

50376  
1968

UNIVERSITÉ DE LILLE

FACULTÉ DES SCIENCES

50.376

1968

5

# THÈSES

présentées

à la Faculté des Sciences de l'Université de Lille  
pour obtenir le grade de Docteur d'État de Sciences Physiques

par

YVES BOULANGER

PREMIÈRE THÈSE

## Structure primaire de la Myoglobine de cheval

**Séquence des Peptides Chymotrypsiques**

DEUXIÈME THÈSE

Proposition donnée par la Faculté

Soutenues le 19 Janvier 1968 devant la Commission d'Examen



JURY : MM. les Professeurs R. DEFRETIN, Président  
P. DESNUELLE, Rapporteur  
J. MONTREUIL  
G. BISERTE  
M. DAUTREVAUX

UNIVERSITE DE LILLE

FACULTE DES SCIENCES

DOYENS HONORAIRES : MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU, J. TILLEU

PROFESSEURS HONORAIRES : MM. ARNOULT, BEGHIN, BROCHARD, CAU, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS, DEHORNE, DOLLE, FLEURY, P. GERMAIN, KAMPE DE FERIET, LAMOTTE, LELONG, KOURGANOFF, Mme LELONG, MM. MAZET, A. MICHEL, NORMANT, PARISELLE, PASCAL, PAUTHENIER, ROIG, ROSEAU, HOUBINE, ROUELLE, WIEMAN, ZAMANSKY.

DOYEN : M. DEFRETIN, Professeur de Biologie Marine

ASSESSEURS: MM. HEUBEL, Professeur de Chimie Minérale  
LEBRUN, Professeur de Radioélectricité

PROFESSEURS :

M. BACCHUS Pierre	Astronomie et Calcul Numérique
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Générale
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Industrielle
M. BECART Maurice	Physique
M. BLOCH Vincent	Psychophysiologie
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Mathématiques
M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. BOURIQUET Robert	Botanique
M. CELET Paul	Géologie Générale
M. CONSTANT Eugène	Radioélectricité
M. CORSIN Pierre	Paléobotanique

M. DECUYPER Marcel	Mathématiques
M. DEDECKER Paul	Mathématiques
M. DEHORS Roger	Physique Industrielle
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELEAU Paul	Géologie et Minéralogie
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique et Minérale 1er Cycle
M. DESCOMBES Roger	Mathématiques
M. DURCHON Maurice	Zoologie
M. FOURET René	Physique
M. GABILLARD Robert	Radioélectricité
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique des Fluides
M. HEIM DE BALZAC Henri	Zoologie
M. HOCQUETTE Maurice	Botanique
M. LEBEGUE André	Botanique C.S.U. AMIENS
Mme LEBEGUE Georgette	Physique C.S.U. AMIENS
M. LEFEBVRE Henri	Chimie Appliquée
Mlle LENOBLE Jacqueline	Physique
M. LIEBART Robert	I.U.T.
M. LINDER Robert	Botanique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. MARION Ernest	Chimie C.S.U. AMIENS
M. MARTINOT-LAGARDE André	Mécanique des Fluides
Melle MARQUET Simone	Mathématiques
M. MENNESSIER Guy	Géologie C.S.U. AMIENS
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Minérale Appliquée
M. MONTREUIL Jean	Chimie Biologique
M. MORIAMEZ Michel	Physique
M. MOUVIER Gérard	Chimie SAINT-QUENTIN
M. PARREAU Michel	Mathématiques
M. PEREZ Jean-Pierre	Physique

M. PHAM MAU QUAN	Mathématiques
M. POUZET Pierre	Calcul Numérique
M. PROUVOST Jean	Géologie et Minéralogie
M. SAVARD Jean	Chimie Générale
M. SCHILTZ René	Physique
M. SCHALLER François	Zoologie
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Mathématiques
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie Minérale Appliquée
M. VAZANT Bernard	Botanique AMIENS
M. VIVIER Emile	Zoologie C.S.U. AMIENS
M. WATERLOT Gérard	Géologie et Minéralogie
M. WERTHEIMER Raymond	Physique Générale

#### MAITRES DE CONFERENCES

M. ATTEIA Marc	Calcul Numérique
M. BELLET Jean	Physique
M. BENABOU Jean	Mathématiques
M. BILLARD Jean	Physique
M. BOILLET Pierre	Physique
M. BUI TRONG LIEU	Mathématiques
M. CHERRUAULT Yves	Mathématiques
M. CHEVALIER Alfred	Mathématiques C.S.U. AMIENS
M. DERCOURT Jean-Michel	Géologie et Minéralogie
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
Mme DIXMIER Suzanne	Mathématiques AMIENS
Mme DRAN Raymonde	Chimie Organique
M. DUQUESNOY Alain	Chimie AMIENS
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M. GUILLAUME Jean	Botanique
M. HANGAN Théodor (associé)	Mathématiques
M. HENRY Lucien	Physique AMIENS
M. HERZ Jean-Claude	Calcul Numérique

M. HEYMAN Michel	Physique C.S.U. AMIENS
M. HUARD DE LA MARRE Pierre	Calcul Numérique
M. JOLY Robert	Zoologie C.S.U. AMIENS
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Générale
M. LACOSTE Louis	Botanique
M. LAMBERT Gérard	Physique SAINT-QUENTIN
M. LANDAIS Jean	Chimie Organique
M. LEHMANN Daniel	Mathématiques
Mme LEHMANN Josiane	Mathématiques
M. LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M. MAES Serge	Physique
M. METTETAL Christian	Zoologie AMIENS
M. MONTEL Marc	Physique C.S.U. VALENCIENNES
M. NGUYEN PHONG CHAU	Mathématiques SAINT-QUENTIN
M. PANET Marius	Electromécanique
M. PARSY Fernand	Mathématiques Appliquées
M. SAADA Georges	Physique
M. SEGARD Emile	Chimie Biologique
M. TUDO Joseph	Chimie Minérale Appliquée C.S.U. AMIENS
M. VAILLANT Jean	Mathématiques
M. VIDAL Pierre	Physique Industrielle
Mme ZINN-JUSTIN Nicole	Mathématiques

---

## AVANT-PROPOS

---

La présentation de ce travail est pour nous l'occasion d'exprimer notre gratitude à nos juges et à tous ceux qui ont aidé à sa réalisation.

Nous remercions vivement Monsieur le Doyen DEFRETIN qui nous fait l'honneur de présider notre jury de thèse et Monsieur le Professeur DESNUELLE qui a bien voulu accepter de juger notre travail.

Nous exprimons notre profonde reconnaissance à Monsieur le Professeur MONTREUIL pour l'amitié bienveillante qu'il nous témoigne depuis de longues années et l'enseignement riche et vivant qu'il nous a prodigué.

Ce travail doit beaucoup à notre père, Monsieur le Professeur BOULANGER qui en a permis la réalisation, à Monsieur le Professeur BISERTE qui nous a guidé et dont les conseils précieux ne nous ont jamais fait défaut, à Monsieur le Professeur DAUTREVAUX qui nous a constamment aidé et encouragé.

Nous remercions également tous nos amis du laboratoire, en particulier Messieurs HAN et MOSCHETTO dont nous avons apprécié la franche amitié, Mademoiselle DESPIERRE dont l'aide efficace a grandement

facilité notre tâche ainsi que Madame MORANDI, Mesdemoiselles CLINCKX, DAUSSE et HEMEZ, Messieurs PICQUE , VANDEPERRE et DEMOUVEAU.

Nous remercions enfin le Centre National de la Recherche Scientifique qui nous a donné les moyens matériels de mener à bien ce travail dans le cadre de la RCP n° 23 et de l'ERA n° 32.

## TABLE DES MATIERES

---

INTRODUCTION	1
<u>CHAPITRE I</u>	
PROPRIETES GENERALES DES MYOGLOBINES	4
A - IDENTIFICATION DE LA MYOGLOBINE - HISTORIQUE	5
B - STRUCTURE PRIMAIRE DE LA MYOGLOBINE	5
C - STRUCTURES SECONDAIRE ET TERTIAIRE DE LA MYOGLOBINE	12
D - DERIVES D'ADDITION DE LA MYOGLOBINE	19
<u>CHAPITRE II</u>	
PREPARATION DE LA MYOGLOBINE DE CHEVAL	23
A - TENEUR EN MYOGLOBINE DU TISSU MUSCULAIRE	24
B - ISOLEMENT DE LA MYOGLOBINE	24
C - PREPARATION DE LA MYOGLOBINE DE CHEVAL	26
D - CRITERES DE PURETE ET D'IDENTIFICATION	26
E - MICROHETEROGENEITE DE LA MYOGLOBINE	28
<u>CHAPITRE III</u>	
HYDROLYSE CHYMOTRYPSIQUE	34
A - CHOIX DE L'ENZYME	35
B - CHOIX DES CONDITIONS D'HYDROLYSE	37
C - RECAPITULATION DES CONDITIONS D'HYDROLYSE	39

## CHAPITRE IV

FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS CHYMOTRYPSIQUES	40
A - INTRODUCTION	41
B - FRACTIONNEMENT DE BASE PAR DIALYSE	42
C - CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION	43
D - ELECTROPHORESE EN FILM LIQUIDE	45
E - CHROMATOGRAPHIE SUR ECHANGEURS DE CATIONS	49
F - CONCLUSION	60
G - CAS PARTICULIER DE L'HYDROLYSE DE LA GLOBINE PAR LA CHYMOTRYPSINE TRAITEE PAR LE TLCK	62

## CHAPITRE V

SEQUENCE DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES	66
---------------------------------------	----

## CHAPITRE VI

DISCUSSION DES RESULTATS - CONCLUSION	116
A - CONTROLE DE LA SPECIFICITE DE LA CHYMOTRYPSINE	117
B - ETABLISSEMENT DE LA SEQUENCE	118
C - COMPARAISON ENTRE MYOGLOBINE ET HEMOGLOBINE	122

## CHAPITRE VII

TECHNIQUES	T1
A - PREPARATION ET CONTROLES DE PURETE DE LA MYOGLOBINE	T2
B - HYDROLYSE CHYMOTRYPSIQUE	T7
C - TECHNIQUES DE FRACTIONNEMENT	T9
D - TECHNIQUES D'ETUDE DES SEQUENCES	T19

## BIBLIOGRAPHIE

INTRODUCTION

---

Lorsque ce travail fut entrepris, les séquences protéiques déjà connues étaient peu nombreuses : il s'agissait essentiellement de l'insuline, de la ribonucléase, du lysozyme et des cytochromes et hémoglobines de quelques espèces animales.

A l'époque venaient d'être publiés les résultats des travaux de l'école de KENDREW et PERUTZ (1) et (2) sur la myoglobine de Cachalot d'une part, sur les hémoglobines de l'Homme et de Cheval d'autre part, qui montraient pour la première fois la configuration tridimensionnelle d'une molécule protéique. Un peu plus tard, les études chimiques d'EDMUNDSON (3), réalisées sur la myoglobine de Cachalot, permettaient de relier une séquence d'acides aminés à une structure secondaire et tertiaire, et de rattacher à une activité physiologique une structure physico-chimique complètement élucidée.

L'importance physiologique de la myoglobine, la simplicité relative de sa molécule et la facilité avec laquelle elle peut être préparée et purifiée en font un substrat de choix pour les études structurales tant chimiques que physiques. Aussi nous a-t-il paru intéressant d'entreprendre l'étude de la séquence des acides aminés de la myoglobine de Cheval afin de la comparer à celle du Cachalot. En effet, les grandes analogies de composition en acides aminés observées chez les différentes espèces animales étudiées (voir Chapitre I) doivent se traduire par des analogies de séquence.

D'autre part, sur le plan phylogénétique, les ressemblances entre l'hémoglobine et la myoglobine posent le problème d'un précurseur ancestral commun à ces deux chromoprotéides. La comparaison des séquences de la myoglobine et de l'hémoglobine d'un même animal présente donc un très grand intérêt du point de vue de l'évolution.

Notre travail sur la myoglobine de Cheval constitue le premier stade de nos recherches dans ce domaine, que nous poursuivrons par l'étude conjointe de l'hémoglobine et de la myoglobine chez des

Vertébrés inférieurs, les résultats obtenus devant permettre de préciser le point de divergence des deux structures.

Au cours de notre travail, nous avons tout d'abord préparé et purifié la myoglobine de Cheval et abordé le problème de sa structure primaire par l'étude des hydrolysats chymotrypsiques. Le couplage de différents procédés de fractionnement nous a permis de séparer et d'isoler les peptides de ces hydrolysats et de déterminer leur formule. Les résultats obtenus conduisent à une reconstitution d'ensemble de la séquence, que nous envisagerons dans notre discussion. Enfin, les techniques utilisées seront exposées dans le dernier chapitre de ce travail.

CHAPITRE I

PROPRIETES GENERALES DES MYOGLOBINES

## A - IDENTIFICATION DE LA MYOGLOBINE. HISTORIQUE.

La présence dans le muscle d'un pigment coloré est connue depuis longtemps, puisque BOERHAVE (4) en 1739 lui attribua la coloration rouge du tissu musculaire. Les recherches spectroscopiques de MÖRNER (5) et de RAY et PAFF (6) montrèrent les analogies de propriétés physico-chimiques et physiologiques de ce pigment avec l'hémoglobine ; cette "hémoglobine musculaire" fut distinguée de l'hémoglobine globulaire par THEORELL (7) au moyen de l'étude comparative des propriétés physico-chimiques et par ROSSI-FANELLI et TRAVIA (8) grâce à la composition en amino-acides.

Enfin, les travaux de ROCHE, DERRIEN et VIEIL (9) en France, de ROSSI-FANELLI (10) en Italie ont achevé l'identification de la myoglobine.

Depuis, de nombreuses études ont été effectuées sur la myoglobine de différentes espèces animales : études structurales aboutissant aux remarquables résultats de KENDREW (11) et d'EDMUNDSON (12) ; études physico-chimiques faisant suite aux précédentes : dans ce domaine, la myoglobine apparaît comme un véritable "modèle moléculaire naturel" permettant de comprendre certaines propriétés physico-chimiques générales des protéines.

## B - STRUCTURE PRIMAIRE DE LA MYOGLOBINE

La myoglobine est un chromoprotéide à un groupement prosthétique ferro-porphyrinique. Ce groupement prosthétique ou hème est le même que celui de l'hémoglobine:ferro-protoporphyrine IX (III).

La protéine ou globine est constituée d'une seule chaîne peptidique de 150 amino-acides environ, ce qui correspond à un poids moléculaire de l'ordre de 17.000.

### 1) Composition en amino-acides

La composition en amino-acides de la myoglobine de nombreuses espèces animales a été déterminée. Nous ne citerons ici que les compositions

établies par une méthode chromatographique sur résines, qui sont les plus satisfaisantes. Chez les Mammifères, les résultats (Tableau I) sont très homogènes : entre des espèces voisines (Homme et Singe, Cachalot et Baleine) les différences sont très minimes (x).

La composition est essentiellement caractérisée par des teneurs élevées en acide glutamique, en leucine et en lysine et des teneurs basses en arginine, en tyrosine, en méthionine et en tryptophane. Les taux d'acide aspartique, de glyco-colle, d'alanine et d'histidine sont également importants. Un élément intéressant de la composition est la présence d'isoleucine à un taux toujours supérieur à celui de la chaîne  $\gamma$  de l'hémoglobine (les chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\delta$  en sont dépourvues). On note l'absence constante de cystéine dans toutes les myoglobines de Mammifères étudiées jusqu'à présent ; la même constatation a été faite chez les Oiseaux (Cormoran, Pélican), tandis que chez les Poissons il existe un résidu de cystéine par molécule (BROWN, MARTINEZ et OLCOTT (24)). La composition en amino-acides de la myoglobine de deux espèces de Thon a été récemment étudiée : elle est comparée dans le tableau II à la composition moyenne de la myoglobine des Mammifères. Outre la présence de cystéine, la myoglobine de Thon se distingue par un taux nettement plus faible d'acide glutamique, de lysine et d'histidine.

La "myoglobine" d'un certain nombre de Mollusques a été également étudiée : chez ces espèces, la distinction entre hémoglobine et myoglobine

---

(x) L'étude de la composition en amino-acides de la myoglobine de Baleine FINBACK (*Balaenoptera physalus*), réalisée par ATASSI et SAPLIN (22), révèle cependant de grandes différences par rapport à celle de la myoglobine de Cachalot ; les résultats sont également très différents de ceux donnés par SCHMID (23) pour la même Baleine.

= TABLEAU I

COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DES MYOGLOBINES DE MAMMIFERES (x)  
(En nombre de résidus par molécule)

	HOMME FERKOFF et al. (13)	SINGE ZIMHAL, JF- KOROV & KEIL (14)	CHEVAL BOARDMAN et ADAIR (15)	CHEVAL THEORELL et AKESON (16)	CHEVAL DAUTREVAUX et BERNARD (17)	BOEUF DAUTREVAUX et BERNARD (17)	MOUTON DAUTREVAUX et BERNARD (17)	PORC DAUTREVAUX et BERNARD (17)	PHOQUE RUMEN (18)	DAUPHIN KAPADZOVA, NETKOV et KEIL (19)	CACHALOT EDMUNDSON et HIRS (20)	BALEINE SCHMID (21)
Asp	12	12	10	11	10	12	12	11	11	12	8	8
Thr	4	5	7	7	7	6	6	5	5	5	5	6
Ser	8	8	5	5	5	8	7	8	7	5-6	6	4
Glu	21	19	19	19	19	15	18	21	16	17	19	20
Pro	6	6	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Gly	15	14	15	16	15	11	13	15	12	14	11	9
Ala	11	12	15	16	14-15	17	15	13	14	18	17	16
1/2 Cys	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Val	8	9	7	8	8	11	10	8	6	6	8	5
Met	3	3	2	2	2	2	3	3	2	2	2	2
Ile	7	7	9	9	9	6	5	6	7	8	9	23
Leu	16	16	17	18	17	15	17	20	18	20	18	
Tyr	2	2-3	2	2	2	2	2	2	2	2	3	2
Phe	7	6	7	7	7	6	8	7	7	8	6	4
Lys	19	18	18	19	18	21	15	17	18	21	19	19
His	9	8	10	11	10	10	10	10	12	12	12	12
Arg	3	3	2	2	2	3	3	2	5	3	4	2
Trp	3	3	2	2	2	-	-	-	-	2	2	4
Amide	11	8	-	7	-	-	-	-	7	-	7	7
Total	154	151-152	152	158	151-152	149(x)	148(x)	152(x)	146(x)	159	153	140

(x) Total ne comprenant pas le tryptophane.

TABLEAU II  
COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DES MYOGLOBINES DE THON

	Composition moyenne chez les Mammifères	<i>Thunnus orientalis</i> KONOSU, HASHIMOTO et MATSUARA (25)	<i>Thunnus albacores</i> HIRS et OLCOTT (26)
Asp	10,8	12	12
Thr	5,5	7	7
Ser	6,6	4	5
Glu	18,5	11	11
Pro	4,4	6	5
Gly	12,9	14	14
Ala	-	21	21
1/2 Cys	0	1	1
Val	7,9	9	8
Met	2,6	2	3
Ile	7,1	9	10
Leu	17,4	16	17
Tyr	2,1	2	2
Phe	6,6	6	6
Lys	18,5	15	15
His	10,5	5	6
Arg	3,0	2	2
Trp	2,3	1	-
Amide	-	14	-
Total	151,6	143	145(*)

(\*) Total ne comprenant pas le tryptophanne

est cependant beaucoup moins nette : malgré le manque d'homogénéité des résultats obtenus actuellement dans ce domaine, il semble que les chromoprotéides ferroporphyriniques isolés chez ces Invertébrés se distinguent nettement à la fois des myoglobines et des hémoglobines de Vertébrés.

## 2) Acides aminés terminaux

L'acide aminé N-terminal est en général le glycofolle ; chez certaines espèces on note la présence de valine (Tableau III). De toute façon, chez toutes les espèces étudiées jusqu'à présent, l'acide aminé N-terminal est toujours l'un des deux acides aminés N-terminaux des chaînes de l'hémoglobine. Dans trois cas (Homme, Cachalot, Cheval) la séquence N-terminale a été déterminée, soit par la méthode des phénylthiohydantoïnes d'EDMAN (35), soit par la méthode à la leucine-aminopeptidase ; ainsi, pour la myoglobine de Cheval les études d'INGRAM (36) ont établi la séquence Gly - Leu. La similitude structurale de ces myoglobines apparaît déjà à l'examen des séquences, quoiqu'il s'agisse d'espèces très différentes.

L'acide aminé C-terminal n'a été déterminé que pour trois espèces : Homme, Cachalot, Cheval ; l'utilisation de la carboxypeptidase et l'étude des peptides isolés des hydrolysats tryptiques ont également permis de préciser la séquence C-terminale (Tableau IV). Il faut noter que dans les trois cas la carboxypeptidase semble détacher successivement le glycofolle, la glutamine et un acide aminé aromatique (phénylalanine ou tyrosine selon les espèces). Comme deux résidus de glycofolle, situés dans la séquence C-terminale, sont détachés lentement par la carboxypeptidase, PERKOFF, HILL, GROWN et TYLER estiment que l'un d'eux est placé à la pénultième position dans la myoglobine humaine et non en position terminale : en effet, un peptide isolé d'un hydrolysat tryptique et qui ne contient ni lysine, ni arginine, révèle par la dégradation récurrente d'EDMAN la séquence Glu - Leu - Gly - Phe - Gly - Gln qui semble bien correspondre au peptide C-terminal. Cette ambiguïté avait déjà été notée par EDMUNDSON (40) pour la myoglobine de Cachalot : le problème a été résolu par l'iso-

TABLEAU III

AMINO-ACIDES ET SEQUENCES N-TERMINAUX DES MYOGLOBINES

Homme	(PERKOFF <i>et al.</i> ) (27)	: Gly - Leu - Ser .....
Singe	(ZMRHAL <i>et al.</i> ) (28)	: Gly .....
Cheval	(INGRAM) (29)	: Gly - Leu
Boeuf	(BERNARD <i>et al.</i> ) (30)	: Gly .....
Mouton	(BERNARD <i>et al.</i> ) (30)	: Val .....
Porc	(BERNARD <i>et al.</i> ) (30)	: Val .....
Phoque	(THEORELL) (31)	: Gly .....
Dauphin	(KARADZOVA <i>et al.</i> ) (32)	: Gly .....
Cachalot	(EDMUNDSON) (33)	: Val - Leu - Ser - Glu - Gly - Glu - Trp .....
Baleine	(SCHMID) (34)	: Val .....

TABLEAU IV

SEQUENCES C-TERMINALES DES MYOGLOBINES

Homme	(PERKOFF <u>et al.</u> ) (37)	:	...	Lys - Glu - Leu - Gly - Phe - Gly - Gln
Cachalot	(EDMUNDSON) (38)	:	...	Glu - Leu - Gly - Tyr - Gln - Gly
Cheval	(HOLLEMAN) (39)	:	...	Phe - Gln - Gly ou Asn

lement d'un peptide pepsique qui contient en quantités équimoléculaires la tyrosine, la glutamine et le glycolle, et dont l'attaque par la carboxypeptidase ne permet la libération que du seul glycolle.

### 3) Séquence des amino-acides

La première, et jusqu'ici la seule myoglobine dont on connaisse la structure complète est celle du Cachalot, étudiée à la fois par des méthodes chimiques (EDMUNDSON) (41) et par la méthode de diffraction des rayons X (KENDREW *et al.*) (42).

EDMUNDSON a reconstitué les séquences en amino-acides à partir des résultats fournis par les hydrolyses enzymatiques (hydrolyses tryptiques, chymotryptiques et pepsiques) et par des méthodes chimiques spécifiques de coupure des protéines, telles que l'action du bromure de cyanogène.

Par la méthode des phénylthiohydantoïnes et à l'aide d'un appareillage automatique, EDMAN et BERG (43) ont déterminé la séquence (\*) d'une partie de la myoglobine de Baleine *Megaptera Nodosa* (Tableau V).

## C - STRUCTURES SECONDAIRE ET TERTIAIRE DE LA MYOGLOBINE

Parallèlement à ces méthodes chimiques, la méthode de diffraction des rayons X appliquée à la myoglobine de Cachalot par KENDREW *et al.* (45) a permis la détermination des structures secondaire et tertiaire de la molécule. C'est après avoir comparé, par une étude cristallographique préalable, les myoglobines de plusieurs espèces animales, que le choix de KENDREW s'est porté sur celle du Cachalot en raison de son obtention plus aisée et de son aspect cristallin plus satisfaisant.

Un premier travail effectué en 1958 permit à KENDREW *et al.* (46) de voir se dessiner et se développer pour la première fois la chaîne polypeptidique de la protéine (pouvoir de résolution  $6 \text{ \AA}$ ).

Les progrès réalisés dans le domaine des ordinateurs électroniques leur permirent d'augmenter le pouvoir de résolution de la méthode.

---

(\*) Une séquence très partielle de la myoglobine humaine a également été donnée par HARRIS C.H. (44) dans sa thèse de Doctorat - Duke University Michigan (1965).

TABLEAU V

SEQUENCES DES AMINO-ACIDES DES MYOGLOBINES DE CACHALOT d'après EDMUNDSON (45)

ET DE BALEINE d'après EDMAN et BERG (46)

(1) Cachalot	Val - Leu - Ser - Glu - Gly - Glu - Trp - Gln - Leu - Val - Leu - His - Val	4	5	10	12	13
(2) Baleine (*)	- - - Asp - Ala -					Asn - Ile
(1) Trp - Ala - Lys - Val - Glu - Ala - Asp - Val - Ala - Gly - His - Gly - Gln - Asp - Ile - Leu		20				
(2) -						
(1) Ile - Arg - Leu - Phe - Lys - Ser - His - Pro - Glu - Thr - Leu - Glu - Lys - Phe - Asp - Arg		35	40			45
(2) - - - - - Gly -						Lys
(1) Phe - Lys - His - Leu - Lys - Thr - Glu - Ala - Glu - Met - Lys - Ala - Ser - Glu - Asp - Leu		50				60
(2) -						
(1) Lys - Lys - His - Gly - Val - Thr - Val - Leu - Thr - Ala - Leu - Gly - Ile - Leu - Lys			70			
(1) Lys - Lys - Gly - His - His - Glu - Ala - Glu - Leu - Lys - Pro - Leu - Ala - Gln - Ser - His		80				
(1) Ala - Thr - Lys - His - Lys - Ile - Pro - Ile - Lys - Tyr - Leu - Glu - Phe - Ile - Ser - Glu			100			
(1) Ala - Ile - Ile - His - Val - Leu - His - Ser - Arg - His - Pro - Gly - Asn - Phe - Gly - Ala		110	120			
(1) Asp - Ala - Gln - Gly - Ala - Met - Asn - Lys - Ala - Leu - Glu - Leu - Phe - Arg - Lys - Asp		130				140
(1) Ile - Ala - Ala - Lys - Tyr - Lys - Glu - Leu - Gly - Tyr - Gln - Gly			150			

(\*) Baleine *Meanteta nodosa*

En 1959, avec un pouvoir de résolution de  $2 \text{ \AA}$ , ils purent ainsi identifier l'hélice  $\alpha$  de PAULING, les segments en pelote statistique ainsi que de nombreux résidus d'acides-amino (avec une certaine probabilité). Enfin, en 1963, un pouvoir de résolution de  $1,4 \text{ \AA}$  montra à KENDREW les atomes constitutifs de la protéine.

### 1) Forme de la molécule

La chaîne peptidique de la myoglobine de Cachalot comporte huit segments d'hélice  $\alpha$  dextrogyre (figure 1) numérotés de A à H, de 8 à 24 résidus chacun et représentent au total 118 résidus sur les 153 que compte la molécule (77 p. 100 d'hélicité). Ces segments sont unis par deux coins aigus (BC et DE) et par 5 segments non hélicoïdaux de 1 à 8 résidus chacun (AB, CD, EF, FG et GH) ; en outre, les segments N- et C-terminaux constituent deux zones non hélicoïdales de 2 et 5 résidus respectivement (WATSON et KENDREW) (48). Les résidus de proline se trouvent au voisinage des coins (dans le premier tour de spire) ou dans des régions non hélicoïdales.

