase et de la phosphoglucomutase;

— le fait de mettre le type « F » en présence de glucose y provoque, en croissance, la disparition de l'UDP-G-deshydrogénase et de la fructose kinase, enzymes dont l'activité persiste lorsque l'expérience est effectuée dans des conditions de non-prolifération.

Le passage d'un glucide à l'autre a aussi pour conséquence des changements de spécificité de certaines deshydrogénases envers le coenzyme nécessaire à leur activité :

— la 6-phosphogluconique deshydrogénase, qui est spécifique du DPN en présence de « F », devient spécifique du TPN après croissance de « F » en milieu glucosé, et l'enzyme, inactif en présence de « G » est synthétisé lorsque ce type bactérien est mis à cultiver dans une solution de fructose et son activité s'exerce indifféremment avec le DPN ou le TPN ;

— la G-6-P-deshydrogénase existe dans les deux types bactériens, « F » et « G », et exige le TPN. Lorsque le type « F » est mis à proliférer dans un milieu au glucose, on constate une augmentation de l'activité spécifique de cet enzyme qui devient indifférent au coenzyme qui lui est nécessaire.

Un « effet glucose » doit s'exercer sur les six premières enzymes citées dont les activités, induites par le fructose, sont réprimées par le glucose. Il a été constaté que pour quatre d'entre eux (phosphoglucomutase, G-6-P-deshydrogénase, 6-P-G-deshydrogénase et glycérokinase), un effet de préinduction par le fructose empêche leur disparition lorsque « F » est mis à proliférer en milieu glucosé.

Le fructose agit comme répresseur vis-à-vis de la 6-P-fructokinase et de la Phosphoglucomutase, avec effet de préinduction par le glucose.

Comme il a pu être prouvé que les différences constatées entre les types bactériens étudiés sont d'ordre phénotypique, l'ensemble de ces résultats tend à montrer que l'on a réuni les conditions dans lesquelles il est devenu possible de maintenir, avec des phénotypes différents, deux populations bactériennes de genotype identique, en les faisant croître dans des conditions identiques.

## H. — MÉTABOLISME DE LA CYSTATHIONINE CHEZ LES MICROORGANISMES.

Revenue des États-Unis, M<sup>me</sup> Delavier-Klutchko a poursuivi le travail entrepris il y a quelques années sur le métabolisme de la cystathionine. Cet acide aminé, par l'intermédiaire duquel se fait le transfert du soufre entre la cystéine et l'homocystéine — réaction de trans-sulfuration — représente une étape de la biosynthèse de la méthionine et a ainsi un rôle physiologique important. Cette réaction de transsulfuration procède par une série de réactions de substitution et d'élimination catalysées par des enzymes dont le pyridoxal phosphate est le coenzyme. Il a été démontré que cette réaction est réversible chez *Neurospora crassa* et *Saccharomyces Cerevisiae*, et irréversible chez deux espèces bactériennes voisines, *Escherichia coli* et *Salmonella typhimurium*, où elle procède de la cystéine vers l'homocystéine, — direction inverse de la réaction connue chez les tissus animaux. En effet, *Neurospora* et la levure dégradent la cystathionine en cystéine et  $\alpha$ -cétobutyrate d'une part (« y élimination ») et en homocystéine et pyruvate d'autre part (« 3 élimination »). *E. coli* et *Salmonella* ne possèdent qu'un « p enzyme » qui diffère d'ailleurs par certaines de ses propriétés de son homologue isolé chez *Neurospora*.

*Neurospora* et la levure catalysent la « 3 synthèse » de la cystathionine à partir de l'homocystéine et de la sérine, « 3 synthèse » qu'il n'a pas été possible de mettre en évidence chez *E. coli* et *Salmonella*. Ces bactéries, par contre, synthétisent la cystathionine à partir de Thomosérine et de la cystéine — « y remplacement ». Cette synthèse de la cystathionine par « y substitution » a été démontrée chez *Neurospora* par l'étude génétique de souches mutantes, mais le système enzymatique impliqué n'a pu, jusqu'ici, être mis en évidence, ni chez *Neurospora*, ni chez la levure.



M. Galvez est chargé des préparations de culture et de l'entretien des souches bactériennes.

Toutes les publications relatives aux travaux du service ont été rédigées avec l'aide de M<sup>me</sup> Costinesco qui assure en outre l'administration bilingue du service assistée de M<sup>me</sup> Guillermic.

## LISTE DES PUBLICATIONS

- F. R. WILLIAMS, T. GODEFROY, E. MERY, J. YON et M. GRUNBERG-MANAGO. « Détermination du vrai substrat de la polynucléotide phosphorylase dans la polymérisation de TADP ». *Biochim Biophys. Acta*, 1964, 80, 349.
- M. GRUNBERG-MANAGO et A. M. MICHELSON. « Stimulation of amino acid incorporation by polynucleotide analogues ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 80, 431.
- F. POCHON, A. M. MICHELSON, M. GRUNBERG-MANAGO, W. E. COHN et L. DONDO\* « Polypseudouridylic acid; synthesis and some physico-chemical properties ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 80, 441.

F. R. WILLIAMS et M. GRUNBERG-MANAGO. « Polynucleotide phosphogase hautement purifiée a partir de *E. coli* ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 40, 66.

M. GRUNBERG-MANAGO et A. M. MICHELSON. « I<sup>14</sup>C and copolymers containing fluorouridylic acid ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 40, 593.

A. M. MICHELSON et M. GRUNBERG-MANAGO. « Nonsense bases ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 91-92.

J. LICAS et M. GRUNBERG-MANAGO. « The effect of temperature on the activity of phosphorylase from *E. coli* ». *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 1964, 14, 395.

M. GRUNBERG-MANAGO et F. GROS. « Remarques sur les propriétés de la phosphorylase de *E. coli* ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 91-92.

J. MASSOUMB et A. M. MICHELSON. « Polynucleotides, propriétés physico-chimiques des dérivés nucléotidiques ». *C. R. Acad. Sci.*, 1964, 269, 293-295.

J. MASSOUMB, R. BLAKE, L. KLOTZ, J. FRESCO. « Une méthode permettant d'étudier séparément les acides nucléiques par les acides polyriboadényliques et polynucleotidiques ». *C. R. Acad. Sci.*, 1964, 269, 31.

K. W. WILSON et A. M. MICHELSON. « Étude de la nucléoside phosphorylase isolée de *E. coli* ». *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1964, 46, 65.

K. BELZECKA, C. MONNY et A. M. MICHELSON. « Étude de la phosphotransférase de carotte ». *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1964, 46, 65.

M. D. W. A. TISSIÈRES, S. BOURGEOIS, A. M. MICHELSON, R. SOFFER et L. LEGAULT. « Étude de la phosphorylase de *E. coli* ». *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 1964, 28, 299.

A. M. MICHELSON. « Étude de la nucléoside phosphorylase de *E. coli* ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 91, 1.

J. TAVLITZKI. « Le code génétique dans « Hérité et Génétique ». Débats, Cahier n° 48, oct. 1964.

J. TAVLITZKI. « Le code génétique. I. Les données du problème. II. La clé du code génétique ». *Sciences*, 1964, 34, 18.

M. N. THANG. « Rôle du chloramphénicol dans la synthèse de l'ARN ». *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1964, 46, 65.

J. MASSOUMB, A. M. MICHELSON, R. SOFFER, S. BOURGEOIS, L. LEGAULT. « Étude de la phosphorylase de *E. coli* ». *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1964, 46, 65.

H. GRUNBERG-MANAGO et J. P. X. « Étude de la phosphorylase de *E. coli* ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, 517.

C. BABINET, A. ROLLER, J. M. DUBERT, M. N. THANG et M. GRUNBERG-MANAGO. « Metal ions requirements of polynucleotide phosphorylase ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1965, 517.

M. GRUNBERG-MANAGO. « Synthesis of polyguanylic acid by polynucleotide phosphorylase of *E. coli* ». *Biochim. Biophys. Acta* (sous presse).

A. M. MICHELSON et R. LETTERS. « Synthesis of Nucleotide-Aminoacyl Anhydrides ». *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 80, 242.

- P. PRIEUR. « Contribution à l'étude de l'influence de la source de carbone utilisée pour la croissance sur le métabolisme des glucides chez *Acetobacter xylinum* ». Thèse de Docteur-Ingénieur, Paris, 1964.
- P. PRIEUR. « Caractère adaptatif du cycle des pentoses chez *Acetobacter xylinum* ». *C. R\* Acad. Sci.*, 1965, 260, 1298.
- P. PRIEUR. « Influence de la nature de la source de carbone utilisée au cours de la croissance sur la biosynthèse de différents enzymes chez *Acetobacter xylinum* ». *Bull. Soc. Chim. Biol.* (sous presse).
- M. FLAVIN, C. DELAVIER-KLUTCHKO et C. SLAUGHTER. « Succinic ester and amide of homoserine : some spontaneous and enzymatic reactions ». *Science*, 1964, 143, 50.
- M. FLAVIN, C. DELAVIER-KLUTCHKO et C. SLAUGHTER. « Succinic ester and amide of homoserine in methionine biosynthesis ». *Abstr. Am. Chem. Soc.*, 1964, 36 A, 75.
- C. DELAVIER-KLUTCHKO et M. FLAVIN. « Enzymatic synthesis and cleavage of cystathionine in fungi and bacteria ». *J. Biol. Chem.* (sous presse).
- W. GUSCHLBAUER, E. G. RICHARD, K. BEURLING, A. ADAMS et J. FRESCO. « Determination of nucleotide composition of polyribonucleotides by multicomponents analysis of their hydrolysate spectra ». *Biochemistry* (sous presse).

*Communications à la Reunion Commune des Biochimistes Allemands Suisses et Français* (Strasbourg, sept. 1963) :

- J. MASSOULIÉ et A. M. MICHELSON. « Étude physique de polynucléotides contenant des analogues de l'uracile », p. 38.
- F. POCHON, L. DONDON, M. GRUNBERG-MANAGO, A. M. MICHELSON, W. E. COHN. « Acide polypseudouridylique », p. 47.

