

Jo. 376
1958
6

50376
1958
6

THÈSES

présentées à la

FACULTÉ DES SCIENCES

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LILLE

(mention : Sciences)

par

JAMES W HOLLEMAN

B. A., Chemistry; M. A., Biochemistry,
University of South Dakota (Vermillion) U. S. A.

le Juin 1958



PREMIÈRE THÈSE

ASPECTS DE LA STRUCTURE DE QUELQUES CHROMOPROTEIDES

DEUXIÈME THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Jury	{	M.M. GERMAIN	Président
		GLACET	}
		MONTREUIL	
		BOULANGER	

UNIVERSITE DE LILLE

FACULTE DES SCIENCES

- DOYEN : M. LEFEBVRE, Professeur de Chimie Appliquée et Chimie de la Houille.
- ASSESEUR : M. ROUELLE, Professeur de Physique et Electricité Industrielles.
- DOYENS HONORAIRES : M.M. CHATELET, PRUVOST.
- PROFESSEURS HONORAIRES: M.M. BEGHIN, CAU, CHAPELLON, CHAUDRON, CORDONNIER, DECARRIERE, DEHORNE, DOLLE, FLEURY, LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG, M.M. MAZET, A. MICHEL, NORMANT, PARISELLE, PASCAL, PAUTHENIER, WIEMANN, ZAMANSKY.
- PROFESSEURS : M.M. ARNOULT, Radioélectricité et Electronique Industrielles.
BONTE, Géologie appliquée.
BROCHARD, Physique.
CORSIN, Paléobotanique.
DECUYPER, Mathématiques Générales.
DEHEUVELS, Analyse Supérieure et Calcul des Probabilités.
DEHORS, Physique Industrielle.
Melle DELWAULLE, Chimie Minérale.
M.M. DESCOMBES, Calcul Différentiel et Intégral.
DUPARQUE, Géologie et Minéralogie.

(Professeurs)

M.M. Jean GERMAIN, Chimie Générale et
Chimie Organique.

Paul GERMAIN, Mécanique rationnelle
et Mécanique Expérimentale.

HEIM de BALSAC, Zoologie.

HOCQUETTE, Botanique Générale et
Appliquée.

KAMPE DE FERIET, Mécanique des
Fluides.

KOURGANOFF, Astronomie.

LEBEGUE, Chimie Agricole et Botanique

PEREZ, Physique P.C.B.

ROIG, Physique Générale.

ROUBINE, Physique.

SAVARD, Chimie Générale.

WATERLOT, Géologie houillère.

MAITRES DE CONFERENCES: M.M. DEFRETIN, Zoologie.

DELATRE, Géologie.

FRENKEL, Mathématiques.

GLACET, Chimie.

HEUBEL, Chimie P.C.B.

LEBRUN, Radioélectricité et Elec-
tronique.

MANDELBROT, Calcul des Probabilités.

MARTINOT-LAGARDE, Mécanique des
Fluides.

MONTREUIL, Chimie Biologique.

Louis MICHEL, Physique Théorique.

PARREAU, M.P.C.

POITOU, Méthodes Mathématiques de la
Physique.

TRIDOT, Chimie Appliquée.

SECRETARE :

Mme BOUCHEZ.

A Monsieur le Professeur GERMAIN, Président du Jury,

A Monsieur le Professeur GLACET,

qui ont accepté de juger cette thèse; nous adressons l'expression de notre respectueuse estime et de notre vive gratitude.

A Monsieur le Professeur BOULANGER,

pour le merveilleux accueil qu'il nous a réservé dans son laboratoire, plein de bienveillance et de compréhension; qu'il trouve ici l'expression de notre fierté et de notre satisfaction d'avoir collaboré avec lui et d'avoir pu contribuer à l'oeuvre de recherche menée par son groupe.

A Monsieur le Professeur MONTREUIL,

avec toute notre reconnaissance pour le plaisir que nous avons eu de collaborer avec lui dans plusieurs travaux et pour l'amitié qu'il nous a témoignée.

A Monsieur le Professeur BISERTE,

qui a constamment dirigé nos travaux; qu'il soit assuré de notre reconnaissance pour sa compréhension et son aide, jamais défaillantes; et de notre grande admiration pour ses hautes qualités scientifiques.

A Monsieur le Professeur OSTEUX,

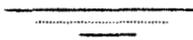
pour l'intérêt et la sympathie qu'il a témoignés à nos travaux.

A Monsieur le Professeur ROCHE,

qui a bien voulu nous parrainer au Centre National de la Recherche Scientifique; nous lui exprimons nos remerciements en même temps que notre vive admiration pour son oeuvre scientifique.

A nos camarades du Laboratoire, chercheurs et collaborateurs techniques, pour leur amitié, pour la sympathie qu'ils nous ont manifestée et l'aide qu'ils ont apportée à notre travail.

CHAPITRE I



INTRODUCTION (*)

A - NOTIONS GENERALES -

Le développement de méthodes d'hydrolyse ou d'analyse très sélectives, le développement et la généralisation de méthodes de séparation possédant un plus grand pouvoir de résolution et de méthodes d'analyse pouvant s'appliquer à de faibles quantités de substrat, ont permis, ces dernières années, l'étude du problème de la structure chimique de protéines bien caractérisées, avec l'espoir, sinon de pouvoir établir leur structure chimique complète, - ce qui devient théoriquement possible dans de nombreux cas mais qui est évidemment un travail de longue haleine, - mais au moins de pouvoir préciser certains aspects de leur structure. C'est ce que nous avons essayé de réaliser pour quelques chromoprotéides. C'est déjà une satisfaction de savoir que chaque petite avance ou chaque acquisition, soit dans le domaine technique, soit dans une compréhension plus poussée de la nature du substrat, ouvre de larges perspectives pour les travaux ultérieurs. Parfois, c'est le développement d'une technique qui met la protéine dans un état physico-chimique plus propice à l'action d'un enzyme, parfois c'est l'acquisition d'une certitude sur un aspect quelconque de la structure qui permet d'orienter les recherches dans une voie nouvelle.

Nous avons choisi, pour étudier leur structure, les protéines suivantes : hémoglobine (de Cheval), myoglobine (de cheval) et cytochrome c (de Cheval). L'intérêt de ces subs-

(*) - Bibliographie page 8. → Les numéros entre parenthèses correspondent à l'ordre d'apparition des citations dans le texte.

trats provient à la fois de l'importance de leurs fonctions physiologiques (transport d'oxygène, mise en réserve d'oxygène, transport d'électrons dans la chaîne d'oxydations intra-cellulaires), de la spécificité de leur action, qui est fonction de leur structure et de leur appartenance au groupe des protéines conjuguées. C'est justement cette conjugaison (avec un noyau porphyrinique, le protohème, dans les trois cas) qui leur donne leur caractère spécial.

L'explication des particularités de leur comportement physiologique doit être recherchée certainement dans la nature du groupement porphyrinique lui-même, dans la nature de la protéine (surtout au voisinage de ce groupement prosthétique) et dans les interactions entre ce groupement et le reste de la molécule.

Au cours de nos recherches, nous avons aussi étudié une autre protéine conjuguée, l'hémérythrine (protéine respiratoire d'un Ver marin, Sipunculus nudus). Cette protéine contient aussi du fer, comme les trois précédentes, mais celui-ci n'est pas inclus dans un noyau porphyrinique. En effet, le fer semble être contenu dans (ou lié à) la protéine sans l'intervention d'un "autre" groupement prosthétique. Ceci est, évidemment, très intéressant sur le plan de la biochimie comparée parce que cette protéine (qui se trouve aussi dans des hématies comme l'hémoglobine) joue un rôle dans la respiration de cet animal tout à fait comparable à celui de l'hémoglobine dans le sang des animaux supérieurs.

Nous n'allons pas aborder ici en détail la question de la distribution biologique de ces protéines. L'hémoglobine se trouve chez les Invertébrés aussi bien que chez les Vertébrés. En général, elle manque chez les Insectes adultes parce que leur système trachéal les dispense du besoin d'avoir une protéine qui joue le rôle de l'hémoglobine dans leur respiration, mais on la trouve dans leurs larves. Quant à la myoglobine, on la trouve partout où il y a un tissu musculaire et les cytochromes sont présents dans pratiquement toutes les cellules qui vivent en aérobiose.

Avant d'aborder le chapitre de la préparation de ces protéines, dans un état de pureté suffisante pour permettre l'étude de leur structure, il nous a semblé utile de préciser quelques points de nomenclature et de résumer brièvement les connaissances acquises sur la forme, la composition et la structure de ces composés et de définir les rapports existant entre la structure de ces composés et leur fonction physiologique.

B - NOMENCLATURE -

La difficulté de créer une nomenclature chimiquement exacte et utilisable provient justement du fait que ces molécules sont des protéines conjuguées et que le groupement prosthétique (nous ne parlons ici que des hémoprotéines) peut fixer un grand nombre de corps (gaz, ions, etc.) et donner naissance à un grand nombre de dérivés. Le groupement porphyrinique originel, le protohème, peut être remplacé par un autre (la mésohématine, par exemple) ou même être modifié in situ pour former des protéines conjuguées qui n'existent pas

dans la nature. Ces possibilités, sans parler des changements que la protéine elle-même peut subir, ont amené une certaine confusion dans la nomenclature. Plusieurs auteurs ont essayé d'apporter de l'ordre dans ce domaine. Il existe une nomenclature très détaillée et parfaitement satisfaisante, développée par CLARK et coll. (1) et par DRABKIN (2), mais son application aux hémoglobines et aux autres hémoprotéines n'est guère à envisager à cause de la complexité qu'elle entraîne.

Trois nomenclatures principales ont été suggérées. La première en date, celle de KEILIN (3), est une nomenclature "mixte", où les termes chimiques et les termes en rapport avec l'état physique de la protéine sont intriqués. Celle de LEMBERG et LEGGE (4) est une nomenclature "flexionnelle" si l'on veut, dont la particularité est l'utilisation de lettres italiennes pour indiquer le degré d'oxydation du fer. S'il n'était question que de l'hémoglobine, on pourrait être tout de suite d'accord (l'utilisation des symboles Hb pour l'hémoglobine et Hi pour l'Hémiglobine, par exemple est séduisante), mais ce système s'applique difficilement aux autres hémoprotéines et les auteurs le reconnaissent eux-mêmes.

Mais cette nomenclature a évolué dans le sens de la sélectivité et, en parcourant la littérature, on constate que c'est celle proposée par PAULING et CORYELL (5), avec quelques changements mineurs, qui semble emporter la faveur de la plupart des chercheurs, sans doute à cause de sa nature analytique qui lui donne une plus grande flexibilité. Cette flexibilité favorise l'incorporation des nouvelles connaissances, dont un exemple est fourni par la découverte récente de niveaux d'oxy-

dation du fer supérieurs à l'état ferrique dans le groupement prosthétique. Dans le produit d'oxydation de la ferrimyoglobine, par exemple, le fer semble être à l'état tétravalent et posséder la structure "ferryl". Pour la myoglobine, GEORGE et IRVINE (6) ont proposé le nom de "ferrylmyoglobine". Des constatations analogues ont été faites pour la peroxidase et la catalase. Le cytochrome c ne semble pas donner ce type de composé; ceci s'explique, sans doute, par une "adhérence" et un "camouflage" plus prononcé du groupement porphyrinique à l'intérieur de la protéine elle-même, qui assure ainsi la "protection" du fer.

Nous sommes satisfaits de constater que la dénomination "carbonyl" semble l'emporter sur les termes "carboxy-" et "carbone-monoxo-". En effet, le terme "carbonemonoxyhémoglobine" est plus long qu'il n'est besoin et le terme "carboxyhémoglobine" peut être confondu avec le produit d'addition qui se forme entre le CO_2 et l'hémoglobine. Certains auteurs ont appelé ce dernier composé "carbhémoglobine", mais maintenant que l'on sait que le CO_2 est lié sous forme d'acide carbamique, on peut l'appeler "carbaminohémoglobine".

La dénomination "myohémoglobine" ou "hémoglobine musculaire" qui est encore utilisée devrait être définitivement écartée en faveur de celle de "myoglobine", ceci par souci de simplicité et aussi parce que l'on préfère le terme "érythrocrurine" à celui d'"hémoglobine des Invertébrés", par exemple. On a pensé pendant très longtemps que la molécule de myoglobine représentait exactement le quart de celle de l'hémoglobine. Or, bien que le poids moléculaire soit effectivement le quart de celui de l'hémoglobine, la compo-

tion en acides aminés est nettement différente (ROCHE et MOURGUE) (7). Selon KRÜGER (8), la myoglobine correspondrait, du point de vue phylogénétique, plutôt aux hémoglobines extra-cellulaires des Invertébrés qu'aux hémoglobines intra-cellulaires des Vertébrés, mais ce fait ne semble pas prouvé. Il est intéressant de noter la présence d'une myoglobine dans le coeur et dans les muscles adducteurs de certains Mollusques, alors que le pigment sanguin est une cu-proprotéine, l'hémocyanine (BALL et MEYERHOF) (9).

La nomenclature des cytochromes est également très imparfaite. En effet, le nombre de cytochromes découverts jusqu'à ce jour est très important (cytochromes a_1 , a_2 , a_3 , a_4 ; cytochromes b , b_1 , b_2 , b_3 , b_4 , b_5 , b_6 , cytochromes c , c_1 , c_2 , c_3 , c_4 , c_5). Plusieurs de ces composés ont des dénominations très diverses, par exemple le cytochrome b_5 est identique au cytochrome b' et au cytochrome m ; le cytochrome c_3 est également connu sous le nom de cytochrome 553. C'est pour remédier à ces anomalies que l'Union Internationale de Biochimie a formé, en 1957, une Sous-Commission qui doit s'efforcer d'homogénéiser la nomenclature des cytochromes.

BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE I

- BALL E. et MEYERHOF B.- J. Biol. Chem., 1940, 134, 483 (9)
- CLARK W., TAYLOR J., DAVIES T. et VESTLING C.-
J. Biol. Chem., 1940, 135, 543 (1).
- DRABKIN D.- J. Biol. Chem., 1942, 142, 855 (2).
- GEORGE P. et IRVINE D.- Biochem. J., 1955, 60, 596 (6)
- KEILIN D.- Proc. Roy. Soc., 1926, 100 B, 129 (3).
- KRÜGER F.- Biol. Generalis, 1941, 15, 456 (8)
- LEMBERG R. et LEGGE J.- "Hematin Compounds and Bile Pigments",
Interscience Publishers, New-York,
1949 (4).
- PAULING L. et CORYELL C.-
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S., 1936, 22
210 (5).
- ROCHE J. et MOURGUE M.- Compt. Rend., 1941, 212, 773 (7).

C H A P I T R E I I
- - - - -

GENERALITES SUR LA STRUCTURE DE L'HEMOGLOBINE,
DE LA MYOGLOBINE, DES CYTOCHROMES ET DE
L'HEMERYTHRINE (✱).

(✱) - Bibliographie, page 24.

A - POIDS MOLECULAIRES, NOMBRES DE CHAINES PEPTIDIQUES

I - HEMOGLOBINE -

a) - Poids moléculaire. - Le poids moléculaire de l'hémoglobine est remarquablement constant dans toutes les espèces supérieures. Chez les Mammifères et même chez tous les Vertébrés, - avec seulement une exception ou deux, - ce poids moléculaire est de l'ordre de 66 - 67.000 et la protéine contient toujours 4 hèmes : le rapport d'une molécule d'hème pour une "unité protéique" d'environ 16.000 est toujours respecté. Cette constatation est assez étonnante lorsque l'on pense que ces hémoglobines possèdent une composition sensiblement différente et surtout que leur molécule ne semble même pas avoir le même nombre de chaînes peptidiques.

b) - Nombre de chaînes peptidiques. - Les hémoglobines sont des molécules pluripeptidiques; mais le nombre de chaînes varie suivant les substrats.

A l'aide de la méthode des dinitrophénylamino-acides, PORTER et SANGER (1) ont, en effet, déterminé les acides aminés N-terminaux suivants :

- Hémoglobine de Cheval et d'Ane :	6 résidus de valine
- Hémoglobine de Boeuf, de Mouton: et de chèvre :	2 résidus de valine 2 résidus de méthionine.

Le nombre de résidus terminaux dans les hémoglobines de l'Homme adulte a été plus difficile à déterminer avec certitude (voir travaux de PORTER et SANGER (2), de RHINESMITH et al.)(3).

Toutefois, à la suite des travaux de MASRI et SINGER (4), de RHINESMITH, SCHROEDER et PAULING (5), on peut admettre que le nombre de résidus de valine est de quatre par molécule. Mais, d'après RHINESMITH et al. (6), la molécule est constituée de deux types de chaînes différentes (chaînes A et B). Après un temps court d'hydrolyse de la DNP-hémoglobine, un peptide N-terminal (DNP-Val-Leu) (*) est libéré presque quantitativement des deux chaînes identiques (Chaîne A), tandis que les deux radicaux de valine provenant des chaînes B sont libérés beaucoup plus lentement et uniquement sous forme de DNP-aminoacides.

(*) - Au cours de notre travail, pour désigner les acides aminés et la constitution des enchaînements peptidiques, nous utiliserons la convention de BRAND et EDSALL (8) qui désigne les résidus d'acides aminés par les trois premières lettres de leur nom. Exemples : alanine, ala; glycocolle, gly. Exceptionnellement, les abréviations suivantes sont employées : isoleucine, ileu; hydroxyproline, HO-pro; glutamine, glu-NH₂; asparagine, asp-NH₂; cystéine, cySH; cyS : désignation d'un demi-résidu de cystine.

Ces abréviations sont utilisées pour la nomenclature des peptides : ainsi le cystéinyl-glycocolle (H₂N - CH - (CH₂SH) CO - NH - CH₂ - COOH) s'écrit : (cySH-gly). Nous voudrions faire remarquer que cet usage est plus qu'une convention : c'est une terminologie classique en Chimie Organique. En effet, le cystéinyl-glycocolle est un glycocolle acylé (sur son groupement H₂N) ou un acyl-glycocolle (cystéinyl-glycocolle). Evidemment, un résidu comportant plusieurs groupements fonctionnels peut être différemment acylé : la sérine, par exemple, forme des dérivés O-acylé et N-acylé.

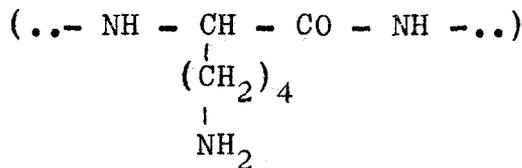
D'après les règles de SANGER (9), lorsque l'ordre des résidus d'acides aminés est connu dans un peptide, on écrit par exemple leu.gly.phe.ser, ou leu-gly-phe-ser. Lorsque l'ordre d'enchaînement n'est pas entièrement connu, on place les abréviations des acides aminés entre parenthèses; exemple : leu-(gly, phe).

Dans les hémoglobines humaines foetales, le nombre de résidus de valine est différent (2,6 pour PORTER et SANGER) (7) : le nombre de chaînes est donc de deux ou de trois).

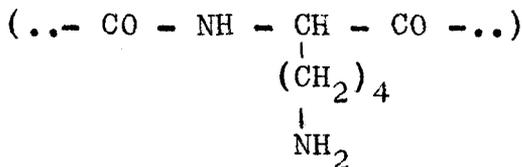
Les résultats obtenus par la méthode des dinitrophénylaminoacides sont beaucoup plus valables que ceux qui ont été antérieurement obtenus par les méthodes de désamination à l'acide nitreux. CHIBNALL (13), par cette méthode, avait trouvé 16 groupes α-aminés libres : ce qui impliquerait l'existence de 16 aminoacides N-terminaux. Ces résultats anormaux s'expliquent par les incertitudes de la méthode de désamination.

(*) - suite de la note de la page II.

Pour BAILEY (10), dans un polypeptide, l'acide aminé porteur d'un groupement α-aminé libre est le résidu N-terminal; celui qui porte le groupe α-carboxylique libre est le résidu C-terminal. Cette nomenclature n'est certes pas entièrement exacte, mais elle est commode et descriptive. FROMAGEOT et coll. (11) ont proposé une autre nomenclature : l'acide aminé qui porte le groupe α-NH₂ libre est le résidu "initial", celui qui porte le groupe α-COOH libre est le résidu "terminal". Enfin, un résidu d'acide aminé peut-être engagé dans une liaison peptidique de deux manières, soit par son groupement α-carboxylique, soit par son groupement α-aminé. Dans le premier cas, on ajoute yl à l'abréviation du nom de l'acide aminé : par exemple, les liaisons arginyl- ou lysyl-acides aminés



Dans le second cas, on ajoute ine à l'abréviation du nom de l'acide aminé (par exemple les liaisons arginine ou lysine :



(ROVERY, DESNUELLE et BONJOUR) (12). Dans ce dernier cas, il me semble utile de dire acyl...ine : exemple liaison acyl-lysine.

2 - MYOGLOBINE.-

a) - Poids moléculaire.- Le poids moléculaire des myoglobines semble se situer entre 16 et 18.000. Elles contiennent toutes un seul hème.

La molécule de globine de la myoglobine est donc sensiblement quatre fois plus petite que celle de la globine de l'hémoglobine. Toutefois, il n'est pas possible de considérer cette molécule comme une sous-unité de l'hémoglobine : car les compositions en acides aminés des deux molécules diffèrent sensiblement.

b) - Nombre de chaînes peptidiques. - La myoglobine de Cheval possède une molécule de glyco-colle comme acide aminé N-terminal : elle est donc unipeptidique (PORTER et SANGER)(14).

Le groupe N-terminal est donc différent de celui de l'hémoglobine de Cheval (valine). Ceci constitue un argument supplémentaire pour distinguer nettement les deux protéines.

La séquence N-terminale de la myoglobine de Cheval, déterminée par la méthode des phénylthiohydantofines de EDMAN (15), est la suivante : gly - leu.. (INGRAM) (16).

La myoglobine de Baleine est terminée par une molécule de valine (SCHMID) (17).

3 - CYTOCHROMES.-

a) - Poids moléculaires.- Le poids moléculaire des différents types de cytochromes est faible et voisin de 13-15.000.

Quelques valeurs obtenues par des méthodes de principes différents sont rassemblées dans le Tableau I.

Il ne semble pas y avoir de différences essentielles entre les poids moléculaires déterminés par des méthodes identiques des cytochromes c d'espèces animales différentes.

Le cytochrome B₅ possède un poids moléculaire légèrement supérieur.

Tableau I

Poids moléculaire de différents cytochromes.

Cytochrome c de Levure	13.000	(MATSUBORA & coll.)(18)
Cytochrome c d'un champignon (<u>Ustilago sphaerogena</u>)	18.000	(NEILANDS) (19)
Cytochrome c (Boeuf)	12.350 ± 175	(TINT et REISS) (20)
Cytochrome c (Cheval)	12.270 ± 125	(TINT et REISS)
Cytochrome c (Porc)	13.000 ± 125	(TINT et REISS)
Cytochrome c (Poule)	13.270 ± 80	(TINT et REISS)
Cytochrome c (Boeuf)	15.000	(ATLAS et FARBER)(21)
Cytochrome b ₅ (cytochrome microsomial de STRITT- MATTER et VELICK)	17.000	(STRITTMATTER et VELICK) (22).

Il y a donc une analogie certaine entre les différents types de cytochromes. Il est évident que la vérification de ces poids moléculaires dépendra, en dernière analyse, de la connaissance exacte du nombre de résidus de chaque acide aminé dans la molécule.

Ces analogies entre les différents cytochromes se retrouvent, d'ailleurs, dans la teneur en fer de ces molécules (cytochrome c de Boeuf : 0,43 p. 100 (*); Poulet : 0,41 p. 100; Saumon : 0,45 p. 100) (PALEUS) (23).

(*) - La méthode classique de KEILIN et HARTREE (1937) (24) permettait d'obtenir un cytochrome c contenant 0,34 p. 100 de fer. L'utilisation de méthodes plus sélectives a permis une purification plus poussée des préparations de KEILIN et HARTREE.

De même, l'activité enzymatique, rapportée à la teneur en fer, est la même pour les différents cytochromes, et les spectres d'absorption (à l'état réduit ou oxydé) sont très comparables : ce qui permet de penser que l'environnement intramoléculaire groupé autour du groupement prosthétique doit aussi être très comparable.

Cependant, la façon dont les cytochromes sont "fixés" dans la cellule n'est pas obligatoirement identique. On sait que le cytochrome c est associé à la partie mitochondriale de la cellule (HOGEBOM et SCHNEIDER) (25) et on pense qu'il fait partie d'un complexe protéique dans les mitochondries elles-mêmes.

Or, les cytochromes c d'origine différente ne sont pas toujours extraits d'une façon identique : le cytochrome c du coeur de Boeuf est extrait de l'homogénat musculaire par de l'acide dilué, tandis que le cytochrome c du champignon Ustilago sphaerogena est extrait par de la soude diluée (NEILANDS) (26).

c) - Nombre de chaînes peptidiques. - À l'aide de la méthode des dinitrophényl-aminoacides, la détermination des groupes α -aminés terminaux libres de la molécule (cytochrome c de Cheval) n'a pas donné, jusqu'à présent, de résultats certains. Les conclusions de MARGOLIASH (27) (présence de deux résidus d'histidine) restent très discutables. Nous reviendrons plus loin sur cette question que nous avons longuement étudiée.

La détermination du nombre de groupements α -aminés par des méthodes de désamination a conduit à des résultats inacceptables (10-11 groupes α -aminés) (THEORELL et AKESON) (28).

4 - HEMERYTHRINE -

a) - Poids moléculaire. - Les résultats obtenus pour ce chromoprotéide non porphyrinique sont assez peu nombreux. Le poids moléculaire du chromoprotéide isolé de Sipunculus nudus est de 66.000 (détermination par osmométrie par ROCHE et ROCHE) (29), celui du chromoprotéide de Phascolosoma gouldii est de 120.000 (LOWE) (30).

b) - Nombre de chaînes peptidiques. - Là également, la détermination du nombre de chaînes peptidiques est très délicate. Nous reviendrons aussi plus loin sur ce détail de structure que nous avons étudié sur l'hémérythrine de Sipunculus nudus.

B - TAILLE ET FORME DES MOLECULES.

Tous ces composés (hémoglobine, myoglobine, cytochrome) sont des protéines globulaires. A l'aide de diverses méthodes physiques (diffusion de la lumière, diffusion, ultracentrifugation, hydratation, cristallographie, etc.) on a pu démontrer que ces molécules ont à peu près une forme arrondie, toutefois légèrement plus longue que large (BRAGG et PERUTZ) (31).

Par l'étude de la dispersion des rayons X, ARNDT et RILEY (32) ont montré que les acides aminés de ces protéines sont "arrangés" sous la forme de l'hélice α de PAULING (soit 3,7 radicaux d'acides aminés par tour de spire). L'interprétation des études cristallographiques permet de préciser que le

nombre de chaînes "cristallographiques" est de beaucoup supérieur à celui que l'on peut déceler par des méthodes chimiques : les chaînes peptidiques sont donc retournées sur elles-mêmes. Il est probable, d'ailleurs, que ces chaînes qui présentent de nombreuses plicatures ne sont pas parallèles (CRICK) (33).

Ces observations ont une incidence certaine sur le fonctionnement physiologique de ces substances, car cette disposition a pour effet d'amener dans des positions correctes les groupements fonctionnels (noyau imidazole, par exemple).

Les hèmes seraient disposés à la surface de la molécule.

Pour l'hémoglobine et la myoglobine, l'orientation des groupements prosthétiques est connue (INGRAM et KENDREW (34), INGRAM, GIBSON et PERUTZ (35)). Toutefois, leur position dans la molécule ne l'est pas. L'angle avec la surface de la protéine est de 40-50° dans la myoglobine et de 32-36° dans l'hémoglobine.

Les molécules de certaines hémoglobines se dissocient réversiblement dans certaines conditions (urée, dilution, changement de pH). Récemment, REICHMANN et COLVIN (36) ont démontré que la molécule de l'hémoglobine de Cheval peut être dissociée en 4 sous-unités de masse moléculaire approximativement égale, mais dont 2 ont un comportement électrophorétique différent.

C - UNION DU GROUPEMENT PROSTHETIQUE ET DE LA PROTEINE

I) - Hémoglobine - Myoglobine.

La réaction caractéristique des hémoglobines et des myoglobines est leur oxygénation réversible, sans oxydation rapide de l'atome de fer qui reste à l'état ferreux. GEORGE (37) a pu démontrer que l'exothermicité élevée de la réaction d'oxygénation vis-à-vis de la réaction d'oxydation est largement responsable de ce phénomène. La réaction la moins spécifique des hémoprotéines est justement l'oxydation du fer. Par contre, dans le cytochrome c, cette réaction devient spécifique à cause de la position très particulière du groupement porphyrinique dans la protéine.

Dans l'hémoglobine, la liaison hème-globine se fait par l'intermédiaire de l'atome de fer.

L'hémoglobine et la myoglobine (à un degré beaucoup moindre) présentent le phénomène décrit sous le nom de l'"effet BOHR" (38). Par oxygénation, la protéine devient plus "acide" et cet effet a une grande importance au cours du fonctionnement physiologique de ces protéines, surtout de l'hémoglobine. Cet effet a été lié à la présence d'un résidu d'histidine de la protéine, dont le groupement imidazole est lié à l'atome de fer. Lorsque la molécule d'eau qui occupe normalement la sixième position de coordination est déplacée par l'introduction d'une molécule d'oxygène, cette liaison est défaite, et un proton est dissocié. Ceci constitue donc un exemple d'interaction entre le groupement prosthétique et la protéine. Les - COOH des deux groupements propioniques du

noyau porphyrinique semblent aussi être impliqués dans les interactions noyau porphyrinique-protéine. On peut envisager, en effet, une liaison électrovalentielle avec des groupes fortement basiques de la globine (ξ -aminé de la lysine; guanidique de l'arginine).

L'union groupe prosthétique-globine se fait donc certainement par plusieurs points des molécules en présence, ce qui assure une plus grande solidité et une meilleure spécificité à la liaison.

Le cytochrome c présente aussi l'"effet BOHR" (THEORELL et AKESON) (39), mais en dehors des limites physiologiques de pH.

Il existe d'autre part des interactions entre les groupements prosthétiques eux-mêmes, et ces interactions seraient responsables de la forme sigmoïde de la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine. Plusieurs théories ont été proposées pour expliquer ce phénomène; il semble qu'il soit accompagné de changements de configuration de la protéine, et les travaux de GEORGE (40) indiquent qu'il s'agirait d'un resserrement des chaînes entre-elles.

En résumé, dans l'hémoglobine et la myoglobine, la porphyrine est associée par son atome de fer avec un = NH d'un résidu d'histidine. Cette liaison est perturbée par la formation de certains complexes. Des changements de configuration ont lieu simultanément.

L'ionisation d'un autre groupement de la protéine, -

certainement aussi un résidu d'histidine, - est également influencée par la formation des complexes. Mais à cause de l'orientation des hèmes, il est trop loin du fer pour lui être lié directement.

2) - Cytochromes. -

Dans le cytochrome c, par contre, l'hème semble être fortement lié entre deux groupes imidazoles de l'histidine et le fer est ainsi "protégé" : le fer sert donc comme un réservoir d'électrons.