L'ensemble est plié de façon complexe et asymétrique pour former un prisme triangulaire aplati dont les arêtes mesurent respectivement 45, 35 et 25  $\text{ \AA}$ . L'aspect est très compact et ne laisse la place qu'à moins de 5 molécules d'eau, emprisonnées définitivement au moment du plissement de la molécule.

### 2) Disposition de l'hème

L'hème est disposé presque perpendiculairement à la surface et enfoncé dans une crevasse limitée par les segments C, E, F, CD, EF et FG ; les groupes propanoïques de l'hème affleurent la surface de la molécule alors que les groupes vinyle sont profondément enfoncés dans la crevasse. La surface intérieure de cette crevasse est tapissée principalement des chaînes latérales de résidus d'acides-amino non polaires aliphatiques

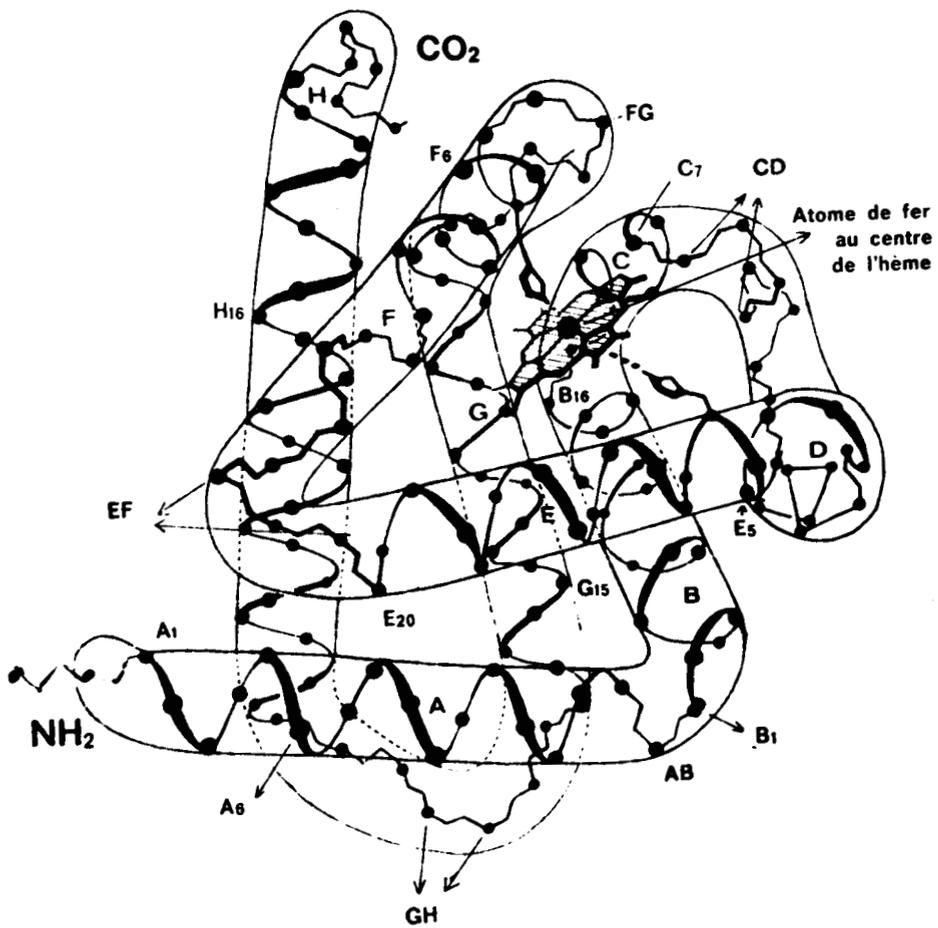


FIGURE 1  
ASPECT GENERAL DE LA MOLECULE DE  
MYOGLOBINE  
(d'après PERUTZ) (47)

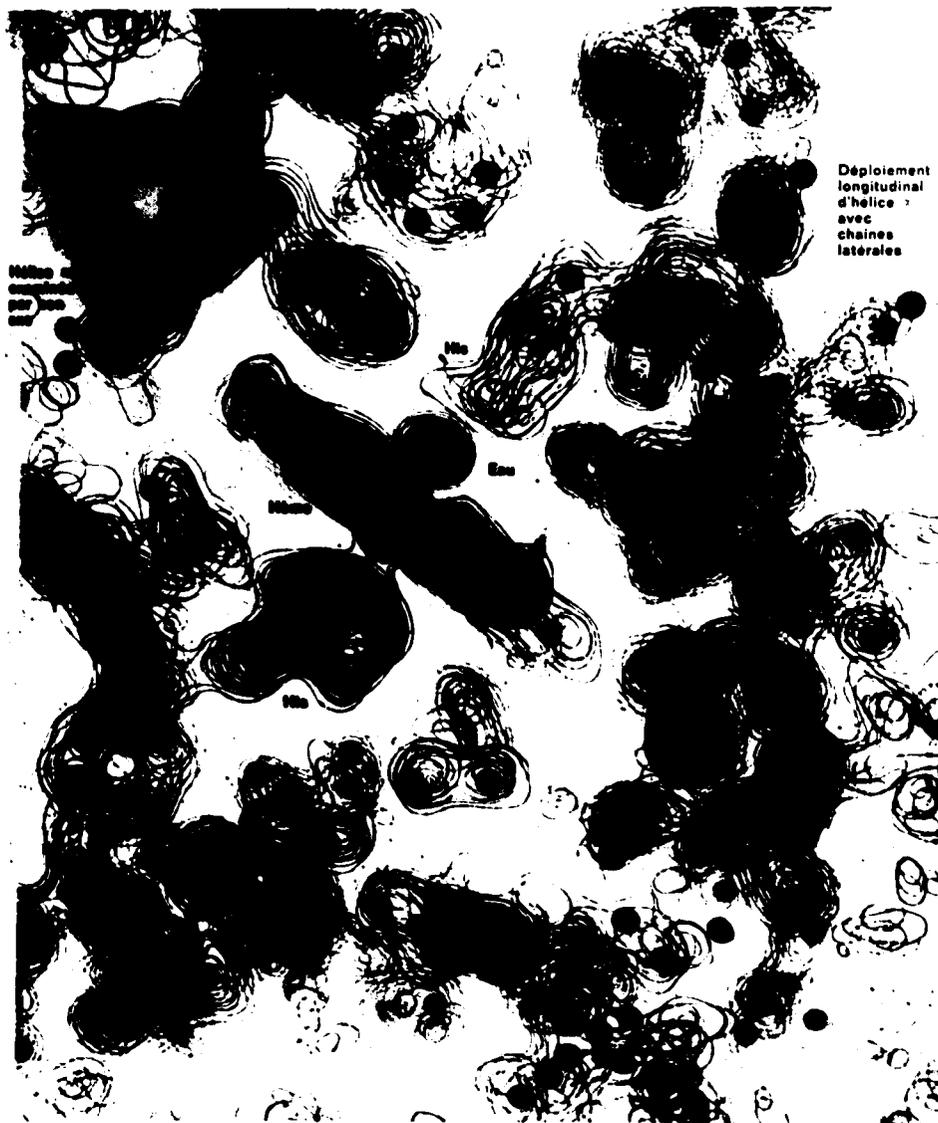
ou aromatiques ; les chaînes latérales d'acides aminés polaires sont au contraire orientées vers la surface extérieure de la molécule, qui présente de ce fait un caractère hydrophile marqué.

### 3) Union hème-globine

Le problème de la liaison hème-globine posé depuis longtemps à propos de l'hémoglobine a été résolu de façon indiscutable par les diagrammes de KENDREW (49) L'hème est lié par son atome de fer à un azote imidazolique d'un résidu d'histidine dite proximale (93 ou F8 chez le Cachalot) (Figure 2).

Selon les schémas proposés par PAULING et CORYELL (50), THEORELL (51) et PAULING (52), le fer peut acquérir une structure de gaz rare en formant un complexe  $d^2sp^3$  octaédrique (Figure 3). KENDREW a montré que, dans la myoglobine réduite, la sixième coordinaence du fer était occupée par une molécule d'eau, unie par une liaison hydrogène à un azote imidazolique d'un deuxième résidu d'histidine dite distale (64 ou E7 chez le Cachalot).

A côté de cette liaison primaire hème-globine, d'autres types de liaison assurent la stabilité de la myoglobine ; KENDREW a ainsi montré l'existence d'une liaison saline entre un groupe propanoïque de l'hème et un groupe guanidyl de l'arginine 45 (Cachalot). Il est certain d'autre part - l'orientation vers l'intérieur des chaînes hydrophobes le prouve - qu'il existe entre l'hème et la protéine des liaisons de Van der Waals. Les expériences de CANN (53) ont mis en évidence la possibilité de telles liaisons. Dans le cas de l'hémoglobine, PERUTZ (54) a montré leur existence : liaison saline entre la lysine FG2 (95 de la chaîne  $\beta$ ) et un groupe propanoïque de l'hème, liaison de Van der Waals entre la leucine FG3 de cette même chaîne et un groupe CH de l'hème. A ce sujet, tout récemment, BRADLEY, WOHL et RIEDER (55) ont isolé une hémoglobine anormale (Hb GUN HILL) dans laquelle une délétion de 5 acides aminés dans la chaîne  $\beta$  (F9 et FG1-4) supprime ces deux liaisons secondaires, ce qui empêche la fixation de l'hème par la chaîne  $\beta$ , bien que l'histidine proximale F8 soit présente. Ceci montre bien l'importance de ces liaisons



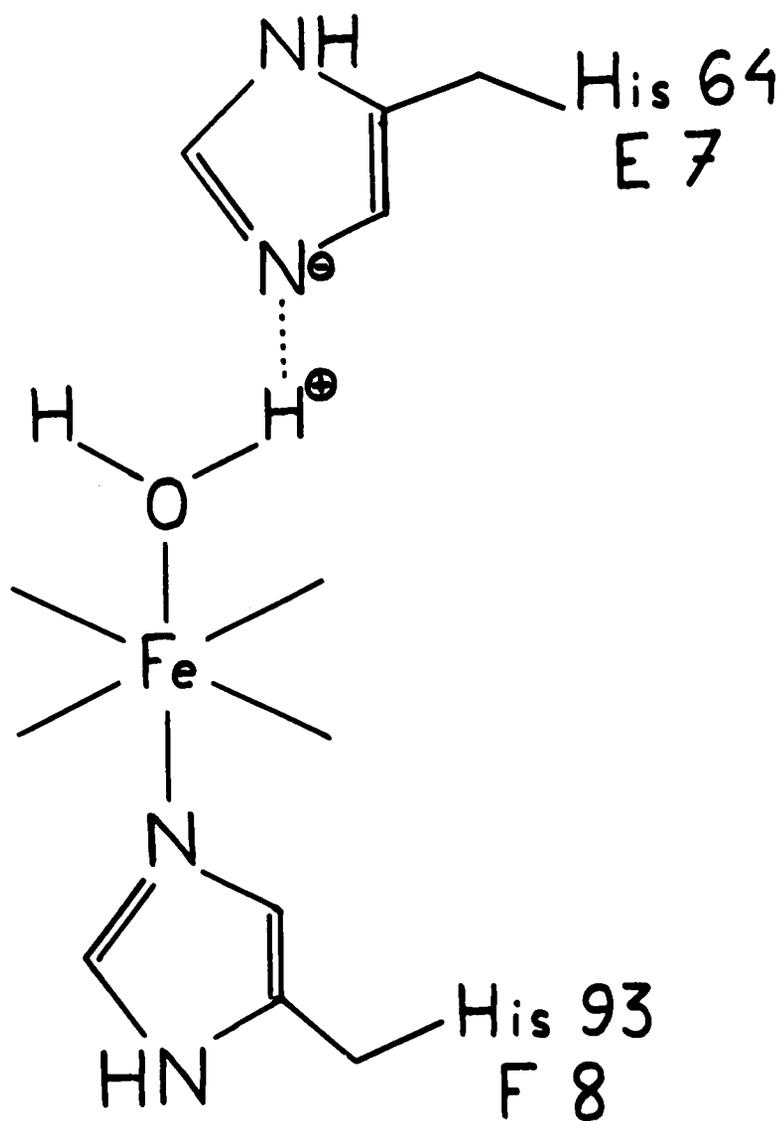
Déploiement longitudinal d'hélice avec chaînes latérales

FIGURE 9 MYOGLOBINE. - Carte électronique représentant, au degré de résolution de 1,4 Å, l'environnement du groupe hème, lié directement à un groupe histidine (partie inférieure), ainsi qu'à une molécule d'eau (sixième coordination). La molécule d'eau est elle-même liée à un résidu histidine distal. Sur la même figure apparaissent, dans la partie supérieure gauche, la coupe d'une hélice à vue par son axe, et le long du côté droit, la trace d'une hélice dans sa progression longitudinale, portant les chaînes latérales des résidus

RIIC  
LILLE

FIGURE 2

DETAIL DE LA MOLECULE DE MYOGLOBINE AU VOISINAGE DE L'HEME



# LIAISON Fer - Protéine



FIGURE 3

LIAISON FER-GLOBINE d'APRES THEORELL et PAULING

secondaires, dans la formation de complexe hème-globine, pour la myoglobine comme pour l'hémoglobine.

Les hypothèses émises par O'HAGAN (56) (liaisons salines) et HAUROWITZ et HARDIN (57) (liaisons de Van der Waals), à propos de la liaison hème-globine, sont donc en partie exactes et trouvent leur confirmation dans ces liaisons secondaires de l'hème et de la globine.

#### D - DERIVES D'ADDITION DE LA MYOGLOBINE.

##### 1) Fixation d'oxygène.

Comme pour l'hémoglobine, la plus importante des réactions d'addition de la myoglobine est la fixation réversible d'oxygène. Les courbes de dissociation de l'oxyhémoglobine réalisées par HILL (58) et ROSSI-FANELLI (59) montrent un aspect hyperbolique qui contraste avec l'allure sigmoïde des courbes de dissociation de l'oxyhémoglobine. La figure 4 montre qu'aux pressions d'oxygène physiologiques, le pourcentage de saturation en oxygène est toujours plus élevé dans le cas de la myoglobine que dans celui de l'hémoglobine. La fixation d'oxyde de carbone conduit à des courbes de saturation analogues à celles de l'oxygène.

##### 2) Structure des dérivés d'addition.

Comme pour l'hémoglobine, la fixation d'oxygène s'effectue sans changement du degré d'oxydation du fer, qui reste à l'état ferreux.

L'étude des propriétés magnétiques et optiques de la myoglobine et de ses dérivés d'addition montre d'importantes différences dans la nature de la liaison hème-globine (WANG) (61).

La forme réduite est paramagnétique, tout comme l'hémoglobine, ce qui implique une liaison à caractère surtout ionique entre le fer ferreux et la globine (THEORELL) (62) ; l'oxyhémoglobine et l'oxymyoglobine sont au contraire diamagnétiques, de même que les dérivés carbonylés correspondants, et la liaison hème-globine est alors covalentielle ; l'oxygène ou l'oxyde de carbone occupe dans ce cas la sixième coordinence

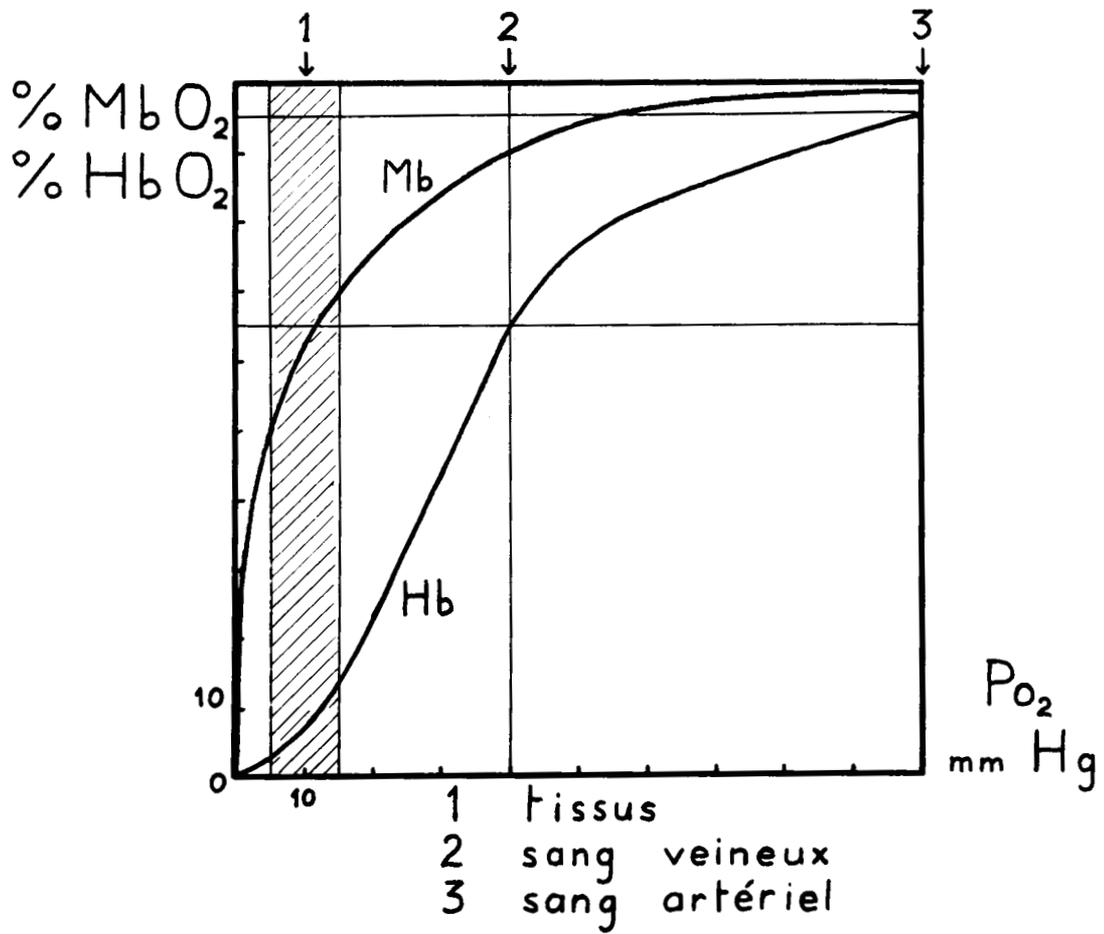


FIGURE 4  
COURBE DE DISSOCIATION DE L'OXYHEMOGLOBINE ET DE L'OXYMYOGLOBINE  
(d'après ROSSI-FANELLI) (60)

du fer. THEORELL (63) confirme ces résultats par l'étude des spectres visibles des chromoprotéides porphyriniques : quatre types de spectres d'absorption dans le visible des composés ferri- et ferro-porphyriniques peuvent être distingués et leurs caractéristiques sont indiquées dans le tableau VI.

Il est à noter que les bandes d'absorption de la myoglobine et de l'oxymyoglobine dans le visible sont décalées vers les grandes longueurs d'onde par rapport à celles de l'hémoglobine et de l'oxyhémoglobine : pour la myoglobine humaine (HAUROWITZ) (64) les maxima d'absorption sont obtenus à 543 m $\mu$  et 583 m $\mu$  , alors que pour l'hémoglobine humaine (THEORELL) (65) ils se situent à 541,5 et 577 m $\mu$  .

Outre ces bandes d'absorption, on note pour la myoglobine, comme pour l'hémoglobine, une forte bande d'absorption à la limite de l'ultra-violet (400 à 420 m $\mu$  ) : c'est la bande de SORET, qui est due à l'hème.

TABLEAU VI

CARACTERISTIQUES DES QUATRE TYPES DE LIAISONS DANS  
LES COMPLEXES GLOBINE-HEME et GLOBINE-HEMATINE

	Coloration	Bandes d'absorption	Electrons céliba- taires	Exemples
Composés ferriques liaisons ioniques	Brune ou verte	une bande vers 630 m $\mu$	5	Catalase Peroxydase Metmyoglobine acide (THEORELL et EHRENBERG)( 63a ) Méthémoglobine acide
Composés ferriques liaisons covalentes	rouge	une à deux bandes dans le vert	1	Cyan-catalase Cyan-peroxydase
Composés ferreux liaisons ioniques	Rouge pourpre	une large bande à 560 m $\mu$	4	Myoglobine réduite Hémoglobine réduite
Composés ferreux liaisons covalentes	Rouge brillant	deux bandes vers 545 m $\mu$ et 580 m $\mu$	0	Oxymyoglobine Oxyhémoglobine Carbonylmyoglobine

CHAPITRE II

PREPARATION DE LA MYOGLOBINE DE CHEVAL

#### A - TENEUR EN MYOGLOBINE DU TISSU MUSCULAIRE

Dans les différentes espèces animales, la teneur du muscle en myoglobine est variable, non seulement en fonction de l'espèce, mais aussi du type de muscle et de l'activité physique de l'animal. C'est ainsi que la teneur en myoglobine est beaucoup plus élevée chez les animaux marins (Cétacés, Phoque, Pingouin, Cormoran) que chez les animaux terrestres (KENDREW, PARRISH, MARRACK et ORLANS) (66). THEORELL (67), par extraction des muscles squelettiques de Phoque, obtient une solution contenant 5 à 10 g p. 100 de myoglobine, c'est-à-dire 10 fois plus concentrée que dans le cas des Mammifères terrestres. De même HARDMAN, EGLAR, BANASZAK et GURD (68) extraient 30 à 35 g de myoglobine par kilogramme de muscle de Cachalot.

DRABKIN (69) a étudié systématiquement la concentration en myoglobine du coeur et des muscles squelettiques de différents Mammifères (Tableau VII). Il conclut à une concentration en myoglobine élevée chez les grands Mammifères (Cheval) et chez les animaux à course rapide (Chien). Chez ces deux espèces, la concentration en myoglobine est plus élevée dans les muscles squelettiques que dans le coeur. La concentration en myoglobine est nettement plus faible chez les petits Mammifères (Rat) et chez l'Homme. BROWN (70) a étudié la concentration en myoglobine chez les Poissons (Thon) : il trouve une concentration de l'ordre de 0,37 à 1,28 mg/g dans les muscles blancs et un taux très élevé, de 3,3 à 24,4 mg/g dans les muscles rouges.

#### B - ISOLEMENT DE LA MYOGLOBINE

L'isolement de la myoglobine s'effectue en général par relargage, à l'aide du sulfate d'ammonium, des solutions aqueuses obtenues par extraction des broyats tissulaires. Les concentrations en sulfate d'ammonium et les pH utilisés sont variables selon les auteurs et selon les espèces animales. Chez les Mammifères, la zone de relargage est en général comprise entre 75 et 95 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium.

TABLEAU VII

TENEUR EN MYOGLOBINE DES MUSCLES DE QUELQUES MAMMIFERES  
(en mg/g)

	Coeur	Muscles squelettiques
RAT	0,91	0,89
CHIEN	1,83	3,33
HOMME	1,18	1,18
CHEVAL	4,56	7,3

D'autres procédés de préparation ont également été mis en oeuvre, notamment la précipitation éthanolique (25 p. 100) en présence de sels de zinc (HARDMAN et al.) (71), et l'ultrafiltration, qui a été employée par BOYER, FAINER et NAUGHTON (72) pour l'extraction de la myoglobine humaine à partir de biopsies musculaires. Dans cette dernière méthode, l'ultrafiltration est réalisée sous pression réduite à travers un sac de cellophane (Visking numéro 8) à 2-5°C pendant plusieurs heures. L'hémoglobine est retenue par la cellophane tandis que la myoglobine la traverse, ainsi d'ailleurs que d'autres protéines, ce qui exige une purification de la myoglobine par une deuxième ultrafiltration (sur collodion, qui retient la myoglobine).

#### C - PREPARATION DE LA MYOGLOBINE DE CHEVAL

Nous avons utilisé, pour préparer la myoglobine de Cheval, une technique de relargage au sulfate d'ammonium dérivée de celle décrite par ADAIR et BOARDMAN (73).

Nous avons choisi une zone de relargage relativement étroite, entre 84 et 94 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium, ce qui présente l'avantage de fournir une myoglobine homogène en électrophorèse de zone sur papier à pH 8,9.

Les auteurs qui utilisent une zone de relargage plus étendue obtiennent une myoglobine souillée d'hémoglobine et qui doit être purifiée ultérieurement par gel-filtration sur Sephadex (AWAD, CAMERON et KOTIE (74) et GONDKO, SCHMIDT et LEVKO (75)).

Nous avons préparé la myoglobine de Cheval soit sous forme non combinée, soit sous forme de carbonyl-myoglobine.

#### D - CRITERES DE PURETE ET D'IDENTIFICATION

##### 1) Cristallisation

La myoglobine de Cheval cristallise dans un système pseudo-orthorhombique, dérivé d'un système monoclinique obtenu plus rarement (KENDREW (76) et KENDREW, PARRISH, MARRACK et ORLANS (77)). La figure 5

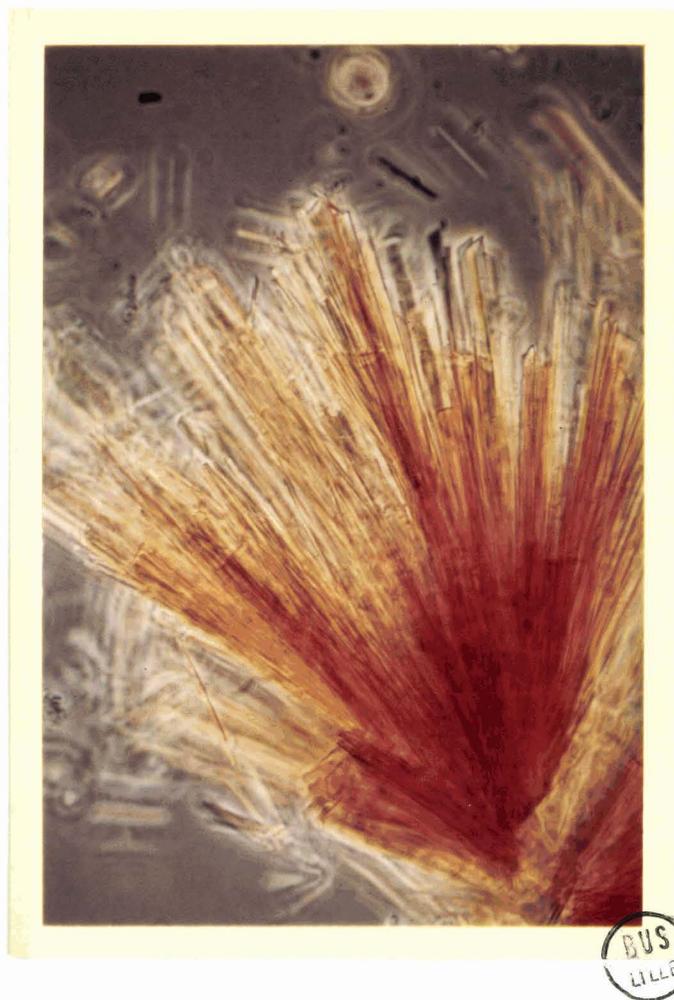


FIGURE 5

CRISTAUX DE MYOGLOBINE

Taille des cristaux : environ 100 microns.

montre l'aspect des cristaux de myoglobine de Cheval.

L'état cristallisé de la préparation obtenue n'est pas vérifié systématiquement ; en effet, pour juger de l'homogénéité des préparations, nous accordons plus de confiance aux critères physico-chimiques tels que l'électrophorèse de zone sur papier, la gel-filtration en couche mince de Sephadex G75 ou l'obtention d'un DNP-amino-acide terminal unique.

#### 2) Electrophorèse de zone sur papier

L'homogénéité électrophorétique de la préparation est contrôlée en électrophorèse de zone sur papier à pH 8,9. Dans les conditions expérimentales utilisées, l'électrophorégramme de la myoglobine montre une bande homogène unique plus lente que l'hémoglobine (Figure 6).