*Communications au Colloque de Biologie Moléculaire* (Orsay, oct. 1964) : •

- A. M. MICHELSON. a Propriétés physico-chimiques des polynucléotides ».
- M. N. THANG et W. GUSCHLBAUER. « Phosphorolyse des S-ARN ».
- J. MASSOULIÉ. « Étude sur les propriétés physico-chimiques des polynucléotides ».
- J. LUCAS et R. HARVEY. « Mécanisme d'action de la polynucléotide phosphorylase »

### COMPOSITION DU SERVICE

- M<sup>mc</sup> M. GRUNBERG-MANAGO, Directeur scientifique au C.N.R.S.
- M. A. M. MICHELSON, Directeur de Recherches au C.N.R.S.
- M. J. TAVLITZKI, Maître de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>««</sup> C. DELAVIER-KLUTCHKO, Chargée de Recherches au C.N.R.S.
- M. F. MEYER, Chargé de Recherches au C.N.R.S. (depuis octobre 1964 dans le laboratoire de M. Clauser à Gif-sur-Yvette).
- M. F. POCHON, Chargé de Recherches au C.N.R.S.
- M. P. PRIEUR, Chargé de Recherches au C.N.R.S.
- M. M. N. THANG, Chargé de Recherches au C.N.R.S.
- M<sup>«e</sup> T. GODEFROY, Attachée de Recherches au C.N.R.S. (actuellement au\* fitats-Unis, Université d'Illinois, Dr. Weber).

- M. J. MASSOULfi**, Attach\* de Recherches au C.N.R.S.  
**M<sup>lle</sup> M. COUSIN**, Boursière C.E.A. (depuis octobre 1964 aux laboratoires Choay).
- M<sup>me</sup> E. MÉRY**, Chimiste, D.G.R.S.T.  
**M. A. FAVRE**, filève E.N.S., étudiant 3<sup>e</sup> Cycle.  
**M. J. P. HENRY**, Élive E.N.S., étudiant 3<sup>e</sup> Cycle.  
**M. J. DONDON**, Collaborate<sup>TM</sup> Technique, C.N.R.S.  
**M<sup>me</sup> L. DONDON**, Collaboratrice Technique, C.N.R.S.  
**M. M. GALVEZ**, Collaborateur Technique, D.G.R.S.T. (mi-temps).  
**M<sup>lle</sup> M. GRAFFE**, Collaboratrice Technique, C.N.R.S.  
**M<sup>lle</sup> c. MONNY**, Collaboratrice Technique, C.N.R.S.  
**M<sup>me</sup> o. SAYAH**, Collaboratrice Technique, D.G.R.S.T.  
**M<sup>me</sup> B. TALOU**, Collaboratrice Technique, C.N.R.S.  
**M<sup>me</sup> D. C. THANG**, Collaboratrice Technique, C.N.R.S.  
**M<sup>me</sup> H. COSTINESCO**, Secrdtaire-Traductrice, C.N.R.S.  
**M<sup>me</sup> M. GUILLERMIC**, Secrdtaire, D.G.R.S.T. (mi-temps).  
**M. C. MCLAUGHLIN**, Boursier N.I.H.  
**M. P. FITT**, Boursier Philippe Foundation (reparti en ju<sup>l</sup>let).  
**M. W. GUSCHLBAUER**, Boursier Helen Whitney Foundation.  
**M. R. HARVEY**, Boursier N.I.H.  
**M. K. KASAI**, Boursier Affaires ftrangères, D.G.R.S.T.  
**M<sup>me</sup> J. LUCAS**, Boursière N.I.H. (repartie en juillet).

## SERVICE DE PHYSIOLOGIE MICROBIENNE

Rapport de M. FRANCOIS GROS, Chef de Service.

Nous avons poursuivi l'étude des propriétés, des mécanismes de synthèse et du rôle des acides ribonucléiques. Cependant, les efforts de notre laboratoire, au cours de l'année écoulée, se sont portés plus spécialement sur les relations entre le contrôle de la synthèse des protéines spécifiques, lors des phénomènes de régulation ou de différenciation cellulaires, et le métabolisme des ARN messagers.

Afin de faciliter la discussion des travaux réalisés au cours de l'année 64 nous d'abordons donc tout d'abord quels ont été nos principaux thèmes de recherches et préciserons quelles en sont les équipes responsables.

### I. — CONTROLE DE LA SYNTHÈSE DES ARN MESSAGERS CHEZ LES MICRO-ORGANISMES

#### A. — ETUDES « IN VIVO ».

a) *Effets de l'induction de protéines spécifiques sur la synthèse des ARN messagers correspondants — Transcription préférentielle de l'opéron lactose au cours de la diauxie.*

Cette étude a été menée à bien par le Dr. S. Naono avec la collaboration de M<sup>lle</sup> J. Rouvière.

b) *Coordination entre « synthèse » et « lecture » des ARN messagers — Le rôle des ribosomes dans le détachement des messagers « naissants ».*

Les responsables de ce travail sont le Dr. Naono, le Dr. A. Shedlovsky (qui a rejoint les États-Unis en juin 64) et M<sup>lle</sup> Rouvière.

#### B. — ETUDES AU MOYEN DE SYSTÈMES ACELLULAIRES.

a) *Synthèse de messagers dans des extraits de bactéries infectées par le bactériophage T<sub>4</sub>.*

Ce travail, commencé en septembre 63 par les Drs. A. Shedlovsky et J. Wynn-gaarden, (tous deux de retour aux États-Unis) est poursuivi actuellement par le Dr. Naono avec la collaboration de M<sup>me</sup> D. Gros. Par ailleurs, les Drs. J. Gallant, R. Weisberg et D. Luzzati ont entrepris un projet d'études biochimiques

(i l'aide d'extraits acellulaires) sur le phénomène d'immunité dirigé contre le phage lambda, dans des systèmes lysogènes surinfectés *k* haute multiplicité.

b) *Étude de l'activité d'ARN polymérase chez des bactéries après transferts dans des milieux enrichis ou appauvris en aminoacides.*

Les Drs. K. S. et S. Nierlich avaient la responsabilité de ce travail. Le Dr. Nierlich vient de terminer son séjour en France; il sera remplacé pour ce travail par le Dr. L. Dalgarno à partir de février 1965.

*ARN Messagers.*

Ce travail est sous la responsabilité complète du Dr. D. Luzzati avec la collaboration technique de M<sup>me</sup> Fagot.

### n. — PROPRIÉTÉS DES COMPLEXES REVERSIBLES ARN MESSAGERS — ARN RIBOSOMIQUES

Les Drs. D. et F. Hayes ainsi que M<sup>lle</sup> M. F. Guérin (technicienne) ont la charge de ce travail.

## III. — ARN RIBOSOMIQUES ET MESSAGERS DANS UN SYSTÈME DIFFÉRENCIÉ

### A. — L'ÉRYTHROBLASTE AVIAIRE.

Cette étude *k* long terme est confiée à la responsabilité du Dr. K. Scherrer. Les collaborateurs sont les Drs. L. Marcaud et B. Breckenridge, récemment arrivés des États-Unis. M<sup>lle</sup> M. F. Latarjet y apporte également son concours bénévole depuis octobre.

### B. — LA SPORE DE B. SUBTILIS.

Ce travail constitue l'un des aspects du sujet de thèse de M. G. Balassa. Les aspects génétiques et morphologiques de ce problème relèvent de la direction du Dr. P. Schaeffer au laboratoire duquel M. Balassa est administrativement rattaché.

## IV. — PROPRIÉTÉS DES ENZYMES DE TRANSCRIPTION

### A. — IDENTIFICATION DES PRODUITS DE TRANSCRIPTION DE L'ADN DU PHAGE DG.

Ce travail amorcé l'an dernier est poursuivi par le Dr. Naono conjointement avec le Dr. Dubert (Institut Pasteur) avec les collaborations de M<sup>me</sup> Gros et de Mae Rouvière.

## B. — TRANSCRIPTION DES OLIGORIBONUCLÉOTIDES.

Les Drs. R. Cukier et D. Hayes ont la responsabilité de ce problème.

v. — *ETUDES BIOCHIMIQUES SUR LA PROTÉINOGENÈSE CHEZ LES MUTANTS D'E. COLI THERMOSENSIBLES*

Ce travail fait l'objet de la thèse de M. M. Yaniv. Divers aspects en sont toutefois étudiés avec la collaboration effective du Dr. Koyama qui assure en outre la responsabilité des études génétiques sur ce problème.

1. — *CONTROLE DE LA SYNTHÈSE DES ARN MESSAGERS CHEZ LES MICROORGANISMES*

## 1. — ETUDES « IN VIVO ».

a) *Inductibilité des ARN messagers.* — Transcription préférentielle de l'opéron lactose pendant la diauxie.

L'emploi des techniques d'hybridation artificielle entre ARN messagers et ADN de séquence homologue nous avait conduits à démontrer il y a déjà deux ans (Attardi, Naono, Rouvière, Jacob et Gros) que l'induction des enzymes spécifiques dépendant d'un opéron particulier entraîne une accumulation des ARN messagers complémentaires de cet opéron. Outre les implications de ce résultat quant aux mécanismes de la régulation, il laissait entrevoir que toute condition tendant à accroître le taux différentiel de synthèse d'enzymes spécifiques entraînerait une accumulation des « messagers » correspondants dans des proportions similaires. On pouvait donc espérer tirer parti de cette prédiction pour chercher à purifier le produit de transcription d'un opéron génétique spécifique.

En collaboration avec le Dr. S. Naono et avec Paide de M<sup>lle</sup> Rouvière, nous avons précisément observé que lors de la période de transition qui sépare la croissance d'une culture d'*E. coli* sur milieu minéral renfermant un mélange de glucose et de lactose, on assistait à une synthèse préférentielle des protéines contrôlées par l'opéron lactose.