Mais, dans le cytochrome c, le groupement prosthétique est également lié à la protéine par deux liaisons covalentes supplémentaires, des liaisons thio-éthers formées entre 2 résidus de cystéine de la protéine et les 2 groupements vinyliques de la porphyrine. Ceci explique la grande stabilité de cette substance vis-à-vis des agents dénaturants, des acides, etc.. En effet, pour rompre cette liaison, il faut traiter la protéine par des sels d'argent ou de mercure, dans des conditions assez brutales.

L'existence de ces liaisons thio-éthers a permis à TUPPY et BODO (41) et à TUPPY et PALEUS (42) de déterminer la séquence des 12 acides aminés situés au voisinage du groupement prosthétique (voir figure 1). Les deux molécules de cystéine sont séparées par 2 autres résidus : ala-glu (NH₂) dans les cytochromes de Cheval, de Boeuf, de Porc et de Saumon, et -ser-glu (NH₂) dans le cytochrome c de Poulet. Cette séquence contient une seule molécule d'histidine, immédiatement après le deuxième résidu de cystéine.

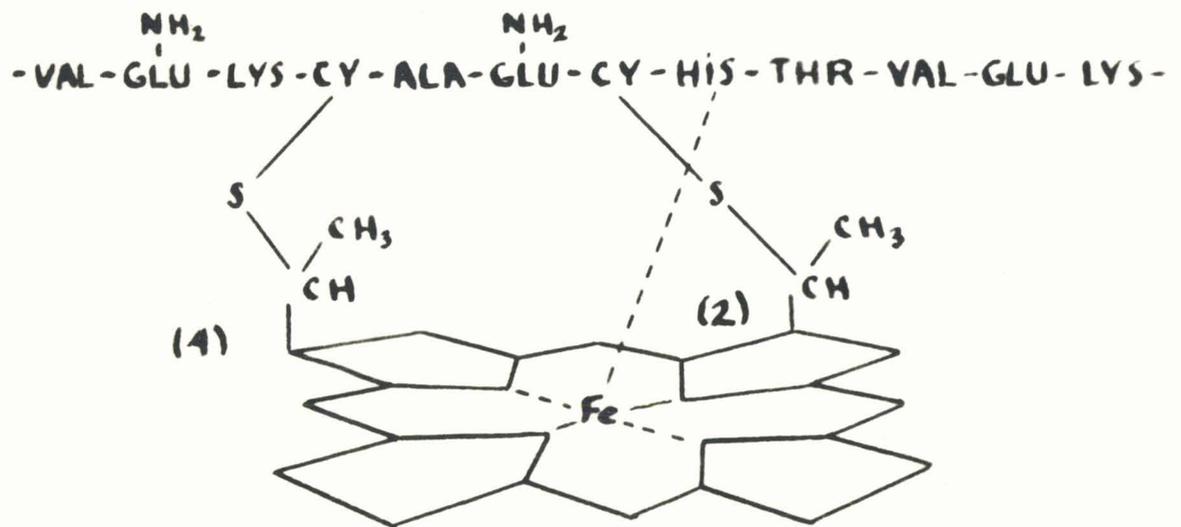


Fig.1

REPRÉSENTATION SCHEMATIQUE DU MODE D'ATTACHE
 DU NOYAU PORPHYRINIQUE À LA CHAÎNE
 PEPTIDIQUE

A l'aide de modèles moléculaires, EHRENBERG et THEORELL (43) ont montré que cette structure peptidique était compatible avec une configuration en hélice α comportant 3,7 résidus d'acides aminés par tour de spire. Les deux résidus de cystéine se trouvent du même côté de l'hélice en position favorable pour la formation des liaisons thio-éthers avec l'hème. Enfin, la position de l'histidine rend possible aussi la liaison avec le fer.

La deuxième molécule d'histidine provient d'une autre partie de la molécule. Selon MARGOLIASH (44), cette histidine serait en position N-terminale. Nous discuterons plus loin cette éventualité.

3) - Hémérythrine. -

Le mode d'union du métal et de la molécule n'a pas encore été précisé d'une façon définitive. Le fer se dissocie facilement à l'état ionique à des pH inférieurs à 5 et il est certain que le complexe auquel il est fixé dans la molécule n'est pas porphyrinique. Selon KLOTZ (45), deux atomes de fer sont directement fixés à la protéine par des chaînes latérales sulfhydrylées. Nous discuterons plus loin cette hypothèse.

Le fer passerait à l'état ferrique au cours de l'oxygénation.

- - - - -

La revue rapide de nos connaissances sur les hémoprotéines nous en montre l'étendue, mais aussi les insuffisances. Au cours de notre travail, nous avons cherché à combler quelques-unes de ces lacunes. Nous avons précisé des points particuliers de la préparation délicate de ces substrats, étudié la composition en acides aminés à l'aide de la méthode des dinitrophénylaminoacides de LEVY, abordé la question très obscure des groupes terminaux du cytochrome c et de l'hémérythrine et indiqué les conditions d'hydrolyse enzymatique spécifique et ménagée de la myoglobine.

- - - - -

BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE II

- ARNDT U. et RILEY D.- Phil. Trans. Roy. Soc., 1950, A 247,
409 (32).
- ATLAS S.M. et FARBER E.-
J. Biol. Chem., 1956, 219, 31 (21)
- BAILEY K., cité dans F. SANGER.-
Adv. Prot. Chem., 1952, 7, I.
Academic Press New-York (10).
- BOHR C., HASSELBALCH K. et KROGH A.-
Scand. Arch. Physiol., 1904, 16, 402(38).
- BRAGG L. et PERUTZ M.-Proc. Roy. Soc. 1954, 225 A, 264 (31).
- BRAND E. et EDSALL J.-
Ann. Rev. Biochem., 1947, 16, 223 (8).
- CHIBNALL A.-
Proc. Roy. Soc., 1942, B1 31, 136, (13).
- CRICK F.-
Acta Cryst., 1953, 6, 685 (33).
- EDMAN P.-
Acta Chem. Scand., 1950, 4, 283 (15).
- EHRENBERG A. et THEORELL H.-
Nature, 1955, 176, 158 (43).
- FROMAGEOT C., JUTISZ M., MEYER D. et PENASSE L.-
Compt. Rend., 1950, 250, 1905 (II).
- GEORGE P.-
"Currents in Biochem. Research". 1956
Interscience, New-York (37, 40).
- HOGEBOM G. et SCHNEIDER W.-
J. Biol. Chem., 1952, 194, 513 (25).
- INGRAM V.-
Biochim. Biophys. Acta, 1955, 16, 599(16).
- INGRAM D. et KENDREW J.-
Nature, 1956, 178, 905 (34).
- INGRAM J., GIBSON J. et PERUTZ M.
Nature, 1956, 178, 906 (35).

- KEILIN D. et HARTREE E.-
Proc. Roy. Soc., 1937, 122 B, 298 (24).
- KEILIN D. et HARTREE E.-
Biochem. J., 1945, 39, 289, (24).
- KLOTZ I.M., KLOTZ T.A. et FIESS H.A.-
Arch. Biochem. Biophys., 1957, 68, 284 (45).
- LOWE W.E.-
Biochim. Biophys. Acta, 1957, 23, 465(30).
- MARGOLIASH E.-
Nature, 1955, 175, 293 (27, 44).
- MASRI M. et SINGER K.-Arch. Biochem. Biophys., 1955, 58, 414 (4).
- MATSUBORA H., HAGIHARA B., HORIO T. et OKUNUKI K.-
Nature, 1957, 179, 250 (18).
- NEILANDS J.-
J. Biol. Chem., 1952, 197, 701 (19, 26).
- PALEUS S.-
Svensk. Kemisk Tidskrift, 1955, 67, 273
(23).
- PORTER R. et SANGER J.-
Biochem. J., 1948, 42, 287 (1, 2, 7, 14).
- REICHMANN M. et COLVIN J.-
Can. J. Chem., 1956, 34, 411 (36).
- RHINESMITH H., SCHROEDER W. et PAULING L.-
J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 609 (3).
- RHINESMITH H., SCHROEDER W. et PAULING L.-
J. Am. Chem. Soc., 1957, 79, 4682 (5,6).
- ROCHE J. et ROCHE A.- Bull. Soc. Chim. Biol., 1935, 17, 1494(29).
- ROVERY M., DESNUELLE P. et BONJOUR G.-
Biochim. Biophys. Acta, 1950, 6, 166 (12).
- SANGER F.-
Adv. Prot. Chem., 1952, 7, I. Academic Press
- SCHMID K.-
Nature, 1949, 163, 481 (17).

- STRITTMATTER P. et VELICK S.F.-
J. Biol. Chem., 1956, 221, 253, (22).
- THEORELL H. et AKESON A.-
J. Am. Chem. Soc., 1941, 63, 1804, 1818
et 1820 (39).
- THEORELL H. et AKESON A.-
Arkiv. Kemi. Mineral. Geol. 1943, 17B,
n^o 7 (28).
- TINT H. et REISS W.- J. Biol. Chem., 1950, 182, 385 et 397
(20).
- TUPPY H. et BODO G.- Monatsh. Chem., 1954, 85, 807, 1024 et
1182 (41).
- TUPPY H. et PALEUS S.-
Acta Chem. Scand., 1955, 9, 364 (42).
- - - - -

C H A P I T R E I I I
- - - - -

PREPARATION DE L'HEMOGLOBINE, DE LA MYOGLOBINE,

DE L'HEMERYTHRINE ET DU CYTOCHROME C (*)

(*) - Bibliographie, page 52.

A - HEMOGLOBINE. -

De ces protéines, l'hémoglobine est certainement la plus facile à isoler. La plupart des méthodes d'isolement comportent le lavage des hématies, leur éclatement par hémolyse et la cristallisation du chromoprotéide. Nous avons suivi essentiellement la méthode de FERRY et GREEN (1) modifiée par DRABKIN (2).

Selon LEMBERG et LEGGE (3), les critères d'une bonne préparation d'oxyhémoglobine sont les suivants : "Complete solubility in the pH range 5 to 9, freedom from contamination by stroma debris, and finally the minimum of hemoglobin". Ces critères ont été développés pour l'obtention d'une solution d'oxyhémoglobine destinée à des études physiologiques et un critère supplémentaire doit être exigé pour les études de structure chimique : l'absence complète d'autres protéines, c'est-à-dire l'homogénéité protéique. Le contaminant le plus habituel des solutions d'hémoglobine est sans doute la catalase. En effet, cette protéine est préparée à partir d'un hémolysat d'érythrocytes : l'hémoglobine est éliminée par dénaturation par EtOH-CHCl₃ et la catalase est précipitée sélectivement. Au cours de la cristallisation de l'hémoglobine, une partie de la catalasé peut être précipitée, mais cette co-précipitation varie suivant les espèces et n'est pas considérable pour l'hémoglobine de Cheval. De toutes façons, en opérant des contrôles spectrophotométriques de nos diverses préparations d'hémoglobine, nous n'avons jamais eu la preuve qu'elles contenaient de la catalase.

Pour éviter la formation de ferrihémoglobine qui conduit à la dénaturation, nous avons d'abord fait barboter du

gaz d'éclairage dans la suspension d'hématies lavées, en présence de dithionite. Mais nous avons abandonné ce procédé en constatant que l'hémoglobine ainsi préparée ne montrait pas le spectre caractéristique de la carbonylhémoglobine mais plutôt celui d'une hémoglobine nitrée.

Pour les préparations ultérieures, nous avons préparé le CO à partir de l'acide sulfurique et de l'acide formique. Il est préférable aussi de réduire avec le réactif de STOKES (tartrate de fer et d'ammonium) (HAWK, OSER et SUMMERSON) (4) plutôt qu'avec la dithionite qui peut donner une certaine oxydation de la protéine par réaction secondaire.

Le mode opératoire que nous avons adopté est le suivant : le sang est recueilli sur oxalate (concentration finale de 3 p. 100), refroidi, lavé six fois par centrifugation avec une solution de chlorure de sodium (d'abord à 0,9 p. 100, puis à 1,2 p. 100). On ajoute 1 volume d'ammoniaque 0,01 M et 0,4 volume de toluène. On laisse l'hémolyse se poursuivre pendant plusieurs heures en chambre froide sous agitation. On centrifuge. La solution d'hémoglobine est filtrée d'abord sur de la laine de verre puis sur du papier filtre. A ce stade, on sature la solution en CO et on ajoute un léger excès de réactif de STOKES. On dialyse contre de l'eau saturée en oxyde de carbone pendant plusieurs jours. Un léger précipité formé au cours de la dialyse est enlevé par filtration et l'hémoglobine est précipitée par l'addition de petites quantités de sulfate d'ammonium jusqu'à environ 54 p. 100 de saturation, en ajustant constamment le pH aux environs de 6,8 par des additions de soude à 10 p. 100. La catalase commence à précipiter aux environs de 60 p. 100 de saturation. Le

précipité est repris dans une quantité d'eau permettant d'obtenir une solution à 10 p. 100 d'hémoglobine. La précipitation est répétée deux fois.

Le précipité final est dissous dans de l'eau saturée en oxyde de carbone pour obtenir une solution à environ 10 p. 100 d'hémoglobine. La solution est dialysée contre une solution de sulfate d'ammonium à 90 p. 100 de saturation, ajustée à pH 6,8 et saturée en oxyde de carbone.

La solution de sulfate d'ammonium est changée plusieurs fois jusqu'à cristallisation. Un précipité amorphe est éliminé. Les cristaux sont lavés trois fois par décantation dans la solution de sulfate d'ammonium. Une partie des cristaux a été gardée ainsi en contact avec le liquide de cristallisation et une autre partie a été dissoute dans de l'eau saturée en oxyde de carbone et traitée encore par le réactif de STOKES, puis dialysée. Une partie a été congelée et une autre partie gardée simplement en chambre froide. Selon DRABKIN (5), l'hémoglobine peut très bien être lyophilisée, mais nous n'avons pas eu de succès avec ce procédé (manque de solubilité après séchage).

B - MYOGLOBINE. -

La myoglobine de Cheval a d'abord été obtenue à l'état cristallisé par THEORELL (6). L'essentiel de sa méthode comprend les étapes suivantes : précipitation des autres protéines de l'extrait par l'acétate de plomb, élimination de ce réactif avec du phosphate de sodium, fractionnement du filtrat avec du sulfate d'ammonium et cristallisation. Or,

l'élimination de l'acétate du plomb est délicate et des changements de pH peuvent se produire. Aussi, nous avons préféré utiliser la méthode de ROCHE et al. (7), en tenant compte aussi des travaux de BOWEN (8). Pour des études physiologiques ou spectrophotométriques, le contaminant principal est l'hémoglobine qui provient du sang resté dans le tissu musculaire, mais pour des études de structure, on doit éliminer aussi d'autres protéines qui ne sont pas des hémoprotéines. Heureusement, la myoglobine est très soluble et cette propriété permet la précipitation de la presque totalité des autres protéines présentes avant d'entreprendre la cristallisation de la myoglobine elle-même.

Les diagrammes de ROCHE et al. (9) font ressortir une plus grande solubilité des préparations amorphes que des préparations cristallisées vis-à-vis des concentrations croissantes de sulfate d'ammonium. Nous avons donc modifié les conditions de BOWEN en opérant avec des préparations amorphes, de façon à transposer tout le système de fractionnement à un niveau plus concentré en sel neutre. Nous avons aussi gardé la protéine à l'état de carbonylmyoglobine, comme pour l'hémoglobine, en saturant le premier liquide d'extraction avec de l'oxyde de carbone, en présence du réactif de STOKES.

Le problème pratique posé au cours de la préparation de la myoglobine est le contraire de celui rencontré pour l'hémoglobine, où le contaminant est plus soluble que le produit cherché.

Si un milieu contient deux protéines dont les courbes de solubilité chevauchent, un précipité de la première

protéine, la moins soluble, contiendra un peu de la protéine la plus soluble entraînée par co-précipitation. Pratiquement, il est donc plus intéressant, si c'est possible, d'éliminer les impuretés par précipitation que d'obtenir la protéine pure par cristallisation, en essayant de ne pas précipiter les impuretés. Comme ROCHE et al. (10), nous avons donc préféré la purification suivant la première modalité, mais en partant de la préparation selon BOWEN et en calculant par des essais témoins le titre de la solution de sulfate d'ammonium nécessaire pour laisser la myoglobine en solution.

Le mode opératoire adopté est donc le suivant:

Des coeurs de Cheval sont recueillis frais à l'abattoir et perfusés par voie artérielle à l'aide d'une grande quantité de sérum physiologique pour enlever le maximum d'hémoglobine. Ils sont mis dans de la glace pour le transport au laboratoire. Le tissu adipeux et conjonctif est éliminé. Les coeurs sont d'abord hachés, puis le tissu ainsi haché est broyé finement mécaniquement en présence de deux volumes d'eau refroidie préalablement saturée en oxyde de carbone. La purée tissulaire est abandonnée une nuit à 0° C., sous atmosphère d'oxyde de carbone (grands bocal, fermés par une feuille de polyéthylène). Le lendemain, on centrifuge et on décante le liquide surnageant auquel on ajoute un léger excès de réactif de STOKES. Après une nouvelle saturation en oxyde de carbone, le liquide est filtré sur papier en faisant attention que le liquide ne mousse pas. Evidemment, on enlève les globules graisseux de la solution.

1) - Purification par cristallisation.-

L'extrait est amené à 50 p. 100 de saturation en ajoutant du sulfate d'ammonium solide sous agitation. Le pH est ajusté à 6,8 par de l'ammoniaque. Après un certain temps de repos, le précipité est enlevé par centrifugation. Le surnageant est saturé en sulfate d'ammonium et abandonné une nuit en chambre froide. Le précipité rougeâtre est recueilli par centrifugation, lavé par une solution saturée de sulfate d'ammonium et dissous dans un volume d'eau (saturée en CO) égal à 4/10èmes du poids de coeur traité. La solution, ajustée à pH 7,2, est dialysée contre une solution saturée de sulfate d'ammonium pendant 3 semaines (avec 3 changements du sulfate d'ammonium du milieu extérieur). Au bout de ce temps, le contenu du sac à dialyse est centrifugé doucement et le surnageant (ainsi que les matières amorphes) enlevés par aspiration. Le résidu est mis en suspension dans du sulfate d'ammonium saturé et versé dans un récipient cylindrique. On laisse déposer les cristaux par gravité, et on aspire la solution surnageante et les matières amorphes plusieurs fois. Le précipité obtenu est enfin soumis à un fractionnement selon la technique de ROCHE et al. (II).

2) - Purification par précipitation des impuretés.-

Le produit obtenu par le procédé de cristallisation décrit ci-dessus est redissous et soumis à une purification par précipitation des impuretés. Une solution à environ 0,2 p. 100 de myoglobine est ajustée à une concentration en sulfate d'ammonium légèrement inférieure à celle qui fait apparaître un léger trouble (cette concentration est déterminée au

préalable sur des échantillons de solution). Puis, on ajoute de petites quantités de sulfate d'ammonium jusqu'à l'apparition d'un trouble. On laisse reposer 2-3 jours, puis on filtre et on continue l'addition de sulfate d'ammonium saturé. Nous avons trouvé deux zones de précipitation : entre 63 et 67 p. 100 de saturation et entre 79 et 83 p. 100 de saturation. Le précipité était formé d'une protéine non colorée et d'un peu de la myoglobine entraînée, surtout dans la dernière zone. Nous avons ensuite saturé complètement la solution par l'addition de sulfate d'ammonium solide et nous avons recueilli le précipité de myoglobine qui a été repris dans de l'ammoniaque 0,01 M saturée en oxyde de carbone et traitée par le réactif de STOKES.

La solution est dialysée contre de l'eau saturée en oxyde de carbone. Cette solution a été finalement lyophilisée. Au cours de la lyophilisation l'oxyde de carbone s'en va, mais cette méthode évite le danger d'une oxydation de la protéine par l'oxygène qui se dégagerait de l'oxymyoglobine.

3) - La question de l'homogénéité de la myoglobine.-

En 1946, THEORELL et DE DUVE (12), en opérant avec la myoglobine humaine, ont noté la présence d'une protéine jaunâtre, plus acide que la myoglobine et précipitant avec celle-ci dans le sulfate d'ammonium. Cette protéine a été enlevée par électrophorèse libre de TISELIUS. Cette substance a été décelée aussi dans la myoglobine préparée à partir d'urine (cas de myoglobinurie). Plus tard, THEORELL et EHRENBURG (13) ont décelé par électrophorèse deux fractions non colorées dans des préparations de myoglobine de Cheval, et LEWIS en étudiant

la stabilité de diverses hémoprotéines vis-à-vis des acides a mis en évidence trois fractions, dans une préparation à 94 p. 100 de pureté électrophorétique. Plus tard, ce même auteur (travaux inédits, cités dans LEWIS et SCHWEIGERT) (15) a séparé, par électrophorèse à pH 8, trois fractions colorées. Il est donc possible que même les meilleures préparations de myoglobine soient encore complexes. Toutefois, notre préparation semble très pure. De toute façon, elle ne donne qu'un seul acide aminé terminal, avec seulement quelques traces d'autres acides aminés qui proviennent d'une adsorption sur la protéine elle-même. Le spectre d'absorption obtenu (MbCO) est identique à celui donné par BOWEN (16) (*). Le taux de fer de notre préparation est de 0,32 p. 100.

C - CYTOCHROME C.-

La plus grande difficulté technique de la préparation de cette protéine provient de sa faible concentration dans les cellules. Quant au traitement lui-même, le fait que le groupement porphyrinique soit lié à la protéine par deux liaisons thio-éthers permet certaines "libertés" qu'on ne peut prendre avec les autres hémoprotéines. On doit, toutefois, éviter les

(*) - En ce qui concerne la spectrophotométrie, nous avons voulu faire des spectres dans l'ultra-violet. Or, aux longueurs d'onde inférieures à 350 m μ , la protéine est dénaturée et un trouble se forme qui empêche des lectures ultérieures. Vraisemblablement l'oxyde de carbone est remplacé par l'oxygène de l'atmosphère et la protéine est oxydée en ferrimyoglobine. Pour effectuer de telles études, il serait donc nécessaire d'utiliser une cellule fermée, comme celle décrite par THEORELL et de DUVE (17).

trop grandes variations de pH, le chauffage, les contacts prolongés avec des acides, car toutes ces opérations lui font perdre la plus grande partie de son activité enzymatique. Nous avons donc choisi des méthodes de préparation "douce".

I) - Préparation du cytochrome suivant la méthode de KEILIN et HARTREE.-

Le mode opératoire adopté est le suivant : Nous avons traité 73 kgs de coeurs de Cheval par la méthode de KEILIN et HARTREE (18) pour avoir 8,3 g de cytochrome c brut, contenant 0,34 p. 100 de fer. Cette préparation a servi de base pour une purification sur colonne selon la technique de MARGOLIASH (19), en tenant compte des observations développées par BOARDMAN et PARTRIDGE (20) sur la nature des attractions existant entre la protéine et la résine à échange d'ions à différents pH et degrés de saturation en cations.

Les coeurs sont perfusés avec du sérum physiologique et ramenés au laboratoire dans de la glace comme pour la préparation de la myoglobine. Les tissus adipeux et conjonctif sont enlevés. Le coeur découpé en morceaux est haché par un hachoir à viande. La viande hachée est broyée finement mécaniquement avec une quantité égale d'acide trichloracétique 0,145 N ajoutée par petites portions. KEILIN et HARTREE recommandent de laisser la suspension à la température de la pièce pendant 3-4 heures, mais nous l'avons laissée une nuit en chambre froide. La suspension est centrifugée et le précipité est rejeté. Le surnageant est ajusté à pH 7,3 avec de la soude diluée. On ajoute 500 g de sulfate d'ammonium par litre de filtrat. On abandonne le mélange une heure ou deux et on filtre.

Au surnageant clair, on ajoute 25 ml d'acide trichloracétique à 20 p. 100 par litre de filtrat pour précipiter le cytochrome c. Cette opération est la plus délicate de la méthode. En effet, on ne doit laisser la protéine en contact avec l'acide que le minimum de temps. On recueille le précipité par centrifugation, on le lave par du sulfate d'ammonium saturé et neutralisé (150 ml environ par kg de coeur). On dissout le précipité dans le minimum d'eau. La solution est dialysée contre une solution 0,01 M d'ammoniaque, pour éviter l'adsorption de la protéine sur la cellophane, jusqu'à élimination totale du sulfate d'ammonium. Un léger précipité non coloré se forme dans le sac à dialyse. On ajoute trois millilitres de chloroforme, on mélange et on filtre. La solution peut être gardée telle quelle, mais nous l'avons précipitée en la versant dans 6 volumes d'acétone refroidie. Le précipité lavé à l'acétone est séché.

2) - Fractionnement sur colonne (MARGOLIASH) (21).-

Une quantité de résine Amberlite IRC-50 (résine carboxylique faiblement acide) de grain fin (résine tamisée sur un tamis français 200) est mise en suspension dans de l'eau contenue dans une éprouvette. La partie trop fine de la résine est enlevée par décantation. Le résidu est suspendu dans un excès de SO_4H_2 2N dans un vase à précipiter et chauffé à 60-80° C., lavé plusieurs fois à l'eau, suspendu dans de l'ammoniaque 2 N puis lavé à l'eau. Ce traitement est répété trois fois. La résine (sous forme NH_4^+) est versée dans la colonne et lavée à l'eau, avant d'y ajouter la solution de cytochrome c. Les particules de résine étant très fines, une certaine pression est nécessaire pour faire couler le liquide.

Nous avons été amenés à construire des colonnes schématisées sur la Figure 2.

Légende de la Figure 2

Schéma de montage des colonnes d'Amberlite IRC 50

Le bouchon supérieur (B.S.) est en caoutchouc mis en forme, taillé à la meule et maintenu sur la colonne contre la pression hydrostatique par une barrette de bois (BA) et des élastiques (EL). Le passage d'air (P.A.) est très utile, à la fois pour faire pression sur le niveau du liquide dans la colonne, mais aussi au cours du remplissage de la colonne. En effet, le meilleur remplissage est fait d'une façon "différentielle", en laissant une partie des grains en suspension s'échapper par la sortie d'air, tandis qu'une autre partie descend dans la colonne. Un remplissage très homogène en résulte.

La forme du bas de la colonne est également importante. Le bouchon de laine de verre ne doit pas aller jusqu'au bout, mais laisser un petit volume libre. La sortie montante de la colonne est un capillaire afin de diminuer son volume et d'éviter une trop grande diffusion des substances dissoutes. Ces deux facteurs permettent d'obtenir une séparation nette des différentes fractions sortant de la colonne. La sortie réelle de la colonne est plus haute que le niveau de la résine : de cette façon, on peut laisser fonctionner la colonne la nuit pour les lavages, régénérations, etc., sans danger de dessiccation.

- - - - -

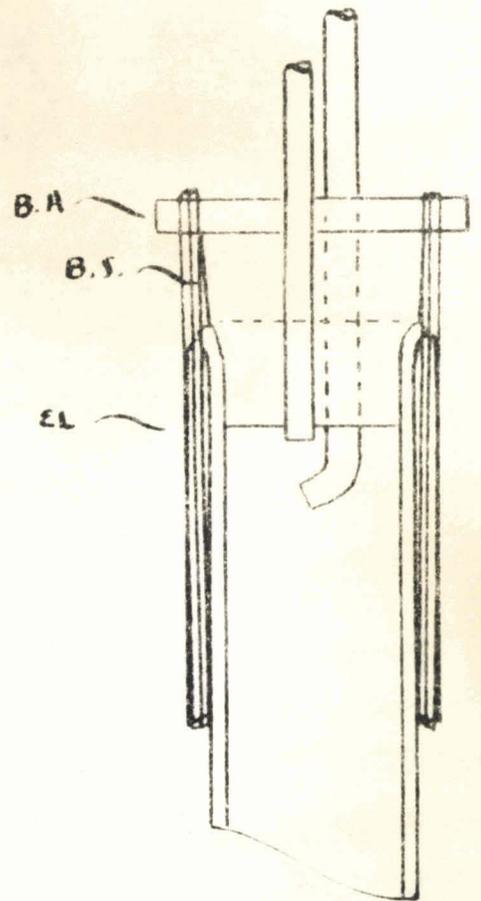
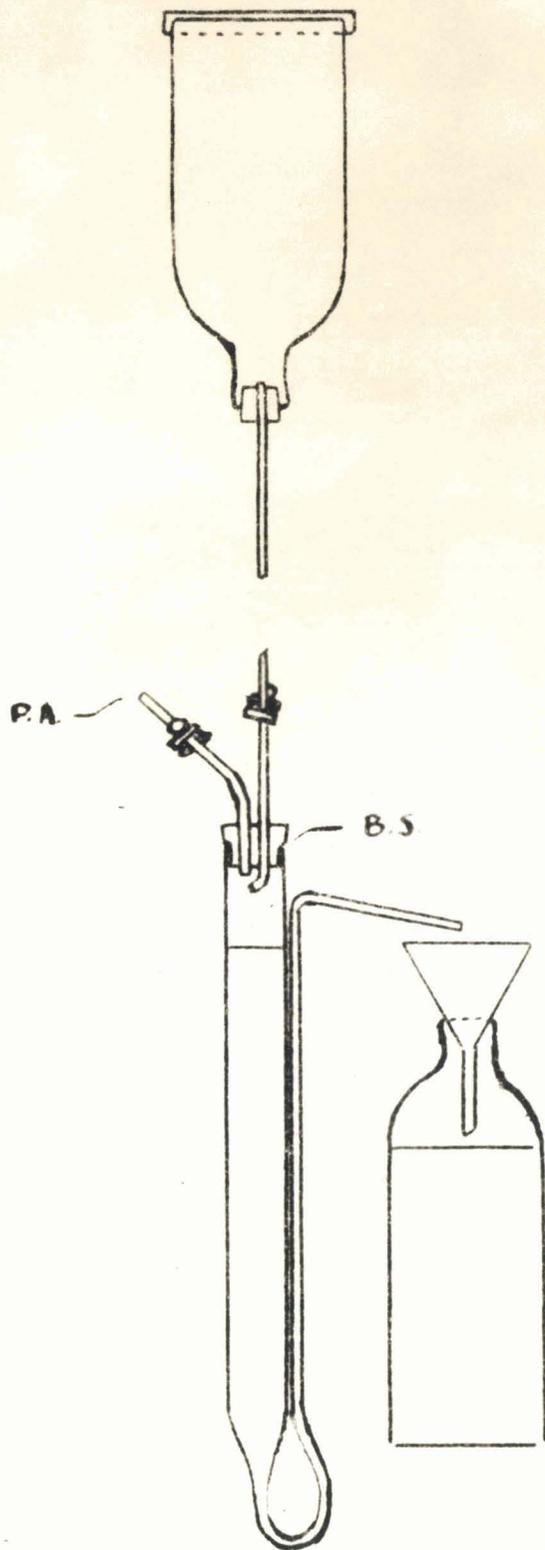


FIG. 2

Les colonnes ont un diamètre intérieur d'environ 2 cm et une hauteur de 42 cm.