#### 3) Chromatographie sur couche mince de gel de Sephadex G75

La chromatographie sur couche mince de gel de Sephadex est une méthode plus sensible encore que la précédente pour contrôler l'homogénéité de la myoglobine, qui migre beaucoup plus lentement que l'hémoglobine, comme l'indique la figure 7.

#### 4) Acide aminé N-terminal

Dans le cas de la myoglobine de Cheval, la vérification de l'"unicité" du DNP-amino-acide terminal est particulièrement intéressante, puisque celui-ci est le glyco-colle alors que l'hémoglobine, qui est le contaminant le plus gênant et le plus fréquent, possède, aussi bien sur les chaînes  $\alpha$  que sur les chaînes  $\beta$ , un résidu de valine en position N-terminale.

### E - MICROHETEROGENEITE DE LA MYOGLOBINE

L'hétérogénéité de la myoglobine cristallisée est connue depuis relativement longtemps, mais elle n'a été définitivement établie que grâce à l'électrophorèse en gel d'amidon : simultanément, LEWIS et SCHWEIGERT (78) mirent en évidence deux constituants A et B dans la myoglobine de Boeuf, tandis que THEORELL et ÅKESON (79) en décelaient trois dans la myoglobine de Cheval. Ce résultat fut confirmé ensuite

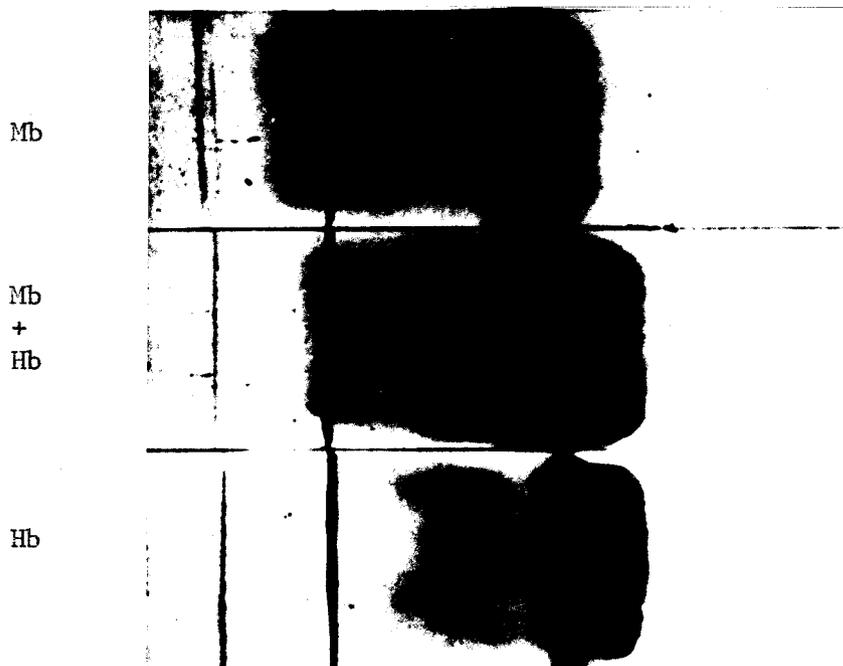


FIGURE 6  
ELECTROPHORESE DE ZONE DE LA MYOGLOBINE  
ET DE 1<sup>e</sup> HEMOGLOBINE DE CHEVAL

Mb : Myoglobine

Hb : Hémoglobine

Révélation à l'Amidoschwarz

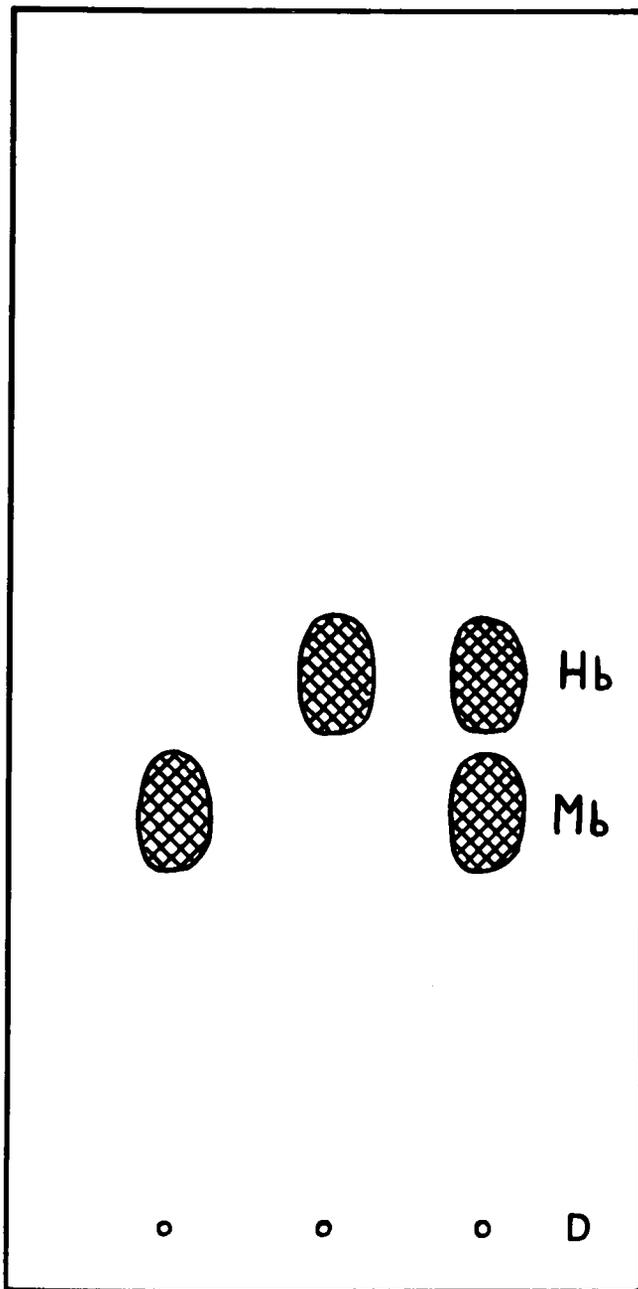


FIGURE 7

CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE GEL DE SEPHADEX G75 DE  
LA MYOGLOBINE ET DE L'HEMOGLOBINE DE CHEVAL

Mb : Myoglobine

Hb : Hémoglobine

Révélation par l'Amidoschwarz

pour la myoglobine humaine par ROSSI-FANELLI et ANTONINI (80).

Le fractionnement par chromatographie sur résine (Amberlite IRC 50 ou CM-cellulose selon les auteurs) des différentes formes de myoglobine a apporté un certain nombre de données intéressantes. Il a été admis assez rapidement que les poids moléculaires et les compositions en amino-acides étaient identiques (BOARDMAN et ADAIR (81), ÅKESON et THEORELL (82), EDMUNDSON et HIRS (83), ATASSI et SAPLIN (84)).

L'hypothèse d'un taux d'amidification différent émise par EDMUNDSON et HIRS à propos de quatre des cinq constituants (Fractions II - V) de la myoglobine de Cachalot, isolés par chromatographie sur Amberlite IRC 50, semble devoir être abandonnée à la suite des dosages de groupements amide effectués par ÅKESON et THEORELL sur les trois composants de la myoglobine de Cheval, séparés par chromatographie sur CM-cellulose : le taux d'amidification est en effet le même pour ces trois formes de myoglobine.

Une première cause de polymorphisme semble être la présence dans les préparations de myoglobine, même cristallisées, de constituants non héminiques, mis en évidence par PERKOFF, HILL, BROWN et TYLER (85) dans la myoglobine humaine : par chromatographie sur DEAE-cellulose, ces auteurs séparent quatre fractions dont trois (F 1, 2, 3) absorbent à la fois à 280 m $\mu$  et 415 m $\mu$  (bande de SORET) et une (F<sub>A</sub>) à 280 m $\mu$  seulement. De même, ATASSI (86) sépare par chromatographie sur CM-cellulose 12 fractions dans la myoglobine de Cachalot, la fraction I n'absorbant qu'à 280 m $\mu$  et non à 415 m $\mu$ . La composition en amino-acides de la fraction I de la myoglobine de Cachalot (voir ci-dessus EDMUNDSON et HIRS), qui diffère de celle des trois autres, peut donc s'expliquer soit par sa nature non héminique, soit par une contamination par une protéine non héminique.

L'éventualité d'une telle contamination ne permet cependant pas d'expliquer la multiplicité des fractions isolées par ces différences de méthodes de chromatographie sur colonne. En fait des différences de constitution ont été mises en évidence par de nombreux auteurs. Ainsi, dans le

cas des fractions héminiques 1 et 2 isolées par PERKOFF *et al.* dans le cas de la myoglobine humaine, la rechromatographie de chacune de ces deux fractions prises individuellement conduit à un mélange de 1 et de 2 ; mais si les fractions sont rechromatographiées sous forme de cyanmetmyoglobine, un pic unique, identique pour les deux fractions est alors obtenu. De même, parmi les douze fractions isolées par ATASSI dans la myoglobine de Cachalot, trois possèdent le spectre de la metmyoglobine et huit celui de la cyanmetmyoglobine. Un résultat analogue a été trouvé par QUINN, PEARSON et BRUNNER (87) avec la myoglobine bovine.

Le polymorphisme peut donc être partiellement expliqué par l'existence de complexes porphyriniques différents, mais il faut aussi invoquer des différences de structure secondaire ou tertiaire (PERKOFF *et al.* (88), ATASSI (89), YAMAZAKI, YOKOTA et SHIKAMA (90)). Ces différences peuvent être mises en évidence par de légères altérations du spectre ultra-violet ou de la cinétique des réactions de dissociation de l'oxymyoglobine ou du complexe hème-globine (QUINN, PEARSON et BRUNNER (91) et RUMEN (92)).

L'une des causes de polymorphisme pourrait donc être l'existence ou l'apparition de formes partiellement dénaturées de la myoglobine dans les préparations cristallisées.

La microhétérogénéité de la myoglobine semble donc due essentiellement à des artéfacts dus au mode de préparation et d'isolement (KOSSMAN, FAINER et BOYER) (93) ; il faut cependant signaler que HARDMAN, EGLAR, RAY, BANASZAK et GURD (94), qui ont préparé la myoglobine de Cachalot par une méthode à l'éthanol, ont retrouvé le polymorphisme observé par ATASSI (95) sur le même substrat préparé par relargage au sulfate d'ammonium. Au contraire, cette microhétérogénéité ne semble pas avoir été retrouvée par AWAD et KOTITE (96) pour la myoglobine de Chameau préparée par chromatographie sur colonne de CM-cellulose, purifiée par gel-filtration sur Sephadex G75 et finalement cristallisée dans une solution de sulfate d'ammonium à 75-85 % de saturation.

En ce qui concerne l'étude structurale, notamment la détermination de la séquence des acides aminés, cette microhétérogénéité ne constitue pas un inconvénient sérieux, car d'une part la composition en amino-acides et le poids moléculaire sont identiques pour toutes les fractions et d'autre part la fraction majeure représente toujours 80 à 90 p. 100 de la préparation.

CHAPITRE III

HYDROLYSE CHYMOTRYPSIQUE

## A - CHOIX DE L'ENZYME

La détermination de la séquence des acides aminés de la myoglobine de Cheval a été abordée notamment par l'étude des hydrolysats partiels enzymatiques : nous avons choisi l'hydrolyse chymotrypsique.

La chymotrypsine hydrolyse principalement les liaisons dans lesquelles sont impliqués les carboxyles du tryptophane, de la tyrosine et de la phénylalanine (dans l'ordre décroissant d'affinité). Sauf exception, ces trois amino-acides seront donc en position C-terminale dans les peptides qui les contiennent.

La chymotrypsine coupe également, à un degré moindre, les liaisons leucyl, méthionyl, histidyl, asparaginy, glutaminy, alanyl, et plus rarement certaines liaisons sérily, thréony, aspartyl et peut-être glutamyl. Une étude générale de la spécificité d'action de la chymotrypsine (\*) sur diverses protéines a été réalisée par NEIL, NIEMANN et HEIN (97).

En raison de cette spécificité assez large, le nombre de coupures et par suite le nombre de peptides libérés est élevé. La taille de ces peptides est donc en moyenne plus faible que celle des peptides libérés par la trypsine, dont la spécificité est limitée aux liaisons lysyl et arginy. De ce fait, l'étude structurale des peptides chymotrypsiques sera plus simple que celle des peptides tryptiques ; de plus, grâce aux coupures secondaires de l'enzyme, de nombreux recoupements sont possibles, ce qui facilite la reconstitution de la séquence dans de larges portions de la molécule.

En contre-partie, le problème du fractionnement d'un tel mélange est très complexe du fait du grand nombre de peptides libérés.

---

(\*) Une étude de l'hydrolyse des liaisons de la leucine par diverses chymotrypsines a été effectuée par GRATECOS et ROVERY (97bis).

La détermination de la séquence complète d'une protéine ne peut cependant être réalisée par l'utilisation d'un seul type d'hydrolyse enzymatique ; deux hydrolysats enzymatiques différents sont requis au minimum : le premier permettra de déterminer des séquences partielles limitées aux peptides isolés ; le second, en enchaînant les unes aux autres les séquences préalablement déterminées, donnera une vue d'ensemble de la molécule.

L'hydrolyse chymotrypsique nous a permis d'atteindre le premier de ces objectifs.

Les préparations commerciales de chymotrypsine utilisées contiennent en général des impuretés et notamment de faibles quantités de trypsine ; en fait, nous avons isolé un certain nombre de peptides "anormaux" correspondant à des coupures de type trypsique.

Dans l'ensemble, ces coupures parasites ont facilité l'étude de nombreux enchaînements, mais elles constituent parfois un obstacle à la reconstitution de certaines séquences basiques, profondément dégradées par des coupures de liaisons lysyl.

Il est actuellement possible d'inhiber les traces de trypsine présentes dans la chymotrypsine par un traitement par la 1-chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanone (\*) LAROS-GUIA, SHAW et COHEN (98) et SHAW et SRINGHORN (99), selon une méthode analogue à celle employée par SCHOELLMANN et SHAW (100) et KOSTKA et CARPENTER (101) pour inhiber la chymotrypsine par un inhibiteur spécifique, la 1-chloro-3-tosylamido-4-phényl-2-butanone (\*\*)

A l'époque où ce travail fut commencé, nous ne disposions pas de cet inhibiteur spécifique de la trypsine (TLCK) et l'essentiel de

---

(\*) En abrégé TLCK : initiales de Tosyl-lysine-chloromethyl-ketone

(\*\*) En abrégé TPCK : initiales de Tosyl-phenylalanine-chloromethyl-ketone

notre expérimentation a été réalisée avec la chymotrypsine cristallisée du commerce.

Nous avons par la suite étudié l'influence du traitement de la chymotrypsine par le TLCK sur l'hydrolyse de la myoglobine de Cheval ; les résultats seront exposés dans le dernier chapitre de ce travail (Chapitre VI).

## B - CHOIX DES CONDITIONS D'HYDROLYSE

### 1) Choix du pH

Nous avons dans un premier temps précisé les conditions optimales d'hydrolyse de la myoglobine et tout d'abord le pH optimum d'action de la chymotrypsine sur la myoglobine par une étude cinétique de l'hydrolyse.

La figure 8 montre l'évolution de la consommation de soude en fonction du temps pour trois valeurs différentes du pH. Dans les trois expériences nous avons utilisé des solutions de même concentration en globine de myoglobine (50 mg pour 20 ml) ; le pH est préalablement ajusté à la valeur désirée (le volume initial est le même à chaque expérience, soit 20 ml).

On voit qu'à pH 9, dans les premiers temps de l'hydrolyse, la quantité de soude consommée est plus grande qu'à pH 8,5 ou 8 : cela correspond à un plus grand nombre de liaisons peptidiques rompues. Pour des durées dépassant 2 heures, les courbes correspondant aux pH 8,5 et 9 se rejoignent. On voit également qu'une deuxième addition d'enzyme n'a qu'une assez faible influence sur la cinétique d'hydrolyse.

Nous avons donc finalement retenu un pH de 9. En effet, à pH 9, le rendement en peptides dialysables augmente, tandis que les fragments adialysables diminuent (voir Chapitre IV).

### 2) Durée de l'hydrolyse

Pour une valeur de pH donnée, la prolongation du temps d'hydrolyse augmente le nombre de coupures secondaires et par suite le nombre de peptides. Si le fractionnement se trouve quelque peu compliqué, en revanche les études de séquences sont facilitées grâce aux nombreux recouplements possibles. Nous avons utilisé une durée de 24 heures, qui

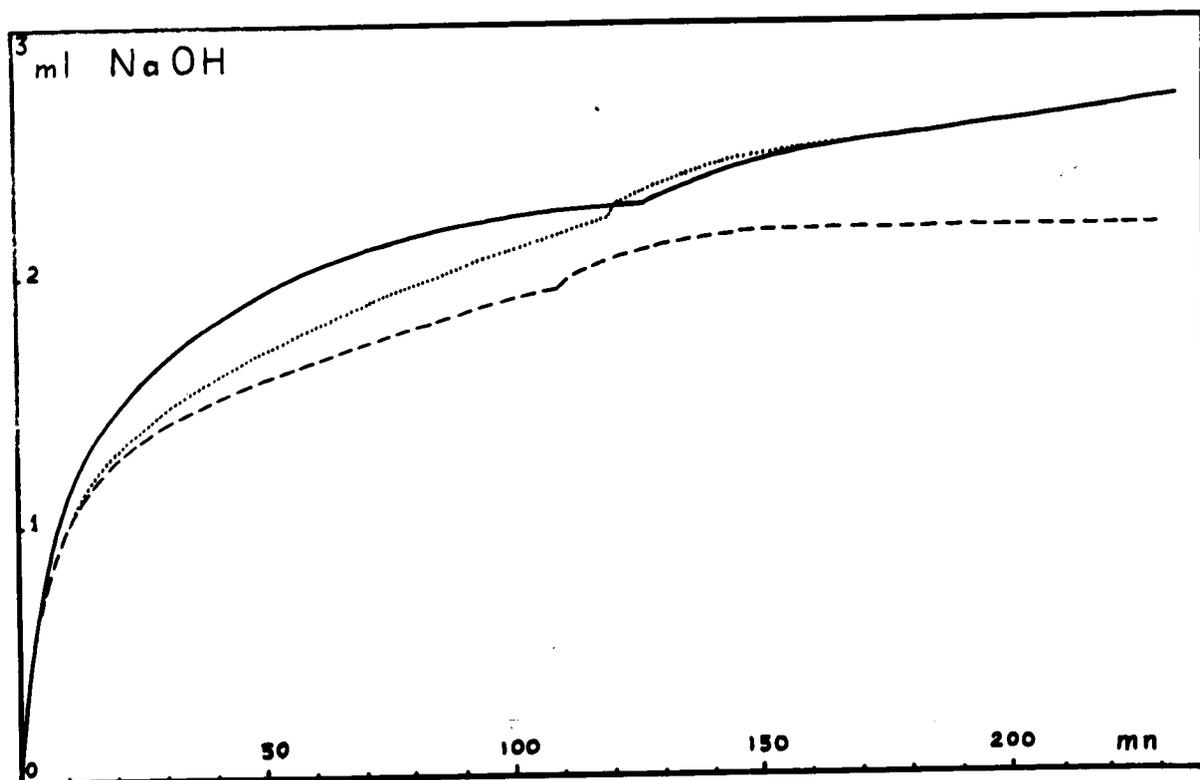


FIGURE 8

ETUDE DE LA CONSOMMATION EN NaOH 0,02 N EN FONCTION DU TEMPS  
LORS DE L'HYDROLYSE CHYMOTRYPSIQUE DE LA GLOBINE

Temps 0 : première addition d'enzyme ; rapport Enzyme/Substrat égal à  
1 p. 100 (en poids).

Temps 110-130 minutes : Deuxième addition d'enzyme (dans le même rapport).

- : pH 9
- ..... : pH 8,5
- : pH 8

donne un rendement plus satisfaisant en peptides dialysables que des durées courtes, de 8 heures par exemple.

Toutefois, en présence de chymotrypsine traitée par le TLCK, nous avons limité la durée de l'hydrolyse à 6 heures.

### 3) Rapport Enzyme/Substrat

Nous avons adopté une valeur du rapport Enzyme/Substrat de 2 p. 100 (en poids), obtenue soit en une seule addition d'enzyme, soit en deux additions identiques aux temps zéro et quatre heures de l'hydrolyse.

### C - RECAPITULATION DES CONDITIONS ADOPTÉES

Nous avons finalement adopté une valeur de pH d'hydrolyse de 9, un rapport Enzyme/Substrat égal à 2 p. 100 en poids, une durée de 24 heures à 38°C, la concentration en protéine étant de 1 g pour 100 ml.

Les conditions expérimentales seront décrites au chapitre technique (Chapitre VII).

CHAPITRE IV

FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS CHYMOTRYPSIQUES

## A - INTRODUCTION

L'hydrolysat chymotrypsique de la globine de myoglobine de Cheval constitue un mélange relativement complexe. A titre d'exemple, nous avons purifié et étudié 80 peptides, sans compter les amino-acides libres et les fractions mineures ou trop hétérogènes pour être purifiées. On conçoit donc que le fractionnement d'un tel mélange exige le couplage de plusieurs des méthodes habituellement utilisées pour la séparation des peptides.

Ceux-ci peuvent être tout d'abord séparés en fonction de leur taille moléculaire soit par dialyse, soit par la gel-filtration sur Sephadex G25.

Les différences de point isoélectrique interviennent de façon peu sélective dans l'électrophorèse préparative en film liquide, plus fine avec la chromatographie d'échange d'ions et l'électrophorèse sur papier.

Le caractère aromatique des peptides à tryptophanne, phénylalanine et tyrosine peut également influencer leur comportement au cours de la chromatographie de gel-filtration ou d'échange d'ions.

Enfin, la nature hydrophile ou hydrophobe des peptides conditionne leur séparation par chromatographie de partage sur papier.

Le plan de fractionnement adopté fait intervenir ces différents facteurs dans un ordre bien déterminé.

Les méthodes les moins sélectives constituent les premières étapes, car elles permettent la séparation de quantités importantes de mélange peptidique. Ensuite, les méthodes les plus fines permettent de séparer des quantités nettement plus faibles à partir de mélanges déjà simplifiés par les étapes antérieures.

Par exemple, la dialyse, la gel-filtration, l'électrophorèse en film liquide permettent de traiter à chaque opération 250 à 450 mg de peptides, tandis que la chromatographie sur résines est effectuée sur des quantités de l'ordre de 100 mg. Dans les étapes finales d'électrophorèse ou de chromatographie sur papier, on sépare quelques milligrammes de peptides par expérience.

## B - FRACTIONNEMENT DE BASE PAR DIALYSE

### 1) Utilité de la dialyse

Les conditions d'hydrolyse utilisées laissent subsister dans l'hydrolysate une quantité de matériel adialysable qui représente 20 à 30 p. 100 du poids initial. Cet adialysable est constitué de gros fragments peptidiques peu hydrolysés par l'enzyme et correspondant à un ou plusieurs "noyaux" résistants au sein de la molécule de globine. Les hydrolysats enzymatiques de myoglobine de Cachalot contiennent également des noyaux polypeptidiques difficilement attaqués (EDMUNDSON) (102). Ces fragments peptidiques doivent être obligatoirement éliminés par dialyse pour faciliter les étapes ultérieures du fractionnement.

### 2) Technique de dialyse

La solution peptidique résultant de l'hydrolyse chymotrypsique (250 mg/25 ml) est dialysée contre de l'eau distillée.

La dialyse peut être effectuée en boudin de cellophane de façon classique, mais la méthode est longue (plusieurs jours) et la fraction dialysable est diluée dans plusieurs litres d'eau à la fin de l'opération.

La dialyse peut être accélérée et améliorée par l'utilisation d'un dialyseur automatique, par exemple celui qui équipe l'autoanalyseur Technicon (⌘) : la solution peptidique, aspirée à l'aide de la pompe proportionnante (Technicon) circule en circuit fermé dans le dialyseur avec un débit de 7,5 à 7,8 ml/minute. La dialyse est poursuivie pendant 24 heures contre un courant d'eau distillée (débit 0,6 ml/minute) circulant dans le dialyseur à température ambiante.

Outre la réduction de temps de dialyse, le volume de la solution contenant la fraction dialysable se trouve réduit à 300 ml environ, au lieu de 10 litres dans les opérations de dialyse classique à l'aide de boudins de cellophane.

---

(⌘) Membrane : cellophane "Cuprothane" Technicon.

Le dialysat est concentré dans un évaporateur rotatif à 40°C et lyophilisé.

## C - CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION

### 1) Technique

La gel-filtration est réalisée sur une colonne de 100 cm de hauteur (\*) sur 3 cm de diamètre, garnie de Sephadex G25 "medium", équilibrée avec un tampon pyridine 0,1 N-acide acétique de pH 4,9. Cette colonne permet le fractionnement de 250 à 300 mg de peptides dialysables. L'élution est assurée par passage de ce même tampon avec un débit de 36 ml par heure obtenu par pompage du liquide effluent, à la sortie de la colonne, au moyen d'une pompe proportionnante (pompe Technicon). Cet effluent est recueilli par fractions de temps de 10 minutes (6 ml par fraction) au moyen d'un collecteur automatique (collecteur Technicon). La courbe d'élution est établie par dosage automatique des peptides de chaque fraction au moyen de la réaction de FOLIN et LOWRY (103) adaptée à l'autoanalyseur (Autoanalyseur Technicon).

### 2) Résultats

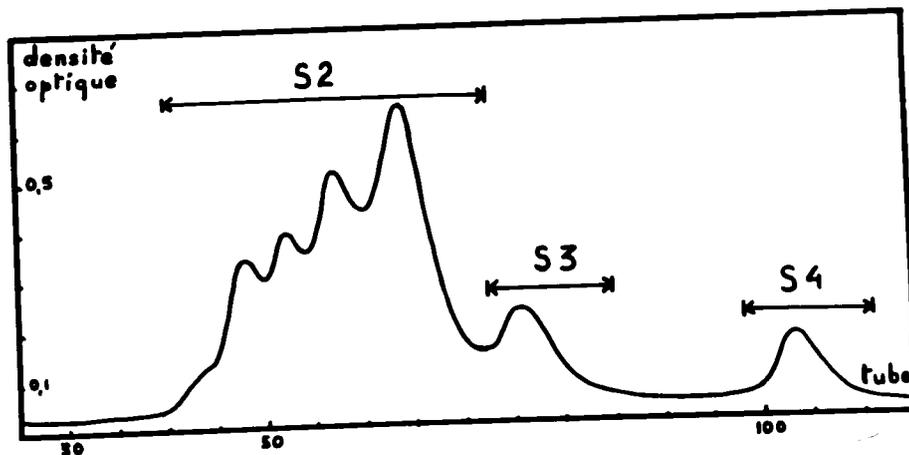
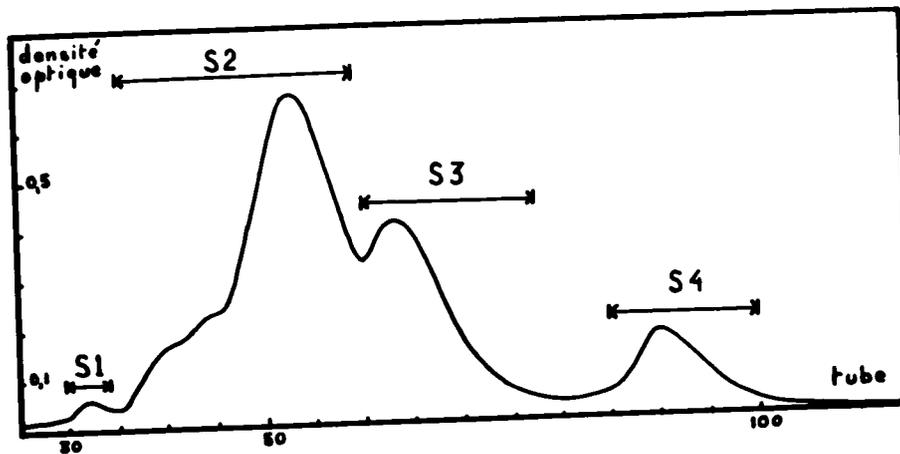
Le diagramme de la figure 9 met en évidence 4 fractions S1, S2, S3, S4.