D'une part, en effet, le taux différentiel de synthèse de la (3-galactosidase et de la galactoside transacétylase (tous deux enzymes inductibles dépendant de deux des gènes du système lactose) est environ 7 à 8 fois plus élevé dans les 5 premières minutes précédant la seconde vague de croissance diauxique (cf. Monod) qui caractérise « l'adaptation » des bactéries au lactose. D'autre part, lorsque une pulsion (1 min.) d'acides aminés radioactifs est pratiquée au cours de cette « transition diauxique » et que l'on analyse sur colonne « type DEAE » les protéines néoformées, la radioactivité est distribuée de façon quasi exclusive en 3 fractions. Deux d'entre elles coïncident exactement avec les emplacements chromatographiques de la galactosidase et de l'acétylase, la 3<sup>e</sup> pouvant repré-

sent, le produit «ventuel du gène « y » (perméase ?). Enfin par des tests sérologiques, on a pu ainsi montrer la prédominance d'une fraction d'ARN à marquage rapide, est voisine de H<sub>2</sub>S S P- % de 30 k

court

**P-galactosylfer' dépourvu** de l'ordre

Ces résultats indiquent que tout au moins pendant quelques minutes, la suspension de « \* » (TM) est correcte, les protéines de l'opéron S<sup>+</sup> L<sup>+</sup> enzymes et de leurs messagers, que les ARN complémentaires de \* o ^ o TM t. a u x formes pendant la phase *precedant* adaptation jM -fectose chromatographique des

Ce point a été clairement établi par Hershey) que les messagers ainsi produits (en utilisant la W ^ ' J J ^ ' g J el et ccharose. On a pu ainsi montrer la prédominance d'une fraction d'ARN à marquage rapide éluable à haute force ionique, ^ f ^ ^ ^ ^ ^ ^ a m t de gènes et ayant la remarquable propriété de s'hybrider ^ ^ J avec un ADN lactose (ADN purifié provenant de U<sup>+</sup> isome de g J > 7 g

**d' r ^ entant une déletion compete** J ^ i ^ \* ^ i ^ \* - . \* 26 S très aisément séparable du reste des ARN, am q. ^ ose. La proportion donc le produit de transcription très purifié <k l operon ^ à l'ensem We deg ARN des messagers « lactose » ainsi accumulés, par f » ppo « eler - les ARN

**à marquage rapide, est voisine de H<sup>+</sup> S S P- % de 30 k** messagers « vrais » ne représentent chez R « f l ^ r-u & (Bolton et 40 % de l'ensemble des polyribonucléotides rapidement ma<sub>4</sub>

McCar%).

**En conclusion, ce travail démontre** ^ J ^ J ^ f induction des protéines messagers et des protéines s'applique même lorsque spécifique est *priferentielle*. De plus, il est désormais possible de purifier le produit résultant de l'induction par étudier 1<sup>+</sup> propriétés. Le fait que 1<sup>+</sup> J N a ^ u m u U . ^ ène ^ poids moléculaire compris entre 1,3 et 1,5 million, suggère en fait qu

lactose est polycistronique.

b) *Coordination entre* ^ e - *lecture des ARN messagers.* — Rôle des ribosomes ^ ^ £ £ i 5 ^ i i t car de certaines

Notre souches d'eff chez qui une mutation P j g ^ J t « » 1 » g ^ (z, y teur lactose » abolit de façon pleiotropique 1 expres -- ' u'un cemin para- « a ) commandes par cet « opérateur » ^ ^ (00), d'existence existait dans le fait que ces mutants opérateu. « , i ^ terieur

ct) d'une part, sont \* m ^ TM f f j Z . , lecture » des codons « non sens . d'5 la région lactose et susceptibles d'affecter la

Hpressseurs de Beckwith);

β) d'autre part ne paraissent pas ^ s ^ £ ^ W o f f r a i e n t : o u b i e n complémentaire de la région lactose. Deux expiicau

lorsqu'un messenger polycistronique est porteur d'un codon « non sens » au pôle initial de lecture, il est détaché de l'ADN sur lequel il prend naissance mais se détruit très rapidement, ou bien il ne peut être libéré de l'ADN au contact duquel il s'est formé, parce que l'attachement des ribosomes aux « messagers naissants » serait indispensable au détachement de ces derniers.

Cette dernière hypothèse était d'autant plus séduisante qu'il paraît raisonnable de supposer l'existence d'une coordination entre la synthèse des messagers et leur « lecture » par les ribosomes. Le fait que les messagers isolés après déprotéinisation soient généralement incapables de former des polysomes *in vitro* (Haselkorn) renforce l'idée que les ribosomes commencent à s'attacher au messenger *lors mime* de sa synthèse *in vivo*. Bremer et Stent avaient également été conduits à postuler que la réaction du messenger avec les ribosomes permet la dissociation du complexe que forme ce messenger avec l'ADN, puisque, en absence de ribosomes, le produit résultant de la transcription de l'ADN par la RNA polymérase n'est jamais dissocié de sa matrice. Enfin récemment Nirenberg a démontré que les ribosomes peuvent s'attacher à l'ADN *in vitro* pour autant que ce dernier soit porteur d'une chaîne de messenger non dissocié.

Pour analyser le rôle éventuel des ribosomes dans la dissociation des ARN messagers néoformés, nous avons recherché si le taux de renouvellement de ceux-ci dépendait du contenu cellulaire en ribosomes. Cette relation a été étudiée dans des cellules d'*E. coli*, préalablement appauvries en ribosomes, par carence prolongée en ions Magnésium. On sait, en effet, qu'après une telle carence, les ribosomes ne sont pratiquement plus détectables dans des extraits des cellules carencées. La perte des ribosomes n'est pas létale cependant. En outre, si l'on transfère les bactéries carencées en milieu renfermant du Magnésium, les ribosomes sont reformés, après une certaine latence, selon une cinétique autocatalytique. En prélevant les bactéries à des stades différents de cette resynthèse on peut disposer de cellules dont la teneur en particules ribosomiques varie dans de très grandes limites.

Nous avons pu montrer que le taux initial de synthèse des messagers (fraction des ARN hybridables avec un excès d'ADN homologue) est proportionnel au contenu en ribosomes. Il semble bien que les ribosomes agissent comme facteurs limitants dans le mécanisme de dissociation plutôt que dans le mécanisme de transcription : en effet le pourcentage des ARN messagers qui sont décomposables en présence d'inhibiteurs de la transcription (acriflavines, dinitrophenol) est proportionnel à la teneur en ribosomes par cellule.

Enfin, tout récemment, nous avons pu montrer qu'une fraction très importante des messagers synthétisés dans des cellules privées de ribosomes formait un complexe avec VADN, complexe sédimentable entre 50 S et 60 S dans des lysats de sphéroplastes préparés à partir des cellules carencées. Ce complexe est dissociable en présence de dodécyl-sulfate de sodium à 0,4 % comme Test celui qui maintient réunis l'ADN et son produit de copiage par l'ARN polymérase purifiée (Stent). On sait, qu'en revanche, dans une cellule normale, la quasi totalité des messagers est associée aux ribosomes sous la forme d'aggrégats milliribosomiques (polysomes). Le rôle des ribosomes dans le mécanisme de détachement des ARN messagers pouvait s'expliquer en admettant qu'une chaîne de messenger est « traduite » en protéines au fur et à mesure de sa formation. Toutefois, ceci ne paraît pas être le cas, ainsi que nous l'avons observé : on peut,

en effet, *interrompre* la synthèse des protéines par des inhibiteurs (tels que la Puromycine ou le chloramphénicol) sans modifier, pour autant, le taux de synthèse des messagers globaux, ou de messagers spécifiques (galactosidase). Il semble donc que l'attachement des ribosomes sur les messagers au pdle correspondant à *Vinitiation* de la lecture *suffise* à accélérer la dissociation des messagers naissants à partir de leur matrice. Ce résultat est en accord avec l'observation de Nirenberg montrant que, même en présence de puromycine, ou de chloramphénicol, le complexe ADN-ARN messenger formé par l'ARN polymérase est capable de fixer les ribosomes (*in vitro*).

## 2. — ETUDES AU MOYEN DE SYSTÈMES ACELLULAIRES.

Si le taux de synthèse des ARN messagers est indirectement réglable par leur capacité dissociation avec les ribosomes, il est *a priori* difficile d'établir, du moins par des Etudes *in vivo*, à quel niveau de la synthèse des protéines s'exerce l'action des répresseurs. Il paraît désormais fort vraisemblable que seul l'emploi de systèmes acellulaires devrait permettre de résoudre ce problème. De là nos efforts pour établir, dans des systèmes acellulaires, les manifestations des mécanismes régulateurs.

a) *Synthèse de messagers dans des extraits provenant de bactéries infectées par des phages virulents.*

L'infection des bactéries par un phage virulent constitue un modèle approprié à l'étude des mécanismes de régulation de la biosynthèse des messagers. On sait depuis les expériences de S. Cohen, Volkin et Astrachan, Nomura et Spiegelman, Brenner, Jacob et Meselson que l'infection par un phage de la série T arrête la synthèse des principaux types d'ARN bactériens (ARN messenger, ARN soluble, ARN ribosomal). Elle s'accompagne au contraire de la production d'ARN messagers représentant le produit de transcription du génome viral. Le mécanisme responsable de l'arrêt des transcriptions de l'ADN bactérien demeure encore obscur. Nomura avait cependant observé que la destruction pure et simple de cet ADN n'en est pas la cause, contrairement à ce qui avait été primitivement avancé. Le même auteur a observé que, lorsque l'infection a lieu en présence de chloramphénicol, l'arrêt des synthèses d'ARN ribosomal n'a pas lieu, mais que celui de la synthèse des *messagers bactériens* se produit « comme dans les conditions normales. Toutefois les études de Nomura Presentaient un caractère purement qualitatif. Les Drs. A. Shedlovsky et J. Wynsaarden ont observé que l'arrêt de production des messagers bactériens est extrêmement rapide et l'on peut penser que, dans la minute même qui suit l'injection de l'ADN phagique, elle est complète. Ce résultat semble découler d'expériences dans lesquelles fut étudié l'effet de l'infection phagique sur la concentration du messenger spécifique de la p-galactosidase chez des cellules produites. En effet des populations d'*E. coli* chez lesquelles on a précédemment induit la synthèse du « messenger p-galactosidase » par addition d'IPTG, en présence de méthyl tryptophane, voient ce messenger spécifique disparaître très rapidement après infection. (Il faut d'ailleurs noter que la durée de vie moyenne

\* Effectuées en collaboration avec le Dr. A. Kepes.

du messenger « galactosidase » chez les cellules infectées est sensiblement plus courte que celle calculée chez des cellules normales brusquement privées d'inducteur).

Ce résultat, bien que suggérant un arrêt immédiat de la capacité de produire des messagers bactériens, n'excluait pas, il est vrai, une interférence avec « l'expression » de ces messagers plutôt qu'avec leur synthèse puisque la méthode employée pour mesurer le niveau cellulaire en un messenger spécifique fait précisément appel ici  $k$  la mesure de l'accroissement d'activité enzymatique qui résulte de son expression.