Le cytochrome c brut est dissous dans un tampon acétate d'ammonium 0,025 M de pH 7, ce qui correspond à une solution d'environ 0,05 p. 100; si la concentration en cations est trop élevée, le cytochrome c est trop fortement absorbé. On laisse passer la solution jusqu'à formation d'une bande colorée de 1,5 à 2 cm. Après affleurement du niveau du liquide à la surface de la résine, on remplit le réservoir d'eau et on lave pendant la nuit. Le lendemain, on développe la colonne avec le tampon acétate d'ammonium 0,25 M de pH 7. On constate l'apparition de trois bandes ; une première bande jaunâtre qui n'est pas du cytochrome, une deuxième contenant la plus grande partie du cytochrome et une troisième bande qui reste en haut de la colonne et qui représente du cytochrome c inactivé (cette bande peut être éluée par de l'ammoniaque 0,5 N). La deuxième bande est recueillie, dialysée et chromatographiée de nouveau de la même façon, mais avec un tampon acétate d'ammonium/ammoniaque 0,25 M de pH 9,6. A ce stade, nous avons modifié légèrement la technique en transformant entièrement la fraction 2 en ferricytochrome c par un léger excès de $\text{Fe}(\text{CN})_6 \text{K}_3$ et en dialysant. En effet, le ferricytochrome c seul donne une bande plus étroite qu'un mélange de ferri- et ferrocytochrome et, de toute façon, la fraction 2 mise sur la colonne et développée à pH 9,6 a tendance à s'oxyder spontanément. Le lavage et l'éluion permettent d'éliminer encore une fraction qui n'est pas du cytochrome et une fraction inactive. Ces différentes fractions ont été dialysées et séparées encore une fois sur une colonne à pH 7, dialysées de nouveau et lyophilisées. Les rendements suivants ont été obtenus :

<u>Fraction 2</u> : ferricytochrome c	2,8 g
<u>Fraction 2 a</u> : cytochrome c enzymatique- ment actif mais paraissant légèrement mo- difié (couleur saumon plutôt que rouge).....	1,5 g
<u>Fraction 3</u> : cytochrome c inactivé	1,7 g
soit au total :	6,0 g

2,3 g d'impuretés ont été éliminés.

3) - Contrôle de pureté de la préparation de cytochrome.-

1^o) - Teneur en fer :

Le dosage du fer par la méthode à l'o-phénanthroline de DRABKIN (21) nous a donné les résultats suivants :

Ferricytochrome c	0,452 p. 100
Fraction 2 a (modifié).....	0,454 p. 100
Fraction 3 (inactivé).....	0,484 p. 100

La dernière valeur, qui est élevée, peut s'expliquer par une absorption de groupements porphyriniques sur le cytochrome c inactivé, ces groupements provenant de l'action des acides sur la myoglobine, par exemple.

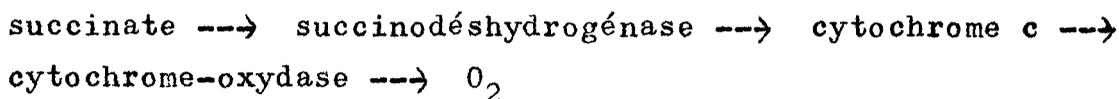
2^o) - Contrôle enzymatique.

L'activité enzymatique a été étudiée par les techniques de SCHNEIDER et POTTER (22) (*).

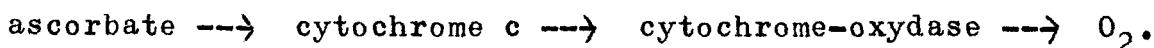
(*) - Nous tenons à remercier tout particulièrement Monsieur le Professeur OSTEUX qui a réalisé ces essais.

Les réactions utilisées sont les suivantes :

- succinodéshydrogénase :



- cytochrome-oxydase :



Les essais ont été effectués en fioles manométriques de WARBURG avec un homogénat de foie de Rat normal (souche Wistar) suivant la disposition représentée dans le tableau 2.

Activité succinodéshydrasique.

Des essais préalables ont montré qu'en l'absence de succinate la consommation en oxygène des fioles A, B et C était négligeable. L'activité succinodéshydrasique s'exprime en Q_{O_2} , c'est-à-dire le nombre de mm^3 d'oxygène consommé par 10 mg de tissu frais en 20 minutes en présence de cytochrome surajouté.

Si nous représentons par A et B les consommations moyennes des quatre premières périodes de dix minutes, nous aurons :

$$Q_{O_2} = 2B = 4A = \frac{4A + 2B}{2}$$

Activité cytochrome-oxydasique.

Pour éliminer la consommation d'oxygène produite par

Cette valeur est alors soustraite de toutes les moyennes des fioles D, E et F et on calcule alors comme précédemment les Q_{O_2} de chaque fiole, soit le chiffre de mm^3 d'oxygène consommé en 20 minutes par 10 mg de tissu frais.

Les résultats d'une expérience-type sont rapportés dans le tableau 3.

Tableau 3

Moyenne de consommation d'oxygène, exprimée en mm^3 , de quatre périodes consécutives de dix minutes.

	A	B	C	D	E	F
Cytochrome Debat	18	36	6	28	40	54
Cytochrome personnel	17,5	34	8,5	30	46	59

Activité succino-deshydrogénasique :

a) - Cytochrome de référence :

$$Q_{O_2} = 2B = 4A = \underline{72}$$

b) - Cytochrome personnel :

$$Q_{O_2} = 2B = \underline{68}$$

$$= 4A = \underline{70}$$

Activité cytochrome-oxydasique :

a) - Cytochrome de référence :

$$\text{auto-oxydation} = D - (E - D) - (F - C) = 2$$

$$\begin{aligned} Q_{O_2} &= (D - 2) \times 10 \times 2 = \underline{520} \\ &= (E - 2) \times \frac{10}{1,5} \times 2 = \underline{507} \\ &= (F - 2) \times 5 \times 2 = \underline{520} \end{aligned}$$

b) - Cytochrome personnel :

$$\text{auto-oxydation} = D - (E - D) - (F - C) = I$$

$$\begin{aligned} Q_{O_2} &= (D - I) \times 10 \times 2 = \underline{580} \\ &= (E - I) \times \frac{10}{1,5} \times 2 = \underline{600} \\ &= (F - I) \times 5 \times 2 = \underline{580} \end{aligned}$$

D - HEMERYTHRINE.-

Les vers marins SIPUNCULUS NUDUS ont été récoltés sur les bancs de sable au large de Concarneau lors des grandes marées de Septembre (*).

La préparation de l'hémérythrine a été conduite suivant les indications techniques de FLORKIN (23) et de ROCHE (24). Le mode opératoire est très voisin de celui qui permet la préparation de l'hémoglobine.

I) - Préparation de l'hémérythrine.

Les vers marins Sipunculus sont découpés dans le sens de leur longueur. Le liquide coelomique de leur cavité est

(*) - Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur Jean ROCHE qui a très aimablement permis cette récolte au Laboratoire Océanographique du Collège de France à Concarneau, ainsi que Monsieur BOUXOM qui l'a contrôlée et Monsieur BLSERTE qui a guidé la préparation du substrat.

recueilli (six litres ont été obtenus à partir de 500 - 550 vers). Le liquide coelomique, qui contient des hématies nucléées et d'autres éléments cellulaires, est filtré dans un sac à plancton. Après un repos d'une heure, le liquide est soigneusement décanté en évitant d'entraîner la couche sédimentée au fond du récipient, qui est constituée de cellules jaunâtres et de sable. Le liquide coelomique est centrifugé 20 minutes à vitesse moyenne et la couche surnageante est éliminée. Les culots de globules sont alors centrifugés à vitesse rapide. Dans ces conditions, le tube à centrifuger est constitué de haut en bas de 3 couches différentes, une couche liquide, une couche de cellules jaunes et une couche de globules rouges. La couche liquide est enlevée à la pipette et la couche de cellules jaunes aspirée à la seringue. Le culot de globules est lavé 4 à 5 fois à l'eau de mer. A chaque centrifugation, la couche de cellules jaunes formée est aspirée à la seringue. On obtient, dans ces conditions, 200 ml de globules. On y ajoute 400 ml de sérum physiologique à 9 p. 1000. Après un certain temps de contact, pour assurer l'hémolyse, le mélange est centrifugé afin d'éliminer les stromas cellulaires.

Le liquide brun violacé est dialysé contre l'eau courante. Au bout de 36 heures, la solution est centrifugée pour éliminer un précipité jaunâtre.

Le surnageant est dialysé alors contre de l'eau distillée pendant 8 jours. Au bout de ce temps, nous n'avons plus observé de précipitation massive de l'hémérythrine comme l'indique ROCHE dans sa technique. Cette solution est hétérogène en électrophorèse sur papier (Figure 3 a); elle contient au moins trois composants : le composant majeur est seul coloré en brun avant toute révélation.

Figure 3

Contrôle électrophorétique de la préparation d'hémérythrine (électrophorèse sur papier à pH 8,9).

- a) : solution d'hémérythrine brute (après hémolyse)
 - b) : précipitation acétonique de la solution d'hémérythrine brute.
 - c) : précipitation alcool-éther (FLORKIN) de la solution d'hémérythrine brute.
 - d) : précipitation de l'hémérythrine à 40 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium.
 - e) : précipitation de l'hémérythrine à 45 p. 100 de saturation.
 - f) : contrôle de l'homogénéité électrophorétique de l'hémérythrine obtenue après précipitation au sulfate d'ammonium.
-

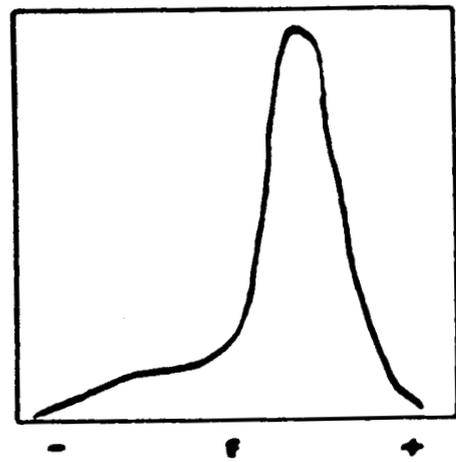
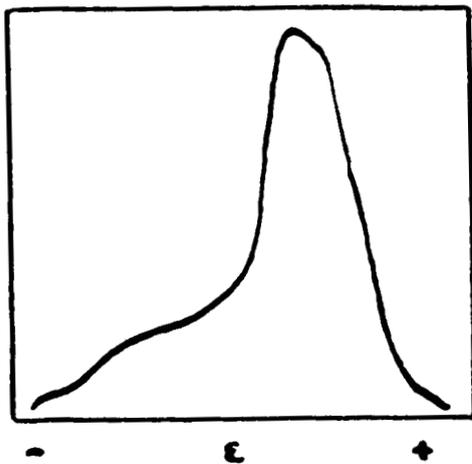
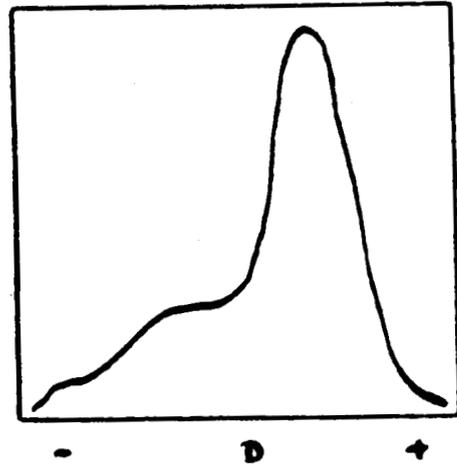
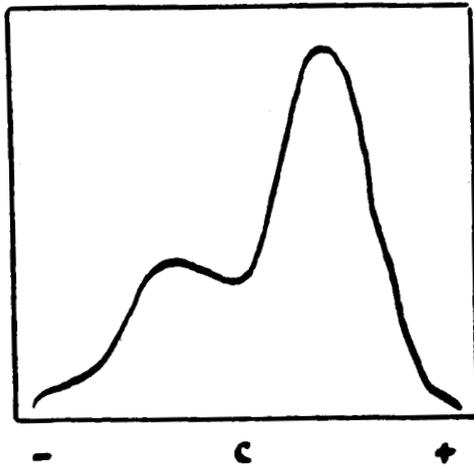
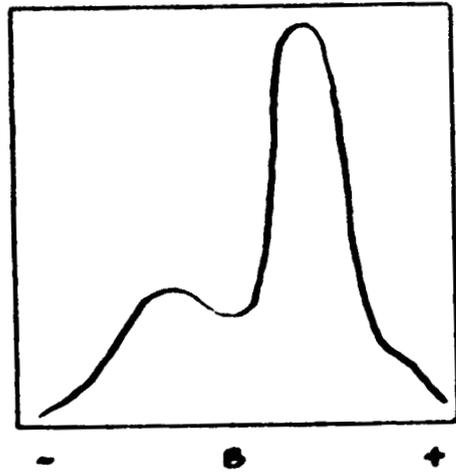
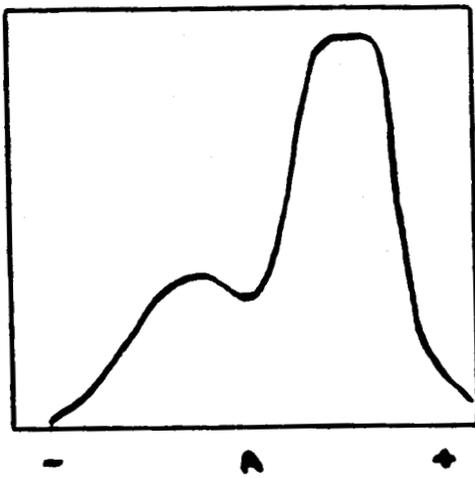


Fig. 3

La précipitation acétonique de cette solution conduit à un mélange de deux protéines électrophorétiquement distinctes (Figure 3 b).

La précipitation alcoolique suivant la méthode de FLORKIN (25) (précipitation à 25 p. 100 d'alcool en présence de 5 p. 100 d'éther sulfurique) conduit également au mélange de plusieurs protéines (Figure 3 c). Comme l'indique FLORKIN (26), nous avons donc essayé la précipitation au sulfate d'ammonium. Les contrôles électrophorétiques des précipitations à 40 et 45 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium démontrent l'hétérogénéité des fractions (Figures 3 d et 3 e). Il ne nous a donc pas semblé utile de modifier les conditions expérimentales de FLORKIN (précipitation à 50 p. 100 de saturation), puisque l'abaissement du taux de saturation n'amenait pas d'améliorations appréciables.

Nous avons précipité la solution d'hémérythrine brute par le sulfate d'ammonium à 50 p. 100 de saturation. Le précipité recueilli par centrifugation est mis en suspension dans l'eau distillée et dialysé à + 3° C. contre l'eau courante (48 heures), puis contre l'eau distillée (24 heures). Au bout de ce temps, un précipité jaunâtre qui se forme est éliminé par centrifugation. La solution est remise en dialyse à + 3° C. pendant 15 jours.

L'électrophorèse sur papier de cette protéine montre son homogénéité (Figure 3f) : les impuretés ne représentent que 8 p. 100 de l'ensemble.

Après cette dialyse, le précipité cristallin est recueilli, lavé à l'acétone et séché (hémérythrine pure cristallisée). La solution, encore très riche en hémérythrine,

est traitée par vingt volumes d'acétone. Le précipité est lavé à l'acétone puis plusieurs fois à l'éther (hémérythrine pure amorphe).

Après le traitement acétonique, la protéine est insoluble. Pour obtenir l'hémérythrine sous forme native, nous avons essayé de purifier la solution par électrophorèse de zone sur amidon. Ces tentatives n'ont pas été couronnées de succès, parce que la protéine est fortement adsorbée sur l'amidon et donne lieu à des effets de traînée importants.

Sur cette préparation, nous avons déterminé la teneur en fer. Elle est de 0,87 p. 100 : ce qui représente environ 10 atomes de fer pour une molécule de poids moléculaire égal à 66.000, le taux de fer est donc légèrement inférieur à ceux qui avaient été antérieurement trouvés (1 pour 100 environ). (KLOTZ) (27) trouve aussi une teneur moyenne de 0,81 p. 100 pour l'hémérythrine de Phascolosoma gouldii.

2) - Préparation de la protéine de l'hémérythrine et du groupe prosthétique.-

Pour obtenir la protéine de l'hémérythrine et éliminer le fer, il suffit de mettre en suspension l'hémérythrine amorphe dans de l'acétone contenant 10 p. 100 (vol/vol) d'acide chlorhydrique N. Après une agitation vigoureuse et un temps de contact de 30 minutes, la protéine est récupérée par centrifugation, lavée à l'acétone chlorhydrique, à l'acétone pure, puis à l'éther : elle se présente sous la forme d'une poudre blanche.

Dans le surnageant acétonique, coloré en jaune brun, on ajoute une quantité de soude N égale à la quantité d'acide chlorhydrique utilisée. Après une nuit de contact, un précipité brun s'est formé qui adhère aux parois du vase. Après décantation de l'acétone, le précipité brun est lavé à l'alcool à 95° C. à plusieurs reprises, puis à l'éther. Le fer de ce précipité brun est à l'état ferrique. Le précipité brun est soluble dans l'acide chlorhydrique 5,6 N. Après une hydrolyse à 100° C., pendant 24 heures, l'hydrolysât étudié en chromatographie bidimensionnelle, montre la présence d'une tache brune importante de R_F faible dans le butanol/ acide acétique et dans le phénol, et une tache faiblement ninhydrine positive qui ne correspond à aucun des acides aminés connus.

Les solutions de lavage alcooliques du précipité brun sont filtrées et abandonnées à la température du laboratoire. Au bout de quelques heures, les solutions deviennent louches et, le lendemain, il s'est formé un précipité blanc abondant que l'on recueille par centrifugation, lavé à l'alcool et séché (voir tableau 4). Il ne nous a pas été possible de déterminer la nature de ce composé : il ne précipite pas avec le nitrate d'argent en milieu nitrique, il donne un précipité blanc verdâtre avec le nitrate d'argent seul, il fait virer la phénolphtaléine au rose, ne donne pas la réaction à la ninhydrine, se colore en vert très pâle avec le dithionate de potassium.

Il ne nous est pas possible d'affirmer que ce dernier composé fasse partie d'un éventuel groupement prosthétique.

SCHEMATISATION DE LA PREPARATION D'HEMERYTHRINE

Liquide coelomique
centrifugation
Hématies nucléées
hémolyse --> centrifugation
Solution d'hémérythrine brute
dialyse --> centrifugation
Précipitation à 50 p.100 de
saturation en sulfate d'ammonium
dialyse --> centrifugation
Solution d'hémérythrine
Précipité cristallin
(hémérythrine cristallisée)
Précipitation acétonique
Précipité d'hémérythrine
pure amorphe
Traitement à l'acétone chlorhydrique
Protéine de l'hémérythrine
Solution acétonique jaune --> neutralisation
Précipité brun lavage à l'alcool
(Fer III) Précipité blanc
(nature inconnue)

EN CONCLUSION GENERALE de ce chapitre, nous pouvons affirmer que nous avons obtenu des substrats répondant aux critères de pureté indispensables pour mener à bien une étude chimique de ces substances.

Nous avons été amenés à faire un choix parmi les nombreuses méthodes proposées et à modifier des points de préparation particulièrement délicats. Nous avons détaillé suffisamment la description de ces techniques afin que celles-ci puissent être reprises, - sans danger et sans inconvénients, - par les expérimentateurs.

- - - - -

- BOARDMAN N., et PARTRIDGE S.-
Nature, 1953, 171, 208 (20).
- BOWEN W.-
J. Biol. Chem., 1948, 176, 747 (8, 16).
- DRABKIN D.-
J. Biol. Chem., 1941, 140, 387 (21).
- DRABKIN D.-
J. Biol. Chem., 1946, 164, 703 (2, 5)
- FERRY R. et GREEN A.-
J. Biol. Chem., 1929, 81, 175 (1).
- FLORKIN M.-
Archives Int. Physiol., 1933, 36, Fasc. 2 et 3 (23, 25, 26).
- HAWK P., OSER B. et SUMMERSON W.-
"Practical physiological chemistry", 12th ed.,
Blakiston, Philadelphia (4).
- KEILIN D. et HARTREE E.-
Proc. Roy. Soc., 1937, B 122, 298 (18).
- KLOTZ I.M., KLOTZ T.A. et FIESS H.A.-
Arch. Biochim. Biophys., 1957, 68, 284 (27).
- LEMBERG R. et LEGGE J.-
Hematin compounds and bile pigments. Inter-
science, New-York. 1949 (3).
- LEWIS U.-
J. Biol. Chem., 1954, 206, 109 (14).
- LEWIS U. et SCHWEIGERT B.-
J. Biol. Chem., 1955, 214, 647 (15).
- MARGOLIASH E.-
Biochem J., 1954, 56, 529 (19, 21).
- ROCHE J.-
Bull. Soc. Chim. Biol., 1933, 15, n° 10 (24).
- ROCHE J., DERRIEN Y. et VIEIL H.-
Bull. Soc. Chim. Biol., 1942, 24, 1018 (7, 9
10, 11).
- SCHNEIDER W.C. et POTTER F.R.-
J. Biol. Chem., 1943, 149, 217 (22).
- THEORELL H.-
Biochem. Z., 1932, 252, 1 (6).
- THEORELL H. et DE DUVE C.-
Arch. Biochem. Biophys., 1947, 12, 113(12,17).
- THEORELL H. et EHRENBERG A.-
Acta Chem. Scand., 1951, 5, 823 (13).

C H A P I T R E I V
- - - - -

COMPOSITION EN ACIDES AMINES (HEMERYTHRINE, MYOGLOBINE,
CYTOCHROME C).

Exposé technique de la méthode de dosage utilisée (*)

(*) - Bibliographie, page 76.

A - NOTIONS GÉNÉRALES.

Le dosage des acides aminés constitue une étape très importante dans l'étude de la structure d'une protéine. Depuis ces dernières années, les méthodes de dosage ont été considérablement améliorées. Les méthodes de dosage microbiologique, largement préconisées aux environs de 1940-1945, ne sont pratiquement plus utilisées. La plupart des dosages se font actuellement soit par la méthode de MOORE et STEIN (1) (chromatographie sur résines à échange d'ions, colorimétrie à la ninhydrine des éluats), soit par la méthode des dinitrophénylaminoacides de LEVY (2). C'est cette dernière méthode que nous avons adoptée et employée, en y apportant des modifications techniques qui en facilitent l'application.

Les différentes étapes de cette méthode comportent l'hydrolyse de la protéine, la dinitrophénylation des acides aminés libérés, leur séparation en chromatographie bidimensionnelle et leur dosage après élution par spectrophotométrie. La séparation chromatographique en première dimension est réalisée à l'aide du système solvant de BISERTE et OSTEUX (3) (il s'agit d'une chromatographie de partage) et dans la deuxième dimension par un tampon phosphate, par relargage tout le long du papier. C'est donc la combinaison de deux principes chromatographiques différents qui a permis la séparation sur une seule feuille de tous les dérivés dinitrophénylés des acides aminés normalement rencontrés dans un hydrolysate de protéine. En effet, le comportement des dérivés dinitrophénylés rappelle un peu celui des sucres; si on se limite à la chromatographie de partage, l'ordre de migration reste sensiblement le même, avec seulement une séparation plus ou moins bonne entre les dérivés d'un même

groupe et il n'est pas très utile de réaliser une chromatographie de partage bidimensionnelle. La séparation à l'aide de plusieurs systèmes unidimensionnels (papier ou colonnes) est possible, mais fastidieuse, et le risque d'erreurs augmente à cause du nombre de manipulations.

Avec la méthode de LEVY, le dosage devient "comparatif" et il n'est même pas nécessaire de connaître la quantité exacte de protéine initiale; il faut seulement étudier d'une façon identique la phase éthérosoluble et la phase hydrosoluble.

L'intérêt d'une méthode de dosage comparative est, en effet, considérable.

Effectivement, la précision exigée pour déterminer le nombre de résidus d'un acide aminé donné d'une protéine augmente à la fois avec le nombre de résidus de cet acide aminé présent et le nombre global de résidus. Autrement dit, dans une protéine contenant 200 résidus, il est plus difficile de dire avec certitude qu'il y a 40 résidus d'un acide aminé, alors que le choix peut se faire entre 39 et 41, que d'affirmer que la molécule contient deux résidus alors que le choix pourrait se faire entre un et trois.

En effet, la courbe qui étudie la variation de l'erreur permise en fonction du nombre de résidus est une courbe hyperbolique (voir la Figure 4 de TRISTRAM) (4).

Or, une méthode de dosage comparative, où les acides aminés subissent simultanément le même traitement et où ils sont dosés l'un par rapport à l'autre, permet de rester relativement facilement au-dessous de la limite d'erreur permise, plus facilement en tout cas que dans les méthodes qui partent d'un poids donné de protéine ou dosent chaque acide aminé dans

Figure 4

Variation de l'erreur permise, en fonction du nombre de résidus.

(d'après TRISTRAM)

Figure 5

Cellule de synthèse pour la dinitrophénylation des acides aminés.

Figure 6

Etude graphique de la consommation de soude au cours de la dinitrophénylation.

(d'après LEVY).

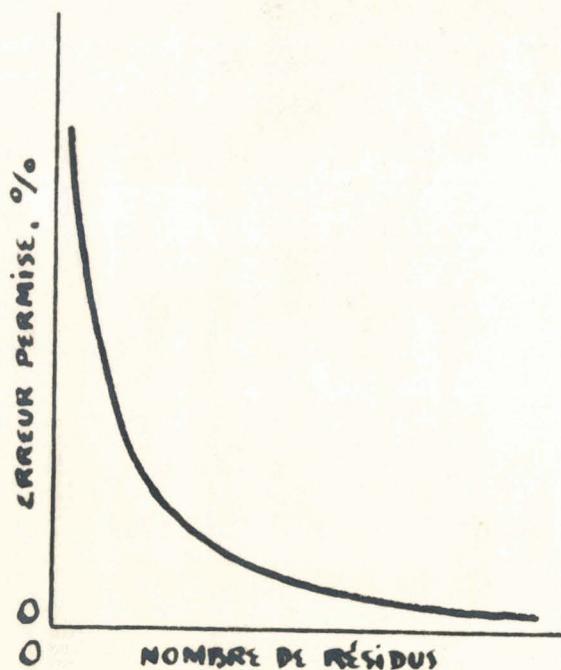


FIG. 4

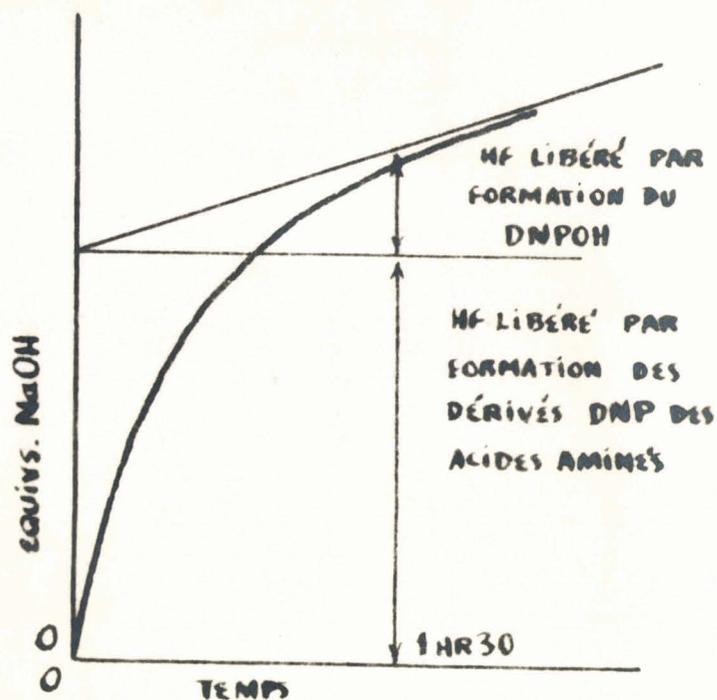


FIG. 6

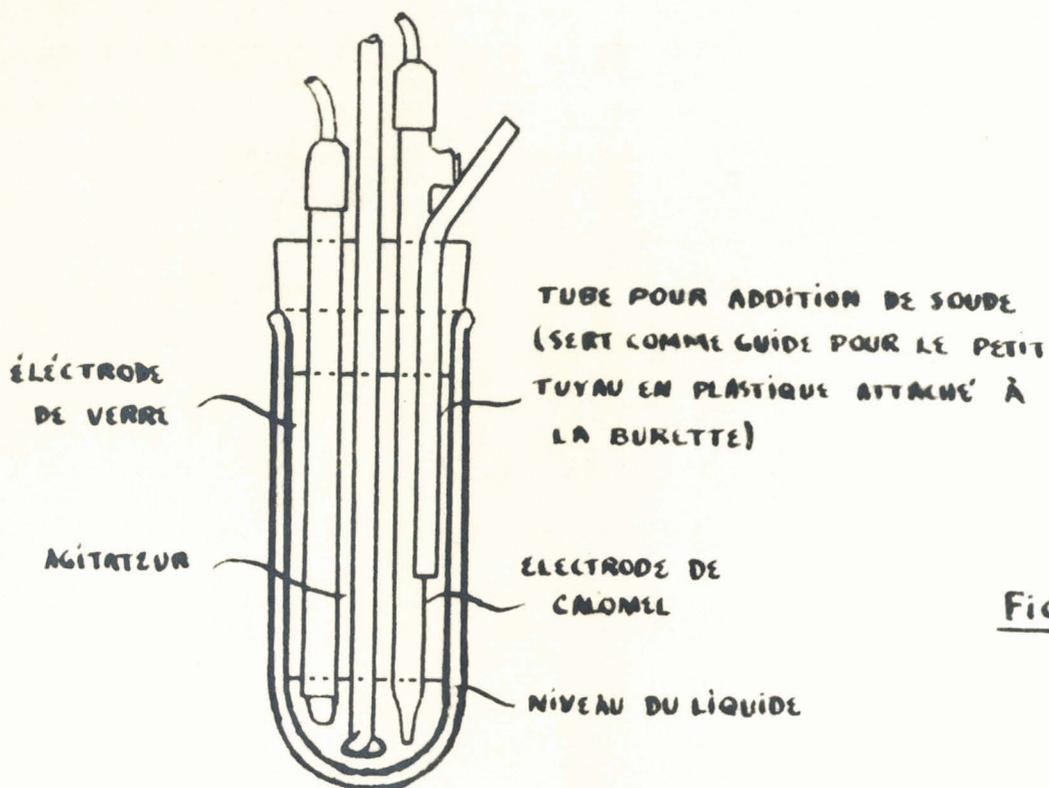


FIG. 5

une partie aliquote de l'hydrolysate. D'autre part, des erreurs grossières dues à des accidents de technique sont immédiatement décelables.

Naturellement, la méthode de LEVY comporte quelques difficultés. Les points les plus critiques sont les suivants : libération complète des acides aminés sans destruction, formation quantitative des dérivés dinitrophénylés, dégradation des dérivés après leur formation (influence de la lumière, de la chaleur, etc), recherche de la quantité optima à chromatographier, standardisation des conditions de chromatographie (*).