La fraction S1 correspond aux plus gros fragments peptidiques. Elle subsiste même après dialyse préalable des hydrolyses chymotrypsiques effectuées à pH 3. Elle disparaît complètement, au contraire, après dialyse des hydrolyses effectuées à pH 9. Ce résultat montre bien l'intérêt de la dialyse en même temps qu'il confirme l'étude de la cinétique d'hydrolyse.

La séparation des fractions S2 et S3 est nettement améliorée par l'utilisation de la colonne de 1 m de hauteur sur 3 cm de diamètre

---

(\*) Les premiers essais, réalisés avec une colonne de 60 cm de hauteur, donnèrent une séparation moins satisfaisante (Figures 9 et 10).



FIGURES 9 et 10

CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION SUR GEL DE SEPHADEX G25

DES PEPTIDES DIALYSABLES DE L'HYDROLYSAT CHYMOTRYPSIQUE DE LA GLOBINE

Figure 9 : Dimension de la colonne 60 x 3 cm. L'hydrolyse a été effectuée à pH 8.

Figure 10 : Dimension de la colonne 100 x 3 cm. L'hydrolyse a été effectuée à pH 9.

Les fractions sont dosées automatiquement sans dilution préalable.



(Figure 10) : c'est donc le type de colonne qui a été retenu pour les séparations.

Les fractions S2, S3 et S4 représentent respectivement 77, 19 et 4 p. 100 du poids total de la fraction dialysable.

L'étude de la composition de ces fractions est effectuée par électrochromatographie sur papier : électrophorèse "en toit" à pH 3,9 suivie de la chromatographie dans le solvant n-butanol - acide acétique - eau (4:1:5) selon la technique décrite par PLAQUET, BISERTE et BOULANGER (104).

Si les fractions S2 et S3 sont encore relativement complexes (\*) S4 par contre apparaît très simple, comme le montre l'électrochromatographie de la figure 11, qui met en évidence quatre taches majeures "ninhydrine positives". Elle a donc été soumise directement à la chromatographie sur échangeurs de cations, alors que S2 et S3 ont été au préalable fractionnées par électrophorèse en film liquide.

Il faut signaler enfin que la zone comprise entre S3 et S4, qui donne une coloration pratiquement nulle à la réaction de FOLIN-LOWRY est en fait "ninhydrine positive". Elle correspond au passage de la phénylalanine libre, que l'on trouve également dans S3 et S4.

#### D - ELECTROPHORESE PREPARATIVE EN FILM LIQUIDE

##### 1) Principe

Les fractions S2 et S3 ont été soumises à une électrophorèse préparative en film liquide selon la technique de HANNIG (\*\*) (105).

Le principe de la méthode peut être schématisé de la façon suivante : une particule ionisée est soumise d'une part à un champ électrique qui lui donne une vitesse uniforme  $v_E$ , d'autre part au flux liquidien, dû au déplacement d'ensemble d'un film liquide de 0,5 mm d'épaisseur circulant entre deux plaques de verre planes et parallèles, qui lui donne une vitesse

---

(\*) Les électrochromatographies de ces deux fractions mettent en évidence 30 à 40 taches "ninhydrine positives".

(\*\*) Appareil Elphor-Vap construit par BENDER et HOBEIN (Munich).

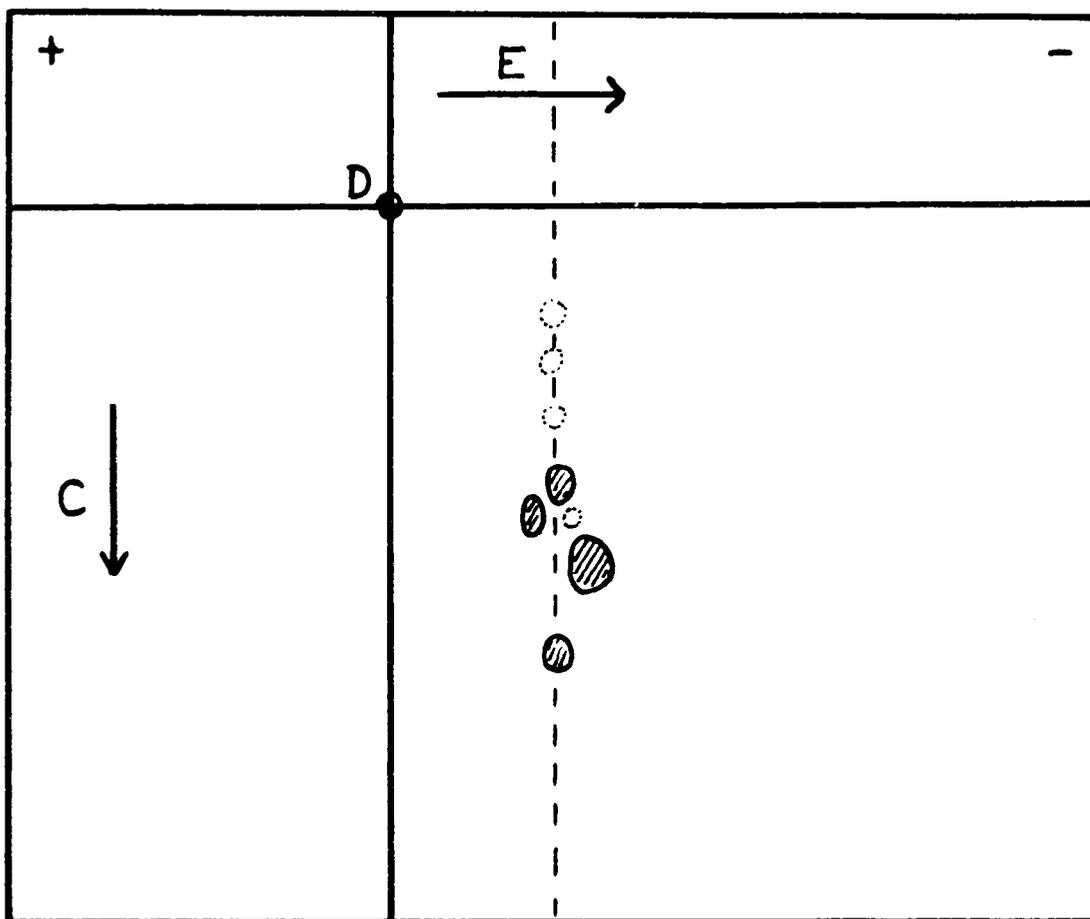


FIGURE 11

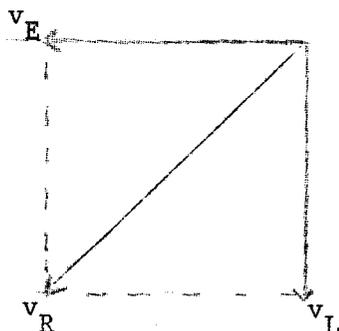
ELECTROCHROMATOGRAPHIE DE LA FRACTION S4

SUR PAPIER WHATMAN n° 1

E : Electrophorèse à pH 3,9 (7 heures sous 630 volts)

C : Chromatographie dans le système solvant n-butanol-acide acétique-eau (4:1:5) (18 heures)

uniforme  $v_L$  perpendiculaire à  $v_E$ . La vitesse de la particule est la résultante géométrique  $v_R$  de ces deux composantes.



Cette résultante détermine donc la trajectoire de la particule.

L'effluent résultant de la séparation électrophorétique en continu est recueilli dans 48 tubes. La courbe de distribution électrophorétique des peptides est établie par dosage automatique du contenu de chacun de ces tubes au moyen des réactions à la ninhydrine et de FOLIN-LOWRY adaptées à l'autoanalyseur (\*). La mise en oeuvre des réactions de SAKAGUCHI, de PAULY et de SPIES et CHAMBERS (106) adaptées à l'autoanalyseur permet en outre de localiser les fractions peptidiques contenant respectivement de l'arginine, de l'histidine et du tryptophane.

## 2) Résultats

### a) Fraction S3

La fraction S3 est séparée en trois groupes (Figure 12). On isole ainsi des peptides neutres (S3E1) et basiques (S3E3) et on recueille également une zone intermédiaire (S3E2). La réaction de PAULY est positive pour ces trois groupes mais surtout pour S3E2 et S3E3. La réaction de SAKAGUCHI montre que les peptides à arginine sont principalement localisés dans S3E2.

Seul le groupe neutre donne une réaction positive pour le tryptophane.

---

(\*) Autoanalyseur Technicon.

FIGURE 12

ELECTROPHORESE PREPARATIVE EN FILM LIQUIDE DE LA FRACTION S3

- : Dosage automatique des fractions après dilution au 1/10e  
par la réaction à la ninhydrine
- .-.-.-. : Réaction de SPIES et CHAMBERS  
..... : Réaction de SAKAGUCHI  
----- : Réaction de PAULY
- } sans dilution

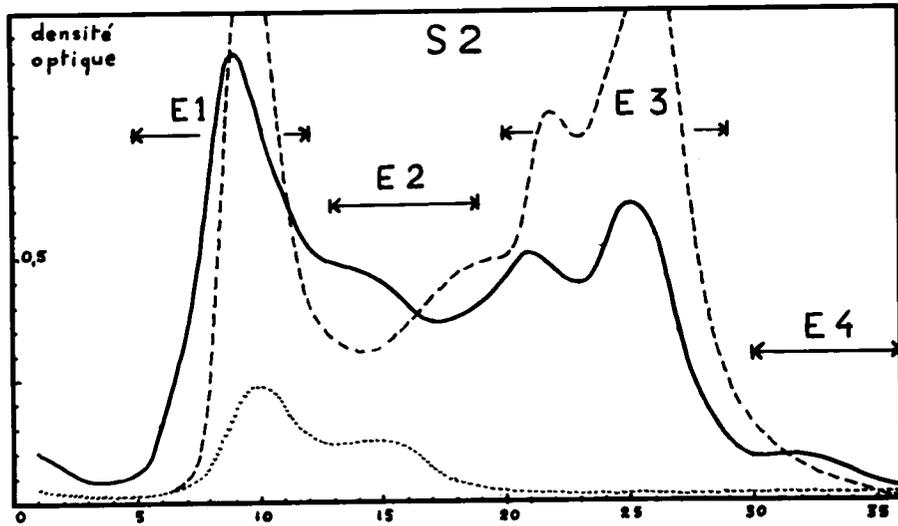
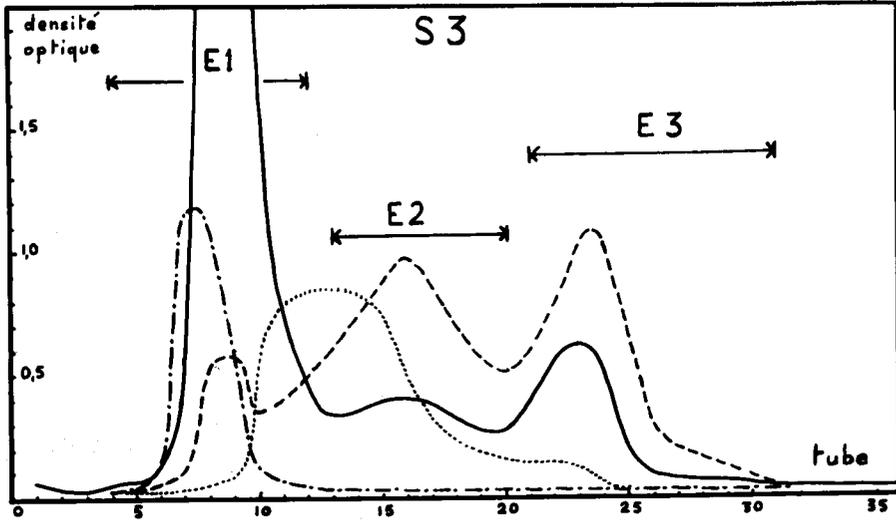
Une densité optique de 1 pour la réaction à la ninhydrine correspond  
à une densité optique de 0,5 pour les trois autres réactions

FIGURE 13

ELECTROPHORESE PREPARATIVE EN FILM LIQUIDE DE LA FRACTION S2

- : Dosage automatique des fractions par la réaction de  
FOLIN-LOWRY (sans dilution)
- ..... : Réaction de SAKAGUCHI (sans dilution)
- : Réaction de PAULY "

Une densité optique de 0,5 pour la réaction de FOLIN-LOWRY correspond  
à la même valeur pour la réaction de SAKAGUCHI et à une densité de 1  
pour la réaction de PAULY.



Les trois groupes ainsi obtenus, dont le diagramme électrophorétique est nettement simplifié, sont alors soumis à une chromatographie sur résine à échange de cations.

b) Fraction S2

La fraction S2 se divise en quatre groupes (Figure 13). Comme pour S3 on isole ainsi des peptides neutres (S2E1) et basiques (S2E3 et S2E4) ainsi qu'une zone intermédiaire (S2E2). La réaction de PAULY est positive pour tous ces groupes. Les peptides à arginine sont localisés dans les groupes neutre et intermédiaire. La réaction de SPIES et CHAMBERS est négative pour l'ensemble de la fraction S2. A ce sujet, il faut cependant signaler que dans les premières expériences de gel-filtration réalisées avec une colonne de 60 x 3 cm, la fraction S2 contenait un peptide neutre à tryptophanne qui se retrouve exclusivement dans les peptides neutres de S3 avec la colonne de 100 x 3 cm.

La fraction S2E4 qui correspond aux peptides très basiques a été directement soumise à la chromatographie sur échangeur de cations.

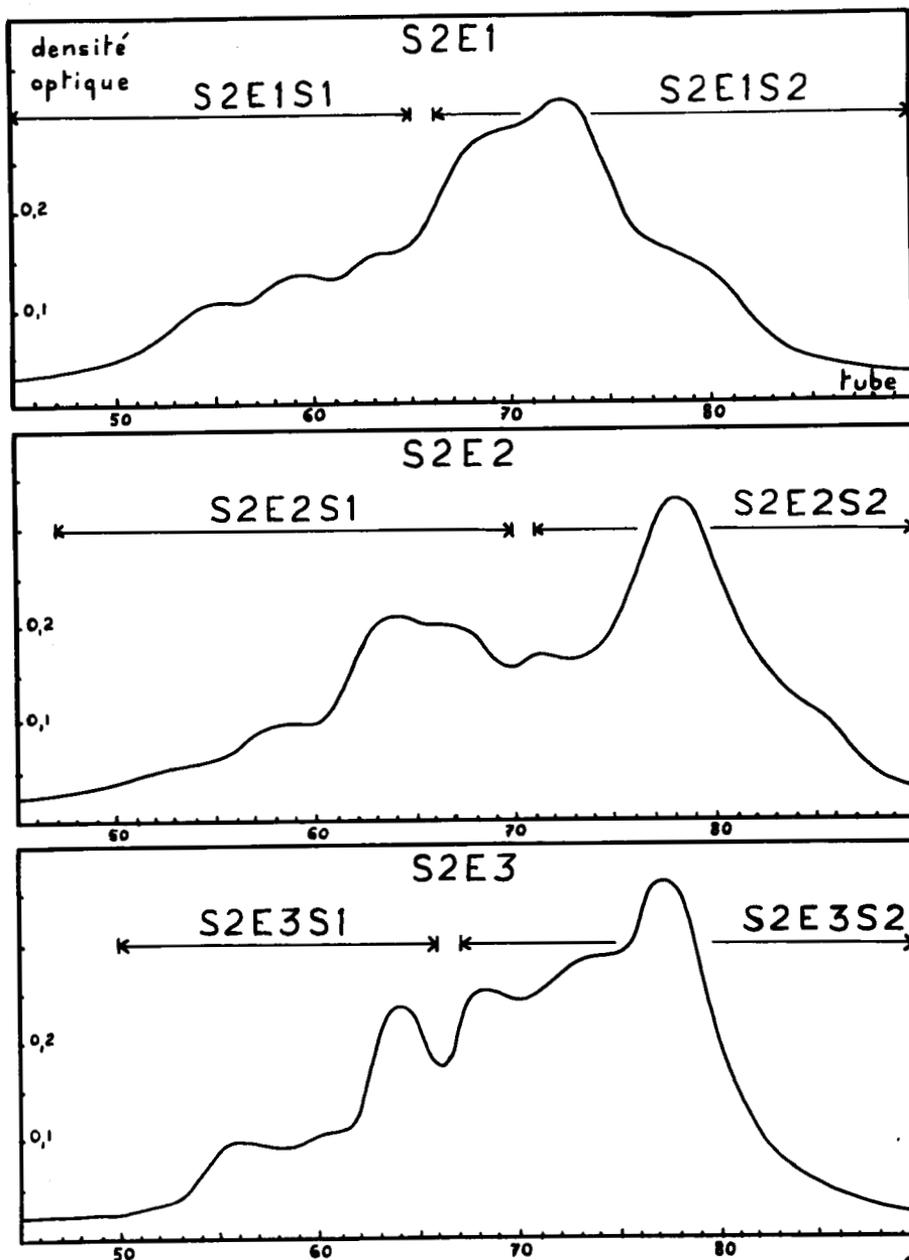
Les fractions S2E1, S2E2, S2E3, encore complexes, ont été au préalable rechromatographiées sur gel de Sephadex G25 dans les mêmes conditions que le dialysable total. Les figures 14, 15 et 16 donnent le résultat de cette opération : chacun de ces trois groupes de peptides peut être séparé en deux sous-groupes qui sont alors chromatographiés sur une résine à échange de cations. Les résultats obtenus par cette chromatographie d'échange d'ions de chacun de ces sous-groupes justifient cette rechromatographie de gel-filtration, comme nous le verrons plus loin.

E - CHROMATOGRAPHIE SUR ECHANGEURS DE CATIONS

1) Fractions S4, S3E1, S3E2 et S3E3

a) Technique

Les fractions S4, S3E1, S3E2 et S3E3 sont chromatographiées sur une colonne (130 x 0,9 cm) maintenue à 40°C et garnie de résine polystyrène sulfonée type Dowex 50W X 2 préalablement tamisée selon la méthode hydraulique de HAMILTON (107) de façon à ne conserver que les grains



FIGURES 14, 15 et 16

CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION DES FRACTIONS S2E1 (Fig. 14)  
S2E2 (Fig. 15) et S2E3 (Fig. 16) SUR SEPHADEX G25

Les conditions sont celles utilisées pour le dialysable total.

La courbe d'élution est établie par dosage automatique des fractions par la réaction de FOLIN-LOWRY sans dilution préalable.

ayant un diamètre de  $50 \pm 5 \mu$  (taille des grains de résine sous forme  $H^+$  en suspension dans l'eau distillée). L'élution des peptides (25 à 130 mg de mélange) est assurée par des tampons pyridine-acide formique ou pyridine-acide acétique (PADIEU) (108). Le gradient de molarité (\*) et de pH est obtenu au moyen de l'appareil décrit par PETERSON et SOBER (109) (modèle Varigrad). Une pompe type Milton-Roy (\*\*\*) assure le passage de ces tampons éluants avec un débit de 36 ml par heure. Comme pour la gel-filtration, l'effluent est recueilli par fractions de temps de 10 minutes (6 ml par fraction) au moyen d'un collecteur automatique (collecteur Technicon). Les peptides de chaque fraction sont dosés par la réaction à la ninhydrine adaptée à l'autoanalyseur, ce qui permet l'établissement de la courbe d'élution (Figures 17, 18, 19, 20 et 21).

Chaque pic de la courbe d'élution est finalement contrôlé par électrochromatographie sur papier. Seules les fractions homogènes peuvent être étudiées directement.

#### b) Résultats

##### Fraction S4

Cette fraction contient quatre constituants majeurs (Figure 17), ce qui confirme l'étude électrochromatographique (Figure 11).

Les pics 3 et 4 correspondent respectivement à la phénylalanine et à la tyrosine libres, les pics 5 et 7 à deux oligopeptides à tryptophane (voir Chapitre V). Du fait de leur caractère aromatique, ces quatre constituants sont nettement retardés par rapport aux autres peptides de S2 et S3.

##### Fraction S3E1

La courbe d'élution du groupe neutre S3E1 fait apparaître 29 pics (Figure 18).

---

(\*) Les molarités indiquées dans les compositions des tampons sont celles de la pyridine.

(\*\*) Pompe branchée sur la tête de colonne (voir chapitre VII).

FIGURE 17

CHROMATOGRAPHIE SUR DOWEX 50W X 2 DE LA FRACTION S4

Particularités du gradient :

a) Elution de la résine par un tampon pyridine 0,1 N-acide formique de pH 2,90 (16-17 heures).

b) Première partie du Varigrad à 9 cellules : les cellules 1, 2, 3, 4 sont remplies chacune par 200 ml du tampon précédent ; les cellules 5 et 6, chacune par 200 ml de tampon pyridine 0,1 N-acide formique de pH 4,25.

c) Deuxième partie du Varigrad à 9 cellules : la cellule 7 contient 200 ml de tampon pyridine 0,1 N-acide formique de pH 4,25 ; la cellule 8, 200 ml de tampon pyridine 1,0 N-acide formique de pH 5,0 ; la cellule 9, 200 ml de tampon pyridine 2,0 N-acide acétique de pH 5,0.

Les deux parties du Varigrad sont utilisées séparément et successivement : la cellule 1 étant reliée à la tête de colonne, par l'intermédiaire de la pompe, le contenu des 6 premières cellules, soit 1200 ml, est pompé à travers la résine. Puis, la cellule 7 étant reliée à la tête de colonne, le contenu des trois dernières cellules (600 ml) est pompé à travers la résine.

d) Elution finale de la résine par le tampon pyridine 2,0 N-acide acétique de pH 5,0 (20 heures).

FIGURE 18

CHROMATOGRAPHIE SUR DOWEX 50W X 2 DE LA FRACTION S3E1

Le gradient utilisé est celui décrit à propos de la Figure 17.

FIGURE 19

CHROMATOGRAPHIE SUR DOWEX 50W X 2 DES PEPTIDES 22-26 DE S3E1

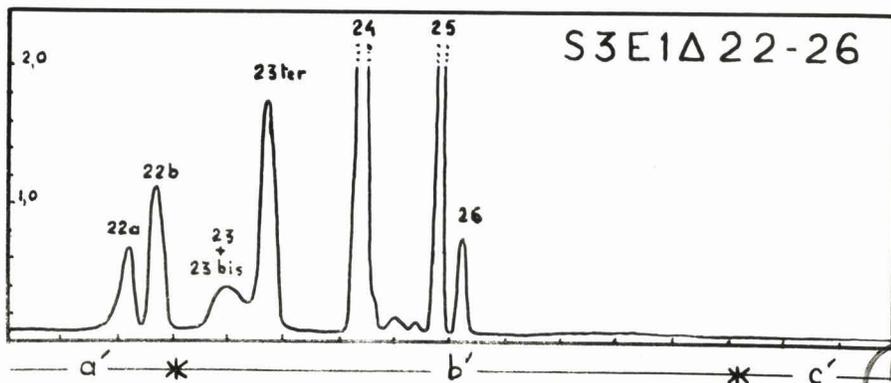
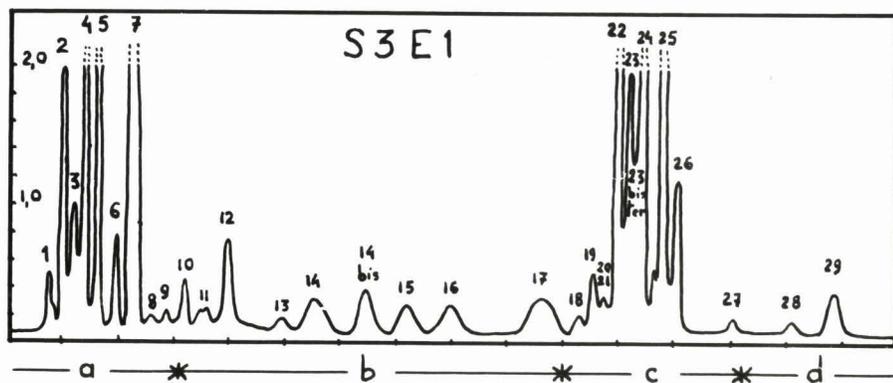
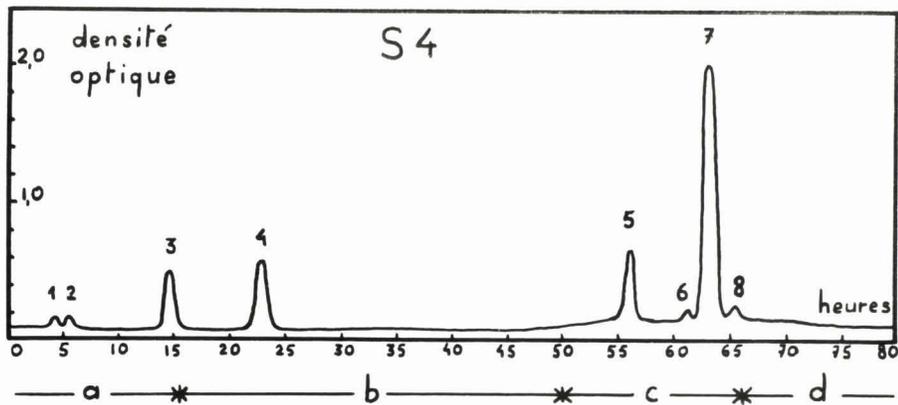
Particularités du gradient :

a' : Elution de la résine par le tampon pyridine 0,1 N-acide formique de pH 4,25 (16-17 heures).

b' : Varigrad à neuf cellules : les cellules 1,2,3,4 contiennent chacune 200 ml du tampon précédent ; les cellules 5,6,7 chacune 200 ml du tampon pyridine 1,0 N-acide formique de pH 5,0 ; les cellules 8 et 9 chacune 200 ml de tampon pyridine 2,0 N-acide acétique de pH 5,0.

c' : Elution de la résine par ce dernier tampon (20 heures). L'échelle est la même pour les trois figures.

308)



BUS  
LILLE

Les pics 1 à 7 correspondent aux amino-acides libres élués dans l'ordre suivant : Asp ; Thr + Ser ; Glu ; Gly + Ala ; Val ; Met ; Ile + Leu.

Le pic 12 contient deux constituants a et b séparés par chromatographie sur papier dans le solvant n-butanol-acide acétique-eau (4:1:5) ; 12a correspond à la phénylalanine libre.

Les fractions 22-26, bien que très resserrées, sont en majeure partie homogènes. Il faut noter par exemple que le peptide 23bis (homogène) correspond au creux entre les peptides 23 et 24 (également homogènes). Cette zone a été rechromatographiée sur la résine Dowex 50W X 2 : la figure 19 montre le résultat de cette deuxième chromatographie.

La fraction 22 s'est dédoublée (22a et 22b), les fractions 23 et 23 bis passent ensemble, mais avant la fraction 24 apparaît un nouveau pic (23 ter).

#### Fraction S3E2

La figure 20 donne le diagramme d'élution de cette fraction.

Le pic 1 correspond à la lysine libre.

La fraction 4 contient trois constituants, deux majeurs (a et c) et un mineur (b), séparés par chromatographie sur papier dans le solvant n-butanol-acide acétique-eau (4:1:5).

Cette même méthode permet de séparer les deux constituants a et b de la fraction 11 (\*) ainsi qu'un peptide mineur 12bis accompagnant le peptide 12.

Enfin, par électrophorèse sur papier à pH 1,7 en tampon acide formique-acide acétique-eau (1:3:16), on sépare les deux peptides a et b du pic 16.