Le Dr. S. Naono, avec la collaboration de M<sup>me</sup> Danièle Gros a donc repris ces études, en utilisant, pour mesurer les ARN messagers produits, la technique de Hall et Nygaard, qui permet de doser directement les différents types de messagers accumulés, en tirant partie de leur seule homologie chimique avec l'ADN. On peut dès lors montrer que la capacité d'*E. coli* BB ou 2 300 à synthétiser des messagers homospécifiques est perdue en deux minutes environ (pour une multiplicité de 6). En revanche, après ce délai, le système infecté ne synthétise plus que des messagers complémentaires de l'ADN de T<sub>4</sub>. La perte de capacité à fabriquer les messagers spécifiques de l'hôte n'est que faiblement ralentie lorsque l'infection se produit en présence de chloramphénicol. Il apparaît ainsi que la production de protéines « phagiques » n'est pas nécessaire à l'interruption des mécanismes de transcription de l'ADN bactérien. Les résultats de ces études cinétiques *in vivo* ont alors encouragé le Dr. Naono et M<sup>me</sup> Gros à étudier dans des extraits de bactéries infectées comment variait la capacité de ces extraits à synthétiser des ARN messagers, *bactériens* ou *phagiques*, selon le stade d'infection des bactéries.

A des intervalles réguliers après infection, des échantillons étaient rapidement refroidis et soumis à une extraction par broyage en présence d'alumine. On mesurait dans chaque extrait la quantité d'ARN messagers homologues des ADN d'*E. coli* ou du phage T<sub>4</sub> produits, après incubation des extraits (pendant une durée constante) en présence des 4 ribonucléosides-triphosphates. // a été observé que les cinétiques des capacités relatives à produire des messagers bactériens ou viraux, étaient les mêmes *in vitro* que chez les bactéries intactes. Ceci est vrai, encore une fois, que l'infection ait lieu ou non en présence de chloramphénicol. Ainsi, même lorsque le phage ne peut répliquer son matériel génétique, et lorsque l'ADN de l'hôte a préservé son intégrité (le chloramphénicol empêchant l'apparition d'exonucléase phagique), l'ARN polymérase paraît être incapable de transcrire l'ADN d'*E. coli* présent dans cet extrait tandis qu'elle peut transcrire l'ADN provenant du phage.

Un tel système devrait se prêter directement à l'étude du mécanisme de l'inhibition observée, ainsi qu'à l'isolement éventuel de l'inhibiteur dont on a tout lieu de penser qu'il est directement infecté par le phage. De telles études sont en cours.

b) *Activité de la RNA polymérase chez les bactéries, après transfert en milieux enrichis ou appauvris en aminoacides.*

On sait que l'addition d'acides aminés dans une culture bactérienne maintenue en croissance exponentielle, dans un milieu minéral, entraîne la répression instantanée des enzymes intervenant dans la biosynthèse de ces aminoacides. Inversement, lorsqu'une population de bactéries, maintenues en présence &

certaines aminoacides, est transférée en milieu minéral sans ces aminoacides, on assiste à la dérépression des enzymes impliqués dans la synthèse de ces métabolites. M<sup>m</sup> L. Legault, ainsi que M. Don Nierlich, en stage dans mon service, ont observé que l'activité de la RNA polymérase globale, mesurée dans des extraits de bactéries ayant subi de tels transferts, variait de façon symétrique en fonction de la nature de ce transfert: ainsi le taux initial d'incorporation de nucléosides triphosphates radioactifs (réaction ADN dépendante) est réduit de 30 à 40 % dans les premières minutes qui suivent l'addition d'un mélange d'aminoacides à la culture. Inversement après transfert d'une population bactérienne d'un milieu « riche » en aminoacides, à un milieu « pauvre » on assiste à un accroissement de 30 à 50 % de l'activité « polymérase » dans les extraits des bactéries correspondantes. L'ARN synthétisé *in vitro* sous la dépendance de l'ADN, représentant essentiellement l'ensemble des ARN messagers, on est fondé de penser que les variations observées dans l'activité de l'ARN polymérase traduiraient les effets respectifs de « répression » ou de « dérépression », consécutifs à l'addition, ou à l'enlèvement des aminoacides. Des études sont en cours pour chercher à établir si les ARN synthétisés *in vitro*, dans les deux conditions qui viennent d'être décrites, représentent des collections différentes d'ARN Messagers, résultant de la transcription d'un nombre plus ou moins grand de segments génétiques, selon que Ton réprime ou déréprime les bactéries *in vivo*. Nous pensons pouvoir préciser ce point par des expériences d'hybridation.

c) *Effets de la carence en thymine sur la capacité à synthétiser des ARN messagers.*

Mme D. Luzzati avec la collaboration technique de M<sup>me</sup> Fagot a poursuivi des recherches concernant les effets consécutifs à la carence en thymine sur la capacité à synthétiser l'ARN *in vivo* et *in vitro*. Rappelons que, dans l'heure qui suit cette carence, les bactéries (*E. coli* 15 T, *E. coli* B<sub>3</sub>) perdent la faculté de synthétiser de l'ARN. Des extraits des bactéries carencées sont incapables d'incorporer des nucléosides triphosphates en liaison covalente dans l'ARN. On a pu démontrer qu'il s'avère que l'ADN des bactéries carencées est impropre à servir de matrice pour la synthèse d'ARN, vis-à-vis de la RNA polymérase purifiée. Il résulte de ces études plus récentes,

« que la cinétique de la perte de capacité de synthétiser l'ARN *in vivo* est voisine de la cinétique de l'effet létal consécutif à la mort par carence en thymine;

« que les bactéries carencées, bien qu'incapables de synthétiser de l'ARN (messager aussi bien que ribosomal), paraissent renfermer cependant un ARN « stable » capable de déplacer, par compétition, des hybrides obtenus entre ARN messagers radioactifs de bactéries normales, et leurs ADN homologues.

L'hypothèse de travail qui oriente actuellement les recherches impliquerait que, lors de la carence en thymine, se forment des complexes ou hybrides stables, A\* > N-ARN, probablement en des secteurs de l'ADN, B, B' \* ns leur formation. La persistance d'une certaine quantité d'ARN sur l'ADN des bactéries carencées, rendrait ce dernier impropre à servir de matrice pour la synthèse de nouveaux ARN messagers *in vitro*.

## II. — PROPRIÉTÉS DES COMPLEXES ARN MESSAGERS — ARN RIBOSOMIQUES

On ne possède que peu d'information sur le mécanisme qui maintient la cohésion du messager et des ribosomes. Depuis près de deux ans, M. Donald Hayes et M<sup>me</sup> Françoise Hayes avec la collaboration de M<sup>lle</sup> Guérin ont donc analysé les propriétés de complexes réversibles entre ARN messagers, naturels ou artificiels, et ARN ribosomiques libres. De tels complexes se forment lorsque la force ionique du milieu est élevée (ex : 0,6 M en NaCl) et se dissocient lorsqu'on l'abaisse. Les effets du pH et de la température sur la stabilité de tels complexes ont été étudiés en détail.

Les résultats les plus nouveaux qui méritent par ailleurs d'être soulignés sont les suivants :

1) Quand la température n'excède pas 40° C, et lorsque la force ionique est grande, on assiste à la formation de complexes réversibles entre TARN messageur d'*E. coli* et le combinat des ARN types 16 S et 23 S, lesquels (ainsi que Pa observé Roger Monier) sont capables de s'associer réversiblement. L'édifice ainsi obtenu sédimente aux alentours de 40 S-50 S et correspond à celui qui résulte de l'union d'un ribosome 70 S et d'une molécule de messageur. Si la température excède 5 à 6° C cet édifice est rompu et on n'observe plus de complexe qu'entre TARN messageur et, soit TARN 16 S, soit TARN 23 S. La stoechiométrie du complexe observé entre TARN messageur et le combinat ARN 16 S + 23 S, suggère que des appariements entre les polynucléotides messagers et ribosomiques suffiraient à expliquer l'attachement des messagers aux ribosomes.

2) Les appariements entre ARN messagers et ARN ribosomiques font intervenir des liaisons types hydrogènes entre bases nucléiques des messagers et bases complémentaires présentes dans les ARN ribosomiques. Toutefois comme ces derniers sont très riches en guanine, ce sont les appariements avec ces bases qui sont les plus aisés. Ceci explique que le poly C ait une affinité considérable pour les ARN types 23 S et 16 S (une molécule d'ARN 23 S peut fixer près de 20 molécules de poly C). Le poly G peut s'apparier en formant des liaisons types G-G. Le poly U s'apparie, d'ailleurs beaucoup plus faiblement, avec des résidus adénine, puisque la formylation ménagée des ARN ribosomiques abolit spécifiquement cet appariement. Le poly A ne s'associe pas du tout, probablement à cause de la facilité avec laquelle il forme des hélices homologues.

## III. — MÉTABOLISME DES ARN MESSAGERS DANS DES SYSTEMES DIFFÉRENCIÉS

### A. — ERYTHROBLASTES AVIAIRES.

Comme nous l'avons déjà souligné, la lignée des cellules formatrices d'hémoglobine chez les oiseaux présente un intérêt physiologique particulier pour des études sur les bases chimiques de la différenciation. Les érythroblastes,

comme les fcythrocytes sont des cellules nucléées. Or, tandis que les premiers sont le siège d'une intense synthèse d'hémoglobine, les seconds ne servent plus qu'au stockage de cette protéine. Les raisons qui conduisent, d'une part à la formation *quasi exclusive* d'hémoglobine chez les érythroblastes jeunes, d'autre part à l'arrêt de cette synthèse chez les fcythrocytes ont constitué notre préoccupation majeure.

M. K. Scherrer, M<sup>TM</sup> L. Marcaud, auxquels s'est joint récemment M. Breckenridge, ont réussi à démontrer la présence d'ARN messagers à marquage rapide chez les érythroblastes jeunes. Ces « messagers » sont caractérisés par leur propriété d'être associés à des polysomes, par leur capacité à se renouveler en présence d'actinomycine D et enfin par leur propriété de former des hybrides complémentaires avec l'ADN homologue. Le fonctionnement d'un grand nombre de gènes semble persister chez les érythroblastes, si l'on en juge par le fait que près de 1 % de l'ADN qui en provient peut être « saturé » par des messagers complémentaires.