En respectant toutes ces conditions, on arrive à une précision très satisfaisante. D'ailleurs, on peut dire que le point le plus critique n'est pas inhérent à la méthode de LEVY elle-même, mais provient de l'hydrolyse, et ceci est commun à n'importe quelle méthode de dosage.

B - MODE OPERATOIRE.-

Le protocole comporte les étapes suivantes :

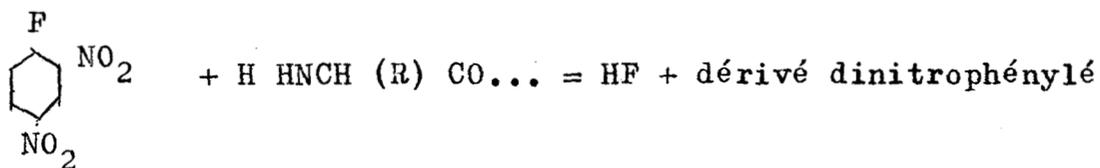
I^o) - Hydrolyse - Dinitrophénylation : 3 à 5 mg de protéine sont hydrolysés en tube scellé sous vide par I - 2 ml de HCl 5,7 N (préparé en distillant trois à quatre fois dans un appareil en verre un mélange azéotropique d'acide chlorhydrique concentré et d'eau) à 105° C. pendant 16 heures. Le temps d'hydrolyse peut varier avec la protéine et doit être déterminé

(*) - Il y a en effet une certaine perte par adsorption irréversible sur le papier. Cette perte est fonction de la distance parcourue.

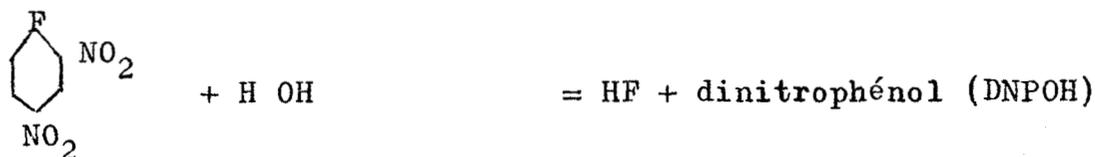
dans chaque cas. L'hydrolysate est séché dans une capsule en verre par ventilation d'air. Il est repris dans l'eau et versé dans une cellule de synthèse. Pour réaliser la condensation dans les meilleures conditions (formation complète des dérivés dinitrophénylés et formation minimum de dinitrophénol, qui est un artefact très gênant), nous avons été amené à construire des cellules de synthèse d'un modèle spécial (Figure 5).

La cellule de synthèse est placée dans un bain-marie à 40° C. et le contenu est ajusté à pH 9,0, d'abord avec de la soude 1 N (ajoutée à la pipette), puis avec de la soude $\text{N}/20$ (ajoutée à la burette). Un excès de I-fluoro-2,4-dinitrobenzène (dose calculée en fonction de la quantité de groupements réactifs présents et de la quantité qui sera utilisée par suite de la formation d'artefacts) est ajouté. Le pH est maintenu à 9,0 par de petites additions de soude $\text{N}/20$. La synthèse dure entre 1 heure et demie et 2 heures. Les principales réactions qui se produisent sont :

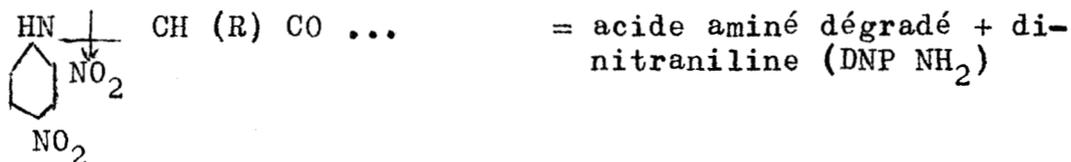
- réaction de condensation avec les groupes aminés :



- hydrolyse alcaline du réactif :



- dégradation du dérivé formé



La cinétique de la réaction peut être suivie en mesurant la consommation de soude et en construisant des tangentes à la courbe pour chaque temps désiré, en tenant compte de l'ionisation de chaque groupement réactif (Voir Figure 6). Etant donné que le fluorodinitrobenzène est en excès, le milieu réactionnel reste saturé en réactif et la formation de dinitrophénol est constante dans le temps. Selon LEVY (5), cette formation est de l'ordre de 0,044 $\mu\text{M}/\text{ml}/\text{min}$. Il y a intérêt à exécuter la réaction dans la plus petite quantité de liquide possible. Si on opère avec des peptides ou avec des éluats de chromatogrammes, on ne peut guère éviter que la quantité de dinitrophénol soit élevée comparativement à la quantité de dérivé dinitrophénylé formé. Dans ce cas, on doit éliminer l'excès de dinitrophénol par sublimation. Il en est de même dans un dosage, si on effectue la condensation en présence d'acétone ou d'alcool (dans le but de dinitrophényler complètement l'histidine) (*). Pour effectuer cette sublimation, nous avons été amené à construire des appareils spéciaux du type représenté sur la Figure 7 a et 7 b.

Cet appareil est conçu pour que la distance entre le film chauffé de dérivés dinitrophénylés et la surface refroidie soit très courte; (Figure 7 a) la surface rodée du joint est située à l'extérieur. Un traitement à 70-80° C. (le chauffage ne commence que lorsque le vide est établi) pendant 5 - 10 minutes est largement suffisant pour enlever la presque to-

(*) - L'histidine peut donner, en effet, trois dérivés différents : l'imidazole-DNP-histidine (histidine à l'intérieur d'une chaîne peptidique), l' α -DNP-histidine et la bis-DNP-histidine (histidine libre ou histidine en position N-terminale).

Figure 7

Appareil employé pour la sublimation du dinitro-
phénol.

Figure 8

- Chromatographie des DNP acides aminés.

en bas, à gauche : cuve à solvant pour la chroma-
tographie dans le "toluène".

en bas, à droite : cuve à solvant pour le système
"phosphate" de LEVY.

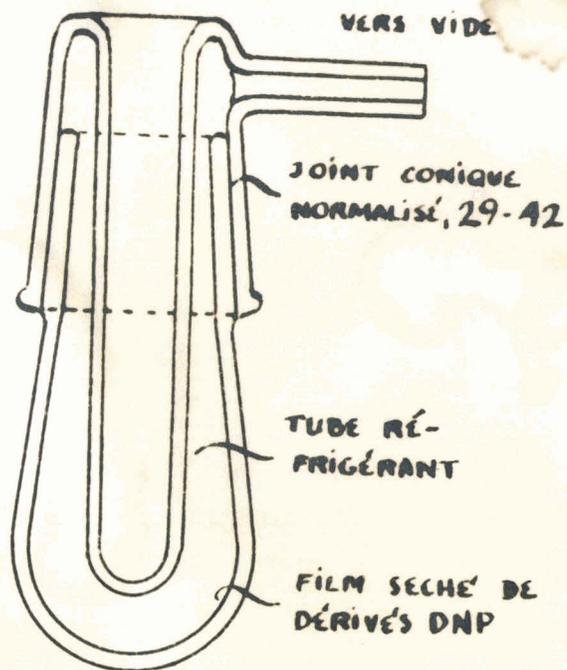
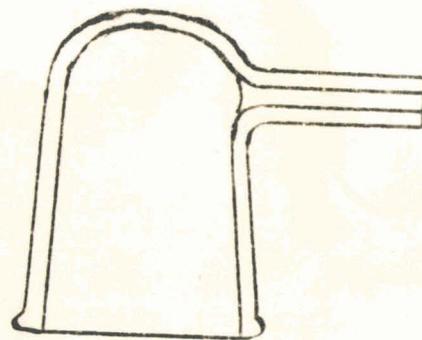
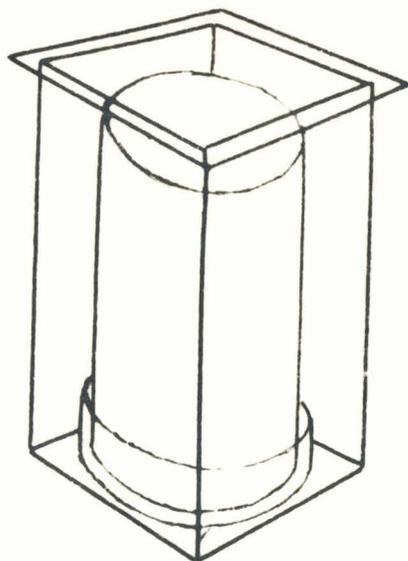


Fig. 7A

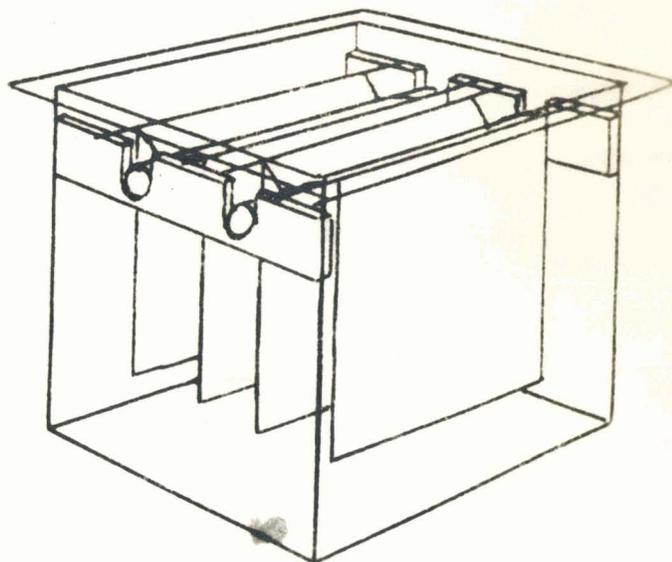


CHAPEAU SANS TUBE
REFRIGERANT

Fig. 7B



1^{ERE} DIMENSION, CHROMATOGRAPHIE
ASCENDANTE, SOLVANT "TOLUENE"



2^{EME} DIMENSION, CHROMATOGRAPHIE
DESCENDANTE, SYSTEME "PHOSPHATE"

Fig. 8

talité du dinitrophénol. Parfois, avant la mise en route, il reste une goutte d'eau dans les fioles, qui a été entraînée au cours de l'extraction étherée. Dans ce cas, un chapeau spécial (sans tube réfrigérant (Figure 7 b) permet de l'enlever sous vide en quelques secondes, avant la sublimation proprement dite. Au cours de la sublimation, la DNP-méthionine peut être légèrement entraînée avec le dinitrophénol.

Pour le traitement de plus petites quantités (peptides, récupération de peptides sur papier, dinitrophénylation d'une protéine) nous effectuons la réaction de synthèse dans des tubes à centrifuger plus petits, dans un tampon carbonate-bicarbonate, sans contrôle constant du pH, et les extractions, lavages, etc., sont exécutés dans le tube lui-même.

2^e) - Extraction des dérivés dinitrophénylés : Une fois la réaction de condensation finie, on verse le contenu de la cellule dans une ampoule à décanter et on extrait 5 - 6 fois avec de l'éther, pour enlever l'excès de fluorodinitrobenzène. L'éther doit être libre de peroxydes, pour éviter une transformation de la DNP-méthionine en DNP-méthionine-sulfone : nous le préparons par distillation sur du SnCl₂ suivi d'un lavage à la soude diluée et un lavage à l'eau; il est conservé sur SO₄Fe pulvérisé.

Ensuite, le mélange est acidifié aux environs de pH 1-3 avec de l'acide chlorhydrique et les dérivés éthersolubles sont extraits par l'éther. On fait évaporer la phase étherée dans des capsules en verre. La phase aqueuse peut être également séchée et reprise ensuite par de l'acétone. Mais, il est préférable d'extraire la phase aqueuse directement avec un mélange à volume égal de butanol secondaire et d'acétate

d'éthyle (KOCH et WEIDEL) (6). Les deux phases organiques séchées sont versées quantitativement dans des tubes gradués et amenées à un volume connu (3,0 ml). Des parties aliquotes de l'ordre de 50 - 150 μ l sont déposées sur du papier Whatman n° I.

3°) - Chromatographie bidimensionnelle : Le papier roulé en cylindre (la forme cylindrique est maintenue par des agrafes de bureau) (figure 8) est mis en chromatographie ascendante dans le système de BISERTE et OSTEUX (7) dont la composition est la suivante : toluène : 30, chloroéthanol : 18; pyridine : 9; NH_4OH 0,8 N : 18.

Ces réactifs ont été purifiés de la façon suivante :

- toluène : extraction par SO_4H_2 , distillation sur Cl_3Al , lavage au CO_3Na_2 , lavage à l'eau, séchage, redistillation.

- chloroéthanol : distillation sous vide.

- pyridine : distillation sur $\text{Ba}(\text{OH})_2$; redistillation.

Le solvant, qui forme deux phases, est équilibré au moins pendant 3 à 4 heures. La phase aqueuse inférieure est rejetée et la phase organique filtrée sur Whatman n° I, pour enlever les quelques gouttelettes d'eau qui restent.

Quant aux chromatogrammes eux-mêmes, ils doivent aussi être bien saturés en vapeurs du solvant. On place de l'ammoniacque 0,8 N dans le cristalliseur central et un peu de phase organique directement dans le fond de la cuve. Le solvant est enfin placé dans l'espace annulaire compris entre

les deux cristallisoirs où se trouve le cylindre de papier. La chromatographie ascendante dure une nuit. Le lendemain, les feuilles sont enlevées, séchées par une ventilation pendant la journée à l'abri de la lumière. La bande des dérivés hydrosolubles est enlevée. Le reste de la feuille retourné est mis en chromatographie descendante avec le système "phosphate" (pH 6, 1 M en H_2PO_4^- , 0,5 M en HPO_4^{--}).

Tous les dérivés sont séparés sauf le DNP-asp et le DNP-glu qui le sont incomplètement. Ces deux dérivés peuvent être séparés en effectuant une autre chromatographie avec un tampon phosphate de concentration plus forte (2,0 à 2,5 M).

Une représentation de la séparation habituellement obtenue est rassemblée sur la Figure 9.

4°) - Elution et dosage : Les taches sont découpées, mises dans des petits tubes avec 4,0 ml de bicarbonate de sodium à 2 p. 100. Les tubes sont chauffés à 50 - 55° C. dans un bain-marie pendant 15 minutes pour parfaire l'éluion, puis secoués et centrifugés. La densité optique est lue au spectrophotomètre à 360 m μ (sauf pour la proline et l'hydroxyproline, où la lecture se fait à 385 m μ). La lecture de densité optique (après correction pour l'absorption du papier lui-même) est multipliée par les facteurs déterminés par LEVY ("facteurs de LEVY") pour chaque acide aminé (voir Tableau 5). Un dosage complet nous permettra de comprendre plus nettement la marche à suivre à ce stade du dosage.

5°) - DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINES
(exemple de l'hémérythrine de Sipunculus nudus).

Figure 9

Carte chromatographique de DNP acides aminés
d'un hydrolysats total de protéine.

à gauche : DNP-éthérosolubles

à droite : DNP-hydrosolubles.

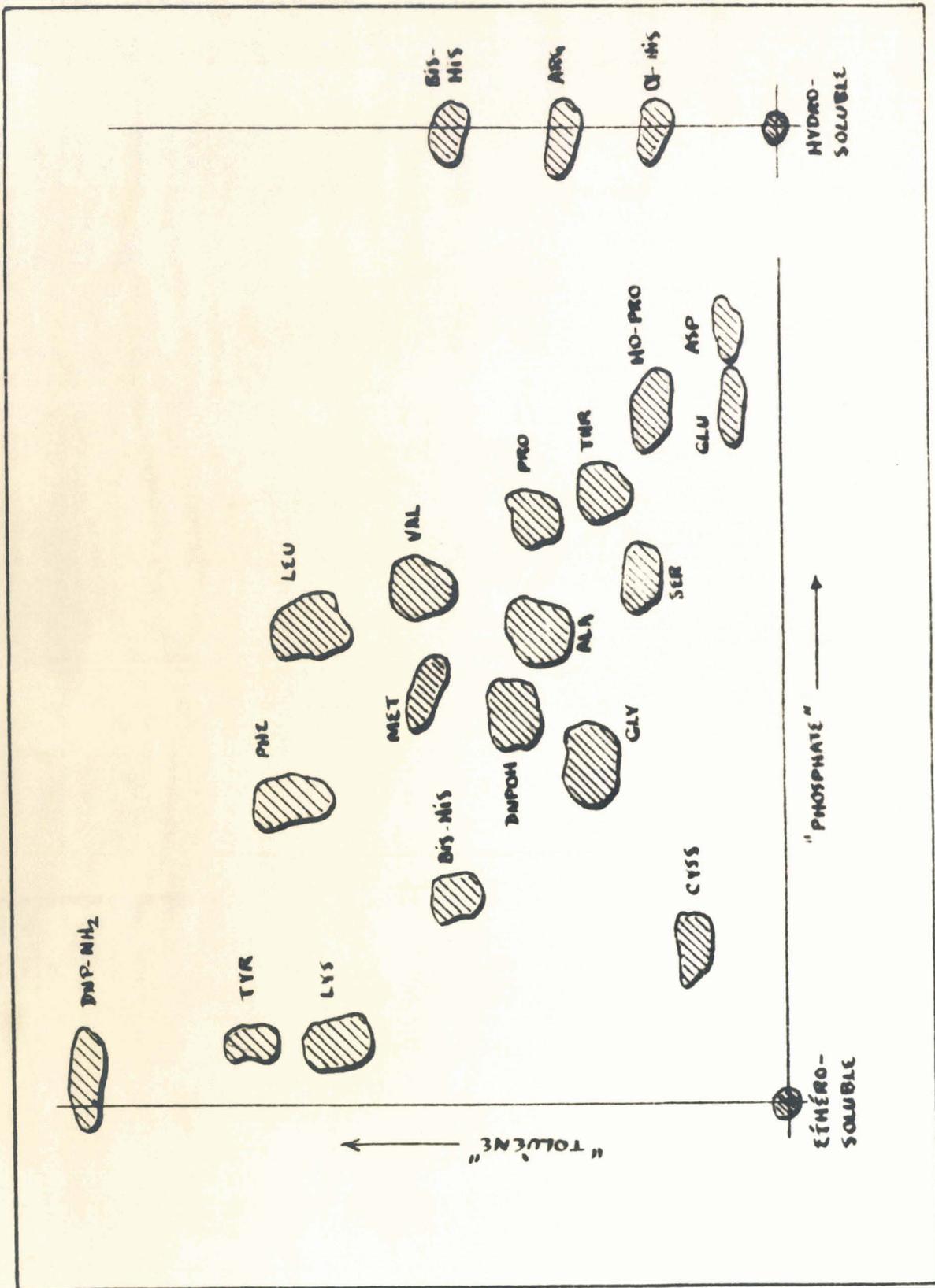
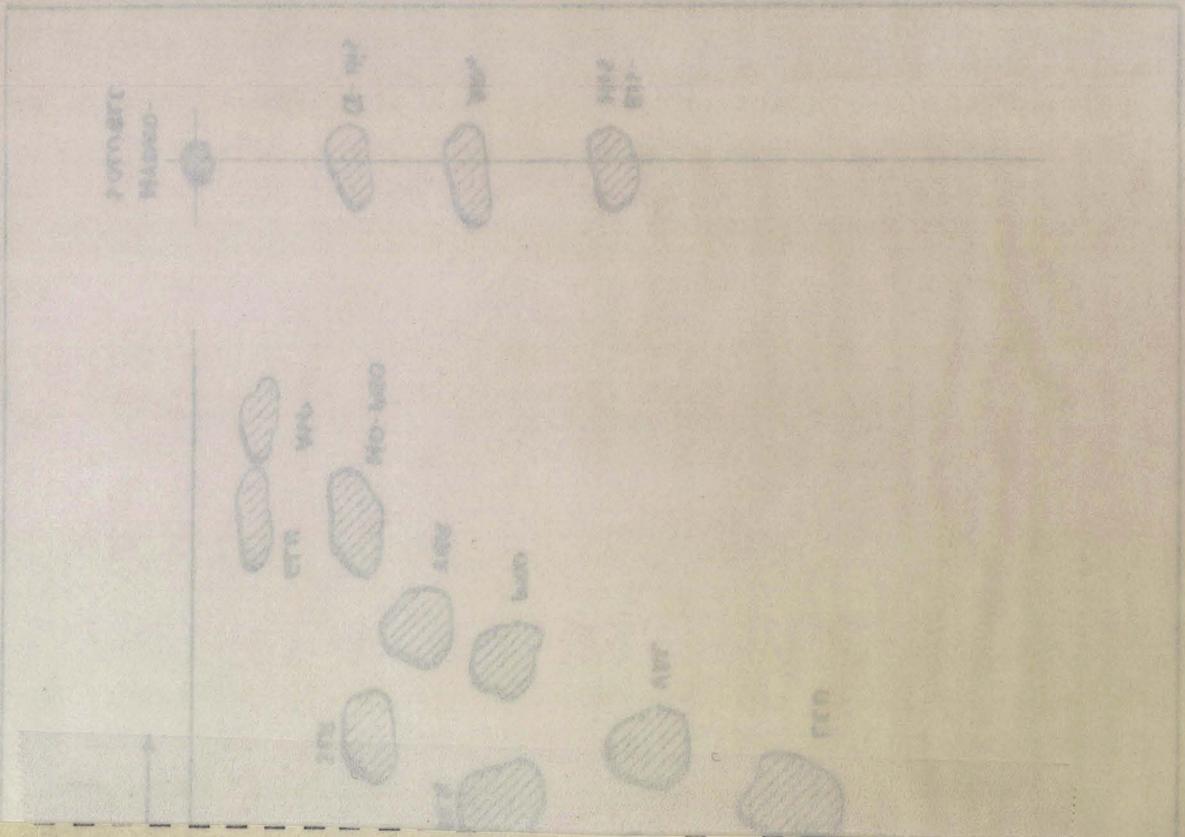
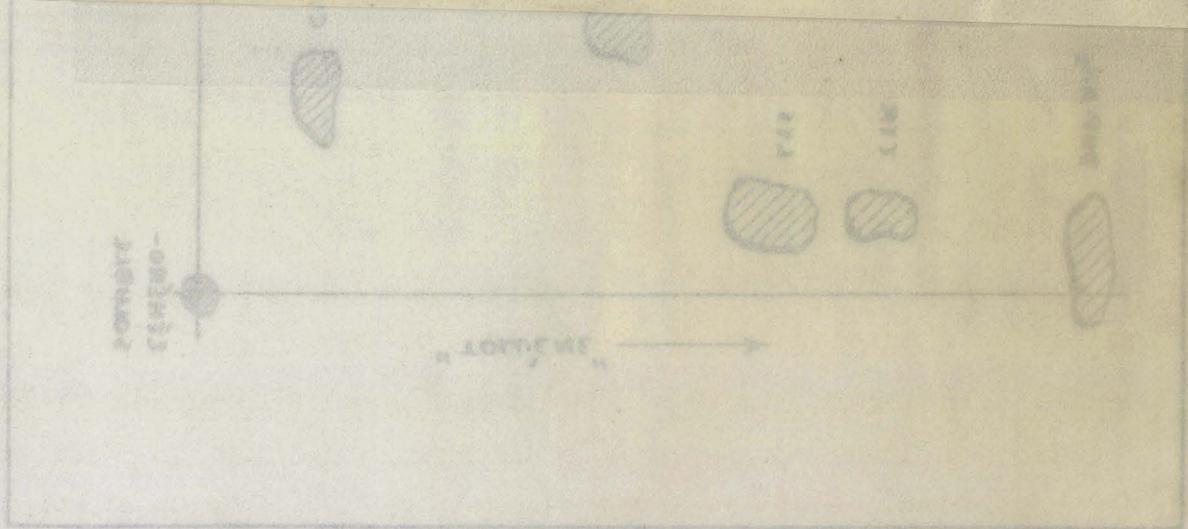


FIG. 9



Erratum: à intercaler entre Lys et Arg, p. 65

Tyr 1,54 0,304 207 244 203 260 232 395 438



Le Tableau suivant rassemble les lectures de densité optique obtenus sur plusieurs chromatogrammes et en partant de plusieurs réactions de condensation de l'hydrolysat.

TABLEAU 5

Acides aminés	Facteur de LEVY	Lecture de densité optique (multipliées par le facteur de LEVY approprié), 8 séparations principales.							
		I	2	3	4	5	6	7	8
Gly	I,03	0,375	0,365	0,396	0,341	0,298	0,278	0,334	0,328
Ser	0,97	0,360	0,349	0,372	0,323	0,286	0,265	0,324	0,309
Thr	I,02	0,397	0,423	0,406	0,334	0,276	0,234	0,287	0,334
Pro	0,93	0,525	0,528	0,568	0,460	0,395	0,296	0,350	0,372
Ala	I,09	0,763	0,735	0,737	0,620	0,468	0,370	0,456	0,479
Met	I,2I	0,042	0,038	0,036	0,030	0,025	0,018	0,024	0,026
Val	0,99	0,564	0,613	0,613	0,519	0,422	0,440	0,504	0,500
Leu	I,10	I,320	I,230	I,230	I,130	0,940	0,891	0,946	I,001
Phe	I,03	I,030	I,040	0,988	0,975	0,746	0,721	0,829	0,824
Lys	0,64	0,729	0,729	0,736	0,630	0,537	0,518	0,572	0,569
Arg	I,06	0,254	0,192	0,217	0,198	0,161	0,151	0,150	0,178
His	I,62	0,477	0,405	0,432	0,419	0,252	0,239	0,245	0,264
Asp	0,99	I,193	I,175	I,215	I,071	0,930	0,917	0,979	0,997
Glu	0,94	0,699	0,689	0,713	0,627	0,545	0,538	0,574	0,584
Cys	0,56	0,034	0,030	0,030	0,027	0,023	0,032	0,034	0,025
Total :		9,066	8,748	8,933	7,907	6,564	6,140	7,010	7,228

Les lectures de densité optique sont additionnées pour donner des totaux (9,066; 8,748; etc.) qui se trouvent au bas de chaque colonne du Tableau. Pour chaque colonne on peut trouver un facteur pour que cette somme devienne 100. On multiplie alors tous les nombres d'une colonne par ce facteur et on peut donc comparer directement les résultats exprimés sur la base de 100 résidus d'acides aminés (Tableau 6).

TABLEAU 6

Nombre de résidus d'acides aminés pour 100 acides aminés de la molécule d'hémérythrine (8 chromatogrammes).

Gly	4,12	4,16	4,43	4,29	4,52	4,58	4,77	4,52
Ser	3,96	3,97	4,16	4,06	4,34	4,37	4,63	4,26
Thr	4,36	4,82	4,54	4,20	4,19	3,86	4,10	4,60
Pro	5,77	6,01	6,36	5,79	6,00	4,88	5,00	5,13
Ala	8,39	8,37	8,25	7,81	7,11	6,10	6,52	6,61
Met	0,46	0,43	0,40	0,37	0,38	0,29	0,34	0,35
Val	6,20	6,98	6,86	6,53	6,41	7,26	7,20	6,90
Leu	14,52	14,02	13,77	14,23	14,28	14,70	13,52	13,81
Phe	11,33	11,85	11,06	12,28	11,33	11,89	11,85	11,37
Lys	8,01	8,31	8,24	7,93	8,16	8,54	8,17	7,85
Tyr	3,34	2,35	2,73	2,55	3,95	3,82	5,64	6,04
Arg	2,79	2,18	2,43	2,49	2,44	2,49	2,14	2,45
His	5,24	4,61	4,83	5,27	3,83	3,94	3,51	3,64
Asp	13,12	13,39	13,60	13,49	14,13	15,13	13,99	13,75
Glu	7,68	7,85	7,98	7,90	8,28	8,87	8,20	8,05
Cys	0,39	0,37	0,37	0,35	0,34	0,38	0,39	0,37

En général, les résultats qui sont les plus variables sont ceux de la tyrosine (variabilité dans la synthèse du dérivé dinitrophénylé), de l'histidine (variabilité dans la synthèse) et de la méthionine (dégradation possible). Parfois, si la séparation chromatographique n'a pas été parfaite, les taches de glycolle et d'alanine sont très voisines de celle du dinitrophénol (ceci se produit surtout lorsque le chromatogramme est trop chargé). En éliminant les valeurs aberrantes qui proviennent indubitablement d'erreurs techniques ou d'imperfections chromatographiques, on peut calculer une moyenne

de tous les résultats et établir le nombre de résidus d'acides aminés pour 100 acides aminés de la molécule étudiée.

Ensuite, en connaissant le poids moléculaire de la protéine, on peut calculer le nombre de résidus de chaque acide aminé présent dans la molécule entière de la façon suivante : connaissant le nombre de chaque résidu pour 100 acides aminés, on multiplie ces nombres par le poids moléculaire de chaque acide aminé correspondant. On fait la somme de tous les résultats. De la somme ainsi obtenue, on enlève la valeur de 1.782 correspondant à 99 molécules d'eau. On calcule le rapport entre le poids moléculaire réel et le poids moléculaire partiel ainsi calculé pour 100 acides aminés.

Le nombre de résidus pour 100 acides aminés multiplié par ce rapport donne le nombre de résidus pour l'ensemble de la molécule. Il suffit alors d'"arrondir" les valeurs obtenues pour connaître le nombre de résidus d'acides aminés (voir tableau 7).

C - COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE L'HEMERYTHRINE, DE LA MYOGLOBINE ET DU CYTOCHROME C.-

1^o) - Composition de l'hémérythrine.-

Nous avons rassemblé dans le Tableau 7 le nombre de résidus d'acides aminés de l'hémérythrine calculé pour un poids moléculaire de 66.000 (ROCHE).

Le tryptophane, détruit au cours de l'hydrolyse acide, ne figure pas au tableau des résultats.

TABLEAU 7

Composition de l'hémérythrine de Sipunculus Nudus.