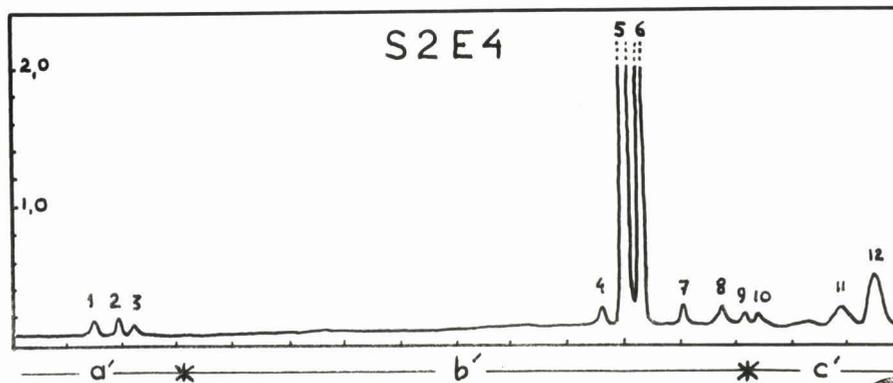
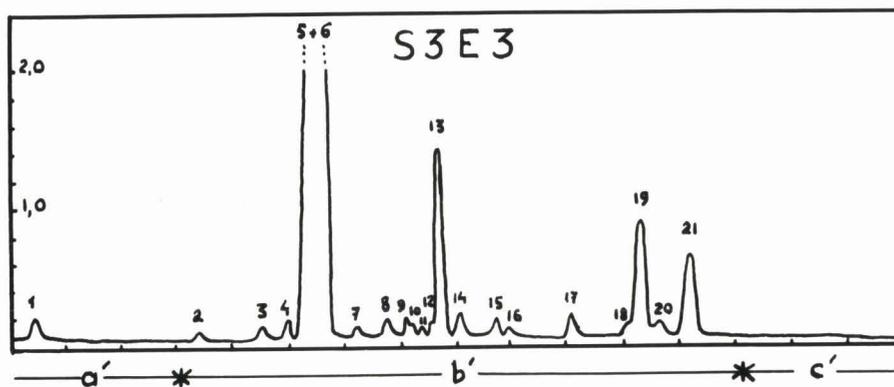
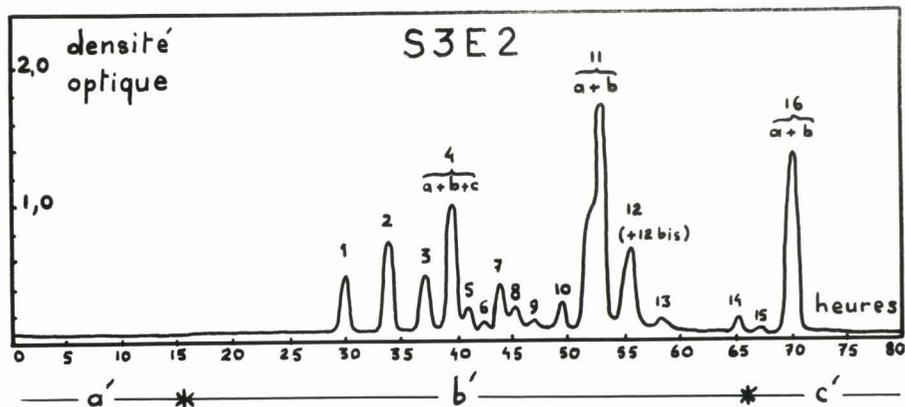
#### Fraction S3E3

Dans ce groupe basique, on trouve principalement des amino-acides libres (Figure 21) élués dans l'ordre suivant : Orn (\*\*\*) (4), Lys + His (5 + 6) et Arg (13).

---

(\*) La fraction 11a contient deux peptides différents (voir Chapitre V).

(\*\*\*) L'ornithine vient de la dégradation de l'arginine au cours de l'hydrolyse et du fractionnement.



FIGURES 20 et 21

CHROMATOGRAPHIE SUR DOWEX 50W X 2 DE LA FRACTION S3E2 (Fig. 20)  
ET DE LA FRACTION S3E3 (Fig. 21).

FIGURE 22

CHROMATOGRAPHIE SUR CHROMOBEADS P DE LA FRACTION S2E4

Colonne de 90 x 0,635 cm.

Le gradient utilisé pour ces trois groupes est celui décrit à propos de la Figure 19. L'échelle est la même pour les trois figures.



## 2) Fractions du groupe S2

### a) Technique

L'ensemble des fractions du groupe S2 a été chromatographié sur une résine à échange de cations du type Chromobeads P (\*) qui est beaucoup plus sélective que la Dowex 50W X 2. La colonne est maintenue à 50°C. L'élution des peptides (100-130 mg de mélange) est assurée par les mêmes tampons que ceux utilisés pour la Dowex 50W X 2 avec le même débit de 36 ml par heure. La courbe d'élution est établie comme précédemment par dosage automatique à la ninhydrine des fractions de 6 ml recueillies en 10 minutes.

Les figures 22 à 30 incluse donnent les résultats pour chaque groupe de peptides.

### b) Résultats

#### Fraction S2E4

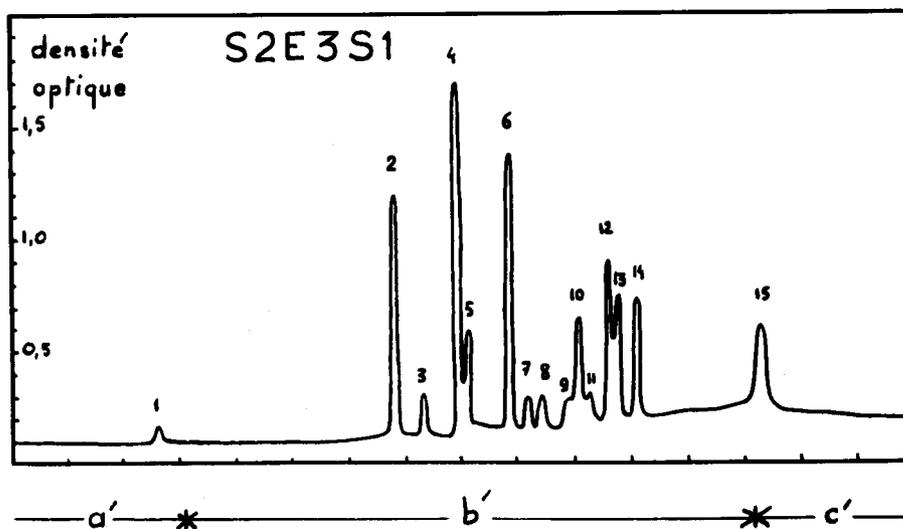
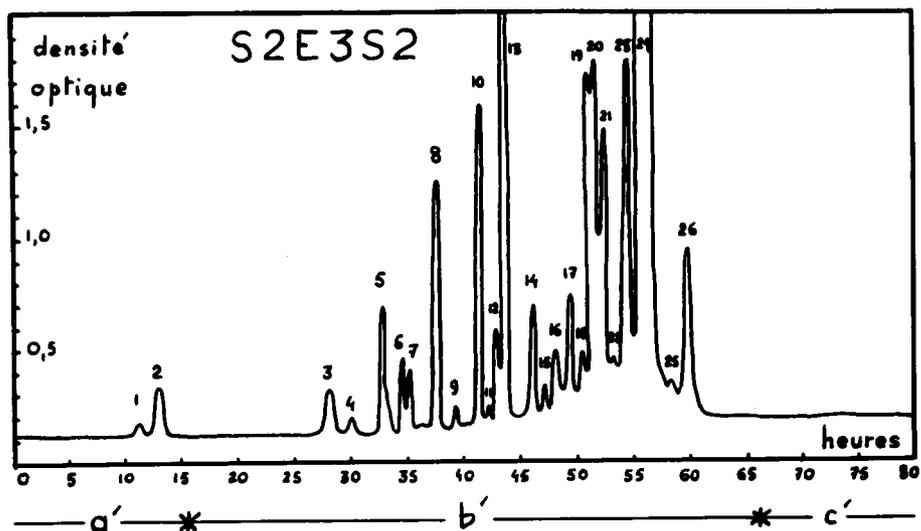
Cette fraction contient, outre des constituants très mineurs, deux peptides P5 et P6 qui migrent plus rapidement vers la cathode que la lysine en électrophorèse à pH 3,9.

#### Fractions S2E3S2 (Figure 23) et S2E3S1 (Figure 24)

La comparaison des courbes d'élution de ces deux sous-groupes basiques montre l'utilité de la rechromatographie sur gel de Sephadex avant l'étape d'échange d'ions. A temps de rétention égal, les peptides d'une fraction sont en effet différents de ceux de l'autre, à l'exception toutefois de S2E3S1P12 identique à S2E3S2P19 et de S2E3S1P13 qui correspond au mélange de S2E3S2P20 et P21. La superposition des figures 23 et 24 montre bien que la chromatographie sur la résine Chromobeads P de la fraction basique globale S2E3 fournirait dans les mêmes conditions que celles utilisées pour chaque sous-groupe, de nombreux pics hétérogènes. Grâce à la rechromatographie de gel-filtration de cette fraction basique, au contraire, les peptides obtenus dans chacun des deux sous-groupes sont

---

(\*) Résine Technicon. Deux types de colonne ont été utilisés : 90 x 0,635 cm et 140 x 0,635 cm.



FIGURES 23 et 24

CHROMATOGRAPHIE SUR CHROMOBEADS P DES FRACTIONS S2E3S2 (Fig. 23)  
et S2E3S1 (Fig. 24) (colonne de 90 x 0,635 cm)

Le gradient utilisé est celui décrit à propos de la figure 19  
L'échelle est la même pour les deux figures.

pour la plupart homogènes.

Certains peptides ont été purifiés par électrophorèse sur papier à pH 3,9 : c'est le cas de S2E3S1P10, S2E3S2P17, S2E3S2P23 et S2E3S2P20 (ce dernier étant souillé de peptide P19) ; le pic S2E3S2P24 correspond à deux peptides a et b séparés par cette même méthode.

#### Fractions S2E2S2 (Figure 25) et S2E2S1 (Figure 26)

La même remarque que précédemment peut être faite à propos de la comparaison des figures 25 et 26 : ici encore, à temps de rétention égal, les peptides isolés dans l'un de ces deux sous-groupes diffèrent de ceux de l'autre, ce qui confirme l'utilité de la rechromatographie des fractions S2E1, S2E2 et S2E3 préalablement à l'étape d'échange d'ions.

La purification par électrophorèse sur papier à pH 3,9 a ici aussi été utilisée : un peptide majeur S2E2S1P11a peut ainsi être séparé d'une impureté mineure 11b.

L'électrophorèse sur papier à haut voltage (\*) (à pH 1,7) permet de purifier le peptide S2E2S2P14 des nombreuses impuretés qui le souillent.

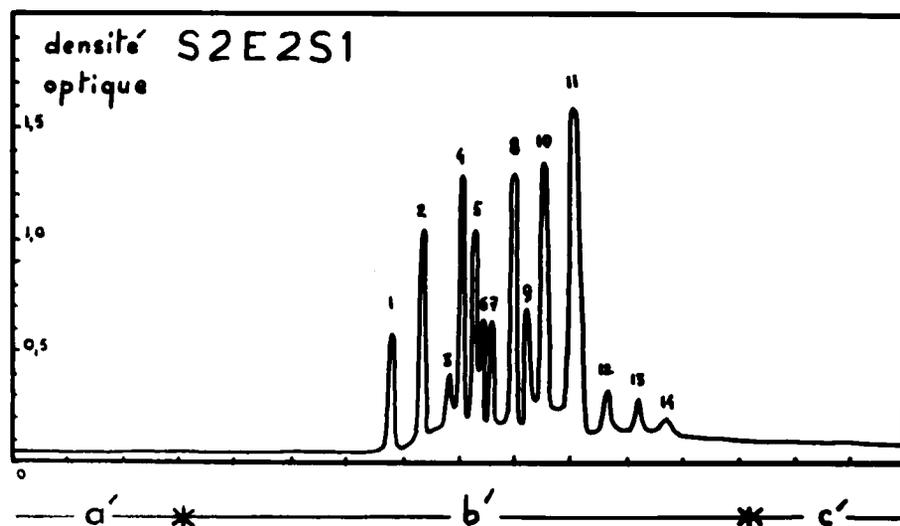
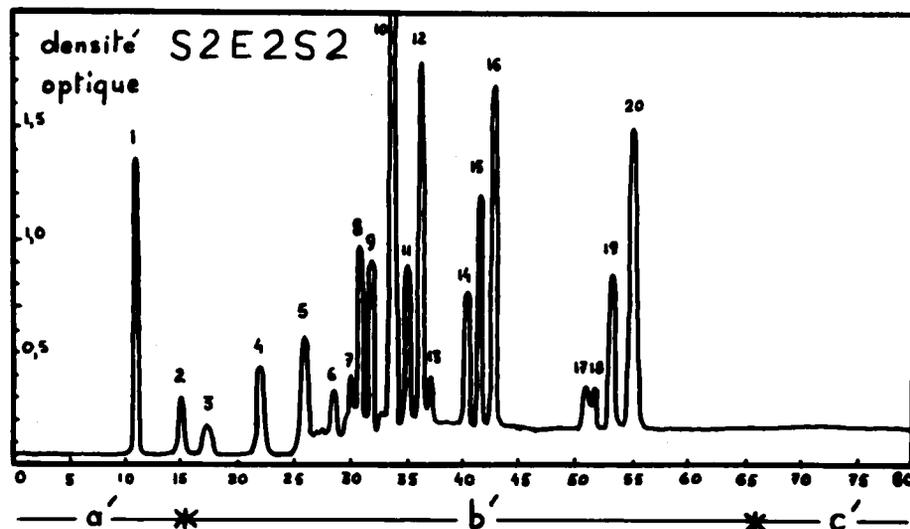
#### Fraction S2E1S2

Plusieurs gradients différents ont été utilisés pour l'élution des peptides de cette fraction, mais aucun d'eux ne permet à lui seul la résolution complète du mélange. Par couplage de trois d'entre eux, décrits à propos des figures 27, 28 et 29, il est cependant possible d'obtenir purs la plupart des peptides de cette fraction.

La comparaison de ces trois figures est intéressante, car elle montre d'une part l'évolution dans la séparation des peptides, d'autre part les inversions dans l'ordre d'élution de certains peptides d'un gradient à l'autre.

---

(\*) Appareil GILSON GME (voir Chapitre technique).



FIGURES 25 et 26

CHROMATOGRAPHIE SUR CHROMOBEADS P DES FRACTIONS S2E2S2 (Fig. 25)  
et S2E2S1 (Fig. 26)

Les conditions sont les mêmes que pour les figures 23 et 24.



FIGURES 27, 28 et 29

CHROMATOGRAPHIE SUR CHROMOBEADS P DE LA FRACTION S2E1S2 \*

Figure 27 : Particularités du gradient

a) Elution de la résine par un tampon pyridine 0,1 N-acide formique de pH 2,90 (17 heures).

b) Varigrad à 6 cellules : les cellules 1,2,3,4 contiennent chacune 200 ml du tampon précédent ; les cellules 5 et 6, chacune 200 ml de tampon pyridine 0,1 N-acide formique de pH 4,25.

c) Varigrad à 7 cellules : les cellules 1 et 2 contiennent chacune 200 ml du tampon précédent (de pH 4,25) ; les cellules 3,4 et 5, chacune 200 ml de tampon pyridine 1,0 N-acide formique de pH 5,0 ; les cellules 6 et 7 chacune 200 ml de tampon pyridine 2,0 N-acide acétique de pH 5,0.

Les deux Varigrad à 6 et 7 cellules, utilisés séparément et successivement pour l'élution de la résine, sont en fait deux appareils distincts à 9 cellules dont 6 ou 7 cellules selon le cas sont remplies de tampon (les 2 ou 3 autres restant vides).

Figure 28 : Particularités du gradient

a) Partie identique à la partie a du cas précédent mais la durée est portée à 20 heures.

b') Elution de la résine par un tampon pyridine 0,1 N-acide formique de pH 4,25 (30 heures).

c') Varigrad à 8 cellules (appareil à 9 cellules dont une inemployée) : les cellules 1, 2, 3, 4 contiennent chacune 200 ml du tampon précédent ; les cellules 5, 6 et 7 chacune 200 ml de tampon pyridine 0,5 N-acide formique de pH 5,0 ; la cellule 8, 200 ml de tampon pyridine 1,0 N-acide formique de pH 5,0.

d') Elution de la résine par le tampon pyridine 2,0 N-acide acétique de pH 5,0 (3 heures).

Figure 29 : Particularités du gradient

a) Zone identique à celle du cas précédent

b') Zone également identique à celle du cas précédent mais de durée réduite à 24 heures.

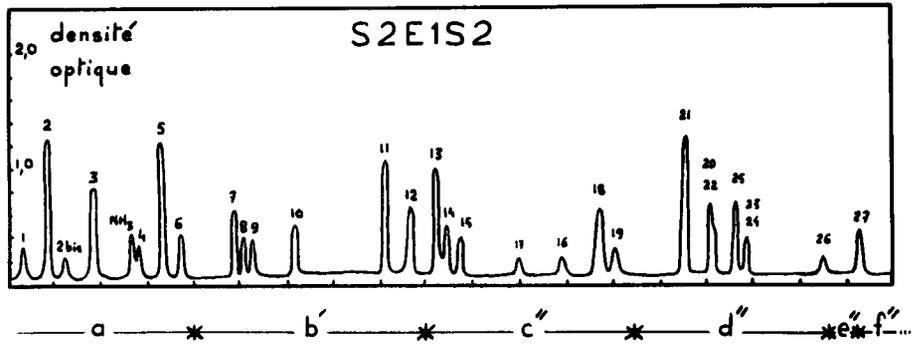
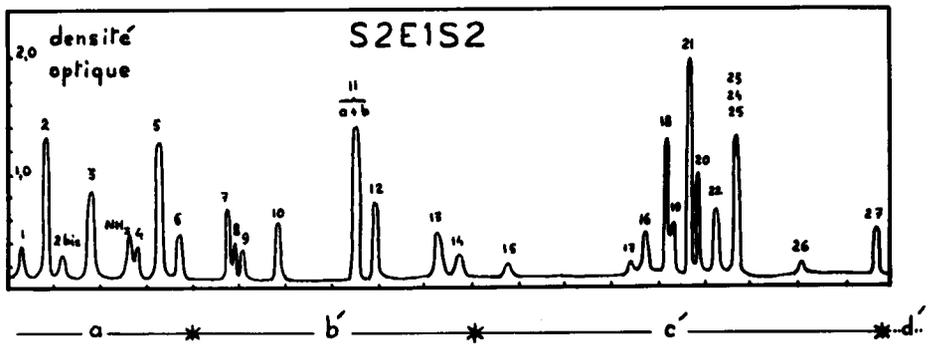
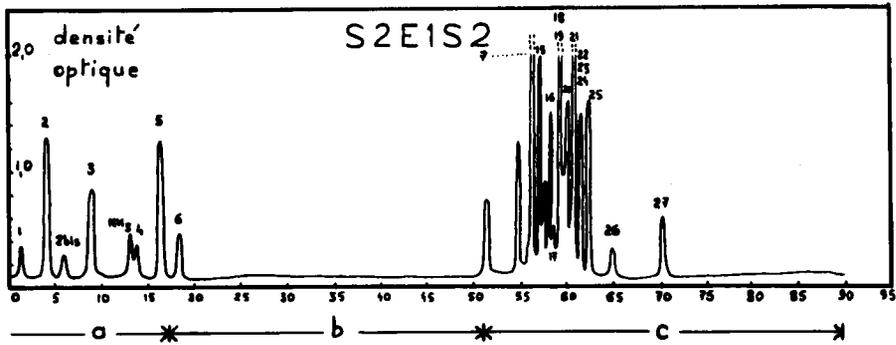
c'') Elution de la résine par un tampon pyridine 0,2 N-acide formique de pH 4,25 (22 heures)

d'') Varigrad à 4 cellules (appareil à 9 cellules dont 5 restent vides) : la cellule 1 contient 200 ml du tampon précédent ; la cellule 2, 200 ml de tampon pyridine 0,3 N-acide formique de pH 5,0 ; la cellule 3, 200 ml de tampon pyridine 0,4 N-acide formique de pH 5,0 ; la cellule 4, 200 ml de tampon pyridine 0,5 N-acide formique de pH 5,0.

e'') Elution de la résine par un tampon pyridine 1,0 N-acide formique de pH 5,0 (2 heures 30 minutes).

f'') Elution de la résine par un tampon pyridine 2,0 N-acide acétique de pH 5,0 (3 heures).

(\*) Colonne de 140 x 0,635 cm.



Le couplage de ces trois gradients est complété par l'utilisation de l'électrophorèse sur papier à pH 3,9 pour la séparation des peptides 23 et 24, et de la chromatographie de partage sur papier dans le solvant n-butanol-acide acétique-eau (4:1:5) pour séparer les deux constituants a et b des pics 3 et 11.

#### Fraction S2E1S1 (Figure 30)

La courbe d'élution de la fraction S2E1S1 permet de mettre en évidence 13 pics dont 2 nettement majeurs (P6 et P9). P6 contient deux constituants a et b séparés par chromatographie sur papier (6b étant d'ailleurs encore hétérogène).

#### F - CONCLUSION

Le couplage de ces différentes méthodes de fractionnement se montre très efficace. L'utilisation de procédés de plus en plus sélectifs aboutit en effet à une simplification progressive du mélange peptidique permettant un fractionnement chromatographique sur échangeur d'ions en un temps relativement court (70 à 90 heures). De plus, la quantité de matériau mise en oeuvre à chaque chromatographie peut être augmentée en fonction de la simplicité du mélange, ce qui permet de terminer plusieurs opérations par une étape chromatographique unique correspondant à une quantité initiale de protéine comprise entre 1 et 5 g selon les fractions.

Certes les tampons volatils utilisés n'ont pas la reproductibilité des tampons du type citrate de sodium, mais ils ont l'avantage d'être facilement éliminés lors de la lyophilisation. Les peptides peuvent donc être recueillis sans souillure minérale, ce qui facilite le contrôle électrochromatographique des pics isolés dans l'étape finale du fractionnement.

Les pics majeurs obtenus par chromatographie sur résine sont pour la plupart homogènes et peuvent être directement étudiés. Certains, hétérogènes, sont facilement purifiés par les techniques de chromatographie ou d'électrophorèse sur papier, comme nous l'avons vu précédemment à propos de chaque groupe de peptides.

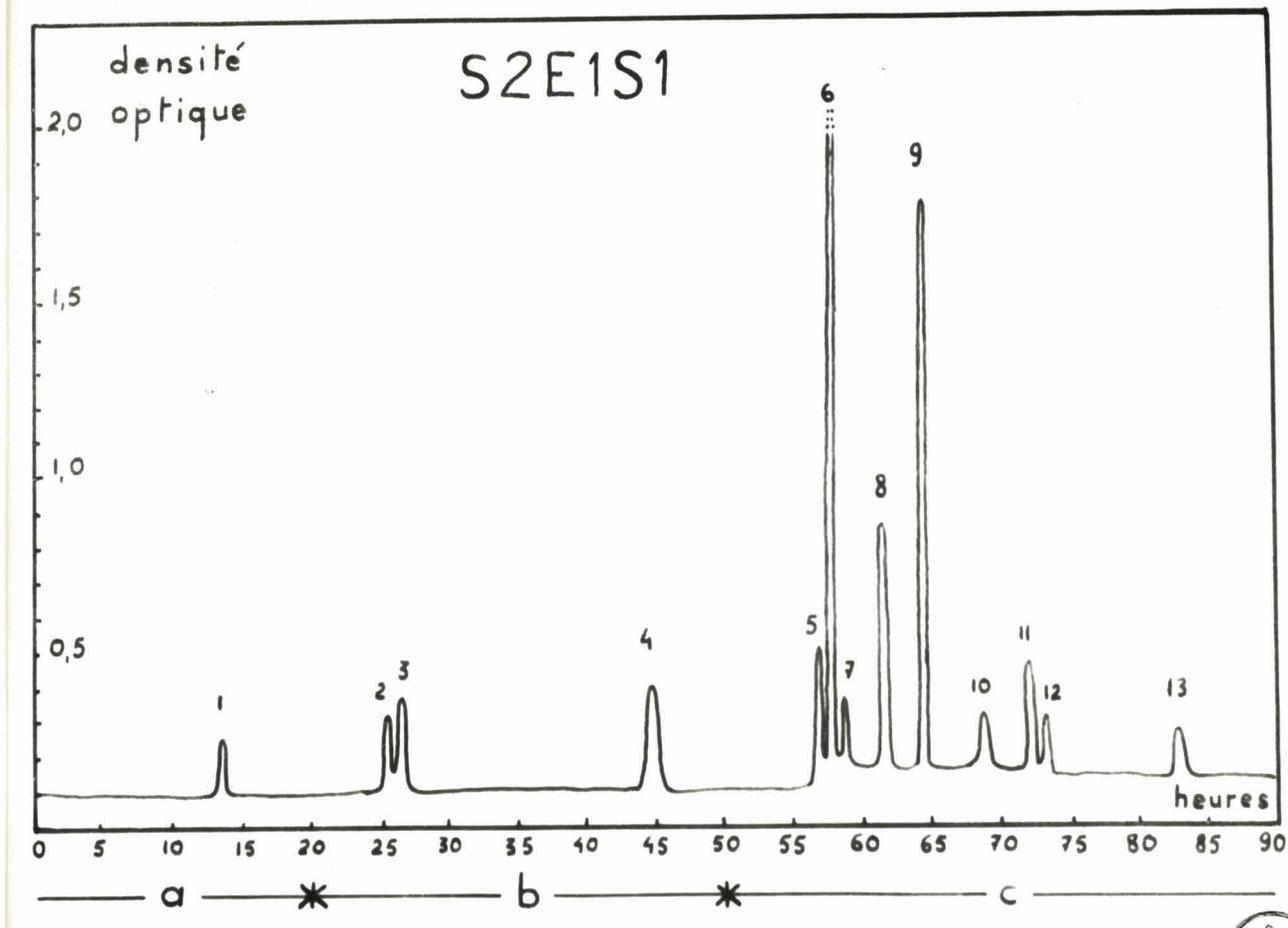


FIGURE 30

CHROMATOGRAPHIE SUR CHROMOBEADS P DE LA FRACTION S2E1S1  
(colonne de 140 x 0,635 cm)

#### PARTICULARITES DU GRADIENT

Zone a : Elution de la résine par le tampon pyridine 0,1 N-acide formique de pH 2,90 (20 heures).

Zone b : Elution de la résine par le tampon pyridine 0,1 N-acide formique de pH 4,25 (30 heures).

Zone c : Varigrad à 7 cellules (\*): les cellules 1 et 2 contiennent chacune 200 ml de tampon précédent ; les cellules 3 et 4, chacune 200 ml de tampon pyridine 0,5 N-acide formique de pH 5,0 ; les cellules 5 et 6 chacune 200 ml de tampon pyridine 1,0 N-acide formique de pH 5,0 ; la cellule 7 200 ml de tampon pyridine 2,0 N-acide acétique de pH 5,0.

(\* ) Il s'agit ici encore d'un appareil à 9 cellules dont 2 restent vides.

D'autres enfin n'ont pas été étudiés par suite soit d'une trop grande hétérogénéité, soit d'une trop faible concentration.

Les fractions mineures sont en fait des produits de coupures enzymatiques très secondaires et les renseignements que fourniraient l'étude de leur structure seraient loin d'être en rapport avec le travail exigé par leur purification.

Le tableau VIII résume le plan de fractionnement des hydrolysats chymotrypsiques de la globine de myoglobine de Cheval. Dans ce tableau les courbes sont schématisées et les fractions homologues hachurées de façon identique. Dans la nomenclature adoptée, les peptides sont désignés par leur fraction de gel-filtration (symbole S), leur mobilité électrophorétique (E) et leur numéro d'ordre dans le diagramme d'élution de la résine (symbole  $\Delta$  pour la Dowex 50W X 2, P pour la Chromobeads P), ces désignations se succédant dans l'ordre des opérations de fractionnement.