La prédominance vraisemblable d'un messenger qui serait spécifique de l'hémoglobine est cependant *suggérée* par le fait que l'ARN à marquage rapide, extrait des polysomes, présente un pic de sédimentation très marqué aux alentours de 8 S, valeur qui caractériserait un polynucleotide capable de coder la formation d'une chaîne de globine.

De nombreux efforts sont actuellement poursuivis (par le groupe de M. Scherrer avec la collaboration récente de M<sup>11\*</sup> Latarjet) pour tenter de purifier ce matériel. Par ailleurs, les érythroblastes (comme les cellules de lignée Hela) produisent de grandes quantités d'ARN à marquage rapide de très haut poids moléculaire (45 S) et de composition proche de celle de l'ARN ribosomal. Une étude systématique des propriétés et du rôle de ces « eosomes » géants est en cours.

#### B. — SPORES DE B. SUBTILIS.

L'étude du métabolisme des acides ribonucléiques et de son contrôle au cours de la sporulation et de la germination a été poursuivie.

Il importe d'insister principalement sur les résultats relatifs au contrôle de la synthèse d'ARN par les aminoacides lors de la sporulation. Il a été observé que, chez les souches sporogènes en cours de sporulation, le taux de synthèse du RNA (mesuré par incorporation d'uracile C<sup>14</sup> car il s'agit de renouvellement plutôt que de synthèse nette) est stimulé dans des proportions très marquées (5 à 6 fois) par l'addition de chloramphénicol. L'addition d'un mélange d'acides aminés et de chloramphénicol ne stimule guère plus que celle de chloramphénicol seul. En revanche, chez les mutants oligosporogènes absolus, le chloramphénicol ne provoque aucune stimulation. Par contre, chez les mutants un mélange de tous les aminoacides et de chloramphénicol stimule à nouveau de 3 à 4 fois la synthèse d'ARN. Ces faits sont interprétés en supposant que, chez la souche sporogène normale existe une protéase activable, au début de la sporulation, et capable de libérer suffisamment d'acides aminés dans le pool cellulaire pour « induire » la synthèse de TARN (au sens défini par Stent et Brenner c'est-à-dire, probablement, en rechargeant TARN de transfert). Chez les asporogènes absolus (oligo-sporogènes), cette protéase n'existerait pas ou bien serait inactive. Quatorze mutants asporogènes ont été étudiés. Tous ceux d'entre eux

qui sont bloqués *k* un stade précoce (oligosporogènes) sont incapables de synthétiser de TARN si les aminoacides inducteurs sont absents. Ceux dont le bloc génétique concerne une étape *intermédiaire* de la sporulation (c'est-k-dire chez qui ce phénomène peut « débiter ») sont, du moins partiellement, stimulés dans leur synthèse d'ARN par la chloromycétine seule. Ces phénomènes ouvrent des perspectives intéressantes sur les modalités de contrôle d'un processus de différenciation par l'intermédiaire des aminoacides ou des protéases qui les libèrent. Par ailleurs, les efforts pour mettre en évidence un ARN messager stable (Aronson), au cours de la sporulation, se sont avérés négatifs.

Une étude cinétique de la synthèse des principales macromolécules : ARN, ADN, protéines, a été effectuée au début de la germination. L'existence d'une protéine *initiatrice* dont la synthèse est requise pour amorcer la réplication de l'ADN a été clairement démontrée.

#### IV. — PROPRIÉTÉS DES ENZYMES DE TRANSCRIPTION

##### A. — IDENTIFICATION DES PRODUITS DE TRANSCRIPTION DE L'ADN DU PHAGE X DG.

En collaboration avec MM. S. Naono et J. M. Dubert (Institut Pasteur) avec l'aide technique de M<sup>me</sup> D. Gros, nous recherchons si le copiage enzymatique par la RNA polymérase de l'ADN provenant du phage transducteur X dg (phage dont le génome insère l'opéron galactose *d'E. coli*) aboutit à la production d'ARN messager homologue des gènes *galactose* et si les dimensions moléculaires des messagers « gal » spécifiques qui seraient ainsi formés, correspondent, ou non, à celles de l'opéron « gal ».

Le but de ces recherches est : *d'une part* de fournir un système d'essai biochimique de l'activité des répresseurs des gènes galactose (en supposant que les répresseurs interfèrent directement avec la transcription DNA-RNA); *d'autre part* de déterminer si la structure de l'ADN est suffisante pour contenir la ponctuation de départ ou d'arrêt du copiage enzymatique. En d'autres termes la RNA polymérase reconnaît-elle des opérateurs spécifiques sur l'ADN, ou s'attache-t-elle au hasard & celui-ci ? Ce travail bien que préliminaire a conduit déjà aux résultats suivants :

1) Le produit de copiage global de l'ADN « X dg » une fois détaché de sa matrice par le dodécylsulfate de sodium, sédimente avec une constante de 14 S. Il s'agit donc en moyenne d'une collection d'ARN de poids moléculaire relativement élevé. Ce résultat est sans doute attribuable au fait que la polymérase est hautement purifiée et exempte de nucléases.

2) En hybridant comparativement les produits de copiage des ADN types X et X dg respectivement, avec les ADN dénaturés types X ou X dg, et en calculant la quantité de messagers ainsi hybridés dans chaque cas, on peut démontrer que près de 30 % du matériel provenant du copiage de l'ADN X dg est de type « galactose ». Cette valeur est plus élevée que ne le laisserait prévoir le pourcentage de gènes « gal » dans l'ADN X dg. Il se pourrait donc que la RNA polymérase *d'E. coli*, ait une affinité plus marquée pour les gènes « gal » que pour les gènes de X.

Quoi qu'il en soit, nous n'avons pas encore déterminé si TARN homologue des gènes « gal » présent dans le produit de copiage de l'ADN X dg, avait ou non des dimensions moléculaires voisines de celle de l'opéron galactose.

#### B. — TRANSCRIPTION DES OLIGORIBONUCLEOTIDES.

Nous avons décrit Tan dernier les études préliminaires de M<sup>lle</sup> R. Cukier sur les modalités de transcription des oligoribonucléotides dont l'isolement a été effectué par M. Michelson. Il s'avérait que le nombre minimum de résidus requis pour que ces oligonucléotides puissent agir comme matrices de l'ARN polymérase d'*E. coli* est voisin de 8 (oligo A ou oligo U). Par ailleurs, dans les conditions employées (en particulier en présence de la quantité d'ions Mn<sup>++</sup> généralement utilisée pour les essais), le produit de copiage de l'oligoribo A<sub>8</sub> en présence d'UTP, était un poly U qui formait des hélices avec les oligo A, eux-mêmes, dans un rapport 2 U : 1 A. La réaction s'arrêtait donc lorsque toutes les molécules d'oligo A se trouvaient « emprisonnées » dans un complexe avec le poly U formé. Il a été observé, cette année, que, si la concentration en ions Mn<sup>++</sup> est abaissée 5 fois, le complexe « poly U : oligo A » se dissocie, et la réaction peut dès lors évoluer de façon catalytique. On peut incorporer pratiquement tout l'UTP ajouté comme substrat dans du poly U (un rapport de 8 U incorporés pour chaque résidu de A présent a été obtenu). Le poly U ainsi formé contient près de 400 résidus comme le démontre l'analyse des proportions respectives d'UMP, d'uridine et d'uridine diphosphate observées après hydrolyse alcaline du produit. Le produit est donc près de 50 fois plus long que la matrice.

#### \*V. - ETUDE DU BLOCAGE DE LA PROTEINOGENESE CHEZ DES MUTANTS A CROISSANCE THERMOSENSIBLE D'E. COLI

Un très grand nombre de mutants d'*E. coli* (CR<sub>34</sub>) capables de croître à des températures atteignant 32° C mais incapables de croître à 41° C, ont été isolés. Parmi ces mutants, ceux chez lesquels, en cours de culture, on n'observe même plus d'accroissement de densité optique à 41° C sont, pour la plupart, totalement incapables de synthétiser des protéines à cette température. En général, au cours d'un transfert de 31° C à 41° C on observe un arrêt des synthèses protéiques après des durées très courtes, comprises entre 1 à 5 minutes selon les mutants étudiés. En revanche les acides nucléiques continuent de s'accumuler : 1AKN pendant 30 à 40 minutes, et l'ADN quelquefois plus longtemps.

De tels mutants constituent, en principe, un matériel de choix pour étudier le déterminisme génétique des éléments intervenant dans la biosynthèse des protéines : ribosomes, enzymes d'activation, enzymes de transfert, sRNA, etc. On sait en effet que, jusqu'ici, il n'a pas été possible de localiser les déterminants génétiques qui contrôlent les propriétés de ces éléments.

Notre premier objectif est donc de préciser à quel stade particulier de la synthèse des protéines les mutants dont nous disposons sont bloqués.

Les mutants CRT, et CRT<sub>7</sub> ont une activité ARN polymérase normale \* 30 comme à 40°C. Les surnageants obtenus après extraction de ces mutants sont incapables cependant de stimuler à 40° C la synthèse des protéines à partir

de ribosomes purifiés émanant de la souche sauvage CR<sub>34</sub> et d'ARN messager engendré par transcription de l'ADN de T<sub>4</sub>. A 30<sup>0</sup> C, l'activité des surnageants des deux mutants est seulement la moitié de celle d'un surnageant provenant de CR<sup>^</sup>. Les ribosomes des deux mutants étudiés sont au contraire parfaitement « compétents » à 40<sup>0</sup> C pour la synthèse de protéines en présence des surnageants émanants de la souche sauvage. Toutefois l'incompétence des « surnageants » des mutants CRT<sub>2</sub> et CRT<sub>7</sub> n'est pas observée lorsque le messenger mis en oeuvre est du poly U. Tout porte donc à croire que l'altération caractérisant les mutants étudiés concerne soit l'activité de sRNA particuliers soit celle de certains enzymes d'activation. Si les surnageants CRT<sub>2</sub> et CRT<sub>7</sub> sont mélangés en présence des ribosomes CR<sub>34</sub> et du messenger provenant de l'ADN T<sub>4</sub>, on n'observe pas à 40<sup>0</sup> C de *potentialisation* très marquée de leurs effets. Il est donc vraisemblable que les facteurs modifiés dans les surnageants CRT<sub>2</sub> et CRT<sub>7</sub> sont les mêmes.