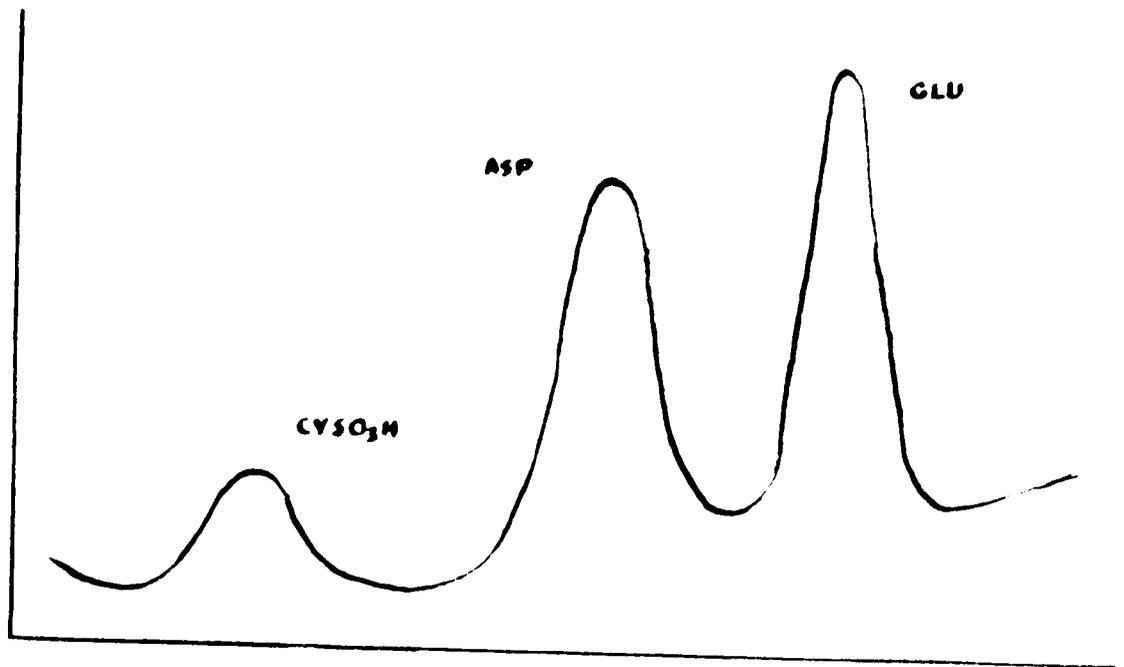
	Nombre de rési- dus pour 100 acides aminés.	Nombre de rési- dus calculés d'après les va- leurs de la co- lonne I sur la base d'un poids moléculaire de 66.000	Nombre de résidus de l'hémérythrine (valeurs arrondies)
Gly	4,42	25,37	25
Ser	4,22	24,33	24
Thr	4,33	24,85	25
Pro	5,62	32,25	32
Ala	7,40	42,47	42
Met	0,38	2,18	2
Val	6,80	39,03	39
Leu	14,10	80,93	81
Phe	11,62	66,69	67
Lys	8,15	46,78	47
Tyr	3,80	21,81	22
Arg	2,42	13,89	14
His	4,36	25,02	25
Asp	13,82	79,32	79
Glu	8,10	46,49	46
Cys	0,34	1,94	2
			----- 572 résidus

Les acides glutamique et aspartique ont été dosés ensemble et le rapport entre ces deux acides aminés a été déterminé à l'aide d'une chromatographie particulière développée dans un tampon phosphate 2 M.

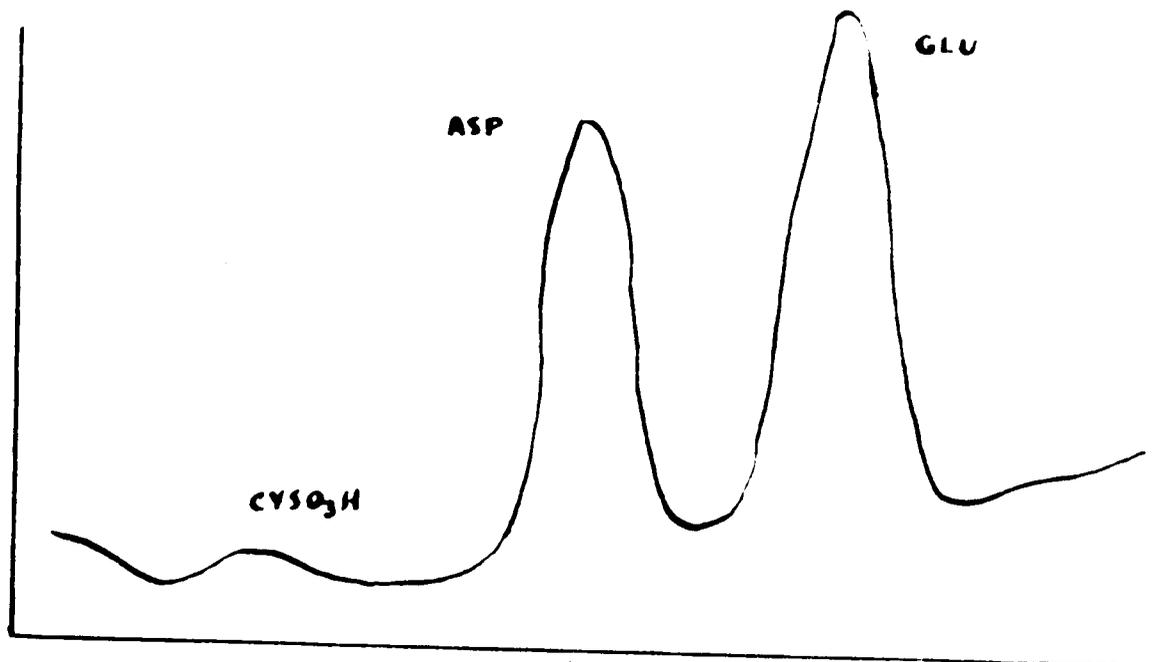
La leucine et l'isoleucine ont été dosées ensemble. Le rapport entre ces deux acides aminés a été déterminé par une chromatographie unidimensionnelle de l'hydrolysate (non dinitro-phénylé) développée dans le système n-butanol/alcool benzylique/eau et révélée à la ninhydrine : il y a 1 molécule d'isoleucine pour 4 de leucine, soit au total environ 16 molécules d'isoleucine pour 65 de leucine.

L'hémérythrine ne contient que très peu de cystine; au maximum deux molécules d'après le dosage des DNP-aminoacides de LEVY).

La cystine n'était d'ailleurs pas visible sur les chromatogrammes bidimensionnels (révélés à la ninhydrine) de l'hydrolysate total. Pour la mettre en évidence, nous avons été dans l'obligation de soumettre l'hydrolysate à une oxydation performique. Dans ces conditions, l'acide cystéique formé a été décelé par électrophorèse sur papier à pH 3,9 (voir Figure 10). En comparant par enregistrement automatique photodensitométrique les colorations à la ninhydrine de l'hydrolysate total d'hémérythrine et du même hydrolysate surchargé par une quantité connue d'acide cystéique, les rapports obtenus sont en faveur de l'existence d'une molécule de cystine.



HÉMÉRYTHRINE, + 10 MOLES CYSH, OXYDÉE



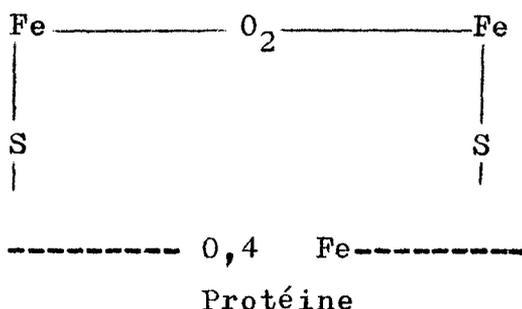
HÉMÉRYTHRINE, OXYDÉE

ENREGISTREMENT PHOTODENSITOMÉTRIQUE DES ÉLECTROPHÉROGRAMMES À PH 3,9 DE L'HYDROLYSAT TOTAL D'HÉMÉRYTHRINE

FIG. 10

Il y a donc dans l'hémérythrine très peu de cystine : 2 ou 1 molécules. Ces données sont très importantes car elles ne sont pas en accord parfait avec la théorie du mode de fixation du fer dans l'hémérythrine de Phascolosoma gouldii émise par KLOTZ et coll. (8).

Pour ces auteurs, le fer de l'hémérythrine de Phascolosoma gouldii se fixe sur les résidus de cystine de la façon suivante : 2 molécules sur les deux soufres d'un résidu de cystine, 0,4 molécule d'une autre manière sur la protéine :



Dans le cas de l'hémérythrine de Sipunculus nudus, les 2 molécules de cystine ne pourraient fixer que 4 atomes de fer sur les 10 trouvés en tenant compte de la teneur en fer (0,87 p. 100) et du poids moléculaire de 66.000 (*).

2^e) - Composition du cytochrome c de Cheval.-

La composition en acides aminés du cytochrome c est rassemblée dans le Tableau 8. Comme l'avaient déjà signalé THEORELL et AKESON (II) la teneur en lysine est particulièrement

 (*) - D'après BOERI et GAIRETTI-MAGALDI (9) le rapport Fe/O₂ est égal à deux pour l'hémérythrine de Sipunculus nudus; d'après LOWE (10), ce rapport est de 2,4.

TABLEAU 8
Composition du cytochrome c de Cheval

	Nombre de résidus pour 100 acides aminés	Nombre d'acides aminés du cytochrome (calculé sur la base d'un poids moléculaire de 12.300)	
	Résultats personnels	Résultats personnels	Résultats de NUNNIKHOVEN (14)
Gly	11,24	11	12,1
Thr	9,60	10	9,8
Ser	-	0	0,4
Pro	3,47	3	3,8
Ala	6,01	6	6,5
Val	2,19	2	3,0
Met	1,11	2	2,1
Leu	10,88	11	5,7 (Ileu) 5,9 (Leu)
Phe	2,61	3	3,6
Lys	19,12	19	18,3
Tyr	3,77	4	3,4
His	4,10	4	2,6
Arg	1,88	2	1,7
Asp	8,21	8	7,8
Glu	13,62	14	11,8
CySH		2 (*)	2 (*)
Try		1 (**)	1 (**)
	Total :	102	

(*) - La cystéine reste accrochée sur le groupement porphyrinique (voir plus haut, chapitre II).

(**) - D'après THEORELL et AKESON, le cytochrome c contient 1 molécule de tryptophane.

grande (19 résidus sur 102). Le taux d'histidine est faible (4 résidus), ainsi que celui d'arginine (2 résidus).

Le soufre du cytochrome (0,95 p. 100) (PALEUS) (12) se répartit entre 2 molécules de méthionine et 2 molécules de cystéine (qui sont combinées par des liaisons thio-éthers avec le groupement porphyrinique). Comme l'a démontré PALEUS, il n'y a pas de pont disulfure cystinique dans la molécule. Ces données sont également en accord avec celles de AKESON (13).

L'ensemble de nos résultats cadre bien avec ceux de NUNNIKHOVEN, obtenus par la méthode de MOORE et STEIN.

Cependant, contrairement à ce que nous admettons, NUNNIKHOVEN (14), trouve un peu de sérine (0,4 molécule), mais cet auteur n'est pas absolument certain de ce résultat car le faible pic noté sur le diagramme d'éluion de la colonne tend à se confondre avec celui de la méthionine-sulfone. Sur les chromatogrammes de DNP-aminoacides, il est intéressant de noter que la sérine et la méthionine-sulfone se superposent également et nous avons pour notre part considéré que la faible tache observée dans cette région du chromatogramme était formée de méthionine-sulfone.

Deux autres discordances peuvent être signalées : l'une concerne l'acide glutanique (14 résidus pour nos résultats, 12 d'après ceux de NUNNIKHOVEN); l'autre concerne l'histidine: NUNNIKHOVEN trouve 3 molécules d'histidine (dans tous les cytochromes étudiés), tandis que comme MARGOLIASH (15), nous en trouvons quatre.

La composition du cytochrome c de Cheval est très comparable à celle du cytochrome c de Boeuf, établie par EHRENBERG et THEORELL (16), et celle du cytochrome c de Levure, établie par NUNNIKHOVEN (17). Comme dans le cas des insulines et des hormones adrénocorticotropes, il n'y a donc que des différences minimes de composition entre les cytochromes c d'espèces différentes.

3^e) - Composition de la myoglobine de Cheval.-

Nous avons rassemblé dans le Tableau 9, les résultats du dosage des acides aminés de la globine de myoglobine. A titre de comparaison, nous avons rassemblé dans le même Tableau 9 les valeurs données par TRISTRAM (18) pour la myoglobine de Cheval et par ROSSI-FANELLI et coll. (19) pour la myoglobine humaine.

Nos résultats sont très comparables à ceux donnés par TRISTRAM et démontrent assez nettement les différences qui existent entre les myoglobines d'origines différentes.

- - - - -

Composition de la globine de la myoglobine
de Cheval.

	Nombre de résidus pour 100 acides aminés -	Nombre d'acides aminés (calculé sur la base d'un poids moléculaire de 17.000)		
		Myoglobine de Cheval		Myoglobine humaine
	Résultats personnels	Résultats personnels	Valeurs ci- tées dans TRISTRAM	ROSSI-FANELLI et coll.
Gly	9,37	13	13	13
Ser	3,36	5	6	7
Thr	4,46	6	7	4
Pro	2,82	4	5	8
Ala	10,51	14	15	11
Val	4,09	6	6	6
Met	0,38	1 ou 2	2	3
Leu	15,96	22	22	24
Phe	4,45	6	5	8
Lys	12,63	17	18	22
Tyr	1,27	2	2	2
Asp	7,32	10	10	10
Glu	14,19	19	19	19
His	7,32	10	9	8
Arg	1,56	2	2	2
Cys	0	0	0	0 (?)
Try	-	2 (?)	2	3
		140	143	142

BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE IV

- ÅKESON Å.- Acta Physiol. Scand., 1942, 4, 362 (13).
- BISERTE G. et OSTEUX R.- Bull. Soc. Chim. Biol., 1951, 33, 50 (3,7).
- BOERI E., GHIRETTI-MAGALDI A.- Biochim. Biophys. Acta, 1957, 23, 489 (9).
- EHRENBERG A. et THEORELL H.- Acta Chem. Scand., 1955, 9, 1193 (16).
- KLOTZ I.M. et KLOTZ T.A.- Science, 1955, 122, 477 (8).
- KLOTZ I.M., KLOTZ T.A. et FIESS H.A.- Arch. Biochim. Biophys., 1957, 68, 284 (8).
- KOCH G. et WEIDEL W.- Z. Physiol. Chem., 1956, 303, 213 (et communication personnelle) -(6).
- LEVY A.- Nature, 1954, 174, 126 (2,5).
- LOVE W.E.- Biochim. Biophys. Acta, 1957, 23, 465 (10).
- MARGOLIASH E.- Nature, 1955, 175, 293 (15).
- MOORE S. et STEIN W.H.- J. Biol. Chem., 1951, 192, 663 (1).
- NUNNIKHOVEN R.- Biochim. Biophys. Acta, 1958, 28, 108(14,17).
- PALEUS S.- Acta Chem. Scand., 1955, 9, 335 (12).
- ROSSI-FANELLI A.- Giornate Biochimiche Italo-Franco-Elvetiche (Napoli, 21-24 Aprile 1954) - Supplemento a la Ricerca Scientifica. Anno 25, 1955, p. 42-95 (19).
- THEORELL H. et ÅKESON Å.- J. Am. Chem. Soc., 1941, 63, 1804 (10).
- TRISTRAM G.- Adv. Protein Chem., 1949, 5, 84 (4).
- TRISTRAM G.- "The Proteins", vol. I-A. Academic Press. New-York, 1953 (18).

C H A P I T R E V
- - - - -

ETUDES SUR L'HEMOGLOBINE ET LA MYOGLOBINE (*)

ISOLEMENT D'UNE FRACTION HEMOPEPTIDIQUE PAR HYDROLYSE ENZYMATIQUE

ESSAI DE SEPARATION ET D'IDENTIFICATION DES "PEPTIDES A HISTIDINE"

(*) - Bibliographie, page 89.

A - Isolement d'une fraction hémopeptidique.

Dans l'intention d'isoler un fragment contenant encore le groupement porphyrinique, nous avons d'abord repris les études de ROSS (1) sur l'hydrolyse des divers dérivés de l'hémoglobine par des enzymes "pancréatiques".

D'autres auteurs ont également abordé ce problème par d'autres techniques. C'est ainsi que WAELSCH (2) a traité l'hémoglobine avec de la soude à 2 p. 100 à 85° C. : la protéine est dénaturée, mais le groupement prosthétique n'est pas enlevé; on peut toutefois craindre que son mode de fixation sur la protéine ne soit modifié par ce traitement. WAELSCH a isolé un produit contenant de l'hématine, de la proline et de l'alanine.

Par alcoololyse à 190° C., KÜSTER et KUPPENHÖFER (3) ont obtenu une fraction hématine-proline. Un peu plus tard, HAUROWITZ (4) a traité l'hémoglobine avec des enzymes trypsiniques et papaïniques et a isolé un produit qu'il a appelé "hémimine-protéose", dont le poids moléculaire est voisin de 23.000. Il a pensé que ce produit résultait d'une recombinaison des groupements prosthétiques avec une partie importante de la protéine. Effectivement, dans ce genre d'études, la difficulté provient de la labilité des liaisons entre le groupement porphyrinique et la protéine : on ne peut jamais être sûr que ces liaisons restent intactes au cours du traitement.

Dans sa première étude, ROSS (5) a traité l'HbO₂ et l'Hb CO avec de la "pancréatine" et a trouvé non seulement une différence dans la vitesse d'hydrolyse des deux composés, mais

aussi dans la nature du produit final formé. Or, en opérant avec des enzymes cristallisés (trypsine et chymotrypsine) au lieu de la "pancréatine" de ROSS, nous avons retrouvé aussi une différence de vitesse d'hydrolyse. Ceci peut s'expliquer surtout par le fait que l'oxyhémoglobine attaquée par l'enzyme a tendance à se transformer en ferrihémoglobine et à être dénaturée. Toutefois, nous n'avons pu constater, comme ROSS l'avait fait, que l'oxyhémoglobine donnait finalement un résidu floconneux brunâtre (hémine-protéose de HAUROWITZ ?) et un précipité d'hématine. Dans nos essais, les deux milieux restaient clairs, bien que de couleur caractéristique pour chaque dérivé. Par contre, dans les deux cas, un précipité floconneux contenant toute la coloration et tout le fer se formait en ajustant la solution à pH 5,0 avec un tampon acétate.

Sur le précipité isolé à pH 5, nous avons fait des études spectrophotométriques et chimiques (détermination des groupements terminaux).

I) - Etude spectrophotométrique.-

L'essentiel des résultats des études spectrophotométriques obtenus pour les hydrolysats de HbCO est rassemblé sur la Figure II. Des résultats comparables ont été observés avec les autres dérivés.

La diminution dans la "bande de SORET" est spectaculaire, mais le fait le plus significatif est son déplacement vers les ondes plus courtes ainsi que le changement d'aspect dans la région 340-400 m μ . Les deux bandes caractéristiques du dérivé, l'une à 540 m μ et l'autre à 570 m μ (non figurée sur le graphique), restent encore visibles.

Figure II

Etude spectrophotométrique de la fraction précipitée à pH 5,0 de la carbonyl-hémoglobine hydrolysée par la trypsine et la chymotrypsine.

Figure I2

Appareil d'élu-tion.

Cet appareil fonctionne de la façon suivante : le godet étant rempli d'eau et la mèche de papier imbibée d'eau, on mouille le bout des bandes à éluer et on les applique sur la mèche contre laquelle elles tiennent par capillarité.

Le produit à éluer migre presque avec le front de l'eau et est récupéré dans des capsules en verre. L'ensemble est recouvert d'une housse en polyéthylène afin d'assurer la saturation en vapeur d'eau de l'enceinte. Les avantages de l'appareil sont :

- 1^o) - l'élu-tion sous un petit volume -
- 2^o) - l'absence de contamination de l'eau du réservoir par les bandes.

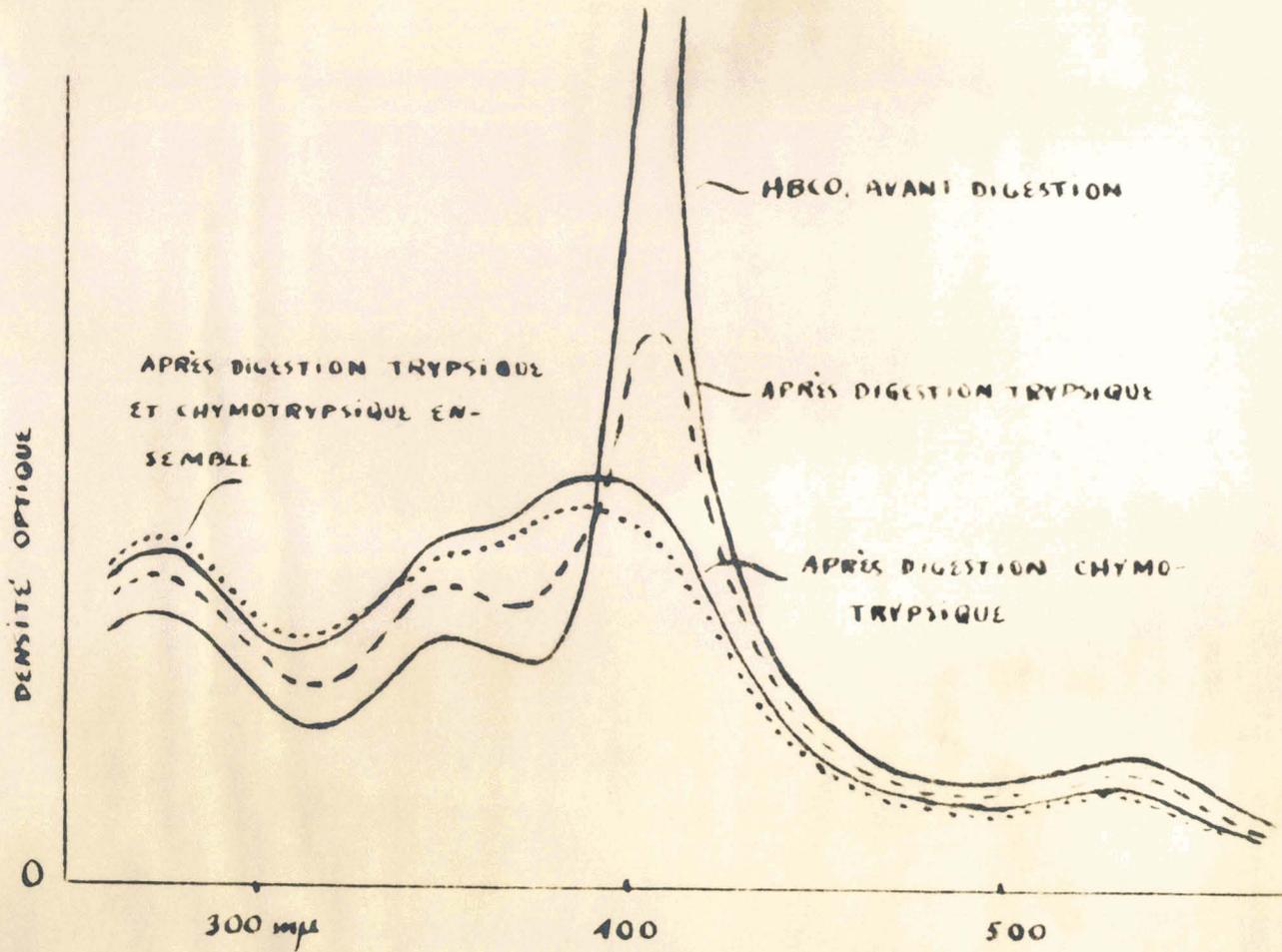


Fig 11

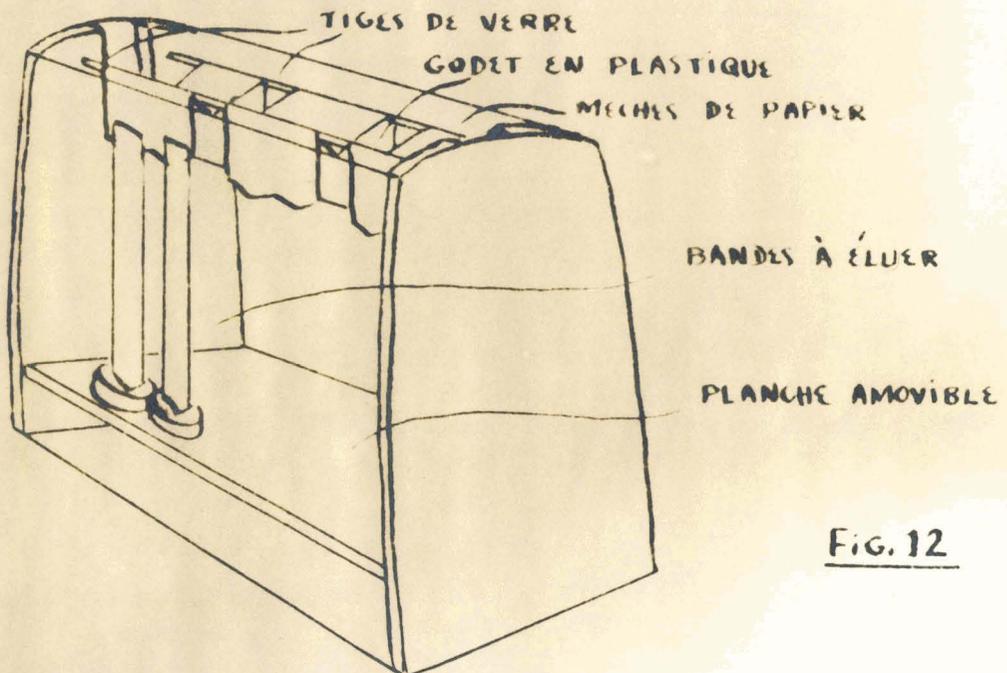


Fig. 12

2) - Etude chimique du précipité à pH 5.-

Nous avons repris la fraction "précipitée à pH 5,0" et l'avons dinitrophénylée. Après hydrolyse totale, nous avons identifié la nature des groupements N-terminaux. La tyrosine est présente en plus grande quantité, mais on trouve aussi la plupart des autres acides aminés. Cette fraction est donc constituée par un mélange ou un complexe de peptides, qui sont co-précipités aux environs de pH 5.

Les résultats de cette expérimentation sont donc dans l'ensemble assez décevants : ils nous démontrent en tout cas qu'il est difficile d'isoler un fragment hémopeptidique caractéristique de la molécule d'hémoglobine, comme cela a été réalisé pour le cytochrome c (voir plus haut, chapitre II).

B - Etude des hydrolysats partiels d'hémoglobine et de myoglobine.-

Toujours dans l'intention de préciser la structure de ces hémoprotéines, nous avons voulu étudier leurs hydrolysats partiels.

INGRAM (6), en comparant les hydrolysats tryptiques d'hémoglobine humaine normale (HbA) et d'hémoglobine de sujet atteint d'anémie sicklémique (HbS), a pu démontrer que l'un des peptides ne possédait pas la même composition dans les deux hydrolysats : l'un d'eux (HbA) correspond à la structure His - Val - Leu - Leu - Thr - Pro - Glu - Glu - Lys, l'autre (HbS) à la structure His - Val - Leu - Leu - Thr - Pro - Val - Glu - Lys.

Nous avons essayé de préciser la composition de quelques "peptides à histidine", puisque nous savons que cet aminoacide joue un rôle essentiel dans le mode d'union protéine-hème.

I) - Etude des conditions d'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine.-

Les expériences rapportées ci-dessus (isolement d'un éventuel hémopeptide) avaient été réalisées sur des dérivés d'hémoglobine non dénaturée : or, l'hydrolyse enzymatique de cette hémoglobine non dénaturée est très variable. Nous avons donc étudié les conditions d'hydrolyse les plus satisfaisantes en préparant toute une série de dérivés (HbCO, HbO₂, ferriHb) et en les dénaturant. Généralement, la dénaturation a été obtenue par chauffage en présence d'urée. L'urée est éliminée par dialyse contre le tampon qui sert ensuite dans l'hydrolyse enzymatique.

Dans la série des activateurs les plus intéressants, nous avons retenu l'action du Ca⁺⁺.

Une expérience-type est résumée ci-dessous :

- carbonylhémoglobine : concentration 0,5 p. 100 en tampon borate M/20 de pH 7,9. Dénaturation par l'urée 6 M (4 minutes à 95° C.), dialyse;

- hydrolyses par la trypsine ou la chymotrypsine cristallisées (rapport enzyme/substrat : 1/50), temps d'hydrolyse : 48 heures à 37° C.;

- précipitation trichloracétique à la fin de l'hydrolyse (concentration finale en acide trichloracétique : 5 p.100);
- dosage d'azote total (micro-Kjeldahl et méthode par cellule de diffusion de CONWAY) dans l'hydrolysate, dans le précipité trichloracétique.

Résultat.-

- Hydrolyse trypsique :
 - sans Ca^{++} : solubilisation de 47 p. 100 de l'azote protéique;
 - avec Ca^{++} (pré-incubation avec l'enzyme, concentration finale en Ca^{++} M/2000) : solubilisation de 63,5 p. 100 de l'azote protéique.
- Hydrolyse chymotrypsique :
 - sans Ca^{++} : solubilisation de 61 p. 100 de l'azote protéique;
 - avec Ca^{++} : solubilisation de 90 p. 100 de l'azote protéique.

2) - Hydrolysats partiels de la myoglobine.-

Nous avons effectué principalement l'étude des "peptides à histidine" sur la myoglobine, qui est le substrat le plus simple et qui contient moins d'histidine (9 résidus, d'après TRISTRAM, 10 résidus d'après nos résultats) que l'hémoglobine (36 résidus).

a) - Hydrolyses enzymatique et acide. Les hydrolyses enzymatiques ont été effectuées sur la carbonylmyoglobine, chauffée en présence d'urée, comme pour l'hémoglobine, et dialysée contre le tampon borate $M/20$ pH 7,9. Pour les hydrolyses enzymatiques, la concentration en protéine a été augmentée à 3 p. 100, mais le rapport enzyme/substrat est resté de 1/50. Les enzymes ont été pré-incubés en présence d'ions Ca^{++} . Les temps d'hydrolyse ont été de 4 jours à 37° C. pour les hydrolyses enzymatiques. Nous avons aussi effectué une hydrolyse acide partielle par de l'acide chlorhydrique pur pendant 6 jours à 37° C. Après l'hydrolyse, les hydrolyses enzymatiques ont été gardées telles quelles, à froid; l'hydrolyse acide a été desséchée sous vide et en présence de soude avec plusieurs additions d'eau, pour enlever l'excès d'acide chlorhydrique.

b) - Séparation des produits d'hydrolyse. Nous avons effectué une séparation de base par électrophorèse sur papier (appareil forme "toit", selon DURRUM, papier d'Arches). Nous avons essayé plusieurs tampons et plusieurs pH; les meilleurs résultats ont été obtenus avec des tampons volatils de pH 3,9 (pyridine-acide acétique-eau (30 : 100 : 4870) et de pH 5,3 (pyridine-acide acétique-eau) (100 : 40 : 3860). Le fait que ces tampons sont volatils est important pour deux raisons : d'abord on évite ainsi une concentration du tampon dans le papier lors de l'électrophorèse, et ensuite on peut effectuer son élimination complète afin de ne pas gêner la séparation dans d'autres systèmes après la récupération.

En général, l'électrophorèse a été poursuivie pendant 15-24 heures à 180 volts. 20 à 30 électrophorèses ont été effectuées pour chaque hydrolyse de 300 mg de protéine. Le pro -

duit est déposé avec une micro-pipette tout le long d'une ligne située entre le pôle positif et le sommet du papier; il faut rechercher la meilleure position de ce point de départ pour chaque type de séparation. En effet, avec le système de DURRUM, on s'efforce de se placer dans des conditions où les produits séparés atteignent une position finale qui dépend d'un équilibre entre le courant électro-osmotique, le déplacement du liquide causé par l'évaporation et leur propre mobilité électrophorétique.