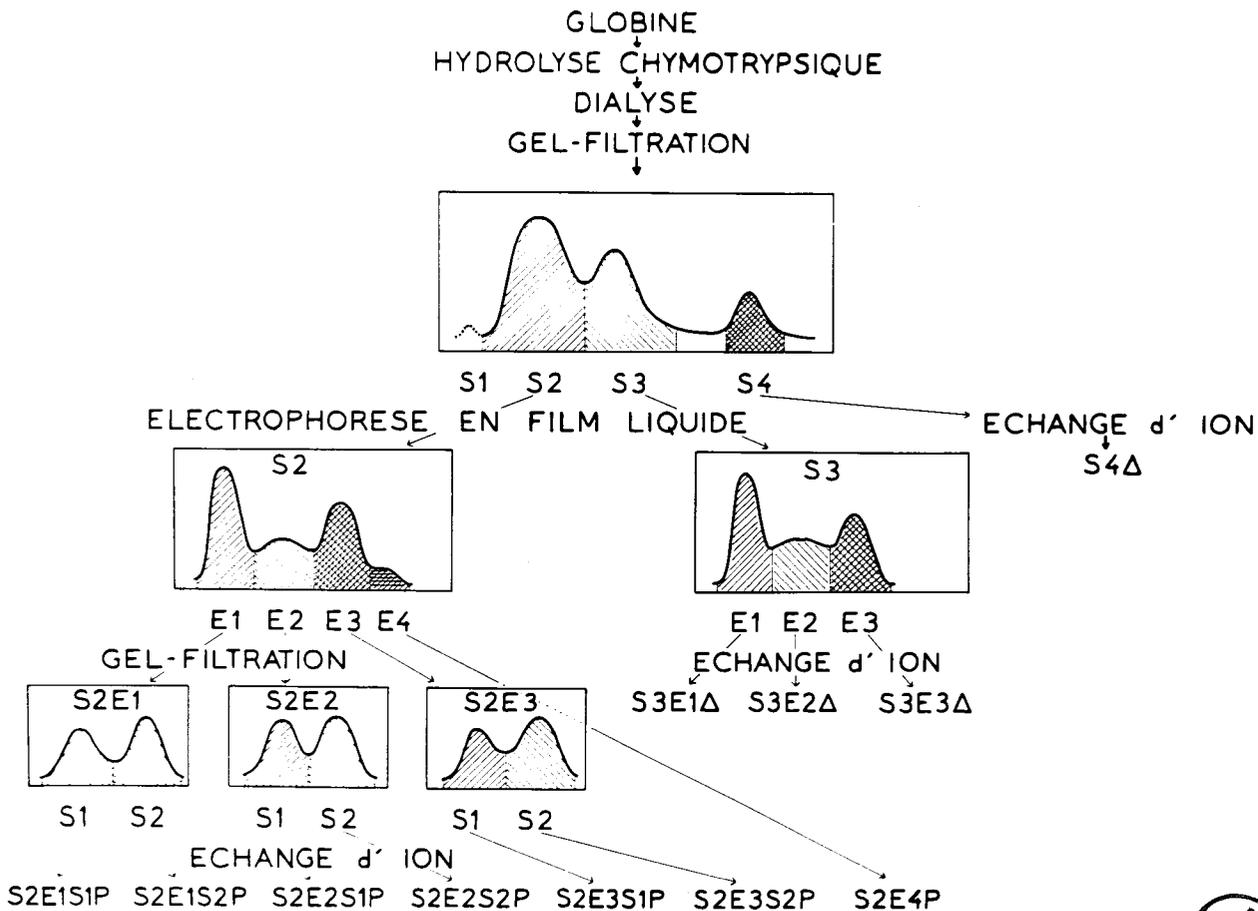
Dans le cas où un même pic correspond à plusieurs peptides, le numéro d'ordre est suivi des désignations bis, ter ou a, b, c. C'est ainsi notamment que sont distingués les peptides séparés par chromatographie ou électrophorèse sur papier.

Un même peptide peut se trouver présent dans deux fractions voisines de la gel-filtration ou de l'électrophorèse et avoir ainsi plusieurs désignations différentes. Ce genre de chevauchement est un inconvénient inhérent au plan de fractionnement utilisé. Il s'agit cependant d'un inconvénient mineur, car la réidentification d'un peptide déjà isolé et étudié exige un simple contrôle électrochromatographique suivi d'un contrôle qualitatif de la composition en acides aminés.

#### G - CAS PARTICULIER DE L'HYDROLYSE DE LA GLOBINE PAR LA CHYMOTRYPSINE TRAITÉE PAR LE TLCK.

Afin d'obtenir de chaque peptide de l'hydrolysate chymotrypsique une quantité suffisante pour les études structurales, nous avons hydrolysé environ 15 g de globine par la chymotrypsine commerciale.

Dans l'étude de l'action du TLCK sur l'activité de la chymotryp-



TABEAU VIII

PLAN DE FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS CHYMOTRYPSIQUES  
 DE LA GLOBINE.

FIGURES 31, 32 et 33

CHROMATOGRAPHIE SUR CHROMOBEADS P DES FRACTIONS S2E3 (Fig. 31)  
S2E2 (Fig. 32) et S2E1 (Fig. 33) DE L'HYDROLYSE DE LA GLOBINE  
PAR LA CHYMOTRYPSINE TRAITÉE PAR LE TLCK

Colonne de 140 x 0,635 cm.

L'échelle est la même pour les trois figures.

Les peptides nouveaux apparus sur chacun de ces trois diagrammes  
ont leur numéro d'ordre souligné d'un trait.

Figure 31 : Particularités du gradient

a) Varigrad à 9 cellules : les cellules 1 et 2 contiennent chacune  
200 ml de tampon pyridine 0,1 N - acide formique, de pH 4,25 ; les  
cellules 3, 4 et 5 chacune 200 ml de tampon pyridine 0,5 N - acide  
formique de pH 5,0 ; les cellules 6, 7 et 8 chacune 200 ml de tampon  
pyridine 1,0 N - acide formique de pH 5,0 ; la cellule 9, 200 ml de  
tampon pyridine 2,0 N - acide acétique de pH 5,0.

b) Elution de la résine par ce dernier tampon (5 heures)

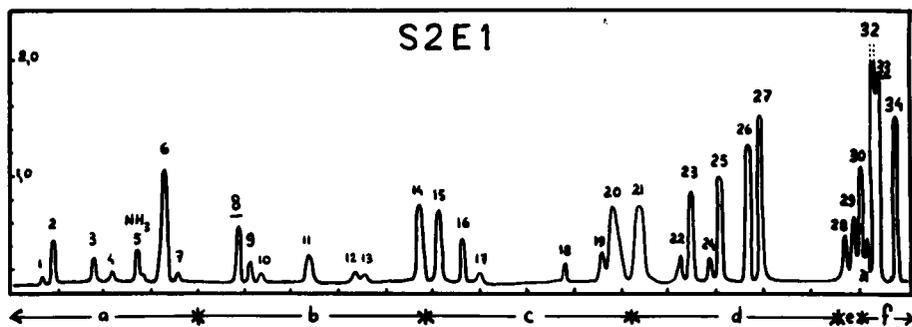
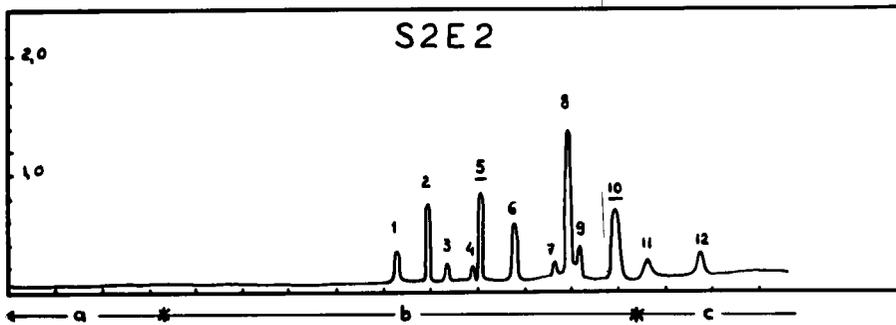
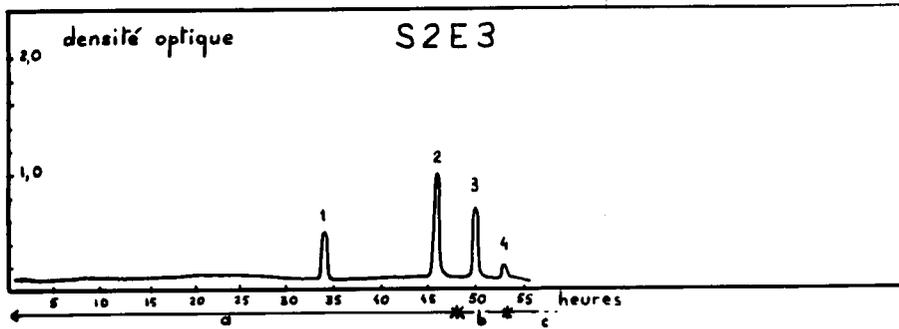
c) Elution de la résine par un tampon pyridine 2,0 N - acide acétique  
de pH 6,5 (2 heures).

Figure 32 :

Le gradient utilisé est celui décrit à propos de la figure 19.

Figure 33 :

Le gradient utilisé est celui décrit à propos de la figure 29.



sine commerciale, nous avons hydrolysé par l'enzyme traité une quantité beaucoup plus faible de protéine, soit 500 mg. C'est pourquoi nous avons légèrement modifié le protocole de fractionnement précédemment décrit pour mieux l'adapter aux quantités plus faibles de peptides à séparer : la fraction S2 de cet hydrolysate (environ 250 mg) donne, par électrophorèse préparative en film liquide, trois groupes S2E1, S2E2 et S2E3 (\*) directement chromatographiés sur Chromobeads P. Les figures 31, 32 et 33 donnent le résultat de cette opération pour chacun des trois groupes.

La plupart des peptides ainsi séparés ont été simplement réidentifiés (\*\*\*) aux peptides déjà étudiés dans les hydrolysats antérieurs. Un certain nombre de peptides nouveaux apparaissent cependant sur les diagrammes ; leur structure a été déterminée : ils correspondent à des séquences moins dégradées par l'enzyme traité que par l'enzyme brut.

---

(\*) Le groupe S2E4 a disparu.

(\*\*\*) par électrochromatographie sur papier suivi d'un contrôle qualitatif de la composition en amino-acides (également par électrochromatographie sur papier).

CHAPITRE V

SEQUENCE DES PEPTIDES "CHYMOTRYPSIQUES"

La séquence des peptides, séparés et purifiés par le couplage des différents procédés de fractionnement décrits au chapitre précédent, a été déterminée par l'utilisation des techniques classiques d'étude des chaînes peptidiques.

La composition en amino-acides est établie sur une certaine quantité du peptide (\*) après hydrolyse totale par l'acide chlorhydrique, par dosage automatique à l'autoanalyseur Technicon. Quand cette détermination révèle la présence d'acides aminés dicarboxyliques ainsi que dans le cas d'un peptide donnant une réaction d'Ehrlich positive, une hydrolyse totale par la leucine aminopeptidase est également effectuée. Le dosage des amino-acides libérés permet alors la mise en évidence de l'asparagine et de la glutamine ou du tryptophane. Dans certains cas simples, ces amino-acides sont identifiés par couplage des techniques d'électrophorèse et de chromatographie sur papier (\*\*).

L'acide aminé N-terminal est identifié par application soit de la méthode classique des DNP-amino-acides de SANGER (110), soit de la micro-méthode plus récente des DANSYL-amino-acides de GRAY et HARTLEY (111).

Dans le cas de la méthode des DNP-amino-acides, nous avons utilisé deux techniques différentes : le plus généralement celle à la triméthylamine et aussi celle au bicarbonate de sodium (technique originale de SANGER) pour les peptides à amino-acides aromatiques ou basiques, dont la forme dinitrophénylée, très hydrophobe, risque, en milieu peu ionisé, d'être extraite par l'éther en même temps que l'excès de réactif (voir Chapitre technique).

La séquence N-terminale est déterminée, soit par établissement de la cinétique d'hydrolyse du peptide par la leucine aminopeptidase (avec dosage automatique des amino-acides libérés), soit par la méthode des

---

(\*) La quantité du peptide qui sera soumise à l'hydrolyse est déterminée approximativement d'après l'intensité de la tache ninhydrine positive obtenue lors du contrôle de pureté en électrochromatographie sur papier.

(\*\*) Par analyse automatique des acides aminés, nous ne pouvons distinguer l'asparagine de la glutamine ; l'identification définitive de l'amide est réalisée sur ces hydrolysats par dosage des acides aminés dicarboxyliques : la différence du taux de l'un et de l'autre de ces acides aminés observée selon le type d'hydrolyse indique alors la part prise par chacun d'eux dans le pic d'amide. Il est à noter également que les dosages d'acides aminés réalisés sur les hydrolysats partiels ou "totaux" par la leucine aminopeptidase sont parfois entachés d'erreur du fait de la présence de peptides résiduels dont les pics d'élution chevauchent souvent ceux des amino-acides.

phénylthiohydantoïnes d'EDMAN (112). Dans ce dernier cas, nous n'avons pas réalisé l'identification systématique des PTH-amino-acides : une fois le résidu N-terminal détaché, le nouvel acide aminé N-terminal est identifié par la méthode des DANSYL-amino-acides.

La séquence C-terminale est établie par l'étude cinétique de l'hydrolyse du peptide par les carboxypeptidases A et B. Dans les cas simples, les amino-acides libérés sont identifiés par les méthodes d'électrochromatographie sur papier. Dans tous les autres cas, ils sont dosés à l'autoanalyseur Technicon, notamment lorsque le peptide contient à la fois de la leucine et de l'isoleucine.

L'acide-amino C-terminal a parfois été identifié par la technique d'hydrazinolyse. Lorsque l'action de la carboxypeptidase est bloquée par la présence de proline ou d'acide glutamique, l'hydrazinolyse a également été employée consécutivement à l'hydrolyse enzymatique par les carboxypeptidases A ou B.

Toutes ces méthodes sont exposées du point de vue expérimental dans le Chapitre VII.

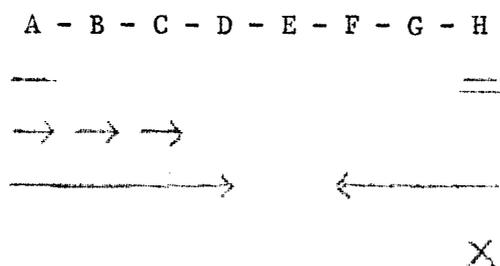
Pour l'exposé des résultats, nous avons découpé la molécule de globine en segments principaux correspondant aux points de coupure majeurs de l'enzyme. Chaque segment contient un ou plusieurs peptides "chymotrypsiques". Pour chaque peptide, un schéma résume la structure ainsi que les différentes techniques utilisées pour la déterminer (Tableau IX).

La numérotation des résidus d'acides aminés a été effectuée par comparaison des séquences obtenues au cours de cette étude avec les séquences correspondantes de la myoglobine de Cachalot ; une étude menée parallèlement, à l'aide des coupures chimiques ou trypsiques, nous permettra en fin de chapitre de discuter la position relative des différents segments étudiés.

TABLEAU IX

PRESENTATION DE LA STRUCTURE D'UN PEPTIDE

PEPTIDE :



A, B, ....., H... : résidus d'acides-amino

— : DNP- ou DANSYL-acide-amino terminal

→ → → : Acides-amino identifiés par la dégradation récurrente d'EDMAN

————→ : Séquence déterminée par étude cinétique de l'action de la leucine-aminopeptidase

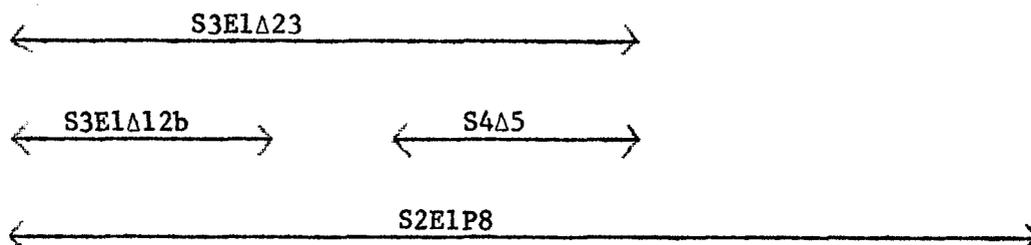
== : Résidu identifié par hydrazinolyse

←———— : Séquence déduite de l'action des carboxypeptidases A et B

X : Acide aminé dont la présence en position C-terminale résulte d'une spécificité majeure de la chymotrypsine.

1) SEQUENCE 1 - 11

Gly - Leu - Ser - Asp - Gly - Glu - Trp - Gln - Gln - Val - Leu  
 1      2      3      4      5      6      7      8      9      10     11



La liaison Trp - Gln est coupée à 100 p. 100 dans les hydrolysats chymotrypsiques de 24 heures. Le peptide S2E1P8 a été isolé à partir d'un hydrolysat de 6 heures.

a) Peptide S3E1<sup>Δ</sup>12b : Séquence 1 - 3

Gly - Leu - Ser

—                      ←

Composition :

Ser	,	Gly	,	Leu
0,82		1,19		0,99

DNP-amino-acide terminal : DNP-Gly

Action de la carboxypeptidase A à 37°C :

Au bout de 4 heures la sérine est libérée (identification par électrochromatographie sur papier).

b) Peptide S4<sup>Δ</sup>5 : Séquence 5 - 7

Gly - Glu - Trp

—                      X

Ce peptide donne une réaction d'Ehrlich positive.

Composition :

Glu	,	Gly	,	Trp
0,99		1,01		détruit

DNP-amino-acide terminal : DNP-GlyAction de la leucine aminopeptidase à 37°C :

En 24 heures les trois amino-acides constitutifs sont libérés dans les rapports molaires suivants :

Glu	,	Gly	,	Trp
1,04		1,16		0,80

Etant donné la spécificité primaire de la chymotrypsine, le tryptophane occupe la position C-terminale. Le peptide S4Δ5 est obligatoirement un fragment de S3E1Δ23, car il n'existe que deux résidus de tryptophane dans la globine. L'autre séquence à tryptophane (S4Δ7) est nettement différente (voir plus loin).

c) Peptide S3E1Δ23 : séquence 1 - 7

Gly	-	Leu	-	Ser	-	Asp	-	Gly	-	Glu	-	Trp
1												7

—

—————→

X

Ce peptide donne une réaction d'Ehrlich positive.

Composition :

Asp	,	Ser	,	Glu	,	Gly	,	Leu	,	Trp
0,93		0,77		1,17		1,97		0,99		détruit

DNP-amino-acide terminal : DNP-GlyAction de la leucine aminopeptidase à 37°C :

En 15 minutes sont libérés le glycolle (1 mole), la leucine (1 mole) et la sérine (0,9 mole) (\*).

---

(\*) Les résultats de l'action des exopeptidases sont toujours exprimés en moles d'acide aminé libéré par molécule de peptide.

En 24 heures tous les acides aminés constitutifs sont libérés dans les rapports molaires suivants :

Asp	,	Ser	,	Glu	,	Gly	,	Leu	,	Trp
0,78		0,86		0,95		1,61		1,08		0,87

La séquence complète du peptide est déduite de ces résultats et de la structure des deux produits de coupure secondaire S3E1 $\Delta$ 12b et S4 $\Delta$ 5.

d) Peptide S2E1P8 : séquence 1 - 11

Gly	-	Leu	-	Ser	-	Asp	-	Gly	-	Glu	-	Trp	-	Gln	-	Gln	-	Val	-	Leu	
1												7		8							11



Ce peptide a été isolé d'un hydrolysats obtenu par la chymotrypsine TLCK en 6 heures. Il donne la réaction d'Ehrlich.

Composition :

Asp	,	Ser	,	Glu	,	Gly	,	Val	,	Leu	,	Trp
1,05		0,99		2,87		2,02		1,04		2,01		détruit

Dansyl-amino-acide terminal : DANSYL-Gly

Action de la leucine aminopeptidase à 37°C :

En 24 heures les acides aminés constitutifs sont libérés dans les rapports molaires suivants :

Asp	,	Ser	,	Gln	,	Glu	,	Gly	,	Val	,	Leu	,	Trp
1,02		0,79		1,93		1,47		1,96		0,90		2,33		0,58

Action de la carboxypeptidase à 37°C :

L'enzyme libère très rapidement (15 minutes) des quantités équimolaires de leucine et de valine ; puis en 30 minutes et 1 heure la glutamine est libérée (identification par chromatographie sur papier).

Hydrazinolyse :

Après action de l'hydrazine, on peut identifier de la leucine qui est donc en position C-terminale.

L'ensemble des résultats permet d'établir la séquence : ce peptide contient en effet l'un des deux résidus de tryptophane qui est commun à S4Δ5 et à S3E1Δ23. L'existence d'une liaison Trp - Glu ou Trp - Gln, démontrée par l'action de la N-bromosuccinimide sur la globine, confirme également la séquence (112 bis).

Remarque : Si on admet un taux de coupure de 100 p.100 pour les spécificités majeures de l'enzyme, on obtient pour la liaison 3-4 et pour la liaison 4-5 un taux de coupure de 15 p. 100.

2) SEQUENCE 12-14

Asn - Val - Trp
12     13     14

Peptide S4Δ7 :

Asn - Val - Trp

—                    X

Réaction d'Ehrlich positive : il s'agit donc du deuxième peptide à tryptophane.

Composition :

Asp	,	Val	,	Trp
1,00		0,99		détruit

DNP-amino-acide terminal : DNP-Asp

Action de la leucine-aminopeptidase à 37°C :

En 24 heures les acides aminés constitutifs sont libérés dans les rapports molaires suivants :

Asn	,	Val	,	Trp
1,15		1,06		0,78

Le tryptophane occupe la position C-terminale en raison de la spécificité primaire de la chymotrypsine.



respectivement de 0,20 mole ; 0,17 mole ; 0,15 mole ; 0,15 mole ; 0,15 mole. Ces résultats sont en faveur d'une séquence Gly - Lys - Val - Glu - Ala, séquence confirmée par l'étude de l'hydrolysats trypsique du fragment N-terminal de la globine obtenu par coupure par le bromure de cyanogène (DAUTREVAUX, HAN, Y. BOULANGER et BISERTE) (113). Le peptide T2 Asn - Val - Trp - Gly - Lys de cet hydrolysats contient en effet l'unique séquence Gly - Lys de la molécule, séquence qui appartient également aux peptides S2E1S2P15 et S2E1S1P6a. D'autre part la séquence partielle du peptide T3 de ce même hydrolysats trypsique, Val-(Glu, Ala, Glu, Val, Ala, Gly, His, Gly, Gln, Asp, Ile)-Leu-Ile-Arg achève de démontrer la séquence Gly - Lys - Val - Glu - Ala en même temps qu'elle recoupe celle du peptide S2E1S1P6a (voir ci-dessous) .

b) Peptide S2E1S1P6a : séquence 15-29

Gly-Lys-Val-Glu-Ala-(Glu, Val, Ala, Gly, His, Gly, Gln, Asp, Ile)-Leu  
 15 29

----- ←

Composition :

Asp	,	Glu	,	Gly	,	Ala	,	Val	,	Ile	,	Leu	,	Lys	,	His
1,03		3,03		2,88		2,10		2,04		0,99		1,00		1,03		0,86

Action de la leucine-aminopeptidase à 37°C :

En 24 heures les amino-acides constitutifs sont libérés dans les rapports molaires suivants :

Asp	,	Gln	,	Glu	,	Gly	,	Ala	,	Val	,	Ile	,	Leu	,	Lys	,	His
0,92		0,86		2,08		2,78		2,18		2,15		1,09		1,15		0,92		0,84

DANSYL-amino-acide terminal : DANSYL-Gly

Action de la carboxypeptidase A à 37°C :

Au bout de 24 heures d'action de la carboxypeptidase A, seule la leucine C-terminale est libérée (0,94 mole).

c) Peptide S2E1S1P2 : séquence 20-29

Glu -(Val, Ala, Gly, His, Gly, Gln, Asp, Ile)-Leu  
 20 29

Composition :

Asp	,	Glu	,	Gly	,	Ala	,	Val	,	Ile	,	Leu	,	His
1,01		2,08		2,03		1,15		0,97		0,93		0,95		0,87

Remarque : Le résidu de glutamine du peptide S2E1S1P6a appartient également au peptide S2E1S1P2 puisque le peptide S2E1S2P15 n'en contient pas.

DNP-amino-acide terminal : DNP-Glu

Action de la leucine-aminopeptidase à 37°C :

En 4 heures les amino-acides sont libérés dans les rapports molaires suivants :

Asp	,	Gln	,	Glu	,	Gly	,	Ala	,	Val	,	Ile	,	Leu	,	His
1,04		0,54		1,07		2,05		1,19		1,07		1,07		1,07		0,91

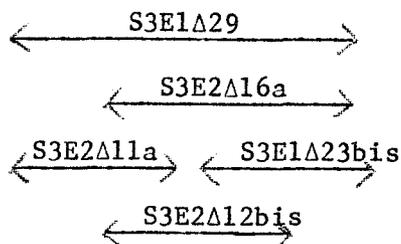
Ces résultats confirment ceux de l'étude du peptide S2E1S1P6a

L'étude de la séquence complète des peptides S2E1S1P2 et S2E1S1P6a est actuellement en cours.

Remarque : La liaison Ala - Glu est coupée à 60 p. 100.  
 19 20

4) SEQUENCE 30-33

Ile - Arg - Leu - Phe  
 30 31 32 33



a) Peptide S3E1Δ29 ou S3E2Δ16b : séquence 30-33

Ile - Arg - Leu - Phe

Composition :

Ile , Leu , Phe , Arg  
0,87    1,11    1,17    0,84

DNP-amino-acide terminal : DNP-Ile ou DNP-LeuAction de la carboxypeptidase A à 37°C :

Au bout de 4 heures, 1 mole de leucine et 1 mole de phénylalanine sont libérées (identification et dosage à l'autoanalyseur Technicon).

La séquence de ce peptide est d'ailleurs confirmée par l'existence d'une liaison Arg-Leu, mise en évidence par hydrolyse trypsique de la globine acétylée (118 119) et par l'examen de ces produits de coupure secondaire, dont la structure est déduite des résultats rassemblés dans le tableau suivant.

b) Tableau :

Peptide	Résidus	Acides aminés				DNP-amino-acide terminal
		Ile	Leu	Phe	Arg	
S3E1Δ16a	31-33		1,14	1,03	0,82	-
S3E2Δ11a	30-31	0,99			1,01	DNP-Ile
S3E2Δ12bis	31-32		1,19		0,81	-
S3E1Δ23bis	32-33		0,98	1,02		DNP-Leu



Hydrazinolyse :

Après 6 heures d'action de la carboxypeptidase A à 37°C, le peptide est soumis à l'action de l'hydrazine : la thréonine est identifiée dans l'hydrolysat par électrochromatographie sur papier.

b) Peptide S3E1Δ25 ou S3E2Δ4a : séquence 41-43

Glu - Lys - Phe

— X

Composition :

Glu	,	Phe	,	Lys
1,02		0,97		1,01

DNP-amino-acide terminal : DNP-Glu

Action de la leucine-aminopeptidase à 37°C :

En 24 heures les trois amino-acides constitutifs (Glu, Phe, Lys) sont libérés et identifiés par électrochromatographie sur papier.

La phénylalanine occupe la position C-terminale, étant donnée la spécificité primaire de la chymotrypsine.

c) Peptide S2E1S1P9 ou S2E2S1P2 : séquence 34-43

Thr - Gly - His - Pro - Glu - Thr - Leu - Glu - Lys - Phe

—

→ → → → ←

Composition :

Thr	,	Glu	,	Pro	,	Gly	,	Leu	,	Phe	,	Lys	,	His
1,85		2,08		1,23		1,11		1,13		0,90		0,83		0,77

DANSYL-amino-acide terminal : DANSYL-Thr

Action des carboxypeptidases A et B à 37°C :

L'action successive des carboxypeptidases A et B permet de

libérer la phénylalanine (en 4 heures) puis la lysine (en 8 heures) en quantités équivalentes ainsi que la leucine et l'acide glutamique en quantité nettement plus faible. Au bout de 24 heures d'action du mélange des carboxypeptidases A + B, ces quatre amino-acides sont libérés en quantités sensiblement égales.

Dégradation récurrente d'EDMAN :

Après la première étape, le nouvel amino-acide N-terminal est le glycocolle (méthode des DANSYL)

Après la deuxième et la troisième étape on trouve respectivement l'histidine et la proline.