Des études sont en cours pour préciser la nature des systèmes d'activation (ou des sRNA) modifiés chez les mutants CRT<sub>2</sub> et CRT<sub>7</sub>, et pour déterminer l'emplacement des gènes qui contrôlent ces systèmes. \*

### CONCLUSION

La démonstration que, dans des cellules dépourvues de ribosomes, l'ARN messager demeure associé à l'état de complexe avec l'ADN est, pensons-nous, riche de perspectives. Outre son implication pour les mécanismes de détachement des messagers naissants, elle devrait permettre de rechercher si l'induction (chez des cellules sans ribosomes) d'un opéron spécifique fait apparaître, ou non, le messenger naissant correspondant, en association avec les gènes induits, et fournir aussi des précisions importantes sur le niveau d'action des répresseurs.

Ainsi que nous nous l'étions proposé, nous nous sommes orientés plus spécifiquement, cette année, vers l'emploi de systèmes acellulaires pour analyser les mécanismes régulateurs de la synthèse des ARN. D'ores et déjà, il semble fondé d'espérer préciser le mécanisme du blocage de la transcription des ADN bactériens par les phages virulents.

Plus encore, nos études sur les messagers synthétisés dans des extraits de bactéries réprimées ou déréprimées pour la biosynthèse d'acides aminés (et récemment celles qui concernent l'induction des prophages chez les bactéries lysogènes) pourraient ouvrir la voie à l'étude de l'action des répresseurs *in vitro*.\*

Des perspectives également intéressantes paraissent s'ouvrir avec l'étude des mutants bactériens thermosensibles. Elles devraient logiquement correspondre à la localisation des gènes contrôlant les éléments fondamentaux du complexe formateur de protéines.

\* Tout récemment les études de M. Yaniv ont conduit à montrer que les mutants CRT<sub>2</sub> et CRT<sub>7</sub> possèdent tous deux un enzyme d'activation de la valine qui est non fonctionnel à 40<sup>0</sup> C.

## LISTE DES PUBLICATIONS

- R. L. SOFFER et F. GROS. « Effects of Dinitrophenol and Proflavin on transcription mechanisms in *E. coli* — An *in vivo* and *in vitro* study ». *Biochim. Biophys. Ada*, 1964, 84, 423.
- M. MANAGO et F. GROS. « Remarques sur les propriétés des ARN messagers et sur le code génétique ». Cinquantenaire de la Société de Chimie Biologique. *Bull Soc. chim. biol.*, 1964, 46, 1441.
- R. L. SOFFER. « Studies on the Biological activity of ribonucleic acid isolated from *E. coli* after exposure to S-Fluoro-uracile ». *Biochim. Biophys. Ada*, 1964, 84, 416.
- G. P. TALWAR, S. L. GUPTA et F. GROS. « Effect of growth hormone on ribonucleic acid metabolism. 3. Nature and characteristics of nuclear sub-fractions stimulated by hormone treatment ». *Biochem. J.*, 1964, 91, 565.
- F. GROS, J. M. DUBERT, S. NAONO, G. ATTARDI et F. JACOB. « ARN messagers et régulation de la biosynthèse des protéines ». Colloque du C.N.R.S. sur la régulation, \* Marseille, 1964 (*k* paraître).
- S. NAONO, J. ROUVIÈRE et F. GROS « Preferential transcription of the lactose operon in *E. coli* ». *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, numéro consacré à David Bonner (sous presse).
- S. NAONO, J. ROUVIÈRE, A. SCHEDLOVSKY et F. GROS. « Role of ribosomes in the dissociation of the DNA nascent messenger RNA complex ». En préparation.
- J. WYNGAARDEN, A. SCHEDLOVSKY, A. KEPES et F. GROS. « Kinetic studies on messenger RNA synthesis in phage infected cells. » En préparation.
- K. SCHERER, F. ZAJDELA, I. LONDON et F. GROS. « Studies on RNA metabolism in avian erythroblasts ». En préparation.
- D. LUZZATI. « Effet de la carence en thymine sur les capacités de biosynthèse des extraits acellulaires de *E. coli* 15 T ». Congrès International de Biochimie, New York, 1964.
- G. BALASSA. « Quantitative regulation of RNA synthesis during sporulation of *B. subtilis* ». *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1964, 15, 240.
- D. HAYES, M. F. GUÉRIN et M. GRUNBERG-MANAGO. « The formation of complexes between homopolyribonucleotides and bacterial ribosomal RNA ». *J. Mol. Biol.* En préparation.
- D. HAYES, F. HAYES et M. F. GUÉRIN. « The formation of  $^{32}\text{P}$ -labeled RNA and ribosomal RNA ». *J. Mol. Biol.* En préparation.
- D. HAYES, R. L. SOFFER et M. F. GUÉRIN. « The effect of ionic strength on the sedimentation behaviour of the biologically active components of bacterial RNA ». *J. Mol. Biol.* En préparation.

## COMPOSITION DU SERVICE

M. FRANCOIS GROS, Directeur de Recherches au C.N.R.S.

M. DONAL HAYES, Maître de Recherches au C.N.R.S.

- M<sup>me</sup> DENISE LUZZATI, Maître de Recherches au C.N.R.S.  
 M. SHIRO NAONO, Charge de Recherches au C.N.R.S.  
 M. KLAUS SCHERRER, Chargé de Recherches au C.N.R.S.  
 M<sup>me</sup> FRANÇOISE HAYES, Chargée de Recherches au C.N.R.S.  
 M<sup>me</sup> RSGINE CUKIER, Chargée de Recherches au C.N.R.S.  
 M<sup>me</sup> LUCIENNE LEGAULT, Chargée de Recherches au C.N.R.S.  
 M<sup>me</sup> LISE MARCAUD, Chargée de Recherches au C.N.R.S.  
 M. GEORGES BALASSA, Attaché de Recherches au C.N.R.S.  
 M. GÉRARD CONTESSE, Boursier de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (actuellement incorporé au contingent).  
 M. MOSHÉ YANIV, Boursier temporaire de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique.  
 M. BRUCE BRECKENRIDGE, Boursier N.I.H. et de l'Université de Washington (U.S.A.).  
 M. JONATHAN GALLANT, Boursier N.I.H. (U.S.A.).  
 M. ROBERT WEISBERG, Boursier de l'American Cancer Society (U.S.A.).  
 M<sup>lle</sup> JOSETTE ROUVIFRE, Biologiste adjointe au C.N.R.S.  
 M<sup>Ue</sup> MARIE-FRANCE GUFIRIN, Biologiste adjointe au C.N.R.S.  
 M<sup>me</sup> JACQUELINE FAGOT, Biologiste adjointe au C.N.R.S.  
 M<sup>me</sup> DANDLE GROS, Biologiste adjointe au C.N.R.S.  
 M<sup>lle</sup> ANNIE MALHIFI, Biologiste adjointe au C.N.R.S.  
 M<sup>lle</sup> MARIE-FRANCE LATARJET, Collaboratrice tan<sup>^</sup>vole.  
 M<sup>lle</sup> GENEVIÈVE MASSFI, Secrétaire (Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique).  
 M<sup>me</sup> MARTINE GUILLERMIC, Secrétaire (mi-temps), Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique.

## SERVICE DE PHYSIOLOGIE

Rapport de M. TH. CAHN, Chef de Service.

Dans le cadre de leurs études sur la régulation hormonale du métabolisme des organismes supérieurs MM. Cahn et Houget se sont particulièrement attachés ces dernières années à Faction d'une hormone du cortex de la surrénale, la cortisone, qu'ils ont administrée au Lapin *k* la dose journalière de *i* mg par kg.

Leur étude a été aussi complète que possible : ils ont chiffré les apports alimentaires quotidiens en glucides, lipides et protéines ainsi que les quantités de ces métabolites brûlées journallement par les animaux avant, pendant et après le traitement à la cortisone. En plus, ils ont déterminé chaque jour dans les périodes post-prandiale et post-absorptive le taux des glucides et des lipides sanguins, quand il y a lieu le glucose urinaire, et à certains stades du traitement le glycogène hépatique et musculaire ainsi que les lipides hépatiques.

L'ensemble des données recueillies permet pour la première fois de présenter une image d'ensemble des perturbations qu'entraîne la cortisone à dose physiologique sur la circulation et la combustion des divers métabolites.

Cette hormone ne modifie pas la valeur des dépenses énergétiques de l'animal mais elle influence profondément la combustion, la transformation et le transport des glucides et des lipides, et, à un moindre degré, la combustion des protéines.

Dès sa première injection, elle stimule l'appétit des animaux et la quantité de glucides absorbée se trouve ainsi en moyenne augmentée d'environ 10 g par Jour, et, malgré cela, on constate pendant les deux premiers jours une diminution journalière de la combustion de ce métabolite de 9 g en moyenne. Ainsi chez le Lapin alimenté il y aura journallement un apport de glucides dépassant de près de 20 g les quantités brûlées. Chez un animal normal cet excès de glucides serait en partie stocké sous forme de glycogène hépatique, et pour la plus grande part transformé en lipides de réserve, transformation que les auteurs ont montré il y a quelques années se reproduire déjà au cours de la traversée de la paroi intestinale. La cortisone abolit complètement cette lipogénèse. Malgré l'absence de ce puissant moyen de maîtriser un excès de glucides alimentaires on ne constate que de très faibles hyperglycémies pendant les deux ou trois premiers jours d'administration de cortisone. Cela est dû à une exaltation des processus de mise en réserve de glycogène dans le foie et les muscles :  
\*<sup>e</sup> troisième jour du traitement à la cortisone le foie a en effet une masse presque double de la normale et son taux de glycogène atteint la valeur extraordinaire <sup>^e</sup> 15 g pour 100 g frais en même temps que le taux du glycogène musculaire <sup>av</sup>oisine le double de ce qu'il est normalement.

Les possibilités de stockage de glucides ont alors largement atteint leurs limites et si Ton continue les injections de cortisone on voit apparaître des hyperglycémies considérables, surtout accusées dans la période post-absorptive, et qui s'accompagnent d'énormes glucosuries pouvant dépasser chez certains animaux 30 g par jour ! Pourtant, dès le troisième ou le quatrième jour des injections, on constate que l'organisme réagit contre les perturbations causées par l'hormone : la combustion des glucides reprend peu à peu son niveau habituel, atteint en général vers le cinquième jour; mais la transformation de l'excès de glucides alimentaires en lipides fait toujours défaut, ce qui explique les hyperglycémies et les glucosuries.