Une fois l'électrophorèse effectuée et les feuilles séchées (hotte obscure, courant d'air tiède), des bandes témoins parallèles à l'axe du papier sont découpées et révélées avec un réactif à la ninhydrine et avec le réactif de PAULY (p-anisidine-nitrite d'amyle) (*). Cette dernière révélation est positive pour le groupement imidazole non substitué de l'histidine. Malheureusement, elle est aussi donnée par le groupement phénolique de la tyrosine; il sera donc nécessaire de faire la distinction, à l'aide de leur composition, entre les "peptides à histidine" et ceux "à tyrosine". On découpe les différentes bandes indiquées par la révélation latérale

(*) - La révélation de PAULY s'effectue de la façon suivante : on pulvérise un mélange à parties égales de la solution A (p-anisidine : 1 g, HCl pur : 1 ml, éthanol à 95° : 100 ml) et de solution B (nitrite d'amyle à 10 g pour 100 ml d'éthanol à 95°; on laisse le chromatogramme 3 à 5 minutes à la température du laboratoire et on pulvérise finalement une solution de potasse alcoolique à 1 p. 100.

et les peptides sont récupérés par élution à l'eau dans un appareil de notre conception (Figure I2).

Les fractions ainsi séparées sont soumises à la chromatographie en butanol/pyridine/acide acétique/eau (30 : 20 : 5 : 24) et en butanol/CH₃COOH/eau (4 : 1 : 5). Après révélation d'un témoin latéral, les fractions nouvellement séparées sont repérées et éluées. L'éluat final est dinitrophénylé selon les modalités décrites dans un chapitre précédent. Le groupement N-terminal est déterminé après hydrolyse totale du DNP-peptide. La composition en acides aminés de la partie résiduelle est précisée après une nouvelle dinitrophénylation, par chromatographie quantitative.

c) - Résultats de l'hydrolyse partielle acide. Sur les électrophorèses, on peut déceler six bandes principales "PAULY-positives". Mais la plupart de ces bandes sont "très complexes; en effet, elles contiennent, en plus des "peptides à histidine" et "à tyrosine", d'autres bandes ninhydrine-positives; par exemple, la bande B-I-a (électrophorèse) peut être séparée par chromatographie sur papier en 7 bandes dont 3 seulement sont PAULY-positives. La bande B-I-b contient deux peptides donnant une réaction de PAULY positive, mais ne contient pas d'autre composant ninhydrine-positive; la bande B-I-c est formée de 6 fractions ninhydrine-positives, dont une seule est PAULY-positive et ainsi de suite.

On conçoit aisément que, dans de telles conditions expérimentales, il soit pratiquement impossible d'obtenir des résultats valables et certains. Pour résoudre des problèmes aussi complexes, il serait nécessaire de mettre en oeuvre des procédés séparatifs très longs et très sélectifs (distribution

à contre-courant, fractionnement sur résines à échange d'ions, etc.,). Il faut d'ailleurs remarquer que la quantité de résultats que l'on pourrait ainsi obtenir ne serait pas en rapport avec la somme de travail fourni et exigé.

d) - Résultats de l'hydrolyse trypsique :

L'hydrolysate trypsique a donné 6 bandes électrophorétiques principales, colorables par le réactif de PAULY.

Peptides caractérisés.-

Dans l'hydrolysate trypsique, par un couplage de méthodes électrophorétiques et chromatographiques (chromatographie dans le butanol/pyridine/acide acétique/eau et chromatographie de DNP-peptides), nous avons caractérisé les peptides suivants :

- α) - Peptide à valine terminale : val (gly₂, ala, leu - glu - his - lys).
- β) - Peptide à leucine terminale : leu (leu, gly₂, ala glu₂, asp, his, arg).
- γ) - Peptide à histidine terminale : his (gly, ser, ala, leu, asp₂, lys).

Plusieurs autres peptides ont été aussi étudiés, mais les données analytiques ont montré que les produits étaient hétérogènes et nous n'avons pas pu tirer de conclusion nette. Par exemple, un autre peptide est riche en proline et contient aussi du glyco-colle, de l'alanine, de la valine, de la leucine, de la phénylalanine, de l'histidine et de la lysine; et un dernier composant contiendrait du glyco-colle, de la thréonine,

de la proline, de la leucine, de la lysine, de l'acide aspartique, de l'acide glutamique et deux molécules d'histidine. Dans tous ces peptides, on peut supposer, à cause de la spécificité étroite de la trypsine, que l'arginine et la lysine sont en position C-terminale.

e) - Résultats de l'hydrolyse chymotrypsique. Les résultats des hydrolyses chymotrypsiques se sont révélés beaucoup moins reproductibles que ceux de l'hydrolyse trypsique, sans doute à cause de la spécificité secondaire de la chymotrypsine. Nous avons pourtant relevé l'existence d'un peptide contenant du glycoColle, de la sérine, de l'alanine, de la valine, de la leucine, de la lysine, de l'histidine et de la phénylalanine, et d'un autre contenant du glycoColle, de la sérine, de la thréonine, de la leucine, de l'acide glutamique, de l'acide aspartique, de l'histidine et de la tyrosine.

EN CONCLUSION, la quantité de renseignements exacts que nous avons pu obtenir en effectuant cette série de séparations n'a pas été en rapport avec le travail nécessaire pour les réaliser. Il apparait donc vain de vouloir isoler seulement quelques peptides de caractère spécial (dans notre cas, des peptides à histidine); il est certainement plus utile d'attaquer le problème d'une façon plus globale et d'isoler systématiquement tous les peptides d'un hydrolysate enzymatique; mais un tel projet ne pouvait être réalisé que par le travail de toute une équipe et dépassait donc le cadre de cette thèse.

Aussi avons-nous dirigé nos efforts vers d'autres aspects de la structure de ces protéines et, dans ce domaine, nous avons pu obtenir des résultats très concrets, qui vont être rapportés dans les chapitres suivants.

BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE V

- HAUROWITZ F.- Z. Physiol. Chem., 1930, 188, 161; 1931, 194,
98 (4).
- INGRAM V.M.- Nature, 1957, 180, 326 (6).
- KÜSTER W. et KUPPENHÖFER G.-
Z. Physiol. Chem., 1927, 170, 106 (3).
- ROSS W.- J. Biol. Chem., 1939, 127, 160 et 179 (1, 5).
- ROSS W. et TURNER R.-
J. Biol. Chem., 1941, 139, 603 (1).
- TRISTRAM G.- In The Proteins, Vol. I, Part A, p. 181
Academic Press. Ed., New-York, 1953 (7).
- WAELSCH H.- Z. Physiol. Chem., 1927, 168, 188 (2).

- - - - -

C H A P I T R E V I
- - - - -

MODIFICATION CHIMIQUE DES SUBSTRATS (*)

Mise en évidence de liaisons arginyl-acide aminé par hydrolyse spécifique de la myoglobine. Séparation des fragments obtenus.

(*) - Bibliographie page I04.

Nous avons essayé plusieurs méthodes de modification chimique des substrats (surtout de la myoglobine) en vue de permettre une hydrolyse enzymatique plus spécifique et plus ménagée (par la trypsine par exemple) ou une hydrolyse plus commode (par la carboxypeptidase, par exemple). Nous avons pu mettre ainsi en évidence certaines liaisons caractéristiques, en tirant partie de la spécificité de la trypsine (voir Tableau IO). Au cours de ces travaux, nous avons aussi étudié l'accessibilité et la réactivité de certains groupements fonctionnels, notamment du groupement imidazole de l'histidine et du groupement ξ -NH₂ de la lysine; pour ce dernier groupement, nous avons constaté des différences d'accessibilité suivant que la protéine était native ou dénaturée. Nous allons décrire en détail l'application de ces méthodes à la myoglobine.

La myoglobine ne contient que deux résidus d'arginine, mais 18 de lysine (TRISTRAM) (1). Or, la trypsine, comme endopeptidase, a une spécificité absolue pour les liaisons arginyl-acide aminé et lysyl-acide aminé et pas de spécificité secondaire notable (voir Tableau IO). Nous avons vu, dans le chapitre précédent, qu'un grand nombre de peptides était formé au cours de l'hydrolyse trypsique de cette protéine, surtout lorsqu'elle est dénaturée. Etant donné donc le petit nombre de résidus d'arginine présents, il nous a semblé intéressant d'essayer de bloquer les groupements ξ -NH₂ de la lysine, afin de pouvoir mettre en évidence et identifier les liaisons arginyl-acide aminé présentes.

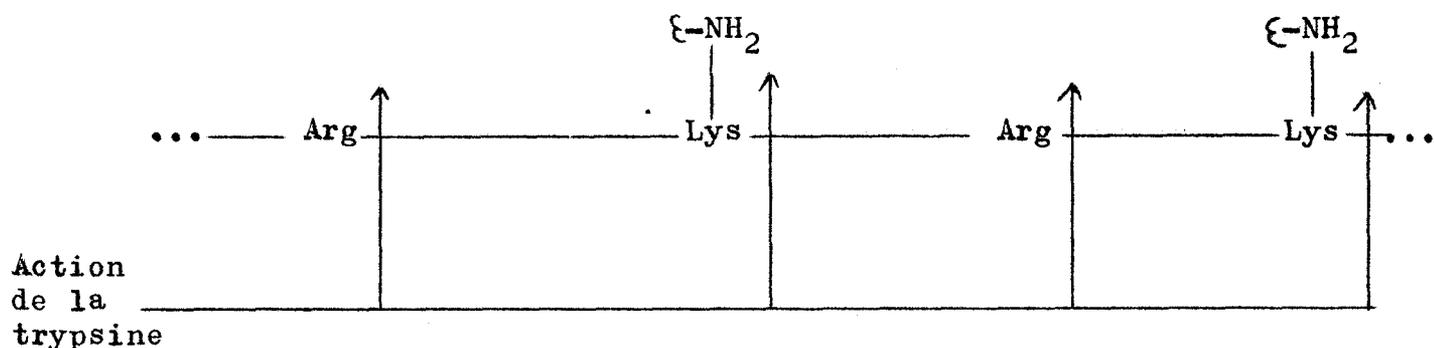
De telles expériences ont déjà été réalisées par REDFIELD et ANFINSEN (2) sur la ribonucléase.

Nos premiers essais ont porté sur une préparation de globine de myoglobine qui était déjà partiellement dénaturée. Le protocole a été le suivant.

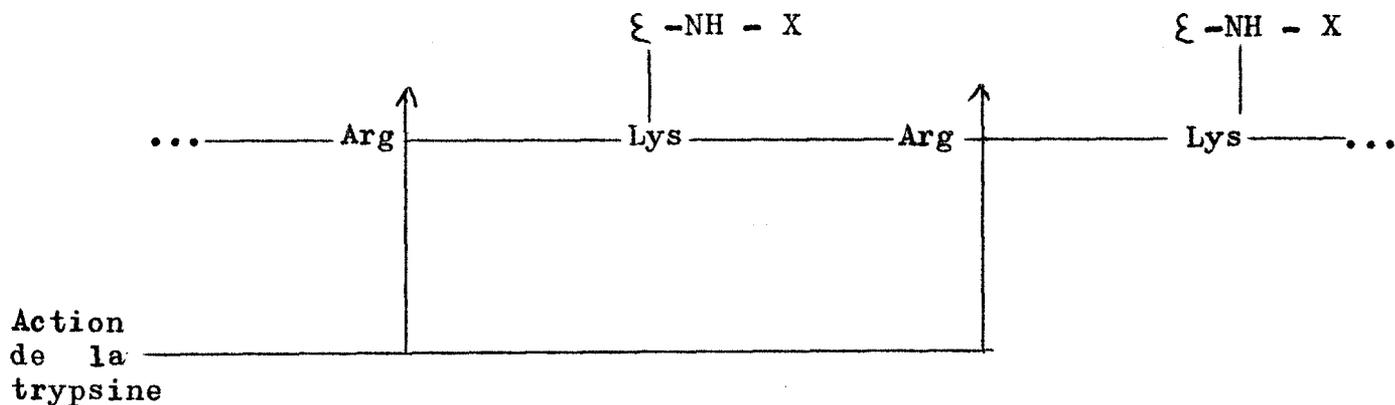
TABLEAU IO

Limitation de la spécificité de la trypsine par
modification chimique du substrat

Substrat initial



Substrat modifié



- X = radical carbobenzoxy (protéine carbobenzoxylée)
- = radical dinitrophényle (DNP-protéine)
- = radical acétyle (protéine acétylée)

Le groupe ξ -aminé peut aussi être remplacé par un
groupe guanidique (protéine guanidylée).

A - GLOBINE (DE LA MYOGLOBINE) DINOTROPHENYLEE.-

I) - Préparation de la DNP-Globine.-

On prépare la globine à partir de la carbonyl-myoglobine par l'acétone chlorhydrique. Après un lavage à l'acétone et à l'éther, la protéine est séchée sous vide. 10 mg de globine (environ 0,5 micromole) sont traités par un excès de fluorodinitrobenzène dans un mélange de bicarbonate de sodium à 2 p. 100 (1 vol.) et d'alcool (2 vol.) sous agitation, pendant 4 heures à 37° C. L'excès d'alcool est chassé par un courant d'air froid, l'excès de réactif éliminé par plusieurs extractions à l'éther, en faisant une émulsion par agitation importante, suivie d'une centrifugation qui sépare les deux phases (on peut aussi ajuster le pH aux environs de 2 avec de l'acide chlorhydrique, recueillir la DNP-protéine par centrifugation et la reprendre dans une solution de bicarbonate pour le lavage à l'éther). Le mélange est enfin ajusté à pH 2 par de l'acide chlorhydrique et la DNP-protéine précipitée est lavée plusieurs fois avec de l'eau à pH 2 contenant 25 p. 100 d'acétone, puis avec de l'alcool et de l'acétone. Lorsque la DNP-protéine est employée pour la recherche des groupements terminaux, on peut enfin la laver à l'éther et la garder sèche; mais ce dernier traitement la rend inutilisable pour les hydrolyses enzymatiques; la meilleure façon de procéder est de laisser la DNP-protéine à l'air pendant 2 à 4 minutes après le lavage final à l'acétone, puis de la reprendre encore humide dans le tampon qui servira à l'hydrolyse enzymatique.

D'autres échantillons de globine ont été traités par le fluorodinitrobenzène en milieu bicarbonate contenant 40 p. 100 d'acétone ou en milieu bicarbonate seul.

2) - Préparation de la trypsine.-

Pour éliminer la possibilité de coupures secondaires dues à la présence d'autres peptidases dans nos échantillons de trypsine cristallisée, nous les avons fait incubé pendant 24 heures à 37° C. dans 1 M HCl / 16 (2 - 5 mg de trypsine dans 1 ml). La trypsine présente une zone de stabilité maximum vis-à-vis du pH aux environs de pH 2 - 2,3; les autres peptidases éventuellement présentes, surtout la chymotrypsine, sont inactivées par ce traitement. Après l'incubation, on ajoute 0,05 ml de Cl₂Ca M / 10 à la préparation et on peut la garder ainsi au moins une semaine au réfrigérateur, sans perte d'activité.

3) - Hydrolyse trypsique et dinitrophénylation de l'hydrolysate.-

La DNP-globine est suspendue ou dissoute, selon la possibilité, dans du bicarbonate à 0,5 p. 100 et une partie aliquote de la préparation de l'enzyme est ajoutée. On laisse l'hydrolyse se poursuivre pendant 24 heures, à 30° C. Puis, on ajoute suffisamment de bicarbonate solide pour amener la concentration à 2 p. 100. On ajoute au mélange une quantité calculée de fluorodinitrobenzène et on laisse la condensation se faire pendant 2 heures en augmentant la température à 40° C. Au bout de ce temps, on ajoute de l'acétone pour obtenir une concentration de 40 p. 100 (en vol.) et on continue la condensation encore pendant 3 heures. Cette façon de procéder permet d'éliminer l'excès de fluorodinitrobenzène en le transformant entièrement en dinitrophénol. En effet, les extractions et lavages des DNP-peptides de l'hydrolysate enzymatique sont très délicats à réaliser et nous avons cherché à ne perdre aucun peptide au cours de ces manipulations. Le milieu est donc

ajusté à pH 2 (HCl). Après centrifugation, le précipité est lavé d'abord avec de l'eau à pH 2, puis à l'acétone acide, puis à l'éther. Après dessiccation, les DNP-dérivés sont hydrolysés en tube scellé sous vide par de l'HCl 5,7 N. De l'hydrolysat dilué (concentration en acide environ 1 N), on extrait les DNP-dérivés libérés, on les identifie et on les dose par les méthodes déjà décrites.

4) - Résultats obtenus (voir Tableau II et Figure I3).

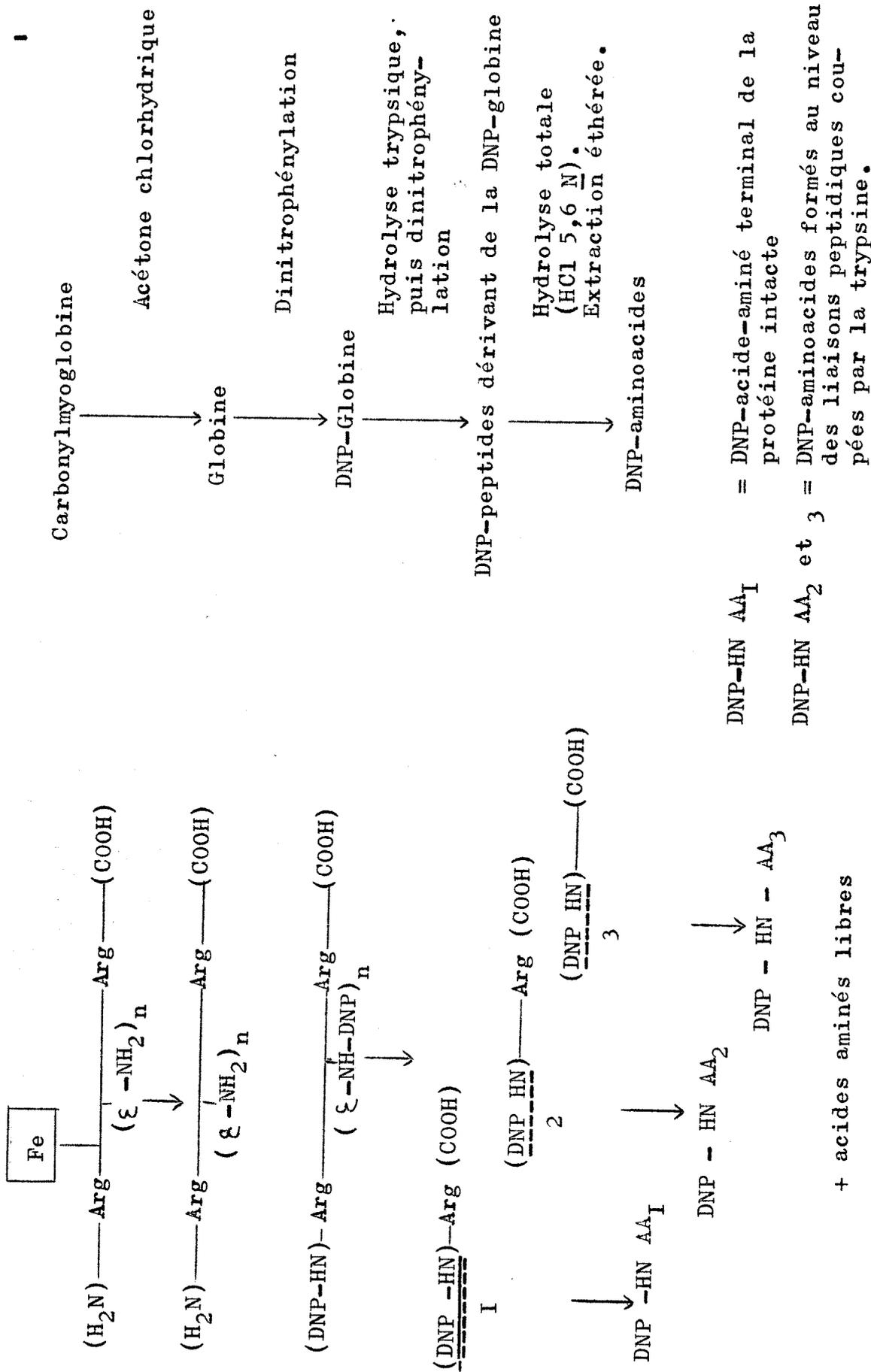
Nous avons trouvé, dans notre première série d'expériences, 3 taches intenses en proportion équimolaire; le DNP-glycocolle qui est le groupement N-terminal de la globine, la DNP-leucine et l'acide DNP-aspartique, et 4 autres taches plus faibles (DNP-alanine, DNP-sérine, DNP-thréonine, DNP-histidine). La DNP-tyrosine est aussi parfois présente.

L'existence d'enchaînements arg-leu et arg-asp (ou asp-NH₂) dans la protéine semblait donc démontrée, mais la présence d'autres taches en quantité assez importante (elles étaient, d'ailleurs, en quantité équimolaires entre elles) était anormale.

Nous avons pensé que la protéine que nous avons employée était un mélange de globine dénaturée et de globine native et que certains groupements ξ -NH₂ de la lysine n'étaient pas accessibles au réactif (pour ces groupements, la question de la réactivité ne joue guère; par contre, pour le groupe imidazole de l'histidine elle est essentielle). Nous avons donc préparé de la globine d'une façon très rigoureuse afin de l'obtenir à l'état natif (manipulation à - 15° C, en chambre froide spé-

TABLEAU II

Hydrolyse limitée de la DNP-globine par la trypsine



Figures 13

Représentation schématique des chromatogrammes bidimensionnels des DNP-acides aminés terminaux de l'hydrolysât trypsique de la DNP-globine (de la myoglobine).

- a : Globine partiellement dénaturée et dinitrophénylée. Hydrolyse trypsique. Le glycocolle est le groupe N-terminal initial. La leucine et l'acide aspartique proviennent de la coupure des liaisons arg-leu et arg-asp. La tyrosine n'est pas toujours présente. De la mono-DNP-histidine se trouve dans la phase hydrosoluble.
- b : Globine non dénaturée et dinitrophénylée. Hydrolyse trypsique. L'intensité relative de la tache du DNP-glycocolle dans les deux chromatographies provient du fait que la DNP-protéine n'a été que partiellement hydrolysée par l'enzyme.
-

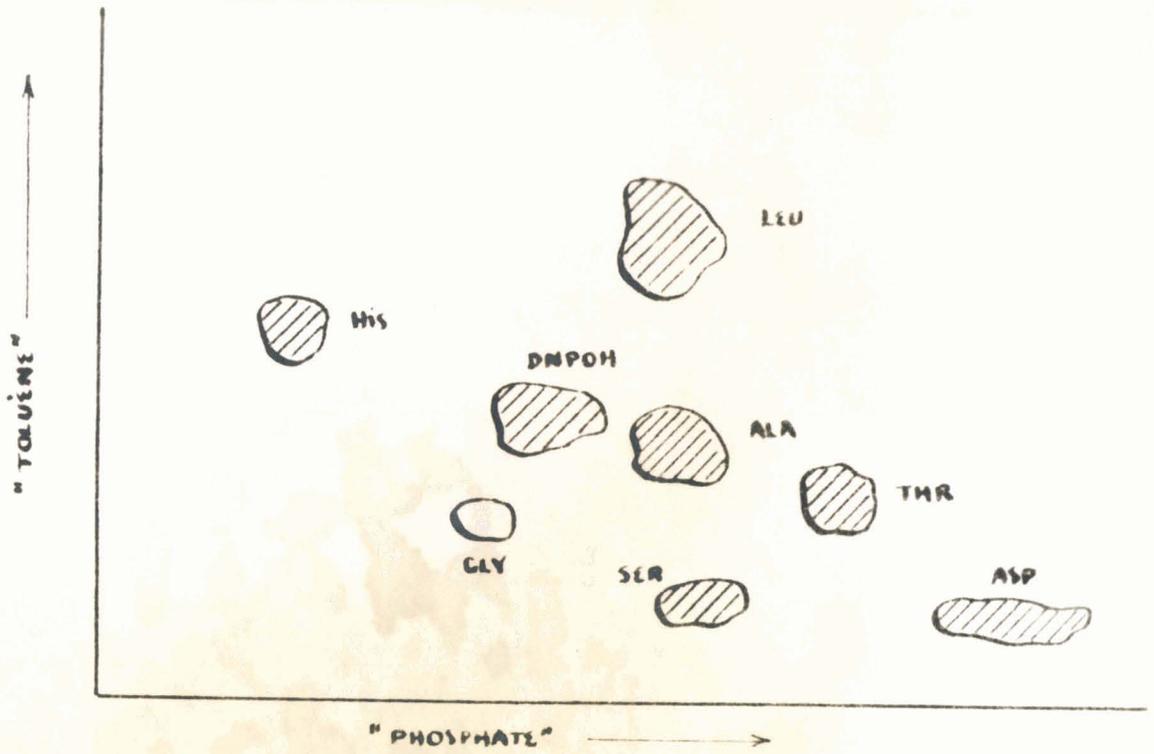


Fig. 14A

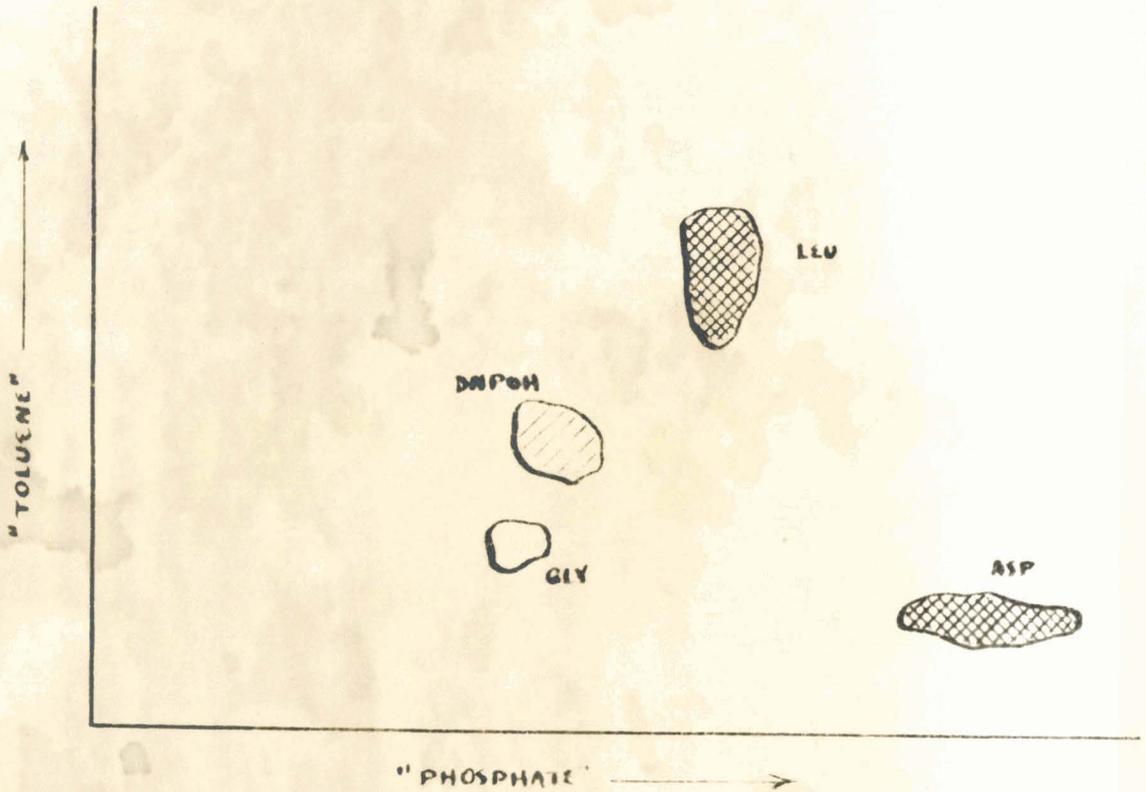


Fig. 14B

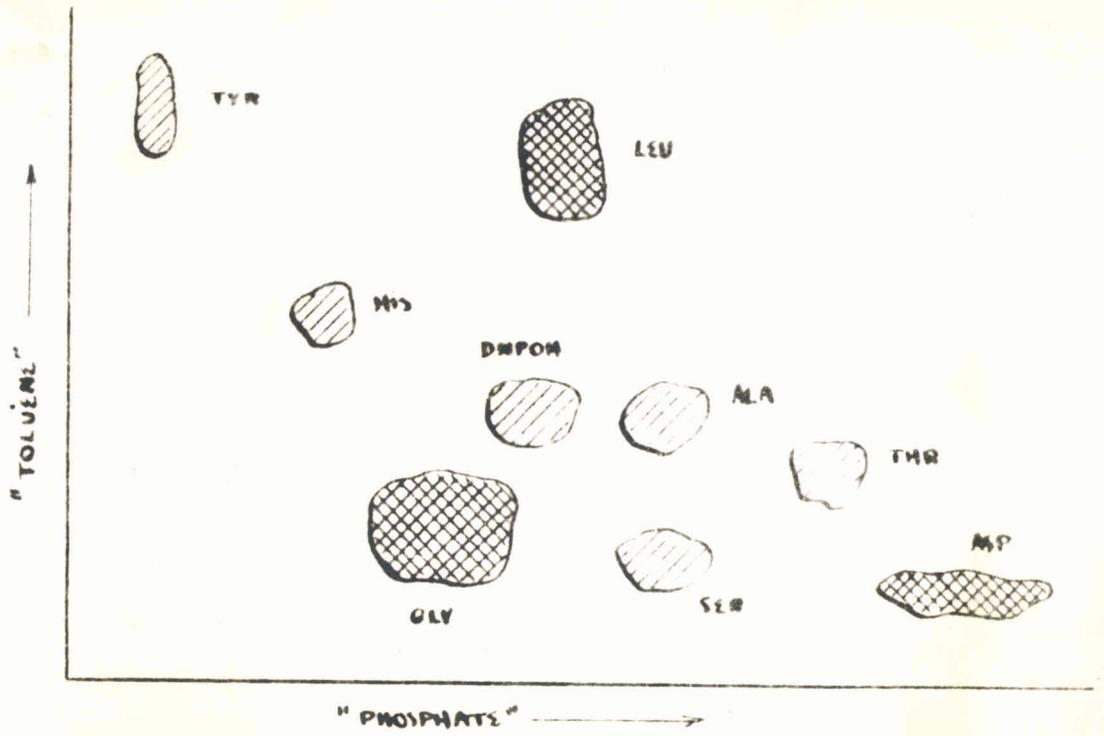


FIG. 13A

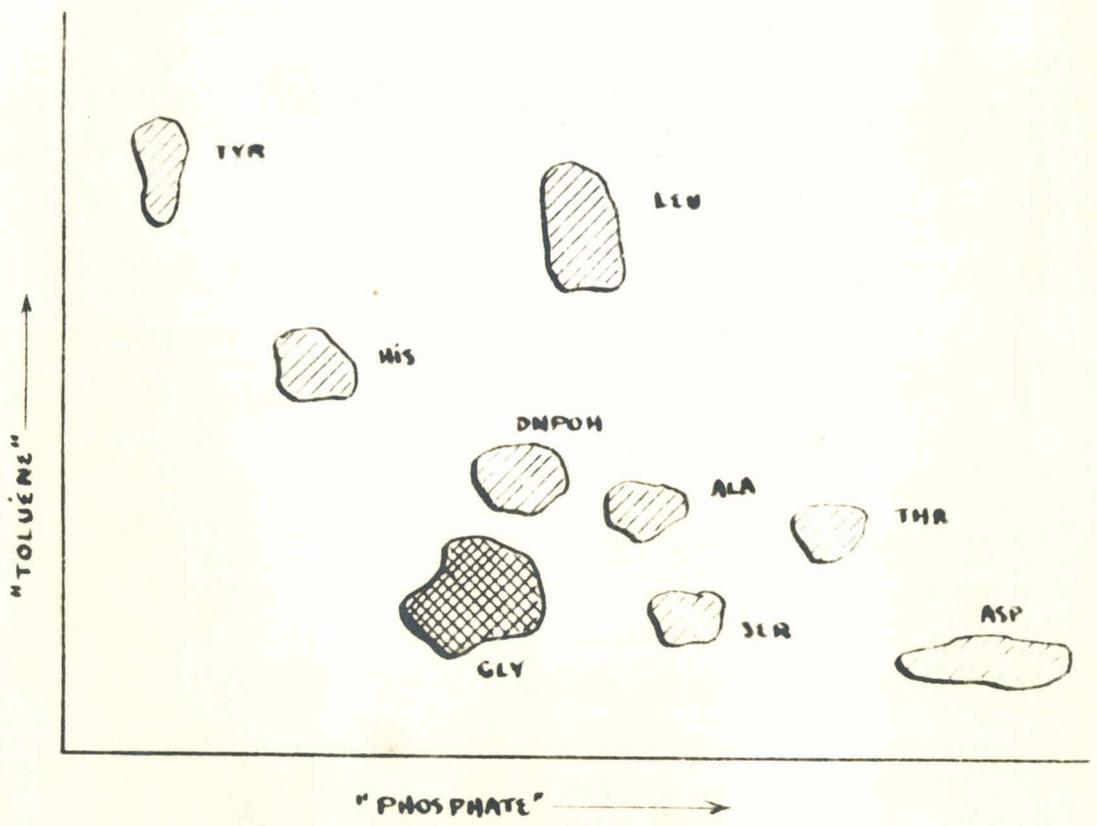


FIG. 13B

ciale) et nous avons répété les expériences. Cette fois-ci, les 7 taches étaient présentes en quantités sensiblement égales et nous avons aussi obtenu le même résultat en dinitro-phénylant la carbonylmyoglobine dans des conditions non-dénaturantes. Quatre, (ou peut-être cinq) des groupements ξ -NH₂-lysine de la protéine non-dénaturée ne sont donc pas accessibles au dinitrofluorobenzène, mais le deviennent après dénaturation.