La séquence du peptide est déduite de ces résultats ainsi que de l'étude de ses deux produits de coupure secondaire (S2E1S2P13 et S3E1Δ25).

Remarques :

- 1) Si l'on admet un taux de coupure de 100 p. 100 pour les liaisons aromatiques de la zone 34-43 il est possible de calculer le taux de coupure correspondant à la liaison 40-41 : cette liaison Leu - Glu est coupée à un taux de 70 p. 100 environ.
- 2) Il reste une ambiguïté à propos du résidu d'acide glutamique en position 38 : l'action de la leucine-aminopeptidase ne permet pas en effet de préciser si ce résidu est sous forme acide ou amide, car le résidu de proline 37 empêche l'hydrolyse totale du peptide par l'enzyme. Ce genre de blocage a été constaté pour d'autres peptides à proline (voir plus loin). Cependant, dans le cas présent la mobilité électrophorétique à pH 3,9 est celle d'un peptide "neutre". Il existe un résidu d'histidine (en position 36) et un résidu de lysine (en position 42), mais les deux résidus d'acide glutamique (positions 38 et 41) neutralisent le caractère basique.

Un autre argument en faveur de la présence de l'acide glutamique est l'impossibilité de détacher la thréonine 39 par la carboxypeptidase A, même en prolongeant l'action enzymatique pendant 48 heures. Un blocage

identique de l'action de la carboxypeptidase A par l'acide glutamique a été constaté à propos du peptide S2E1S2P15 (voir ci-dessus) ainsi que d'autres peptides (voir page 115).

6) SEQUENCE 44-46

Asp - Lys - Phe  
44 45 46

Peptide S3E1Δ24

Asp - Lys - Phe

— X

Composition :

Asp , Phe , Lys  
0,94 0,98 1,08

DNP-amino-acide terminal : DNP-Asp

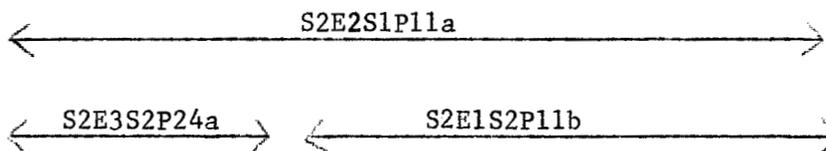
Action de la leucine-aminopeptidase à 37°C :

En 24 heures, l'acide aspartique, la phénylalanine et la lysine sont libérés et identifiés par électrochromatographie sur papier.

La phénylalanine est en position C-terminale en raison de la spécificité primaire de la chymotrypsine.

7) SEQUENCE 47-55

Lys - His - Leu - Lys - Thr - Glu - Ala - Glu - Met  
47 48 49 50 51 52 53 54 55



a) Peptide S2E3S2P24a ou S3E3Δ21 : séquence 47-49

Lys - His - Leu

— ←

Composition :

Leu , Lys , His  
1,07 0,98 0,95

DNP-amino-acide terminal : di-DNP-Lys

Action de la carboxypeptidase A à 37°C :

En 8 heures la leucine est libérée et identifiée par électrochromatographie sur papier.

b) Peptide S2E1S2P11b : résidus 50-55

Lys - Thr - Glu - Ala - Glu - Met

— X

Composition :

Thr , Glu , Ala , Met , Lys  
0,94 2,11 1,09 0,92 0,92

DANSYL-amino-acide terminal : di-DANSYL-Lys

La séquence de ce peptide est démontrée par l'étude d'un peptide Thr - Glu - Ala - Glu - Hse,\* isolé des hydrolysats trypsiques du fragment N-terminal de la globine obtenu par coupure de la myoglobine par le bromure de cyanogène (DAUTREVAUX, HAN, Y. BOULANGER et BISERTE) (114)

c) Peptide S2E2S1P11a ou S2E3S1P10 : séquence 47-55

Lys - His - Leu - Lys - Thr - Glu - Ala - Glu - Met  
47 49 50 55

— ←

Composition :

Thr , Glu , Ala , Met , Leu , Lys , His  
0,93 1,84 1,12 0,87 1,03 2,13 1,09

---

(\* ) Hse = Homosérine.

DNP-amino-acide terminal : di-DNP-Lys

Action de la leucine-aminopeptidase à 37°C :

Par électrochromatographie sur papier on identifie, dans l'hydrolysate de 24 heures, l'acide glutamique. Il n'y a pas de glutamine.

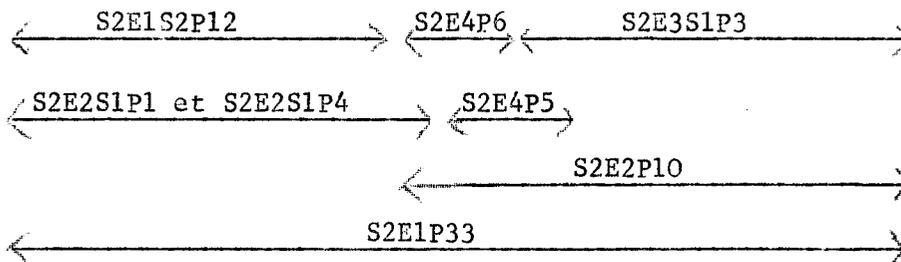
Action de la carboxypeptidase A à 37°C :

Au bout de 8 heures, l'enzyme libère la méthionine (1 mole) et l'acide glutamique (0,40 mole). Au bout de 24 heures d'action, on obtient 0,95 mole d'acide glutamique pour 1 mole de méthionine. La séquence du peptide est déduite de ces résultats ainsi que de l'étude des peptides S2E3S2P24 et S2E1S2P11b (voir pages 81 et 82).

Remarque : Le taux de coupure de la liaison Leu - Lys est de 84 p. 100 par rapport aux coupures primaires de l'enzyme.  
49 50

8) SEQUENCE 56-69

Lys-Ala-Ser-Glu-Asp-Leu-Lys-Lys-His-Gly-Thr-Val-Val-Leu  
56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69



a) Peptide S2E2S1P1 ou S2E3S1P2 : séquence 56-62

Lys - Ala - Ser - Glu - Asp - Leu - Lys  
56 61 62





comparable à celle observée pour le peptide précédent. Il faut cependant noter que l'hydrolyse semble moins complète, les quantités libérées de leucine et d'acide aspartique restant même en 24 heures nettement inférieures à celles des autres amino-acides.

L'hydrolysats enzymatique contient les acides aspartique et glutamique et non leurs amides.

Action des carboxypeptidases B et A à 37°C :

L'action successive des carboxypeptidases B et A permet la libération de lysine puis de leucine (identification sur papier).

Les résultats sont donc en faveur de la même séquence que pour le peptide précédent. Or, ces deux peptides ont des migrations nettement différentes en électrophorèse à haut voltage (\*).

Dans l'état actuel de nos recherches, il ne nous est pas possible d'expliquer la présence de ces deux peptides apparemment identiques du point de vue de leur séquence, mais néanmoins bien distincts par leurs caractéristiques ioniques (mobilité électrophorétique et temps de rétention sur la résine Chromobeads P). L'un de ces deux peptides résulte peut-être de la transposition en  $\beta$  de la liaison Asp-Leu comme cela a déjà été signalé par HALEY et al. (115) dans les hydrolysats enzymatiques de diverses protéines et notamment dans le cas de la ribonucléase (HALEY et CORCORAN) (116).

Les études effectuées récemment par JORNVALL (117) sur les trois composants de la myoglobine de Cheval isolés par ÅKESON et THEORELL (voir Chapitre I) semblent indiquer que l'un des trois contient un groupement acétyle par molécule. Il serait alors possible d'envisager que l'un des deux peptides (S2E2S1P1 ou S2E2S1P4) porte un groupement acétyle sur la fonction  $\epsilon$ -aminée de la lysine C-terminale. Des études sont actuellement en cours pour vérifier ou infirmer ces différentes hypothèses.

---

(\*) 5000 volts - 250 mA - 15 minutes à pH 1,7 (voir Chapitre VII).





g) Peptide S2E4P5 ou S2E3S2P20 ou S3E3A19 : séquence 63-64

Lys - His

Composition :

Lys	,	His
1,03		0,96

DNP-amino-acide terminal : di-DNP-Lys

Il existe trois autres séquences Lys - His dans la molécule : résidus 47-48, résidus 96-97 et résidus 118-119. Le peptide S2E4P5 provient vraisemblablement de trois de ces quatre séquences 47-48, 63-64, et 96-97 ; la troisième, 118-119, précède en effet un résidu de proline à 120° ce qui exclut une rupture chymotrypsique de la liaison His - Pro (voir plus loin résidus 116-123).

119 120

h) Peptide S2E4P6 ou S2E3S2P21 : séquence 62-63 (\*)

Lys - Lys

Composition :

L'hydrolyse totale donne exclusivement de la lysine. Ce peptide a un temps de rétention sur la Chromobeads P très supérieur à celui de la lysine libre. En électrophorèse sur papier à pH 3,9 il migre plus rapidement que la lysine libre.

Dinitrophénylation :

Le peptide est dinitrophénylé puis hydrolysé par l'acide chlorhydrique (24 heures à 105°C). L'hydrolysate est extrait à l'éther et la phase étherée soumise à la chromatographie classique des DNP-amino-acides (voir Chapitre VII). La phase aqueuse est redinitrophénylée et soumise à cette même chromatographie. Dans ces conditions, on identifie la di-DNP-lysine dans les deux phases (phase étherée et phase aqueuse

---

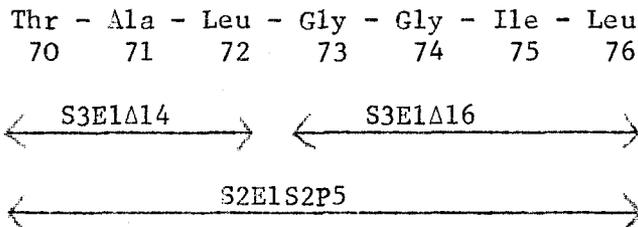
(\*) Ce peptide provient également de la séquence 77-79 (voir page 91).



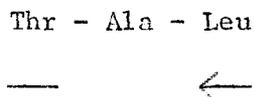
gel d'amidon puisque notre étude a été effectuée sur la préparation globale (voir microhétérogénéité de la myoglobine, Chapitre II).

La récupération de ce peptide représente au maximum le dixième de celle du peptide S2E2P10 : la séquence Lys - Lys - His est donc prédominante, tandis que la séquence Lys - Leu - His est mineure.

9) SEQUENCE 70-76



a) Peptide S3E1Δ14 ou S2E1S2P4 : séquence 70-72



Composition :

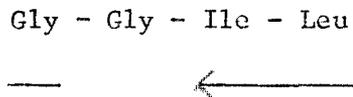
Thr	,	Ala	,	Leu
1,03		0,94		1,06

DNP-amino-acide terminal : DNP-Thr

Action de la carboxypeptidase A à 37°C :

En 4 heures seule la leucine est libérée et identifiée par électrochromatographie sur papier.

b) Peptide S3E1Δ16 ou S2E1S2P6 : séquence 73-76



Composition :

Gly	,	Ile	,	Leu
2,01		0,92		1,07

DNP-amino-acide terminal : DNP-Gly

Action de la carboxypeptidase A à 37°C :

En 4 heures sont libérées la leucine (1 mole) et l'isoleucine (0,27 mole). En 8 heures on obtient 0,58 mole d'isoleucine pour 1 mole de leucine.

c) Peptide S2E1S2P5 : séquence 70-76

Thr - Ala - Leu - Gly - Gly - Ile - Leu

Composition :

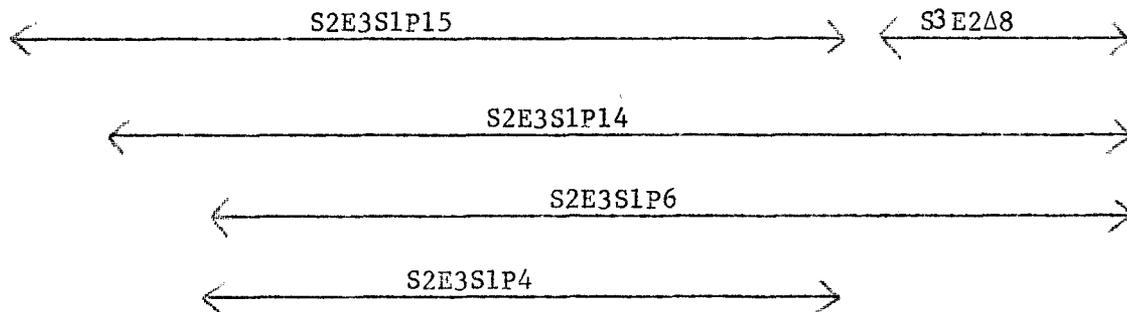
Thr	,	Gly	,	Ala	,	Ile	,	Leu
0,95		2,03		1,02		0,99		2,01

DANSYL-amino-acide terminal : DANSYL-Thr

La séquence de ce peptide est déduite de celle de ses deux produits de coupure secondaire S3E1A14 et S3E1A16 (voir page. 90). Le pourcentage de la coupure secondaire de la liaison qui unit ces deux peptides est de 47 p. 100.

10) SEQUENCE 77-89

Lys	-	Lys	-	Lys	-	Gly	-	His	-	His	-	Glu	-	Ala	-	Glu	-	Leu	-	Lys	-	Pro	-	Leu
77		78		79		80		81		82		83		84		85		86		87		88		89



a) Peptide S2E3S1P4 : séquence 80-86

Gly - His - His - Glu - Ala - Glu - Leu  
80 86



Composition :

Glu , Gly , Ala , Leu , His  
2,02 1,04 1,04 1,05 1,86

DNP-amino-acide terminal : DNP-Gly

Action de la carboxypeptidase A à 37°C :

En 4 heures la leucine est libérée (1 mole). En 8 heures on obtient 1 mole de leucine et 0,29 mole d'acide glutamique. En 24 heures sont libérés : leucine (1 mole), acide glutamique (0,77 mole) et alanine (0,52 mole).

Action de la leucine aminopeptidase à 37°C :

En 30 minutes on observe la libération de glycocolle, (0,39 mole), d'histidine (0,58 mole) et d'acide glutamique (0,15 mole). En 1 heure, l'enzyme libère tous les amino-acides du peptide (jusqu'au C-terminal).

b) Peptide S3E2Δ8 ou S2E3S2P8 ou S2E2S2P12 : séquence 87-89

Lys - Pro - Leu



Composition :

Pro , Leu , Lys  
1,12 1,02 0,85

DNP-amino-acide terminal : di-DNP-Lys

La présence de la proline dans ce peptide permet de déduire la séquence, étant donné la spécificité de la chymotrypsine.



Composition :

Glu , Gly , Ala , Leu , Lys , His  
 2,15 1,2 1,3 0,94 1,81 1,56

DNP-amino-acide terminal : di-DNP-Lys

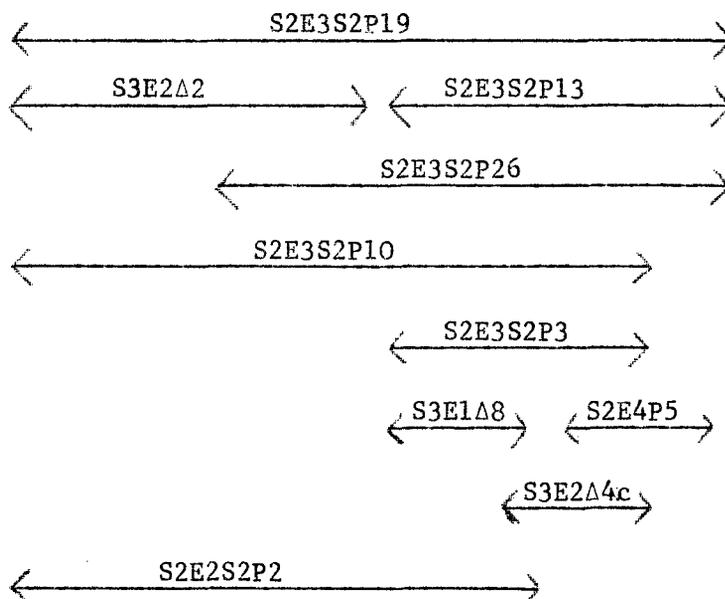
La séquence de ce peptide est déduite des séquences des peptides précédents.

Remarque : La lysine 77 est placée par analogie avec la myoglobine de Cachalot. Les résultats de l'hydrolyse trypsique de la globine de myoglobine de Cheval sont également en faveur de l'existence d'un résidu de lysine dans cette position (\*). Les trois liaisons lysyl de cette séquence 77-79 sont nettement hydrolysées par la chymotrypsine commerciale : les pourcentages de coupure des trois liaisons 77-78, 78-79 et 79-80 sont respectivement de 100 p. 100, 83 p. 100 et 87 p. 100. Aucun peptide chymotrypsique contenant à la fois les trois résidus de lysine 77, 78 et 79 n'a en effet été isolé. La liaison Leu - Lys est coupée à 40 p. 100 environ.

86 87

11) SEQUENCE 90-97

Ala - Gln - Ser - His - Ala - Thr - Lys - His  
 90 91 92 93 94 95 96 97




---

(\*) Résultats non publiés.



Composition :

Thr	,	Ser	,	Glu	,	Ala	,	Lys	,	His
0,96		0,92		1,01		2,02		1,11		1,96

DNP-amino-acide terminal : DNP-Ala

Action de la leucine-aminopeptidase à 37°C :

En 24 heures, les amino-acides constitutifs sont libérés et, par électrochromatographie sur papier, on identifie la glutamine dans l'hydrolysate qui par ailleurs ne contient pas d'acide glutamique.

Action de la carboxypeptidase A à 37°C :

En 8 heures l'enzyme libère uniquement de l'histidine. L'étude des produits de coupure secondaire de ce peptide, notamment S3E2Δ2 et S2E3S2P13, permet d'en établir la séquence. D'autres peptides mineurs confirment cette structure.

d) Peptide S2E3S2P26 : séquence 92-97

Ser - His - Ala - Thr - Lys - His

— ←

Composition :

Thr	,	Ser	,	Ala	,	Lys	,	His
1,12		1,06		1,02		1,07		1,71

DNP-amino-acide terminal : DNP-Ser

Action de la carboxypeptidase A à 37°C :

L'enzyme libère uniquement de l'histidine (en 8 heures).

e) Peptide S2E3S2P10 ou S2E2S2P14 : séquence 90-96

Ala - Gln - Ser - His - Ala - Thr - Lys  
90 96

— ←

Composition :

Thr	Ser	Glu	Ala	Lys	His
0,93	0,96	1,01	1,90	1,08	1,10

DNP-amino-acide terminal : DNP-Ala

Action de la leucine-aminopeptidase à 37°C :

L'hydrolyse totale du peptide par l'enzyme (24 heures) permet d'identifier la glutamine dans l'hydrolysats.

Action de la carboxypeptidase B à 37°C :

L'enzyme libère de la lysine (4 heures). La carboxypeptidase A est sans action sur le peptide.

f) Peptide S2E2S2P2 : séquence 90-95

Ala - Gln - Ser - His - Ala - Thr
90 <span style="float: right;">95</span>

Composition :

Thr	Ser	Glu	Ala	His
1,07	1,07	0,92	1,92	1,00

DNP-amino-acide terminal : DNP-Ala

g) Peptide S2E3S2P3 : séquence 94-96

Ala - Thr - Lys

Composition :

Thr	Ala	Lys
0,92	0,99	1,08

DNP-amino-acide terminal : DNP-Ala

Action de la carboxypeptidase B à 37°C :

L'enzyme libère de la lysine (en 24 heures)

h) Peptide S3E1Δ8 : séquence 94-95

Ala - Thr

Composition :

Thr , Ala  
0,99 1,01

DNP-amino-acide terminal : DNP-Ala

i) Peptide S3E2Δ4c : séquence 95-96

Thr - Lys

Composition :

Thr , Lys  
0,86 1,13

DNP-amino-acide terminal : DNP-Thr

j) Peptide S2E4P5

(voir l'étude de la séquence 56-69, page 88 ).

Remarque : La séquence des résidus 90-97 est abondamment confirmée par l'ensemble de ces résultats : ceux-ci nous fournissent une excellente illustration des possibilités de recouplement offertes par l'hydrolyse chymotrypsique.

Nous avons rassemblé ci-dessous en pourcentages de coupure des différentes liaisons de cette zone. Ils sont calculés (en p. 100) par rapport à un taux de 100 p. 100 affecté aux coupures primaires (liaison 89-90 et liaison 97-98).

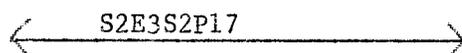
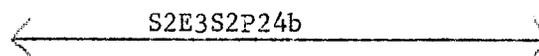
1 00		10		34		7	19	100	
↓		↓		↓		↓	↓	↓	
-	Ala	-	Gln- Ser	-	His - Ala	-	Thr - Lys	-	His -

Il n'est pas possible de calculer le pourcentage d'hydrolyse de la liaison Ala - Thr, car les produits de cette coupure (par exemple les

peptides Thr - Lys et Lys - His) ne proviennent pas exclusivement de cette portion de la molécule : le peptide Thr - Lys peut provenir aussi de la séquence 132-133 (voir page 110 ).

12) SEQUENCE 98-103

Lys - Ile - Pro - Ile - Lys - Tyr  
98 99 100 101 102 103



a) Peptide S2E3S2P24b ou S2E2S2P20 : séquence 98-103

Lys - Ile - Pro - Ile - Lys - Tyr  
98



Composition :

Pro , Ile , Tyr , Lys  
1,20 1,87 0,97 1,94



DNP-amino-acide terminal : di-DNP-Lys

Action des carboxypeptidases A et B à 37°C :

La carboxypeptidase A détache uniquement de la tyrosine (en 4 heures). Ensuite, l'action de la carboxypeptidase B permet en 4 heures de détacher de la lysine. L'action du mélange A + B en 24 heures ne permet pas de détacher d'autres amino-acides que tyrosine et lysine.

Action de la leucine-aminopeptidase à 37°C :

En 6 heures l'enzyme ne détache que la lysine N-terminale (0,9 mole). En 24 heures d'action, on obtient 0,94 mole de lysine, mais aucun autre amino-acide.

Dégradation c<sup>1</sup> EDMAN :

Après 24 heures d'action de la leucine-aminopeptidase, le nouvel amino-acide N-terminal est l'isoleucine (identification de la di-DANSYL-Lys et de la DANSYL-Ile) : après enlèvement de cette isoleucine par la méthode d'EDMAN, on peut mettre en évidence la proline en position N-terminale par la méthode des DANSYL-amino-acides.

L'ensemble de ces résultats permet d'établir la séquence.

b) Peptide S2E3S2P17 : séquence 98-102

Lys - Ile - Pro - Ile - Lys

Composition :

Pro	,	Ile	,	Lys
1,08		2,03		1,88

La séquence de ce peptide est déduite de celle du peptide précédent dont il est un produit de coupure secondaire du type "trypsique". Le pourcentage d'hydrolyse de la liaison Lys - Tyr est de 1,7 p. 100.

102 103

13) SEQUENCE 104-106

Leu - Glu - Phe  
104 105 106

Peptide S3E1A22b

Leu - Glu - Phe

— X

Composition :

Glu	,	Leu	,	Phe
1,05		0,95		1,00

DNP-amino-acide terminal : DNP-Leu

Action de la leucine-aminopeptidase à 37°C :

En 24 heures, l'enzyme libère l'acide glutamique, la leucine et la phénylalanine, identifiés par électrochromatographie sur papier.

La phénylalanine est en position C-terminale, étant donné la spécificité primaire de la chymotrypsine.

14) SEQUENCE 107-113

Ile - Ser - Asp - Ala - Ile - Ile - His  
 107 108 109 110 111 112 113

← S2E1S2P10 →

← S2E1S2P7 →

a) Peptide S2E1S2P7 : séquence 109-113

Asp - Ala -(Ile, Ile, His)  
 109 113

←

Composition :

Asp	,	Ala	,	Ile	,	His
0,94		1,02		1,02		0,99

DNP-amino-acide terminal : DNP-Asp

Action de la leucine-aminopeptidase à 37°C :

L'enzyme libère en 24 heures les amino-acides constitutifs dans les rapports molaires suivants :

Asp	,	Ala	,	Ile	,	His	(*)
0,97		0,97		2,07		0,30	

Le fait que les hydrolyses enzymatiques mettent en évidence 2 résidus d'isoleucine alors que l'hydrolyse acide n'en donne qu'un seul peut s'expliquer par l'existence d'un enchaînement Ile - Ile difficilement

---

(\*) Nous n'avons pu expliquer ce faible taux d'histidine.



difficilement hydrolysé par l'acide chlorhydrique 6 N à 100°C.

Hydrolyse pepsique (24 heures à 37°C ; pH 1,8) :

L'hydrolysat pepsique du peptide est soumis à une électrophorèse sur papier à pH 3,9. On sépare ainsi deux bandes ninhydrine positive : l'une est légèrement basique et donne une réaction de PAULY fortement positive, l'autre est neutre et donne une réaction de PAULY très faiblement positive.

Le peptide légèrement basique possède en position N-terminale l'alanine (méthode des DANSYL-amino-acides) et correspond donc au fragment C-terminal du peptide : Ala-(Ile, Ile, His).

L'action de la carboxypeptidase A à 37°C pendant 6 heures libère l'histidine et l'isoleucine en quantités équivalentes.

Après avoir enlevé l'alanine N-terminale par la méthode d'EDMAN, on obtient un tripeptide (Ile, Ile, His) ; la carboxypeptidase A n'enlève que le résidu d'histidine C-terminal et n'agit pas sur le dipeptide résiduel.

En conclusion, l'ensemble des résultats obtenus permet d'établir la séquence

Ile - Ser - Asp - Ala - Ile - Ile - His

Par rapport aux coupures primaires, la liaison Ser-Asp est coupée à 36 p. 100.

15) SEQUENCE 114-115

Val - Leu  
114 115

Peptide S3E1A17

Val - Leu

Composition :

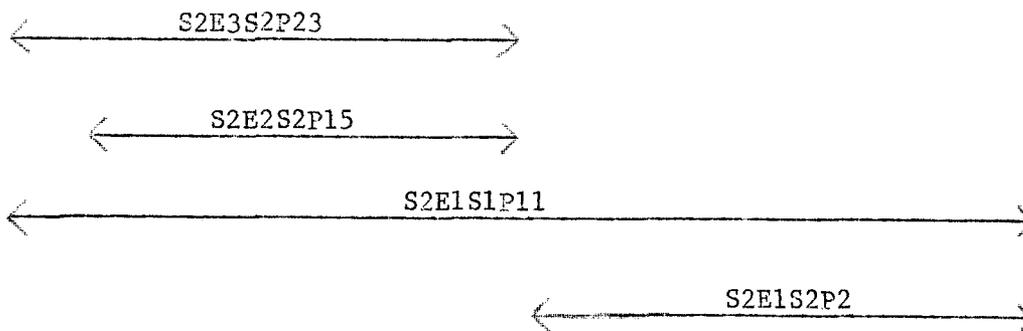
Val , Leu  
1,03 0,97

DNP-amino-acide terminal : DNP-Val

Il faut noter que deux autres séquences Val - Leu existent par ailleurs dans la molécule (résidus 10-11 et 68-69).

16) SEQUENCE 116-131

His-Ser-Lys-His-Pro-Gly-Asn-Phe-Gly-Ala-Asp-Ala-Gln-Gly-Ala-Met  
116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131



a) Peptide S2E3S2P23 ou S2E2S2P19 : séquence 116-123

His -(Ser, Lys)-(His, Pro, Gly, Asx)- Phe  
116 117 123



Composition :

Asp	Ser	Pro	Gly	Phe	Lys	His
1,07	0,98	1,27	1,00	0,96	0,93	1,78

DNP-amino-acide terminal : di-DNP-His

Action de la carboxypeptidase A à 37°C :

Après 24 heures d'action, seule la phénylalanine est libérée et identifiée par électrochromatographie sur papier.