On remarquera que l'ensemble des résultats concernant les glucides établit d'une manière indubitable l'indépendance entre les valeurs de la glycémie et l'importance de la combustion des glucides; or très généralement c'est la conception inverse qui est acceptée, souvent implicitement d'ailleurs.

Lorsque Ton cesse les injections de cortisone les énormes dépôts de glycogène, restés jusque-là comme figés, se vident si rapidement que malgré la relâche de la combustion des glucides — qui couvre alors environ 90 % des dépenses énergétiques, pourcentage jamais atteint dans les conditions normales — malgré la reprise vigoureuse de la transformation des glucides en lipides, l'organisme se trouve inondé de glucose et c'est le deuxième jour après la cessation des injections de l'hormone que les hyperglycémies et les glucosuries sont souvent les plus fortes.

Ces dérèglements du métabolisme des glucides cessent rapidement et en quelques jours la marche des processus et la régulation de la glycémie redeviennent normales.

Le métabolisme des lipides est lui aussi fortement perturbé par la cortisone. Dès la première injection on voit la combustion des lipides s'intensifier, et cela compense la diminution de combustion des glucides. En même temps il se produit une chute profonde du taux des lipides sanguins, chute qui se maintient pendant deux jours, et qui doit être la conséquence d'une certaine inhibition du processus normal de mobilisation des graisses à partir de leurs dépôts. Cet état de choses entraîne aussi dans ce domaine une réaction de l'organisme d'une intensité extraordinaire : à partir du troisième jour d'administration de cortisone la mobilisation des lipides de réserve, entravée jusqu'ici, s'intensifie considérablement et entraîne des taux de lipides sanguins de jour en jour plus élevés, pouvant atteindre 10 fois les valeurs normales, surtout chez les femelles. Il est possible que ces taux si élevés soient dus non seulement à l'accélération des processus de mobilisation mais encore au fait que la combustion des lipides s'amenuise à partir du troisième jour d'administration de cortisone en même temps que Ton voit la combustion des glucides retrouver peu à peu son intensité habituelle. Contrairement à ce que l'on constate dans les conditions normales, cette intense mobilisation de lipides n'est pas accompagnée par un accroissement des lipides hépatiques, le foie ne joue pas son rôle de régulateur, peut-être à cause de son engorgement par les énormes dépôts de glycogène. Dès que Ton arrête les injections de cortisone, la combustion des lipides cesse, la transformation des glucides en lipides reprend avec une intensité plus forte que normalement et tout cela entraîne un nouvel accroissement du taux des lipides sanguins qui atteignent leur plus haut niveau 24 à 48 heures après la fin du

traitement *k* la cortisone. Quelques jours plus tard la combustion et le transport des lipides retrouvent leur valeur habituelle.

La cortisone a aussi une influence sur la dégradation des protéines qu'elle augmente, mais dans une assez faible mesure, chez l'animal alimenté où l'augmentation de l'alimentation assure un bilan presque équilibré. Chez l'animal jeûneur les dépenses azotées sont beaucoup plus fortement accrues par la cortisone.

L'origine alimentaire évidente de certaines des perturbations que Ton vient de voir est confirmée par les résultats obtenus chez les animaux maintenus au jeûne tout le temps de l'expérience : chez eux on ne constate pas d'hyperglycémie notable bien que la cortisone impose toujours au début une nette diminution de la combustion des glucides de réserve. Le métabolisme des lipides ainsi que leur circulation ne sont pratiquement pas touchés chez l'animal jeûneur recevant de la cortisone : la mobilisation des lipides se produit sans entraves, et on ne trouve pas les hyperlipémies réactionnelles constatées chez les animaux alimentés. Toutefois lors de la réalimentation après la fin du traitement *k* la cortisone il se produit une augmentation de la lipémie qui rappelle celle décrite plus haut, bien que d'une intensité beaucoup plus faible.

Ainsi les perturbations métaboliques qu'entraîne la cortisone rappellent grossièrement certaines des caractéristiques du diabète pancréatique au point que l'on parle couramment de « diabète cortisonique ». Pourtant des différences fondamentales les séparent : les hyperglycémies du diabète persistent pendant le jeûne alors que les hyperglycémies cortisoniques sont uniquement d'origine alimentaire; les dépôts de glycogène sont insignifiants dans le diabète, alors qu'ils sont pléthoriques dans le diabète cortisonique; les lipémies du diabète sont accompagnées de foies gras alors que les lipémies cortisoniques ne le sont pas; la fonte protéique est intense dans le diabète alors que le catabolisme azoté n'est que faiblement augmenté dans le diabète cortisonique.

---

### LISTE DES PUBLICATIONS

- Th. CAHN et J. HOUGET. « Action de la cortisone sur la circulation des métabolites chez le Lapin alimenté et jeûne ». *C. R. Acad. Sci.*, 1964, **268**, 2412.
- Th. CAHN et J. HOUGET. « Sur l'action métabolique de la cortisone ». *C. R. Acad. Sci.*, 1964, **258**, 2682.
- Th.** CAHN et J. HOUGET. « Perturbations métaboliques apportées par la cortisone chez le Lapin ». *Arch. des Sciences Physiol.*, 1964, 18, 469.

---

### COMPOSITION DU SERVICE

- M. Th. CAHN, Directeur Scientifique au C.N.R.S.  
 M. J. HOUGET, Directeur Scientifique au C.N.R.S.  
 M<sup>e</sup> M. LOURAU, Chargée de Recherches au C.N.R.S.  
 Mme G. WEISS, Collaboratrice technique au C.N.R.S.  
 M<sup>n</sup> A. FAUVEAUD, Collaboratrice technique au C.N.R.S.

## LABORATOIRE DE CHIMIE MACROMOLECULAIRE

Rapport de M<sup>m</sup>\* A. DOBRY-DUCLAUX, Chef de Laboratoire.

Comme dans les années précédentes, les sujets traités au laboratoire se divisent en deux groupes :

### I. — *CONSTITUTION CHIMIQUE DES CENTRES ACTIFS DES ENZYMES*

Les recherches de cette année font suite & celles des années précédentes. Grâce & une nouvelle méthode mise au point au laboratoire et décrite précédemment, il est devenu possible de détecter la présence des groupes basiques azotés dans les centres actifs des enzymes et de déterminer les substrats qui se fixent sur ces groupes, ainsi que le rôle qu'ils jouent dans la réaction elle-même.

Les résultats obtenus cette année sont les suivants :

1) La malate deshydrogénase contient dans son centre actif des groupes basiques azotés sur lesquels se fixe l'oxalacétate dans un sens de la réaction et le NAD<sup>+</sup> dans l'autre sens.

2) La glycérine-I-phosphate deshydrogénase contient également dans son centre actif des groupes basiques azotés sur lesquels se fixe le dihydroxyacétone-phosphate dans un sens de la réaction et le NAD<sup>+</sup> dans l'autre sens.

3) L'alcool-deshydrogénase du foie chélate le zinc par des ligands azotés, comme le fait celle de la levure, étudiée précédemment. Le mode de fixation du coenzyme oxydé et du coenzyme réduit est également identique pour les deux isoenzymes.

4) Par contre, un autre enzyme, contenant du zinc dans son centre actif, la carboxypeptidase A, ne chélate pas le zinc par des ligands exclusivement azotés. En effet, le sel de Roussin ne se fixe pas sur le chélate et n'est pas compétitif avec le substrat. Ce résultat est en accord avec celui de Vallee qui a pu mettre en évidence la fixation du zinc sur l'enzyme par un groupe sulfhydryle, & côté d'autres ligands inconnus.

5) Quant à la glucose-6-phosphate deshydrogénase, étudiée également cette année, elle ne se prête à l'essai que dans un seul sens de la réaction, ce qui restreint les conclusions qu'on peut en tirer; ni le NADP<sup>+</sup>, ni le glucose-phosphate ne se fixent sur les groupes basiques azotés.

Le nombre d'enzymes étudiés jusqu'à présent s'élève à 19. Ce nombre est encore trop restreint pour pouvoir en déduire des conclusions générales. Il serait surtout nécessaire de voir si la fixation des substrats dans chaque groupe d'enzymes, catalysant des réactions analogues, se fait sur les mêmes groupes chimiques. Dans ce but, l'effort des deux dernières années s'est porté principalement sur des deshydrogénases, agissant en présence du coenzyme I ou du coenzyme II. Parmi ces 9 deshydrogénases, deux seulement présentent une similitude complète, à savoir la malate- et la glycérine-I-phosphate deshydrogénases. Dans les deux cas, le substrat oxydé et le coenzyme oxydé se fixent sur les groupes basiques azotés. Une similitude partielle se retrouve également pour toutes les hydrogénases catalysant les acides  $\alpha$ -cétoniques jusqu'aux  $\alpha$ -alcools acides. Chez tous les quatre enzymes étudiés jusqu'à présent (malate-, lactate-, isocitrate- et glycérine-I-phosphate deshydrogénases), le substrat oxydé se fixe sur les groupes basiques azotés. L'analyse des résultats obtenus indique la participation directe de ces groupes dans chacune de ces réactions.

Les cinq autres deshydrogénases étudiées catalysent des réactions différentes, aussi la nature chimique du groupe qui fixe soit le substrat, soit le coenzyme, varie d'un enzyme à l'autre.

## II. — CHIMIE-PHYSIQUE DES MACROMOLÉCULES

Par suite de la longue absence de M. Duclaux, ses travaux entrepris en collaboration avec M<sup>me</sup> Cohn, ont été suspendus pendant des mois. Il s'ensuit que les résultats obtenus ne sont pas aussi nombreux que dans les années précédentes. Us se rapportent aux problèmes essentiels de la chimie colloïdale, à savoir au mode de la réactivité des particules colloïdales. La conception prédominante jusqu'ici était que les particules colloïdales réagissent essentiellement par absorption; comme exemple de ce mode de réaction, on citait entre autres la formation des laques colorées, puisque celles-ci ne suivaient pas en apparence les lois de la chimie. Or leur formation, comme M. Duclaux et M<sup>me</sup> Cohn ont pu le montrer, est en réalité une réaction stoechiométrique, ce qui contredit la conception purement physique d'absorption. Pour pouvoir mettre cette stoechiométrie en évidence, ils ont démontré que seuls les atomes qui possèdent des groupes ionisés (et pas les atomes qui forment la charpente tridimensionnelle) sont susceptibles de réaction chimique.