B - GLOBINE (de la myoglobine) CARBOBENZOXYLEE.-

Nous avons fait des expériences analogues avec le chlorure de carbobenzoxyle (*). Le principe de la condensation de ce réactif avec la protéine est identique à celui que l'on réalise avec le fluorodinitrobenzène, mais l'hydrolyse du réactif lui-même est beaucoup plus poussée, et on doit normalement effectuer la réaction à une température plus basse. Les résultats obtenus avec la protéine carbobenzoxylée sont moins reproductibles que ceux obtenus avec la DNP-protéine, mais sont néanmoins similaires.

Nous avons étudié les dérivés carbobenzoxylés avec l'espoir de séparer les peptides obtenus et de les "régénérer" par décarboboxylation : en effet, le déblocage du groupe carbobenzoxy peut se faire soit par hydrogénation catalytique, soit par l'action de l'acide bromhydrique en milieu formique.

(*) - Nous remercions vivement notre collègue, M. DAUTREVAUX, pour la préparation de ce réactif.

Malheureusement, nos essais n'ont pas été couronnés de succès à la suite de plusieurs difficultés techniques :

- au cours de nos essais, l'action de la trypsine ne s'effectuait pas d'une façon complète sur de tels substrats;

- la régénération des peptides par décarboboxylation n'était pas techniquement commode.

C - GLOBINE (de la myoglobine) ACÉTYLÉE.-

Nous avons donc essayé une troisième méthode de modification chimique, l'acétylation, qui s'est révélée utile non seulement dans le cas des hydrolyses limitées, mais aussi dans les études des groupes terminaux (voir Chapitre VII). Nous nous sommes inspiré des travaux de HUGHES (3).

1) - Préparation d'acétylglobine non dénaturée.-

Nous décrirons d'abord le protocole employé pour acétyler les groupements NH_2 (ξ - NH_2 -lysine et α - NH_2 des acides aminés) tout en ne dénaturant pas la protéine.

Une solution de MbCO (quantité connue, de l'ordre de 10 - 20 mg, dissoute dans une petite quantité d'eau saturée en oxyde de carbone) est amenée à demi-saturation en acétate de sodium et refroidie à 0° C. dans un bain de glace. Sous agitation pendant trois heures, on ajoute de petites quantités d'anhydride acétique. La quantité totale ajoutée peut être, éventuellement, supérieure à la quantité théorique. La protéine acétylée est précipitée en ajoutant 5 volumes d'éthanol, lavée plusieurs fois par le mélange éthanol/acide chlorhydri-

que $N/40$ (5 : 1) pour enlever l'excès d'anhydride acétique et d'acétate de sodium (la présence d'acide empêche la solubilisation de l'acétylprotéine dans l'éthanol). La protéine est ensuite lavée à l'acétone plusieurs fois. Après le dernier lavage, on laisse évaporer la plus grande partie de l'acétone du précipité et on ajoute une petite quantité d'eau. Un gel rougeâtre se forme. En ajustant le pH aux environs de 7 - 8, l'acétylprotéine devient complètement soluble. Dans certains essais, nous avons ajusté le pH; dans d'autres, nous avons repris la protéine directement dans les tampons qui servent aux hydrolyses.

2) - Préparation d'acétylglobine dénaturée.-

Nous avons essayé plusieurs techniques de dénaturation de la protéine en vue de son acétylation : chauffage avec ou sans urée, traitement par l'éthanol, par du chlorhydrate de guanidine 6 M, etc... Le meilleur procédé pour dénaturer la protéine tout en la gardant sous une forme maniable a été le suivant :

A la protéine native (MbCO ou ferriMb), dissoute dans une petite quantité d'eau (1 - 2 ml habituellement), on ajoute suffisamment de chlorhydrate de guanidine pour obtenir une solution 0,2 M. La guanidine agit comme agent de dispersion. On ajoute à la solution de l'éthanol jusqu'à ce qu'un changement de transparence soit imminent et sans que la protéine soit coagulée. On laisse toute la nuit sous agitation, à la température de la pièce, et le lendemain on continue l'addition d'alcool, lentement et sous une forte agitation, jusqu'à ce que la protéine soit complètement coagulée. On ajuste la pro-

portion d'éthanol à 3 volumes, et on continue l'agitation 2 à 3 heures, tout en s'assurant que la protéine coagulée soit bien dispersée. On ajoute 6 volumes d'acétone refroidie (quantité calculée sur la base de la solution aqueuse initiale) et on récupère la protéine dénaturée par centrifugation. On vérifie, s'il s'agit d'un essai quantitatif, que toute la protéine a été précipitée en versant le surnageant dans un volume égal d'acétone froide. On suspend la protéine dans le minimum d'acide chlorhydrique $N/20$ et on ajoute, sous forte agitation, un grand excès d'acétone chlorhydrique (acétone contenant 2 p. 100 d'HCl concentré) pour enlever le groupement porphyrinique. On centrifuge et on répète l'opération deux fois. Enfin, on lave plusieurs fois à l'acétone. L'acétylation est effectuée de la même façon que pour la protéine entière, non dénaturée, sauf qu'aucune précaution spéciale n'est prise quant à la température et que l'éthanol aqueux qui sert au lavage peut être plus acide, du fait que le danger d'enlever le groupement porphyrinique n'existe plus. En reprenant dans de l'eau, on obtient un gel presque blanc qui est soluble en milieu alcalin.

3) - Hydrolyse trypsique de la globine acétylée.-

Des schémas des chromatogrammes obtenus sont reproduits sur la Figure 14. Ils démontrent, notamment ceux qui décrivent les résultats de l'hydrolyse trypsique de la globine dénaturée et acétylée, que deux liaisons caractéristiques ont été coupées : l'une est une liaison arg - leu, l'autre arg - asp (ou asparagine). En analysant surtout les résultats d'hydrolyse trypsique de la DNP-globine et de carbobenzoxylation, il semble que la liaison arg - leu soit plus facilement attaquée que la liaison arg - asp (ou asp - NH_2).

Figures I4

Représentation schématique des chromatogrammes bidimensionnels des DNP-acides aminés terminaux de l'hydrolysats trypsique de la globine (de la myoglobine) acétylée.

- a : Carbonylmyoglobine non-dénaturée, acétylée.
Hydrolyse trypsique. L'hydrolysats trypsique est dinitrophénylé et, après hydrolyse totale, les DNP-acides aminés sont chromatographiés. La petite quantité de DNP-glycocolle doit être attribuée à une acétylation incomplète du groupement N-terminal de la globine.
- b : Globine dénaturée (éthanol/guanidine/acétone acide) et acétylée. Hydrolyse trypsique. Il ne fait aucun doute que la DNP-leucine et l'acide DNP-aspartique proviennent des liaisons arg-leu et arg-asp (ou asp-NH₂) de la protéine.
-

D - ESSAIS DE SEPARATION DES FRAGMENTS PEPTIDIQUES LIBERES PAR
HYDROLYSE TRYPSIQUE DE LA DNP-GLOBINE MODIFIEE.-

L'intérêt de l'hydrolyse trypsique limitée et spécifique est représentée essentiellement par le "découpage" de la molécule en trois fragments de poids moléculaire réduit. La simplification du substrat qui en résulte augmente considérablement les possibilités d'études structurales. La disposition exacte de ces trois fragments sera facile à déterminer.

Le fragment de "tête" a le même groupe N-terminal que la globine initiale, le fragment de "queue" le même groupe C-terminal que la globine initiale.

Il est donc indispensable de pouvoir séparer efficacement et relativement aisément ces trois fragments.

Les essais séparatifs, comme nous l'avons déjà dit, ont été vains avec les DNP-peptides et les carbobenzoxy-peptides. En effet, dans ce cas, l'hydrolyse est trop incomplète. Les DNP-peptides obtenus ne séparent pas nettement dans le système de REDFIELD et ANFINSEN (4) (tampon borate en milieu urée concentrée sous haut voltage et en milieu toluène refroidi).

Avec les peptides acétylés, les essais séparatifs ont été plus satisfaisants. En tampon véronal de pH 8,9, on sépare assez nettement 4 fractions, assez faiblement colorables par le bleu de bromophénol par suite de l'acétylation des substrats. Parmi ces quatre fractions, l'une est constituée encore par de la globine acétylée non attaquée. En effet, l'hydrolyse trypsique n'est pas complète, sans doute parce que la trypsine

s'autolyse rapidement au cours de l'hydrolyse (*). Il serait donc nécessaire de rajouter de la trypsine à différents temps de l'hydrolyse.

De ces quatre fractions, 3 sont révélables par le réactif de SAGAKUCHI, spécifique de l'arginine : l'une est la globine acétylée intacte, qui contient 2 molécules d'arginine, les deux autres sont les deux fragments peptidiques possédant l'arginine en position C-terminale.

- - - - -

BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE VI

GABELOTEAU C. et DESNUELLE P.-

Bull. Soc. Chim. Biol., 1958, 40, 35 (5).

HUGHES W.-

Cité dans HERRIOTT R., Adv. Prot. Chem., 1947, 3, 169 (3).

REDFIELD R. et ANFINSEN C.-

J. Biol. Chem., 1954, 221, 385 (2, 4).

TRISTRAM G.-

in "The Proteins", vol. I, Part A, p. 181.
Academic Press, ed. New-York, 19 (1).

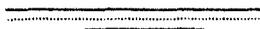
- - - - -

(*) - GABELOTEAU et DESNUELLE (5) ont séparé par chromatographie sur résine Dowex 50 II fragments peptidiques formés au cours de l'autolyse de la trypsine, à 30° C., pendant 6 heures.

C H A P I T R E V I I
- - - - - - - -

ETUDES SUR LES ACIDES AMINES N- et C-TERMINAUX DES HEMOPROTEINES

(Méthodes chimiques et méthodes enzymatiques)(*)



(*) - Bibliographie, page 121.

A - DETERMINATION DE L'EXTREMITÉ N-TERMINALE.-

I) - Extrémité N-terminale de la globine.-

Nous avons vérifié l'identité du groupement N-terminal de la myoglobine. La méthode est la suivante :

Environ 1 micromole de la protéine (MbCO non-dénaturée, globine, globine traitée par le chlorhydrate de guanidine et l'éthanol) est dissoute ou mise en suspension selon le cas dans 3 ml de bicarbonate de sodium à 2 p. 100 (pH 8,0). On ajoute une quantité calculée de fluorodinitrobenzène et on agite à 40° C., pendant la nuit. Le lendemain, on ajoute 2 volumes d'éthanol et on laisse continuer l'agitation pendant 2 à 3 heures, pour parfaire la condensation et éliminer l'excès de réactif. On acidifie (HCl) et on recueille le précipité de DNP-protéine par centrifugation. Le précipité est repris dans 3 ml de solution de bicarbonate de sodium à 2 p. 100 et on lave à l'éther plusieurs fois, par centrifugation. On acidifie encore, on ajoute un volume d'acétone et on lave plusieurs fois avec un mélange d'acétone et d'eau légèrement acide, enfin avec de l'acétone pure, puis avec de l'éther. On laisse sécher le précipité et on le reprend dans 2 ml d'HCl 5,7 N, dans un tube à essai, qu'on scelle sous vide. On chauffe à 105° C pendant 16 heures (*). L'hydrolysate est dilué pour obtenir une concentration une fois moléculaire en acide chlorhydrique et extrait à l'éther puis au mélange acétate d'éthyle/butanol secondaire. Les extraits sont séchés, soumis à la su-

(*) - Suivant les substrats, le temps d'hydrolyse peut être modifié, notamment raccourci, pour réduire la destruction du DNP-aminoacide terminal.

blimation pour enlever le dinitrophénol et étudiés en chromatographie bidimensionnelle. Les éluats de la tache (ou des taches trouvées) sont dosés par spectrophotométrie (voir plus haut Chapitre IV).

Un témoin du DNP-aminoacide identifié est aussi hydrolysé en présence du substrat (non dinitrophénylé) afin d'estimer la destruction subie par le groupement terminal au cours de l'hydrolyse.

En utilisant cette méthode, nous avons retrouvé les résultats classiques INGRAM (1) FRAENKEL-CONRAT (2), c'est-à-dire 1 molécule de DNP-GLYCOCOLLE dans le cas de la globine de myoglobine.

2) - Extrémité N-terminale de l'hémérythrine et du cytochrome c.

a. - Essais de détermination par la méthode des dinitrophénylaminoacides de SANGER.-

α) - Difficultés techniques : La détermination des extrémités N-terminales de l'hémérythrine et du cytochrome c est particulièrement délicate. Nos travaux, bien que poursuivis depuis un certain temps déjà, sont toujours en cours, et nous n'avons pas encore réussi à obtenir des conclusions définitives.

La difficulté du problème résulte du fait que, dans ces protéines, les groupements N-terminaux, s'ils existent, ne conduisent pas à des dérivés dinitrophénylés éthéro-solubles. Il faut donc surtout rechercher les résidus N-terminaux

dans la phase aqueuse, qui peut contenir les dérivés de l'arginine et de l'histidine.

L'arginine, qui ne forme qu'un dérivé monodinitrophénylé, se trouve toujours dans la phase aqueuse, d'où elle peut être extraite finalement par le mélange de KOCH et WEIDEL, en même temps que l' ξ -DNP-lysine et éventuellement quelques peptides contenant de l' ξ -DNP-lysine. La bis-DNP-histidine se partage entre les deux phases, étherée et aqueuse, mais elle peut être extraite de cette dernière, soit par extraction continue à l'éther dans un extracteur spécial, soit par l'acétate d'éthyle.

L' α -DNP-histidine et l'imidazole-DNP-histidine se comportent comme la DNP-arginine, c'est-à-dire qu'elles restent dans la phase aqueuse, d'où elles peuvent être extraites par le mélange de KOCH et WEIDEL.

Nous avons essayé de déterminer le degré de destruction des dérivés dinitrophénylés hydrosolubles. Au cours de ces essais, nous pouvons récupérer dans tous les cas plus de 90 p. 100 de la DNP-arginine ajoutée (hydrolyse de la DNP-arginine en présence de la protéine, séparation par électrophorèse, récupération, dosage) et il semble donc que la destruction de la DNP-arginine ne soit pas considérable et que l'on puisse, en règle générale, retrouver ce dérivé lorsqu'il est en position N-terminale. Il n'est pas exclu, évidemment, que la destruction de la DNP-arginine encore engagée dans une liaison peptidique soit plus importante. Quant aux dérivés de l'histidine, leur destruction semble être assez considérable, surtout pour les dérivés substitués sur le groupement imidazole.

Une autre difficulté technique provient de la présence de l' ξ -DNP-lysine, qui est toujours plus abondante que le dérivé N-terminal. Mais la séparation entre la DNP-arginine et l' ξ -DNP-lysine est assez facile à réaliser, en utilisant l'électrophorèse à pH 10,5 (NH_4OH $\underline{\text{M/I}}$) que nous avons décrite. La seule cause d'erreur peut provenir de la présence de dini-traniline, qui occupe la même place que la DNP-arginine; mais ces deux composés ont des fluorescences nettement différentes en lumière de WOOD et, de toutes façons, après récupération de la zone électrophorétique, une chromatographie dans le système "toluène" permet d'obtenir facilement leur séparation. La séparation électrophorétique de l' ξ -DNP-lysine et des dérivés de l'histidine est moins satisfaisante et doit être obligatoirement complétée après élution des bandes électrophorétiques par une séparation chromatographique. Nous donnons un schéma du comportement électrophorétique des dérivés rencontrés (Figure 15).

Mais un deuxième obstacle technique majeur (surtout dans le cas de l'histidine) provient de la difficulté d'hydrolyser complètement la DNP-protéine avant que le groupement terminal ne soit totalement détruit. Enfin, dans nos hydrolysats, nous avons été très gênés par la présence de peptides jaunes contenant de l' ξ -DNP-lysine. Dans le cas de l'hémérythrine, nous avons même pu isoler et identifier le peptide phe- -DNP-lysine.

β) - Résultats obtenus : Il ne nous est pas possible d'affirmer avec certitude la présence de l'histidine comme résidu N-terminal dans les deux protéines étudiées. Il est évidemment possible que ces molécules ne contiennent pas de

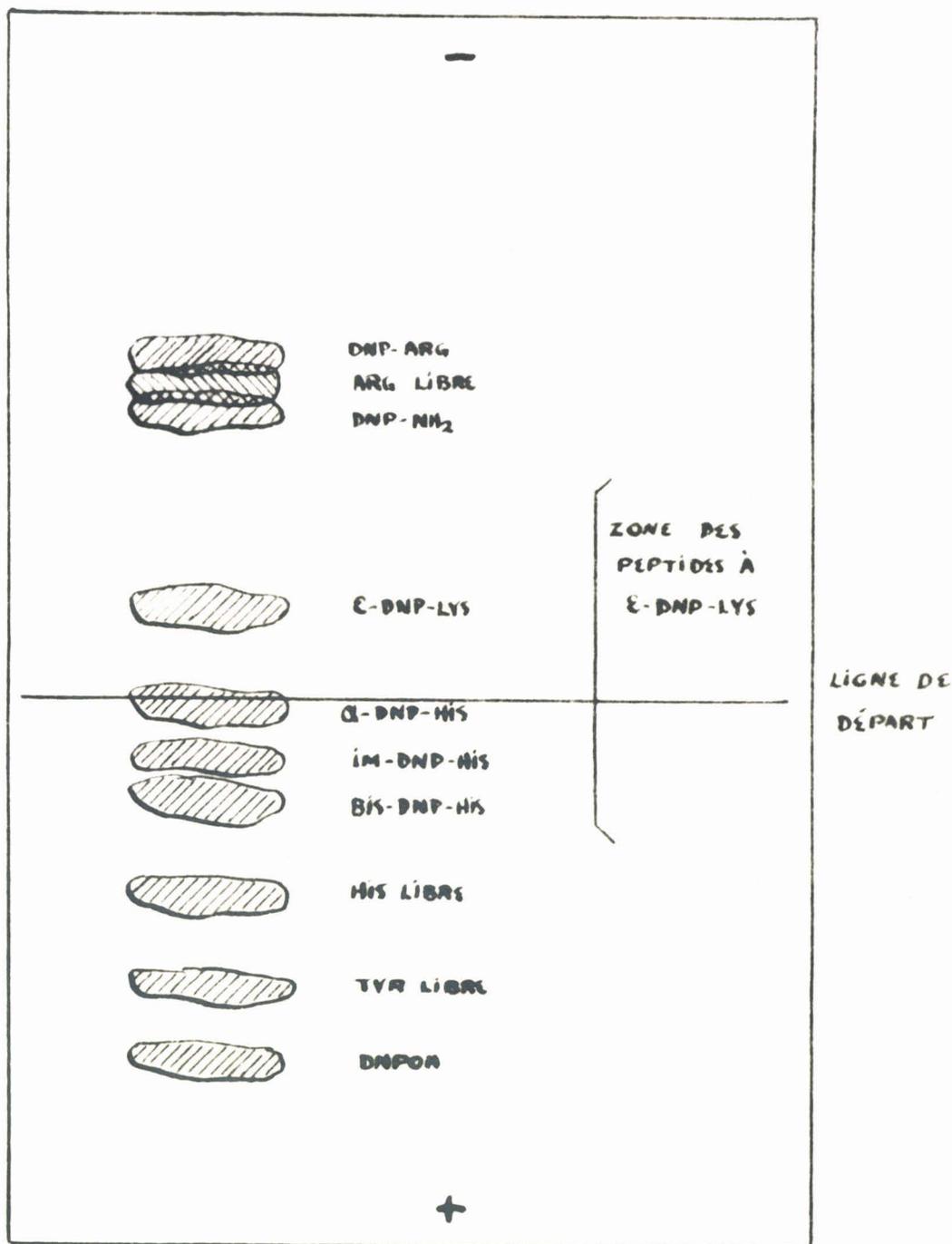


Fig.15 SÉPARATION ÉLECTROPHORÉTIQUE DES DÉRIVÉS DNP ET QUELQUES ACIDES AMINÉS LIBRES POUVANT SE TROUVER DANS LA PHASE HYDROSOLUBLE

groupements terminaux (protéine cyclique) ou que les groupements aminés terminaux soient bloqués (acylation, association électrostatique, etc.) ou difficilement accessibles (empêchement stérique).

Nous sommes le premier qui ayons travaillé sur les groupements N-terminaux de l'hémérythrine, mais la question du cytochrome c a une histoire, que nous allons résumer brièvement.

PAUL (3) a montré que, si l'on traitait le cytochrome c de Boeuf par le dinitrofluorobenzène, une petite partie de l'histidine (0,47 résidu sur trois) n'atait pas dinitrophénylable; cette détermination d'histidine libre ayant été faite par dosage microbiologique à l'aide d'une décarboxylase spécifique. MARGOLIASH (4) a trouvé que sur les 4 résidus d'histidine présents dans le cytochrome c de Cheval, l'un donnait de la bis-DNP-histidine et représentait donc un groupement N-terminal "normal" (non associé avec la porphyrine), un autre donnait un dérivé imidazole-DNP-histidine et provenait donc d'un résidu d'histidine situé dans la chaîne peptidique, un autre ne donnait pas de dérivé dinitrophénylé et pouvait donc être un résidu de la chaîne dont le groupement imidazole n'était pas accessible (association avec la porphyrine ?); enfin le dernier donnait un dérivé bis-DNP-histidine, mais seulement après traitement de la protéine par de l'eau oxygénée, et représenterait donc un deuxième groupement N-terminal dont le groupement imidazole serait associé avec la porphyrine. Ces résultats sont très séduisants, surtout parce qu'ils fournissent un tableau complet de la situation des histidines dans la molécule, mais nous n'avons jamais réussi à les reproduire.

Nous avons pu démontrer, en utilisant le peptide synthétique histidyl-histidine (his-his), que les arguments concernant le manque de réactivité du groupement imidazole vis-à-vis du dinitrofluorobenzène doivent être interprétés avec beaucoup de prudence. Par extraction continue à l'éther d'un hydrolysat de DNP-cytochrome c, nous avons trouvé de petites quantités de bis-DNP-histidine, mais en quantités si faibles qu'on ne peut affirmer que l'histidine est en position N-terminale. Nos essais de mise en évidence de l' α -DNP-histidine ont rencontré les difficultés discutées plus haut.

Plus tard, un groupe japonais (MATSUBARA, HAGIHARA, HORIO et OKUNUKI) (5) ont trouvé l'arginine comme groupe N-terminal dans le cytochrome c de Boeuf et de Cheval, et l'arginine et la thréonine pour le cytochrome c de Levure. Nous n'avons pu confirmer ces travaux, en ce qui concerne le cytochrome c de Cheval. Or, il nous semble presque impossible de ne pas retrouver l'arginine par les méthodes (électrophorèse, récupération, chromatographie, révélation spécifique, dosage) que nous avons utilisées.

Nous devons conclure donc en disant que la présence d'arginine comme acide aminé N-terminal nous semble bien improbable, tandis que la présence d'histidine est possible mais n'est pas démontrée clairement.

b. - Essais de détermination des groupes terminaux par la leuciné-aminopeptidase.

En vue d'obtenir des renseignements plus précis, nous avons essayé de déterminer le groupe N-terminal (et la séquence

N-terminale) en utilisant la leucine aminopeptidase que nous avons préparée selon HILL et SMITH (6) à partir d'homogénat de reins de Porc. Bien que nos préparations d'enzyme se soient montrées très actives vis-à-vis de la leucylglycine (leu-gly) synthétique et aussi de l'insuline pure standard (Commission Internationale de Biochimie, IUPAC, fournie par British Drug House, Ltd), aucune activité significative n'a pu être observée, aussi bien sur l'hémérythrine, sur la myoglobine (aussi bien sur la globine que sur la carbonylmyoglobine) que sur le cytochrome c. Il semble que ces substrats soient trop complexes ou ne soient pas suffisamment "dépliés" pour que l'enzyme puisse agir.

B - DETERMINATION DE LA SEQUENCE C-TERMINALE PAR LA CARBOXY-PEPTIDASE.-

La carboxypeptidase est un enzyme se trouvant normalement dans les sécrétions pancréatiques et qui agit sur les protéines (ou les peptides) en enlevant, l'un après l'autre, les acides aminés situés à l'extrémité C-terminale de la chaîne peptidique. La spécificité de l'enzyme est assez large; seule, la présence d'un résidu de proline dans la chaîne constitue un barrage absolu à l'action de l'enzyme. Toutefois, la vitesse de libération des différents résidus d'acides aminés peut varier de façon importante. La phénylalanine est l'acide aminé libéré le plus vite, la lysine celui qui l'est le plus lentement. L'enzyme dont nous disposons (Worthington Biochemicals, Inc.) est une préparation très purifiée et qui n'est pratiquement pas souillée par d'autres enzymes protéolytiques, mais, pour plus de rigueur dans nos expériences, nous

l'avons traité, avant son utilisation, par un léger excès de diisopropylfluorophosphate. Ce réactif inhibe surtout la chymotrypsine qui pourrait être présente, et n'influe guère sur l'action de la carboxypeptidase.

Nous avons essayé l'activité de cet enzyme sur un échantillon d'insuline pure et nous avons pu constater l'enlèvement de quantités presque stoichiométriques d'alanine (chaîne A), d'asparagine (chaîne B) et d'une trace d'acide aspartique qui provient de l'asparagine en position C-terminale.

Dans des conditions comparables, l'enzyme n'a montré aucune activité sur le cytochrome c et seulement une faible activité vis-à-vis de la globine de myoglobine ou de la myoglobine elle-même. Néanmoins, ces premières expériences nous ont donné quelques indications sur l'identité des résidus de la séquence C-terminale de la myoglobine; en effet, à partir de la myoglobine, environ un 1/10 d'équivalent de glycocolle est libéré avec des traces d'autres acides aminés. Devant ces échecs, il nous a semblé indispensable d'essayer de faciliter l'action de l'enzyme en dénaturant la protéine et en la modifiant chimiquement, comme nous l'avons fait pour l'hydrolyse trypsique spécifique; dans ces conditions, nous avons obtenu des résultats très satisfaisants.

I. - Séquence C-terminale de la globine de myoglobine de Cheval.-

a) - Préparation de la globine. Dénaturation et acétylation. Une quantité de myoglobine suffisante (4 à 5 mg, soit 0,25 micromole par prélèvement; (6 à 8 prélèvements en tout)

est dénaturée par traitement avec un mélange chlorhydrate de guanidine-éthanol. Après précipitation, lavage, enlèvement du groupement prosthétique, la globine est acétylée, de la façon déjà décrite (Chapitre VI). La protéine, qui se présente sous la forme d'un gel après le dernier lavage à l'acétone légèrement acide, est dissoute dans une quantité d'eau légèrement inférieure à celle qui permet des prélèvements de 2,0 ml (4 à 5 mg de protéine dans 2 ml de mélange final) et le pH est amené aux environs de 7,0 - 7,5, avec de la soude diluée. On tamponne avec 1 ml de bicarbonate de sodium à 0,2 p. 100 (les groupements ξ -NH₂-lys de la protéine étant complètement bloqués, la protéine est très acide) et on parfait l'ajustement du pH jusqu'à 8,0. Si la protéine a été correctement traitée, la préparation est complètement soluble. La solution est équilibrée à 37° C. et à ce moment on peut ajouter l'enzyme pour commencer l'expérience.

b) - Préparation de l'enzyme. La quantité d'enzyme pour une expérience normale (30 à 40 mg de myoglobine) est de 1 à 2 mg. La quantité correspondante de suspension commerciale d'enzyme, prélevée à la pipette, est lavée trois fois à l'eau par centrifugation. On dissout l'enzyme à froid dans un millilitre de chlorure de lithium à 10 p. 100. On ajoute 0,5 ml de bicarbonate de sodium à 2 p. 100, 0,5 ml d'eau et un léger excès (quelques gouttes) d'une solution de di-isopropylfluorophosphate (DFP) faite extemporanément dans l'eau (*). On ajuste

(*) - Nous gardons le DFP (composé très toxique) dans des petits tubes en verre, presque capillaires. Pour chaque expérience, on amène une goutte vers l'extrémité du tube que l'on casse à l'aide d'une lime à verre, on laisse tomber le bout du tube dans une petite quantité mesurée d'eau et on renferme le tube.

la quantité de solution pour permettre le prélèvement d'une partie aliquote qui servira de témoin de l'incubation de l'enzyme lui-même. On fait également un témoin avec la solution de globine : les quantités d'acides aminés trouvées dans ces témoins sont toujours insignifiantes. On mélange la solution d'enzyme et celle d'acétyl-globine et on fait immédiatement un prélèvement (temps zéro). Pour faciliter ce prélèvement au temps zéro, on peut inhiber l'action de l'enzyme avant de le mettre en contact avec la solution d'acétylglobine.

c) - Conduite de l'action enzymatique. Traitement des prélèvements. Des prélèvements de 2,0 ml sont placés dans un tube à centrifuger contenant un millilitre d'acide chlorhydrique N/1. L'acidité du mélange arrête instantanément l'action enzymatique et l'acétyl-globine précipite. Les tubes sont centrifugés et le surnageant est placé dans un tube contenant 150 mg de bicarbonate de sodium (80 mg environ servent à neutraliser l'acide, le reste sert à amener le pH aux environs de 8,0). Le précédent précipité d'acétyl-globine est lavé une fois avec un millilitre d'eau que l'on ajoute au premier surnageant. On ajoute dans le surnageant une quantité calculée de fluorodinitrobenzène et on effectue la condensation à 40° C pendant 3 heures. Au bout de ce temps, on extrait le mélange plusieurs fois à l'éther pour enlever l'excès de réactif, puis on acidifie et on extrait à l'éther et avec le mélange butanol secondaire/acétate d'éthyle comme nous l'avons décrit plus haut (dosage des DNP-aminoacides - Chapitre IV). Les extraits sublimés sont chromatographiés. Les éluats des taches sont dosés spectrophotométriquement. On peut aussi suivre la cinétique de la réaction par la chromatographie classique des acides aminés. Mais cette technique nécessite la déminéralisa-

lisation préalable du mélange réactionnel. Il est donc plus commode de transformer les acides aminés libérés en dérivés dinitrophénylés, que l'on peut doser facilement et directement.