M. Duclaux et M<sup>me</sup> Cohn ont commencé récemment un travail sur la migration unilatérale de Teau à travers des membranes organiques sous l'influence de diverses substances. Ce travail débute et sera analysé dans le prochain rapport.

---

## LISTS DES PUBLICATIONS

- A. DOBRY-DUCLAUX. « Sur la détermination des sites actifs de certains enzymes. VI. Étude de l'inhibition dans les deux sens de la réaction. » *Biochim. Biophys. Acta*, 1964, 89, 1.

- J. DUCLAUX et Ch. COHN. « Sédimentation des macromolécules et mesure de la masse moléculaire. » *Journal .Chim. Phys.*, 1964, **61**, 391.
- J. DUCLAUX et Ch. COHN. « Formation des laques colorées. » *Bull. Soc. Chim. Fr.* **9**, 1964, 1600.
- 

### COMPOSITION DU LABORATOIRE

- M<sup>me</sup> A. DOBRY-DUCLAUX, Directeur de Recherches au C.N.R.S.  
M. J. DUCLAUX.  
M<sup>me</sup> Ch. COHN.  
M<sup>lle</sup> N. DAUMAS, Collaboratrice technique au C.N.R.S.  
M. W. ZASEMPA (Pologne), Boursier du Gouvernement français (à partir du 1<sup>er</sup> novembre 1964).

## Rapport de M<sup>lle</sup> NINE CHOUCROUN, Directeur de Laboratoire.

### I. — *Recherches concernant le lipopolysaccharide Pmko extrait du bacille tuberculeux.*

1) Nous avons déjà signalé l'efficacité d'une nouvelle méthode d'extraction de ce lipopolysaccharide, par disintégration ultrasonique du matériel bacillaire, dans le milieu organique oil ce constituant est précisément soluble. La connaissance des propriétés physiques et chimiques de cet antigène permet de le séparer des autres constituants de la cellule bactérienne, libérés et retenus en solution dans le milieu de suspension. Nous avons entrepris l'identification de ces autres constituants, pour des bacilles provenant de souches de virulences différentes.

2) L'étude comparative des intensités des réactions intradermiques au lipopolysaccharide Pmko et à la tuberculine, faite sur quelques centaines de sujets tuberculeux, à des stades différents de la maladie, nous avait permis d'établir l'influence de l'ancienneté de la maladie et celle du contexte évolutif de la tuberculose sur le développement de l'hypersensibilité au Pmko. L'ancienneté de la maladie, qui témoigne d'une résistance certaine à l'infection tuberculeuse, se montrait un facteur prépondérant du développement et du maintien de cette allergie, dont par ailleurs l'intensité est généralement d'autant plus forte que la tuberculose s'éloigne davantage de sa phase aiguë, pour évoluer dans un sens favorable. Ces résultats ont été confirmés, et même renforcés, dans le cas de tuberculeux pulmonaires devant subir une exérèse, par la confrontation de l'état des pièces anatomiques prélevées, avec les résultats des épreuves intradermiques pratiquées quelques jours avant l'opération. Tout semblait bien indiquer que le développement de l'hypersensibilité au lipopolysaccharide Pmko était lié aux processus de résistance contre l'infection tuberculeuse.

On pouvait se demander si la capacité de l'organisme à développer cette hypersensibilité n'était pas l'une des manifestations de sa *résistance naturelle* contre le bacille de Koch. Le fait que le cobaye, si vulnérable à l'infection tuberculeuse, développe difficilement un degré appréciable d'hypersensibilité au Pmko incitait à le croire. Mais une réponse précise ne pouvait être donnée que par des animaux de même espèce présentant génétiquement des résistances différentes au développement de l'infection par le bacille de Koch.

Un tel matériel expérimental, unique en son genre, a été patiemment constitué, au cours des trente dernières années, par le Dr. Max Lurie de Philadelphie, qui a bien voulu nous offrir de l'utiliser pour élucider certains aspects de l'action du Pmko. Il s'agit de familles de lapins lentement sélectionnés, dont le degré

de résistance à l'infection tuberculeuse est parfaitement connu, et rigoureusement déterminé par le nombre de lésions primaires qui se développent chez l'animal normal, après l'inhalation d'un nombre défini de bacilles tuberculeux virulents d'origine humaine.

Des expériences ont été entreprises dans le laboratoire du Dr. Lurie, sur des lapins appartenant respectivement à la famille T la plus résistante, à la famille C la moins résistante, et aux familles FC et AD de résistance moyenne. Les premiers résultats indiquent nettement que, dans les mêmes conditions d'immunisation avec le lipopolysaccharide Pmko, les lapins de la famille T développent le degré le plus élevé d'hypersensibilité au Pmko ; les lapins de la famille C le degré le moins élevé, et les lapins des familles FC et AD des degrés intermédiaires d'intensité de cette hypersensibilité. *La résistance naturelle de l'organisme sensible favorise le développement de l'hypersensibilité au Pmko.*

L'étude histologique précise des réactions intradermiques qui révèlent cette hypersensibilité, chez des animaux de résistance ou de susceptibilité bien définies, devrait permettre de mieux comprendre le mécanisme du développement de cette hypersensibilité au lipopolysaccharide du bacille de Koch, et son rôle dans la résistance à l'infection.

3) Comme je l'ai souvent rappelé, le polysaccharide séparé par hydrolyse alcaline du Pmko est un antigène-haptène sérologiquement très actif dans la détermination des anticorps polysaccharidiques qui se développent au cours de l'immunisation expérimentale par le bacille de Koch. Par ailleurs cet antigène sérologique est le seul qui permette une précipitation *directe* d'anticorps contenus dans le sérum des sujets tuberculeux. Les anticorps polysaccharidiques qu'il précipite ne sont décelables dans la circulation que si la tuberculose a au moins six mois d'ancienneté, mais grâce à la spécificité de la réaction, leur apparition est toujours l'indication d'une évolution de l'infection par le bacille de Koch.

Nous avons depuis longtemps cherché à utiliser ce test de précipitation pour le dépistage sérologique d'une tuberculose évolutive chez les Bovidés. Mais nous n'avons jamais réussi à obtenir de précipité spécifique avec les sérums d'animaux tuberculeux, en raison peut-être de la présence de substances inhibitrices que nous n'avons pu identifier.

Nous avons récemment essayé l'action de cet antigène sur les *globulines* isolées de ces sérums, à la fois par la méthode de précipitation directe, et par les méthodes de double diffusion et de microélectrophorèse. Ce travail qui est en cours, semble devoir apporter une solution satisfaisante au problème du dépistage de la tuberculose chez les Bovidés. Ce test serait un complément fort utile du test tuberculinique, qui n'est pas toujours l'indication que l'animal réagissant est atteint d'une tuberculose en évolution.

II. — *Vélocité de l'électrisation superficielle des spermatozoïdes* d'origine bovine, et la séparation de ces éléments selon l'importance de leur charge, se poursuit dans le sens indiqué dans nos précédents rapports. En vue de l'insémination éventuelle des populations sélectionnées par électrophorèse, c'est dans un milieu à base de lait que ces spermatozoïdes doivent être soumis à l'action du champ électrique, et nous avons dû définir à nouveau les conditions dans lesquelles,

dans ce milieu, ces éléments ne soient pas altérés par le traitement électrophorétique.

Nous avons d'autre part commencé l'étude comparative de l'électrisation superficielle de certaines cellules provenant d'animaux sensibilisés au Pmko, et des cellules homologues provenant d'animaux normaux. Cette étude pourrait permettre de mettre en évidence des anticorps cellulaires non décelables par d'autres méthodes.

---

*COMPOSITION DU LABORATOIRE*

**M<sup>lle</sup> N. CHOUCROUN**, Directeur Scientifique au C.N.R.S.

**M<sup>me</sup> J. BAZIN**, Collaboratrice technique au C.N.R.S.

**M<sup>lle</sup> C. SANSON**, Collaboratrice technique au C.N.R.S.

## **PROFESSEURS EN VISITE**

**Au cours de l'année 1964, l'institut de Biologie Physico-Chimique a reçu, pour des séjours de diverses durées, les personnalités suivantes :**

**M. G. DEL RE, Professeur à l'institut de Chimie Théorique de Naples;**

**M. W. TYSAROWSKI, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Varsovie;**

**M. S. S. COHEN, Professeur à l'Université de Pennsylvanie;**

**M. M. KAMEN, Professeur à l'Université de Californie;**

**M. J.-P. GREEN, Professeur à l'Université de Yale;**

**M. E. LOZA, Professeur à l'Université de Lodz.**

## TABLE DES MATIÈRES

COMPOSITION DU CONSEIL D* ADMINISTRATION. . . . .	5
COMPOSITION DU COMITÉ DE DIRECTION. . . . .	6
SERVICE DE BIOPHYSIQUE, rapport de M <sup>m</sup> e S. FILITTI-WURMSER, Chargé de Service. . . . .	7
SERVICE DE BIOCHIMIE THÉORIQUE, rapport de M. B. PULLMAN, Chef de Service. . . . .	17
SERVICE DE BIOCHIMIE A, rapport de M <sup>m</sup> e Y. KHOUVINE, Chargée de Service. . . . .	29
SERVICE DE BIOCHIMIE B, rapport de M <sup>m</sup> e M. GRUNBERG-MANAGO, Chargée de Service. . . . .	33
SERVICE DE PHYSIOLOGIE MICROBIENNE, rapport de M. F. GROS, Chef de Service. . . . .	44
SERVICE DE PHYSIOLOGIE, rapport de M. Th. CAHN, Chef de Service..	59
LABORATOIRE DE CHIMIE MACROMOLÉCULAIRE, rapport de M <sup>TM</sup> A. DOBRY-DUCLAUX, Chef de Laboratoire. . . . .	62
LABORATOIRE de M <sup>lle</sup> N. CHOUCROUN. . . . .	65
<b>PROFESSEURS EN VISITE. . . . .</b>	<b>68</b>

**IMPRIMERIE F. PAILLART  
ABBEVILLE**

**o. 9538-  
*Ddp6t Ugal ; \*• tritntstr\* 1965.***