L'horaire des prélèvements et la durée totale d'une expérience peuvent varier d'une protéine à une autre et même d'une préparation à une autre; deux de nos expériences types ont comporté les temps de prélèvement suivants : 0, 10, 25, 55, 100, 160, 230, 320 minutes et 16 heures pour la première, - 0, 4, 10, 20, 40, 80 minutes pour la seconde.

d) - Résultats obtenus. Les résultats sont rassemblés sur les graphiques de la Figure I6, sur les schémas des chromatogrammes de la Figure I6 et dans le Tableau I2.

L'acide aminé en position C-terminale est donc le glycocolle, vraisemblablement suivi (ou plutôt précédé pour respecter notre convention de terminologie) par la phénylalanine, l'asparagine (ou la glutamine), la leucine; on trouve ensuite l'acide glutamique et la thréonine ou l'inverse. On libère aussi de l'alanine, de la sérine, de la valine, de la lysine et de l'histidine. La courbe de la leucine (d'après des expériences poursuivies pendant des temps longs de 16 et 24 heures) semble indiquer la présence de deux résidus de cet acide aminé. En effet, la courbe de libération continue à augmenter sans s'infléchir et arrive à couper celle de l'asparagine. De plus, au cours des expériences prolongées dans lesquelles la quantité de résidus secondaires libérés devient assez importante, nous avons effectué la séparation chromatographique des taches d'acide glutamique et d'acide aspartique:

TABLEAU I2

Dosage des DNP-aminoacides libérés par l'action de la carboxypeptidase sur la globine.

	Gly	Phe	Asp NH ₂ Glu NH ₂	Leu	Thre	Glu	Ala	Ser	Val	His	Lys
Facteur de LEVY	1,03	1,03		1,10	1,02	0,94	1,09	0,97	0,89	1,62	0,64
4'	0,084	0,096	0,051	0,009	-	-	0,013	0,019	-	-	-
10'	0,280	0,252	0,128	0,046	-	0,020	0,009	0,019	-	-	-
20'	0,458	0,336	0,207	0,128	0,038	0,053	0,030	0,018	0,013	0,008	0,004
40'	0,638	0,380	0,322	0,233	0,138	0,105	0,105	0,023	0,015	0,014	0,008

Les nombres sont exprimés en densité optique après correction par les facteurs de LEVY : le nombre 0,92 représenterait 1 mole d'acide aminé/mole de protéine.

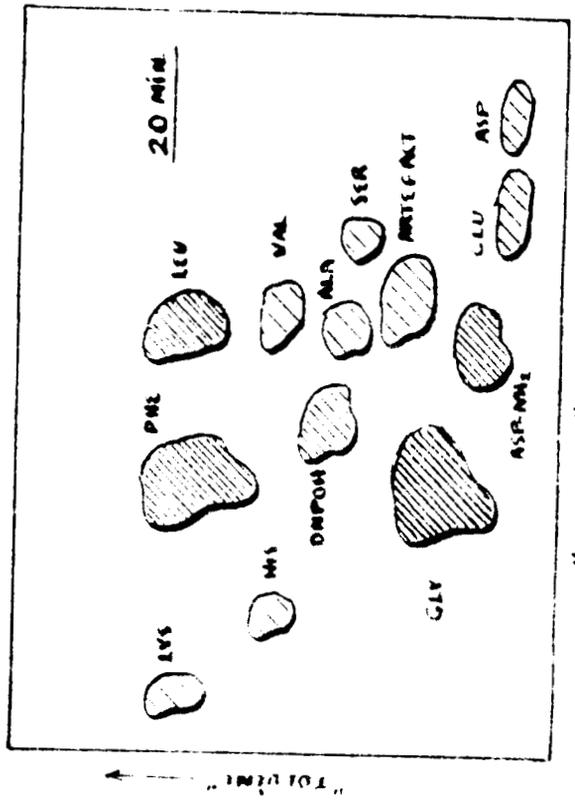
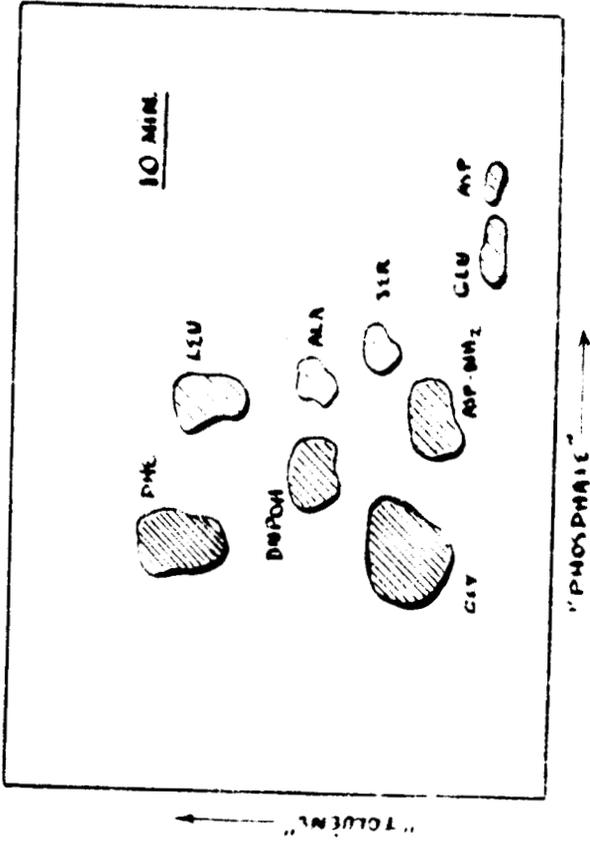
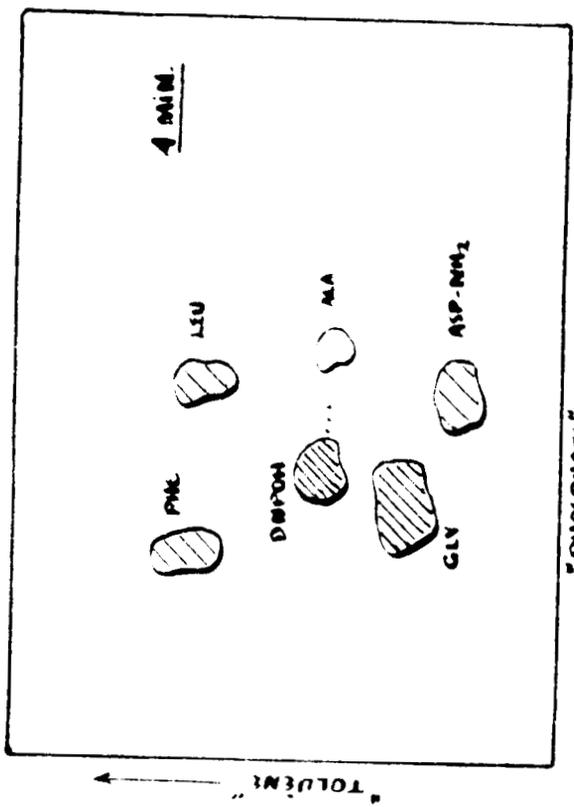
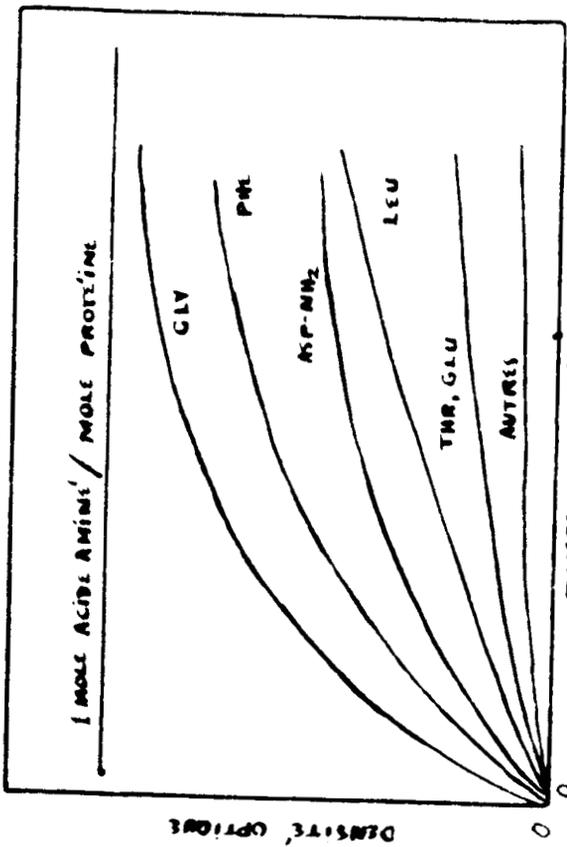


Fig. 16

la quantité d'acide glutamique trouvée a été toujours supérieure à celle de l'acide aspartique.

La séquence C-terminale peut donc être représentée de la façon suivante :

(Val, His, Leu) Glu
Pro--) Ala, Ser (, ou --- Leu-Asp (NH₂)-Phe-Gly (COOH).
(Asp, Lys,) Thr

2. - Groupements C-terminaux du cytochrome c.-

Des chercheurs japonais (TITANI, ISHIKURA et MINAKAMI) (7), en utilisant la méthode d'hydrazinolyse de AKABORI et coll., (8) ont mis en évidence la présence d'acide glutamique comme résidu C-terminal dans les cytochromes c de Cheval, de Baleine et de Levure de bière. Or, nous avons traité notre cytochrome c de la même façon que la myoglobine (dénaturation, acétylation, etc), et nous avons constaté la libération par action de la carboxypeptidase de faibles quantités d'acides aminés, parmi lesquels on peut identifier l'acide glutamique.

Nos travaux ne sont pas suffisamment avancés pour que nous puissions présenter la séquence C-terminale de cette protéine. La mise en évidence d'un groupement C-terminal est, évidemment, d'un très grand intérêt théorique, parce qu'elle permet d'affirmer que la protéine n'a pas une structure cyclique.

BIBLIOGRAPHIE DU CHAPITRE VII

AKABORI S., OHNO K., IKENAKA T., OKADA Y., HANAFUSA H.,
HARUNAI., TSUGITA H., SUGAE K. et MATSUSHIMA T.-
Bull. Chem. Soc. Japan, 1956, 29, 507 (8).

FRAENKEL-CONRAT H.-
J. Am. Chem. Soc., 1954, 76, 3606 (2).

HILL L. et SMITH E.-
J. Biol. Chem., 1957, 228, 578 (6).

INGRAM V.M.- Biochim. Biophys. Acta, 1955, 16, 599 (1).

PAUL K.,- Acta Chim. Scand., 1951, 5, 379 (3).

MARGOLIASH E.-
Nature, 1955, 175, 293 (4).

MITSUBARA H., HAGIHARA Y., HORIO T., et OKUNUKI K.-
Nature, 1957, 179, 250 (5).

TITANI K., ISHIKURA H. et MINAKAMI J.-
J. Biochem. (Tokyo) 1957, 44, 499 (7).

- - - - -

C H A P I T R E V I I I
- - - - -

CONCLUSIONS GENERALES

.....

L'expérimentation que nous avons rassemblée dans les chapitres précédents peut être résumée de la façon suivante :

A - EN CE QUI CONCERNE LES TECHNIQUES :

a) - Nous avons développé la description de l'élégante méthode du dosage des acides aminés par l'intermédiaire de leurs dérivés dinitrophénylés (méthode de LEVY). Nous avons décrit minutieusement les conditions de synthèse des DNP-amino-acides (description d'une cellule de synthèse) et précisé les possibilités d'élimination des artéfacts (description d'un dispositif de microsublimation du dinitrophénol), insisté sur les précautions nécessaires à l'extraction des dérivés dinitrophénylés (notamment en ce qui concerne les dérivés "hydro-solubles" extractibles par le mélange à parties égales de butanol secondaire et d'acétate d'éthyle) et donné une description complète de la séparation chromatographique de ces dérivés (précisions sur les différentes étapes chromatographiques, indications indispensables sur la préparation des solvants).

Les comparaisons que nous avons pu faire (notamment à propos de la composition du cytochrome c de Cheval) entre la méthode des DNP-aminoacides que nous avons utilisée et la méthode de MOORE et STEIN, qui est actuellement considérée comme la meilleure méthode de dosage, sont très satisfaisantes.

b) - Nous avons décrit une méthode de détermination de la séquence C-terminale par l'action de la carboxypeptidase sur une protéine partiellement dénaturée et acétylée.

Le succès de la détermination de la séquence C-termi-

nale d'une protéine par l'action spécifique et récurrente de la carboxypeptidase dépend, en grande partie, de la réactivité du substrat. La préparation du substrat est donc une étape capitale : ce dernier doit être suffisamment dénaturé pour être accessible à l'enzyme, mais doit rester complètement soluble. La dénaturation par le mélange chlorhydrate de guanidine/éthanol et l'acétylation du substrat nous ont donné entière satisfaction.

D'autre part, la cinétique de l'action de la carboxypeptidase est très facilement suivie par le dosage des acides aminés transformés en dérivés dinitrophénylés.

c) - Nous avons donné une description détaillée de la préparation de l'hémérythrine de Sipunculus nudus, du cytochrome c de Cheval, de la myoglobine de Cheval, en choisissant parmi les données de la littérature les conditions expérimentales les plus satisfaisantes, les plus commodes et les plus sûres.

B - EN CE QUI CONCERNE LA STRUCTURE DES HEMOPROTEINES ETUDIEES, l'ensemble de nos résultats peut être schématisé ainsi :

a) - Sur l'hémérythrine de Sipunculus nudus :

I^o - Nous avons déterminé la composition en acides aminés. Cette protéine est très riche en leucines, en phénylalanine et en acide aspartique.

La teneur en cystine est très faible: 1 ou 2 résidus sur les 572 de la molécule. Cette détermination est très im-

portante, car elle permet de réfuter la théorie émise par KLOTZ et coll. en ce qui concerne la fixation du fer sur l'hémérythrine de Phascolosoma gouldii. Pour ces auteurs, le fer de l'hémérythrine de Phascolosoma gouldii se fixe sur les résidus de cystine (2 atomes de fer avec les deux soufres d'un résidu de cystine). Or, l'hémérythrine de Sipunculus nudus, en tenant compte de sa teneur en fer (0,87 p. 100) et de son poids moléculaire (66.000), contient au moins 10 atomes de fer. Donc la protéine, qui contient au maximum deux résidus de cystine, ne peut fixer que 4 atomes de fer sur les 10 existants. La théorie de KLOTZ est peut être valable pour l'hémérythrine de Phascolosoma gouldii dont la composition en acides aminés n'est pas connue; elle ne l'est pas pour l'hémérythrine de Sipunculus nudus.

2° - Nous avons abordé l'étude des groupements N-terminaux de la molécule. Nous n'avons pas décelé de DNP-aminoacides terminaux éthérosolubles et nous avons rencontré des difficultés techniques importantes en ce qui concerne la détermination de DNP-acides aminés terminaux hydrosolubles (arginine ou histidine). Il ne nous est donc pas possible de donner une conclusion définitive à ce sujet.

b) - Sur le cytochrome c de Cheval :

1° - Nous avons déterminé la composition en acides aminés. L'ensemble de nos résultats est en bon accord avec ceux de NUNNIKHOVEN obtenus très récemment par la méthode de MOORE et STEIN. Deux discordances peuvent toutefois être notées, l'une en ce qui concerne l'acide glutamique (14 résidus d'après notre composition, 12 d'après celle de NUNNIKHOVEN),

l'autre en ce qui concerne l'histidine. NUNNIKHOVEN trouve 3 molécules d'histidine; comme MARGOLIASH nous en trouvons quatre.

Le taux d'arginine du cytochrome c est faible (2 résidus sur les 102 de la molécule). La teneur en lysine est particulièrement élevée (19 résidus sur 102). Le cytochrome c ne contient pas de sérine.

2° - Nous avons également abordé le problème des groupes N-terminaux du cytochrome. Cette question est, en effet, très discutée. MARGOLIASH a trouvé deux résidus d'histidine. MATSUBARA et coll. ont décelé un résidu d'arginine.

Comme dans le cas de l'hémérythrine, des difficultés techniques importantes surviennent au cours de l'identification des DNP-hydrosolubles terminaux. Nous pouvons affirmer qu'il n'existe pas d'arginine en position N-terminale. Nous avons isolé une petite quantité d'histidine, mais nous n'avons pas pu retrouver dans leur intégralité les conclusions de MARGOLIASH. En ce qui concerne la détermination de ces groupements N-terminaux, nous n'avons pas obtenu de résultats précis en utilisant la leucine-aminopeptidase purifiée suivant la méthode de HILL et SMITH.

c) - Sur l'hémoglobine de Cheval :

Nous avons échoué dans nos essais d'isolement d'un fragment caractéristique de la molécule contenant encore le groupement porphyrinique, comme cela avait été réalisé pour le cytochrome c. Etant donné la labilité des liaisons exis-

tant entre le groupement ferroporphyrinique et la protéine, nous ne pouvions être assuré de l'intégrité de ces liaisons au cours des étapes de la préparation et de l'isolement.

De toutes façons, en étudiant la nature de leurs groupements N-terminaux, les fractions hémopeptidiques isolées par ajustement à pH 5 des hydrolysats trypsiques ou chymotrypsiques d'hémoglobine se sont révélées être constituées par un mélange ou un complexe de peptides co-précipités par acidification.

d) - Sur la globine de la myoglobine de Cheval :

1^o - Nous avons déterminé la composition en acides aminés. La molécule est très riche en leucines (22 résidus sur les 140) et en lysine (18 sur 140). Elle ne contient que deux résidus d'arginine.

2^o - Après avoir défini les conditions optima d'hydrolyse trypsique de la carbonylmyoglobine (notamment l'influence de la dénaturation par l'urée 4 M et de l'activation de l'enzyme par le Ca^{++}), nous avons isolé des hydrolysats, par un couplage de techniques électrophorétiques et chromatographiques, quelques peptides caractéristiques contenant de l'histidine, qui pouvaient être révélés spécifiquement par la réaction de PAULY.

La composition et une séquence partielle de trois d'entre eux ont été établies :

- (H₂N) Val (Gly₂, Ala, Leu, Glu, His) Lys (COOH)
- (H₂N) Leu (Leu, Gly₂, Ala, Glu₂, Asp, His) Arg (COOH)
- (H₂N) His (Gly, Ser, Ala, Leu, Asp₂) Lys (COOH)

3° - Nous avons confirmé l'existence du glycolle en position N-terminale (pour INGRAM et FRAENKEL-CONRAT, la séquence N-terminale est Gly-Leu).

A partir de la globine partiellement dénaturée et acétylée, nous avons étudié la séquence C-terminale par la carboxypeptidase. Nous avons pu déterminer avec certitude la nature des 4 derniers acides aminés. La nature des 9 autres acides aminés voisins a été identifiée, mais leur position dans la chaîne ne peut être établie d'après les données de l'étude cinétique de l'hydrolyse.

(Val, His, Leu (Glu
Pro -) Ala, Ser, Asp) , ou -- - Leu - Asp (NH₂)-Phe-Gly(COOH)
(Lys (Thr

4° - Nous avons réussi à découper la molécule de globine de myoglobine en trois fragments peptidiques en effectuant une hydrolyse tryptique spécifique et limitée. En effet, la trypsine a, en tant qu'endopeptidase, une spécificité absolue pour les liaisons arginyl-acide aminé et lysyl-acide aminé. Après blocage des groupes ξ -aminés de la lysine de la protéine (soit par dinitrophénylation, par carbobenzoylation, ou par acétylation), seules les liaisons arginyl-acide aminé sont hydrolysées par la trypsine.

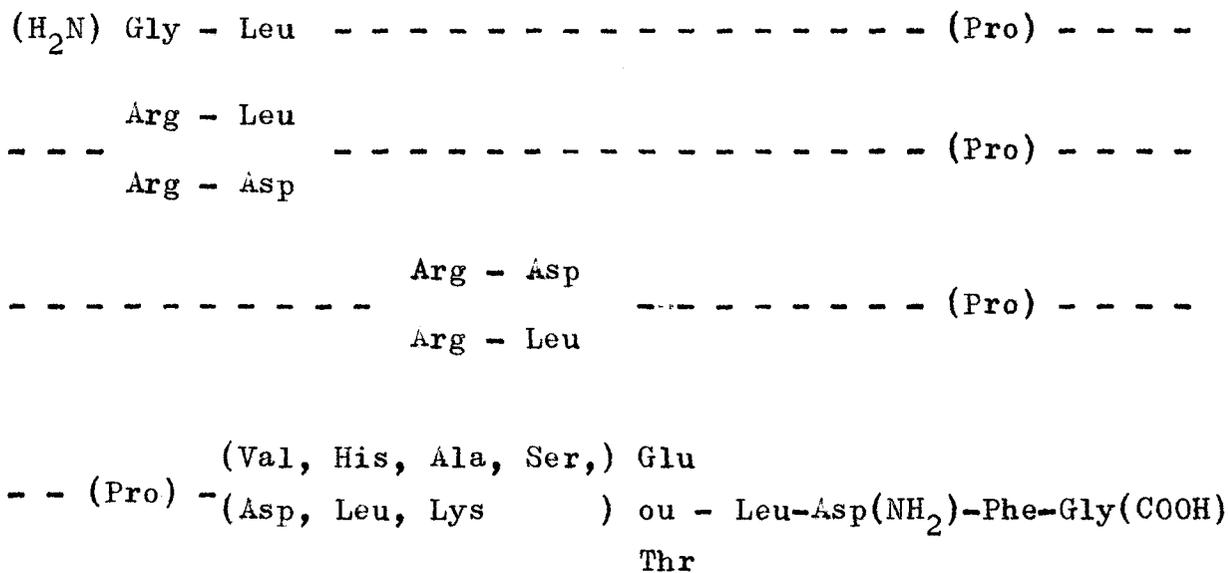
Comme la globine de la myoglobine ne contient que deux résidus d'arginine, il est possible, dans ces conditions, de réaliser deux coupures spécifiques et d'obtenir trois fragments peptidiques à partir de la molécule initiale.

Au cours de ces essais d'hydrolyse spécifique, les résultats les plus satisfaisants, aussi bien en ce qui concerne la préparation du substrat, le degré d'hydrolyse, que la possibilité de séparation des peptides formés, ont été obtenus à partir de la globine partiellement dénaturée et acétylée.

Nous avons également déterminé la nature de l'acide aminé voisin des deux résidus d'arginine de la molécule en dinitrophénylant l'hydrolysats tryptique d'acétylglobine dénaturée : la molécule contient les enchaînements arginyl-leucine et arginyl-acide aspartique (ou arginyl-asparagine).

Enfin, la séparation des trois fragments peptidiques obtenus a été réalisée par électrophorèse de zone sur papier à pH 8,9.

5° - L'ensemble des résultats obtenus sur la globine de la myoglobine peut être schématisé de la façon suivante :



(les plicatures de la chaîne peptidique pouvant se faire au niveau des quatre résidus de proline).

- - - - -

L'état actuel de nos recherches peut constituer une base de départ très favorable à la continuation fructueuse de l'exploration de la structure de la myoglobine.

- - - - -

TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
<u>CHAPITRE I</u>	I
INTRODUCTION	2
A) Notions générales	2
B) Nomenclature des chromoprotéides	4
Bibliographie	8
 <u>CHAPITRE II</u>	
GENERALITES SUR LA STRUCTURE DE L'HEMOGLOBINE, de 1a MYOGLOBINE DES CYTOCHROMES ET DE L'HEMERYTHRINE	9
A) - <u>Poids moléculaire. Nombre de chaînes peptidiques</u>	10
1) <u>Hémoglobine</u>	10
a) Poids moléculaire	10
b) Nombre de chaînes peptidiques	10
2) <u>Myoglobine</u>	13
a) Poids moléculaire	13
b) Nombre de chaînes peptidiques	13
3) <u>Cytochromes</u>	13
a) Poids moléculaire	13
b) Nombre de chaînes peptidiques	15
4) <u>Hémérythrine</u>	16
a) Poids moléculaire	16
b) Nombre de chaînes peptidiques	16
B) - <u>Taille et forme des molécules.</u>	16
C) - <u>Union du groupement prosthétique et de la protéine :</u>	18
1) Hémoglobine. Myoglobine	18
2) Cytochromes	20
3) Hémérythrine	22
Bibliographie	24

	<u>Pages</u>
<u>CHAPITRE III</u>	
PREPARATION DE L'HEMOGLOBINE, DE LA MYOGLOBINE, DU CYTOCHROME C ET DE L'HEMERYTHRINE	27
A) - <u>Hémoglobine</u>	28
B) - <u>Myoglobine</u>	30
1) Purification par cristallisation	33
2) Purification par précipitation des impuretés	33
3) La question de l'homogénéité de la myoglobine	34
C) - <u>Cytochrome c.</u>	35
1) Préparation du cytochrome	36
2) Fractionnement sur colonne	37
3) Contrôle de pureté du cytochrome	40
D) - <u>Hémérythrine</u>	44
1) Préparation de l'hémérythrine	44
2) Préparation de la protéine de l'hémérythrine et du groupement prosthétique	48
Bibliographie	52
<u>CHAPITRE IV</u>	
COMPOSITION EN ACIDES AMINES (HEMERYTHRINE, MYOGLOBINE, CYTOCHROME C)	
Exposé technique de la méthode de dosage utilisée	53
A) - <u>Notions générales</u>	54
B) - <u>Mode opératoire</u>	57
1) Hydrolyse. Dinitrophénylation	57
2) Extraction des dérivés dinitrophénylés	61
3) Chromatographie bidimensionnelle	62
4) Elution et dosage	63
5) Détermination de la composition en acides aminés (exemple de l'hémérythrine de <u>Sipun-</u> <u>culus nudus</u>)	63
C) - <u>Composition en acides aminés de l'hémérythrine, de la myoglobine et du cytochrome c</u>	67
1) Hémérythrine	67
2) Cytochrome c	71

	<u>Pages</u>
3) Myoglobine	74
Bibliographie	76
 <u>CHAPITRE V</u>	
ETUDES SUR L'HEMOGLOBINE ET LA MYOGLOBINE	
Isolement d'une fraction hémopeptidique par hydrolyse enzymatique.	
Essai de séparation et d'identification en "peptides à histidine"	
	77
A) - <u>Isolement d'une fraction hémopeptidique.</u>	78
I) Etude spectrophotométrique	79
2) Etude chimique du précipité à pH 5	81
B) - <u>Etude des hydrolysats partiels d'hémoglobine et de myoglobine</u>	81
I) Etude des conditions d'hydrolyse enzymatique de l'hémoglobine	82
2) Hydrolysats partiels de la myoglobine	83
a) Hydrolyse enzymatique et acide	84
b) Séparation des produits d'hydrolyse	84
c) Résultats de l'hydrolyse partielle acide	86
d) Résultats de l'hydrolyse trypsique	87
e) Résultats de l'hydrolyse chymotrypsique	88
Bibliographie	89
 <u>CHAPITRE VI</u>	
MODIFICATION CHIMIQUE DES SUBSTRATS	
Mise en évidence des liaisons arginine -acide aminé par hydrolyse spécifique de la myoglobine. Séparation des fragments obtenus	
	90
A) - <u>Globine (de la myoglobine) dinitrophénylée.</u>	93
I) Préparation de la DNP-globine	93
2) Préparation de la trypsine	94
3) Hydrolyse trypsique et dinitrophénylation de l'hydrolysat	94
4) Résultats obtenus	95

	<u>Pages</u>
B) - <u>Globine (de la myoglobine) carbobenzoxylée</u>	98
C) - <u>Globine (de la myoglobine) acétylée</u>	99
1) Préparation d'acétylglobine non dénaturée	99
2) Préparation d'acétylglobine dénaturée	100
3) Hydrolyse trypsique de la globine acétylée	101
D) - <u>Essais de séparation des fragments peptidiques libérés par hydrolyse trypsique de la DNP-globine modifiée</u>	103
Bibliographie	104

CHAPITRE VII

ETUDES SUR LES ACIDES AMINES N- ET C-TERMINAUX des HEMOPROTEINES

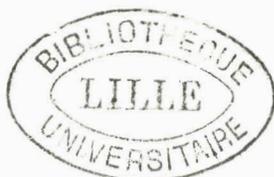
Méthodes chimiques et méthodes enzymatiques	105
A) - <u>Détermination de l'extrémité N-terminale.</u>	106
1) Extrémité N-terminale de la globine	106
2) Extrémité N-terminale de l'hémérythrine et du cytochrome c	107
a) - Essais de détermination par la méthode des dinitrophénylaminoacides de SANGER	107
α) Difficultés techniques	107
β) Résultats obtenus	109
b) - Essais de détermination des groupes terminaux par la leucine aminopeptidase	112
B) - <u>Détermination de la séquence C-terminale par la carboxypeptidase.</u>	113
1) Séquence C-terminale de la globine (de la myoglobine)	114
a) - Préparation de la globine (de la myoglobine) (Dénaturation et Acétylation)	114

b) - Préparation de l'enzyme	II5
c) - Conduite de l'action enzymatique. Traitement des prélèvements	II6
d) - Résultats obtenus	II7
2) Séquence C-terminale du cytochrome c	I20
Bibliographie	I21

CHAPITRE VIII

CONCLUSIONS GENERALES	I22
-----------------------------	-----

TABLE DES MATIERES



SECONDE THESE

=====

Propositions données par la Faculté

=====

"L'ultracentrifugation, théorie et applications".

Vu et approuvé

Lille, le 29 Mai 1958

Le Doyen de la Faculté des Sciences de Lille

H. Lefebvre



Vu et permis d'imprimer,

Lille, le 31 Mai 1958

Le Recteur de l'Académie
de Lille

G. Debeyre