Composition :

Asp , Glu , Gly , Ala , Met  
 1,03 1,10 1,93 2,91 0,94

DANSYL-amino-acide terminal : DANSYL-Gly

Action de la carboxypeptidase A à 37°C :

En 24 heures, l'enzyme libère la méthionine (0,73 mole) et l'alanine (0,19 mole).

Action de la leucine-aminopeptidase à 37°C :

L'action de l'enzyme est résumée dans le tableau suivant :

Amino-acide	Quantités libérées (en mole)		
	15 min	60 min	120 min
Gly	0,11	1,12	1,25
Ala	0,25	1,39	1,71
Asp	0,15	0,44	0,58
Gln		0,37	0,47
Met		0,20	0,35

Ces résultats ne permettent pas de préciser la séquence N-terminale.

Dégradation récurrente d'EDMAN :

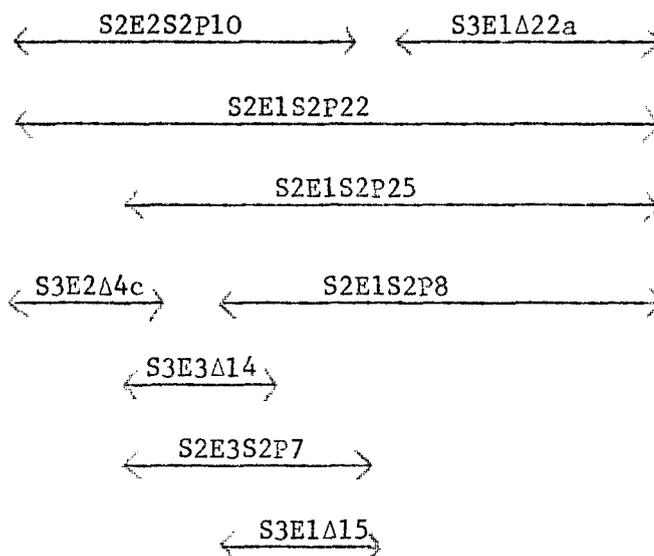
Après la première étape le nouvel acide aminé N-terminal est l'alanine (méthode des DANSYL-amino-acides) ; après la deuxième étape, on peut identifier l'acide aspartique par la même méthode.

La séquence est déduite de ces résultats et de ceux de l'étude du peptide S2E1S1P11.



17) SEQUENCE 132-138

Thr - Lys - Ala - Leu - Glu - Leu - Phe  
 132 133 134 135 136 137 138



a) Peptide S2E2S2P10 : séquence 132-135

Thr - Lys - Ala - Leu  
 132                      135



Composition :

Thr	,	Ala	,	Leu	,	Lys
0,90		1,05		1,09		0,97

DNP-amino-acide terminal : DNP-Thr

Action de la carboxypeptidase A à 37°C :

En 2 heures, l'enzyme libère la leucine, et l'alanine en quantité beaucoup plus faible. En 8 heures, ces deux amino-acides sont libérés en quantités sensiblement égales (identification par électrochromatographie sur papier).



d) Peptide S2E1S2P22 : séquence 132-138

Thr - Lys - Ala - Leu - Glu - Leu - Phe  
 132 138

Composition :

Thr , Glu , Ala , Leu , Phe , Lys  
 0,92 1,03 1,15 1,97 0,87 1,05

DANSYL-amino-acide terminal : DANSYL-Thr

L'ensemble des résultats précédents permet d'établir la séquence de ce peptide. Celle-ci est en outre confirmée par l'étude des autres produits de coupure secondaire (voir Tableau suivant).

e) Tableau :

Peptides	Résidus	Acides Aminés						DANSYL ou DNP-amino-acide terminal
		Thr	Glu	Ala	Leu	Phe	Lys	
S3E2Δ4c*	132-133	0,86					1,13	DNP-Thr
S3E3Δ14 ou S2E3S2P6	133-134			1,03			0,97	di-DNP-Lys
S2E3S2P7**	133-135			+	+		+	di-DNP-Lys
S3E1Δ15	134-135			0,94	1,06			DNP-Ala
S2E1S2P8	134-138		1,14	1,22	1,83	0,80		DANSYL-Ala

(\*) Voir la remarque sur la séquence 95-96, page 99.

(\*\*) Composition qualitative (identification sur papier des amino-acides après hydrolyse totale).

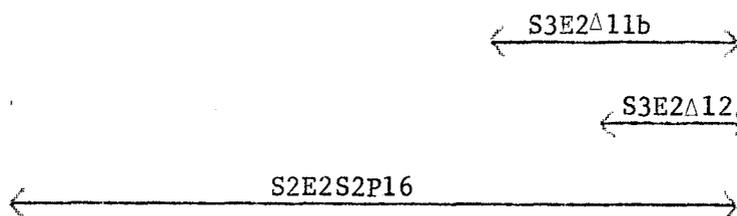
L'ensemble des résultats rassemblés dans ce tableau permet de déduire les séquences des peptides correspondants.

Les pourcentages de coupure des liaisons de cette séquence sont les suivants :

100      41      8      1      34      100 (en p. 100)  
 ↓      ↓      ↓      ↓      ↓      ↓  
 - Thr - Lys - Ala - Leu - Glu - Leu - Phe -

18) SEQUENCE 139-146

Arg - Asn - Asp - Ile - Ala - Ala - Lys - Tyr  
 139 140 141 142 143 144 145 146



) Peptide S3E2Δ11b : séquence 144-146

Ala - Lys - Tyr  
 144            146  
 —            X

Composition :

Ala    ,    Tyr    ,    Lys  
 0,98    0,39    1,01

La tyrosine a été partiellement détruite lors de l'hydrolyse acide.

DNP-amino-acide terminal : DNP-Ala

Action de la leucine-aminopeptidase à 37°C :

En 24 heures, les trois amino-acides suivants sont libérés dans les rapports molaires indiqués :

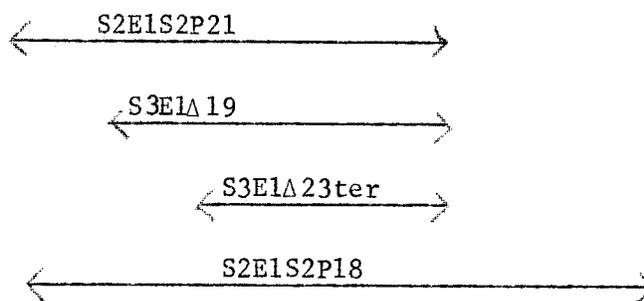
Ala    ,    Tyr    ,    Lys  
 1,10    0,72    0,94



évidence par hydrolyse trypsique de la globine acétylée (119 bis) confirme également la séquence.

19) SEQUENCE 147-153

Lys - Glu - Leu - Gly - Phe - Gln - Gly  
 147 148 149 150 151 152 153



a) Peptide S3E1Δ23 ter : séquence 149-151

Leu - Gly - Phe  
 149            151  
 —            X

Composition :

Gly , Leu , Phe  
 0,85    1,17    0,97

DNP-amino-acide terminal : DNP-Leu

La phénylalanine est en position C-terminale étant donné la spécificité primaire de la chymotrypsine.

b) Peptide S3E1Δ19 : séquence 148-151

Glu - Leu - Gly - Phe  
 148                    151  
 —                    X

Composition :

Glu ,	Gly ,	Leu ,	Phe
1,14	1,10	0,77	0,97

DNP-amino-acide terminal : DNP-Glu

Action de la leucine-aminopeptidase à 37°C :

En 24 heures, tous les amino-acides constitutifs sont libérés. L'hydrolysat contient de l'acide glutamique, mais pas de glutamine.

c) Peptide S2E1S2P21 ou S3E1Δ 26 : séquence 147-151

Lys -	Glu -	Leu -	Gly -	Phe
147				151

— ←—————

Composition :

Glu ,	Gly ,	Leu ,	Phe ,	Lys
1,01	1,11	0,98	0,78	1,11

DANSYL-amino-acide terminal : diDANSYL-Lys

Action de la carboxypeptidase A à 37°C :

En 8 heures, l'enzyme libère la phénylalanine et en quantité nettement plus faible le glycoacide et la leucine.

En 24 heures, ces trois amino-acides sont libérés en quantités sensiblement égales (identification par électrochromatographie sur papier). La séquence C-terminale est donc (Leu, Gly)-Phe. L'étude des produits de coupure secondaire (S3E1Δ 23ter et S3E1Δ 19) de ce peptide achève de démontrer sa séquence.

Remarque : Les deux peptides S3E1Δ 23ter et S3E1Δ 19 sont très mineurs par rapport au peptide S2E1S2P21 (moins de 5 p. 100).

d) Peptide S2E1S2P18 : séquence 147-153

Lys -	Glu -	Leu -	Gly -	Phe -	Gln -	Gly
147						151

— ←—————

====

Composition :

Glu	,	Gly	,	Leu	,	Phe	,	Lys
1,98		2,03		1,11		0,83		1,03

DANSYL-amino-acide terminal : di-DANSYL-Lys

Action de la leucine-aminopeptidase à 37°C :

Après 24 heures d'hydrolyse, on identifie dans l'hydrolysât l'acide glutamique et la glutamine en quantités égales.

Action de la carboxypeptidase A à 37°C :

En 24 heures, l'enzyme libère principalement du glyco-colle, puis en quantités plus faibles de la glutamine et de la phénylalanine, et des traces de leucine.

Hydrazinolyse :

L'action de l'hydrazine permet la libération de glyco-colle. Remarque : Un autre peptide (S<sup>2</sup>E1S2P16) possède la même composition en acide aminé et le même amino-acide N-terminal (Lysine). L'hydrolysât total par la leucine-aminopeptidase ne contient pas de glutamine, mais seulement de l'acide glutamique. Il s'agit donc également d'une forme désamidée (\*). Elle représente 40 p. 100 du total des deux peptides.

La liaison Phe - Gln est coupée à 70 p. 100 seulement, contrairement aux autres liaisons aromatiques dont le taux de coupure avoisine 100 p. 100. Ce résultat est normal, compte tenu de la position très "externe" de cette liaison dans la chaîne peptidique.

Il faut enfin signaler que, dans les hydrolysats tryptiques du fragment C-terminal de la globine obtenu par coupure par le bromure de cyanogène, le peptide Gly - Leu - Gly - Phe - Gln - Gly a été isolé (120), ainsi que la forme désamidée correspondante Glu - Leu - Gly - Phe - Glu - Gly. Dans les hydrolysats chymotryptiques, les résidus Gln et Asn sont donc vraisemblablement les seuls à être désamidés. 152 140

---

(\*) La carboxypeptidase A est sans action sur ce peptide, sans doute à cause du résidu d'acide glutamique en position 152 qui inhibe l'enzyme.

CHAPITRE VI

DISCUSSION DES RESULTATS

CONCLUSION

A - CONTROLE DE LA SPECIFICITE DE LA CHYMOTRYPSINE

Nos résultats sont dans l'ensemble conformes à la spécificité admise pour la chymotrypsine. Ils sont très comparables à ceux obtenus par EDMUNDSON (121) au cours de l'hydrolyse chymotrypsique de la globine de myoglobine du Cachalot. Nous avons en effet retrouvé la plupart des points majeurs de coupure chymotrypsique signalés par cet auteur.

Quant aux coupures "parasites" de type trypsique, elles sont en général mineures (liaisons 31-32, 96-97, 133-134 par exemple), exception faite toutefois des séquences basiques où deux ou trois résidus de lysine sont contigus dans la chaîne peptidique. Le taux de coupure des liaisons lysyl correspondantes peut alors atteindre 100 p. 100 (séquences 62-63 et 77-79).

Le traitement de la chymotrypsine par le TLCK se révèle très efficace et supprime la plupart de ces coupures parasites.

Nous avons étudié par électrochromatographie sur papier les fractions S3 et S4 correspondant aux hydrolyses effectuées avec la chymotrypsine traitée par le TLCK. La fraction S3 ne contient plus de lysine libre et la fraction S4 ne contient plus de tyrosine libre. Les deux résidus de tyrosine engagés dans des liaisons Lys - Tyr ne peuvent en effet être libérés que par des coupures de type trypsique.

Bien que nous n'ayons pu étudier systématiquement tous les peptides de la fraction S2 de ces mêmes hydrolysats, les résultats rassemblés dans les tableaux X, XI et XII montrent une disparition très nette des coupures de type trypsique. Cependant, la liaison 96 - 97, Lys-His, est coupée par la chymotrypsine-TLCK à un taux de 20 p. 100, ce qui constitue une réplique à la coupure de certaines liaisons leucyl (11-12 et 89-90) par la trypsine-TPCK (DAUTREVAUX, HAN, Y. BOULANGER, BISERTE) (121 bis).

Certaines coupures chymotrypsiques sont supprimées ou nettement diminuées quand on utilise l'enzyme traité par le TLCK (liaison Ala-Glu 19-20 par exemple), mais ceci peut s'expliquer par la réduction à 6 heures

de la durée de l'hydrolyse. A ce sujet, un fait remarquable à signaler est la présence, dans les hydrolysats correspondants, du peptide S2E1P8 (séquence 1-11) qui contient une liaison Trp - Gln non coupée : l'enzyme paraît donc couper la liaison leucyl 11-12 de préférence à cette liaison tryptophyl.

#### B - ETABLISSEMENT DE LA SEQUENCE

Les peptides isolés des hydrolysats chymotrypsiques couvrent les 153 amino-acides de la protéine. L'étude de leur structure permet la reconstruction de portions assez importantes de la molécule.

Le raccordement des diverses séquences chymotrypsiques ainsi étudiées peut se faire en premier lieu en plaçant les différents peptides par analogie avec la séquence de la myoglobine de Cachalot, en tenant compte éventuellement des substitutions d' amino-acides correspondant aux différentes mutations subies par les deux espèces. Tous les peptides isolés peuvent ainsi être placés dans une chaîne peptidique qui constitue avec une grande probabilité la molécule de myoglobine de Cheval.

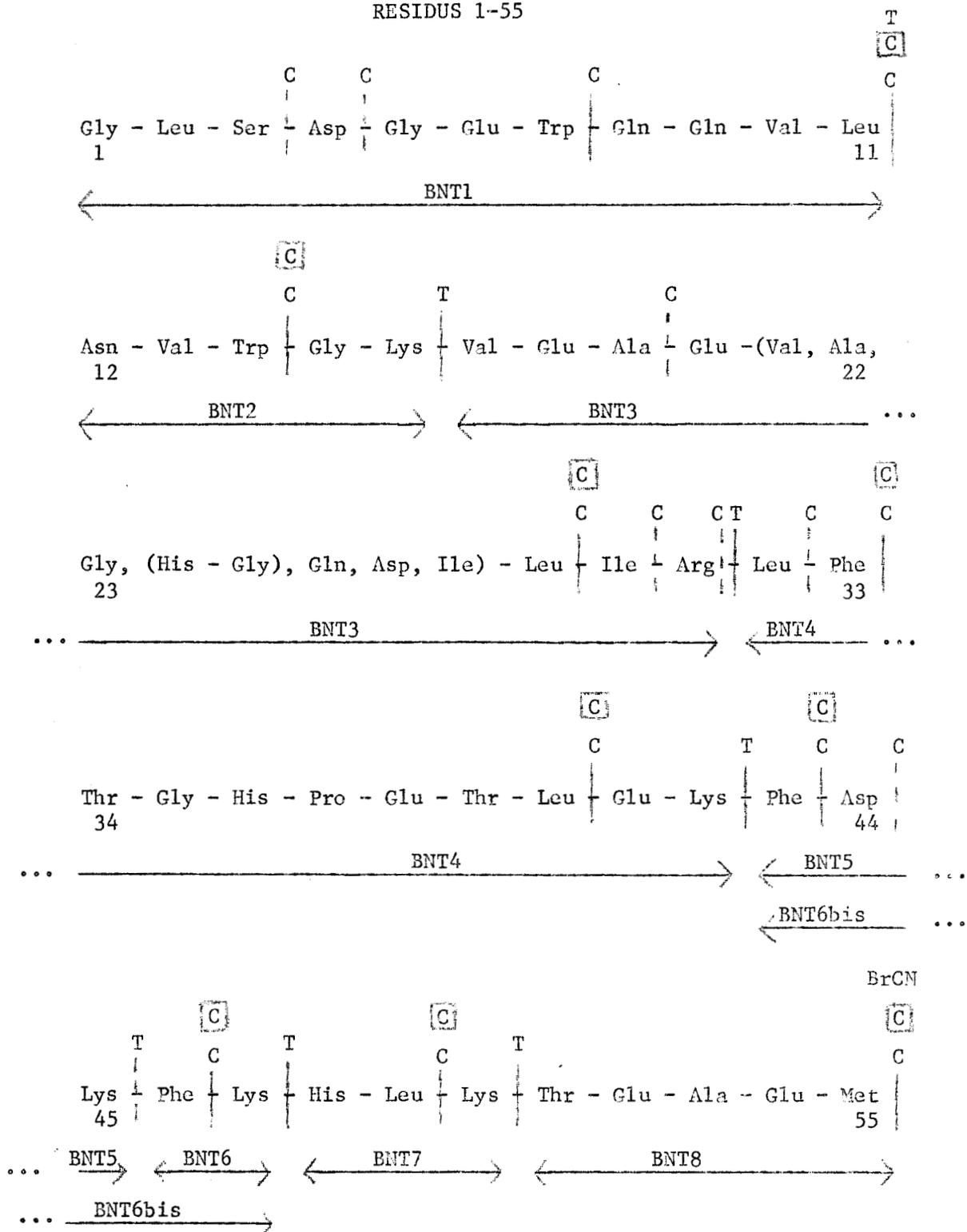
Cette séquence probable est actuellement en grande partie confirmée par l'étude des 3 peptides libérés par l'action sur la globine du bromure de cyanogène, étude réalisée conjointement à celle des hydrolysats chymotrypsiques (DAUTREVAUX, HAN, Y. BOULANGER et BISERTE) (122 et 123).

La séquence C-terminale (résidus Met 131 à Gly 153) a pu ainsi être complètement démontrée, ainsi que la séquence N-terminale jusqu'au résidu Met 55, par hydrolyse trypsique des deux peptides correspondants ; l'étude du segment médian est actuellement en cours (résidus 56-131).

Les tableaux X, XI et XII montrent la reconstitution de ces trois segments.

TABLEAU X

SEQUENCE N-TERMINALE DE LA MYOGLOBINE DE CHEVAL  
RESIDUS 1-55



T = Coupure par la trypsine ; C = Coupure par la chymotrypsine (en trait plein les points d'attaque majeurs, en pointillé les coupures secondaires) ; [C] = Coupure par la chymotrypsine traitée par le TLCK ; BNT = Peptide tryptique du fragment N-terminal obtenu par coupure de la globine par le bromure de cyanogène (BrCN).

TABLEAU XI  
 SEQUENCE PROBABLE DU SEGMENT MEDIAN DE LA  
 MYOGLOBINE DE CHEVAL  
 (résidus 56-131)

[C]

Lys - Ala - Ser - Glu - Asp - Leu <sup>C</sup> | Lys <sup>C</sup> | Lys <sup>C</sup> | His <sup>C</sup> | Gly - Thr - Val - Val -

56

[C]

Leu <sup>C</sup> | Thr - Ala - Leu <sup>C</sup> | Gly - Gly - Ile - Leu <sup>C</sup> | Lys <sup>C</sup> | Lys <sup>C</sup> | Lys <sup>C</sup> | Gly - His -

69

[C]

His - Glu - Ala - Glu - Leu <sup>C</sup> | Lys - Pro - Leu <sup>C</sup> | Ala <sup>C</sup> | Gln <sup>C</sup> | Ser - His <sup>C</sup> | Ala <sup>C</sup> |

82

[C] [C]

Thr <sup>C</sup> | Lys <sup>C</sup> | His <sup>C</sup> | Lys - Ile - Pro - Ile - Lys <sup>C</sup> | Tyr <sup>C</sup> | Leu - Glu - Phe <sup>C</sup> | Ile -

95

[C]

Ser <sup>C</sup> | Asp - Ala - Ile - Ile - His <sup>C</sup> | Val - Leu <sup>C</sup> | His <sup>C</sup> | Ser - Lys - His - Pro -

108

[C]

BrCN

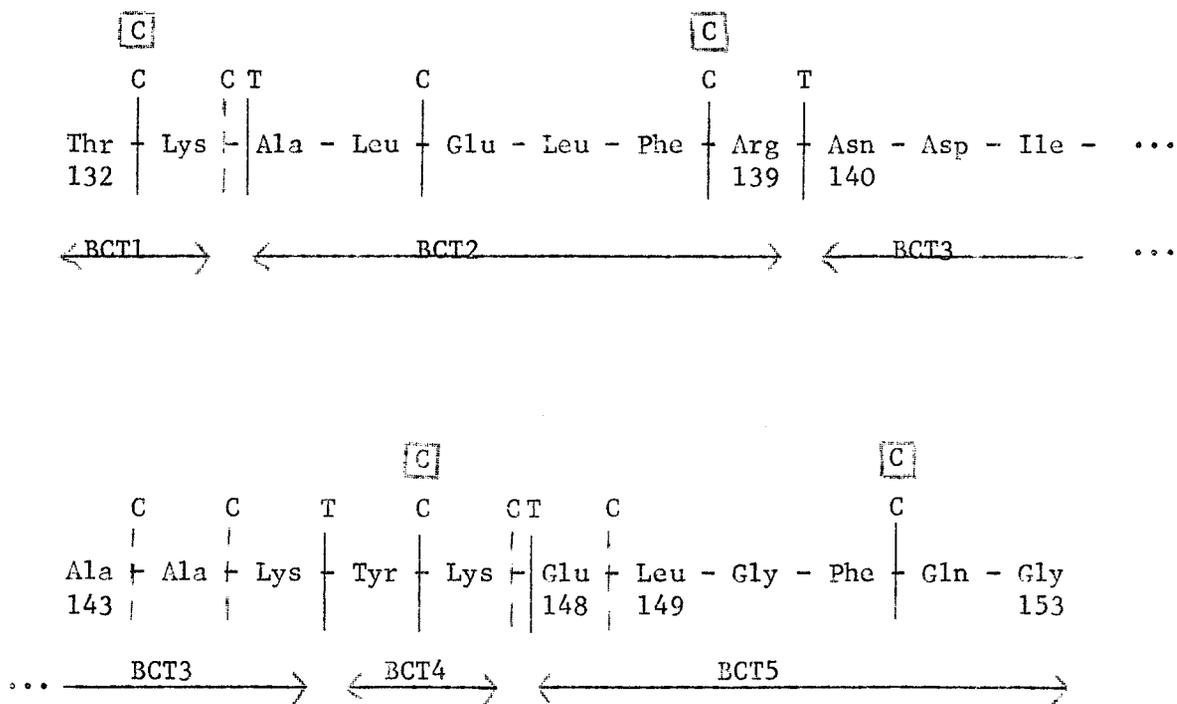
Gly - Asn - Phe <sup>C</sup> | Gly - Ala - Asp - Ala - Gln - Gly - Ala - Met <sup>C</sup> |

121 131

TABLEAU XII

SEQUENCE C-TERMINALE DE LA GLOBINE DE MYOGLOBINE DE CHEVAL

Résidus 132 à 153



BCT = Peptide tryptique du fragment C-terminal obtenu par coupure de la globine par le bromure de cyanogène.

### C - COMPARAISON ENTRE MYOGLOBINE ET HEMOGLOBINE

La comparaison des séquences des myoglobines de Cachalot et de Cheval montre une grande ressemblance entre les deux protéines, puisque l'on n'observe que 16 différences sur 153 acides aminés. Il s'agit d'une part de 15 substitutions correspondant à des mutations ponctuelles conformes au code génétique de NIRENBERG (124) (Tableau XIII). A ces 15 mutations ponctuelles, il faut ajouter d'autre part une inversion : la séquence Val - Thr (66-67) du Cachalot est remplacée par une séquence Thr - Val chez le Cheval. Dans le Tableau XIII, les deux myoglobines du Cachalot et du Cheval sont également comparées à la myoglobine de Baleine (*Megaptera nodosa*) dont la séquence des 60 premiers acides aminés a été déterminée par EDMAN et BERG (124 bis). Dans cette séquence des résidus 1-60, on observe 7 substitutions entre les myoglobines de Cheval et de Baleine, 9 entre le Cheval et le Cachalot, 6 entre le Cachalot et la Baleine.

Au total, il existe 18 différences entre ces trois myoglobines : 17 substitutions et 1 inversion.

Du point de vue du code génétique, à chacune des 17 substitutions correspond un changement de l'une des trois bases du codon : 3 mutations affectent la première de ces trois bases, 10 la seconde et 4 la troisième ; 13 de ces 17 mutations ont pour cause le remplacement d'une base purique par une base pyrimidique (mutation par transversion) dont 6 correspondent à une mutation  $U \leftrightarrow A$ .

Il faut noter également que 10 mutations (sur 17) sont "conservatrices" c'est-à-dire qu'elles remplacent un acide aminé par un autre ayant le même caractère ionique, hydrophile ou hydrophobe (Asp - Glu, Lys - Arg, Val - Leu ou Val - Ile, Gly - Ala).

L'étude de la localisation de ces substitutions par rapport à la position de l'hème est très intéressante. Nous avons vu (Chapitre I) que l'hème était enfoncé dans une crevasse limitée par les segments C, E, F, CD, EF et FG. Seules, deux substitutions affectent ces zones : résidu

TABLEAU XIII

DIFFERENCES OBSERVEES ENTRE LES MYOGLOBINES  
DU CACHALOT, DE LA BALEINE\* ET DU CHEVAL

Résidu	1	4	5	9	12	13
Cachalot	Val	Glu	Gly	Leu	His	Val
Baleine	Val	Asp	Ala	Leu	Asn	Ile
Cheval	Gly	Asp	Gly	Gln	Asn	Val
Résidu	15	20	34	35	45	66-67
Cachalot	Ala	Asp	Lys	Ser	Arg	Val-Thr
Baleine	Ala	Asp	Lys	Gly	Lys	
Cheval	Gly	Glu	Thr	Gly	Lys	Thr-Val
Résidu	74	109	118	132	140	151
Cachalot	Ala	Glu	Arg	Asn	Lys	Tyr
Cheval	Gly	Asp	Lys	Thr	Asn	Phe

(\*) Baleine *Megaptera nodosa* dont la séquence des 60 premiers amino-acides a été déterminée par EDMAN et BERG.



45 ou CD3 (Arg -Lys) et résidu 74 ou E17 (Ala - Gly). Ces deux substitutions concernent des résidus tournés vers l'extérieur de la molécule et non vers l'intérieur de la crevasse. Il en est de même pour l'inversion 66-67 ou E10 - E11 qui affecte deux résidus (Val et Thr) tournés vers l'intérieur de la molécule. De plus la substitution Arg - Lys en CD3 laisse subsister la liaison ionique existant entre le groupement basique de la chaîne latérale (guanidyle ou  $\epsilon\text{-NH}_2$ ) et un des groupements propa-noïques de l'hème.

Les autres substitutions intéressent des acides aminés éloignés de l'hème ou qui ne sont pas directement en contact avec celui-ci.

La comparaison entre les deux myoglobines de Cachalot et de Cheval et les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémoglobine de Cheval (Tableau XIV) est également intéressante. La myoglobine de Cheval est en effet beaucoup plus proche de la myoglobine de Cachalot que de l'une ou l'autre des chaînes  $\alpha$  ou  $\beta$  de l'hémoglobine de Cheval. En particulier les centres basiques contenant les histidines proximales et distales sont identiques pour les deux myoglobines. Par contre, le centre basique contenant l'histidine proximale des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de l'hémoglobine de Cheval diffère sensiblement de celui de la myoglobine. En effet, seules l'histidine F8 (93 Mb, 92 $\beta$  ou 87 $\alpha$ ) et la lysine FG2 (96 Mb, 95 $\beta$  ou 90 $\alpha$ ) sont communes aux trois types de chaîne. On note dans cette région plusieurs mutations non conservatrices, dont l'une surtout est importante : la leucine FG3 des chaînes de l'hémoglobine (91 $\alpha$  ou 96 $\beta$ ) est remplacée dans la myoglobine par une histidine. Or cette leucine est liée à l'hème par une liaison de Van der Waals (voir Chapitre I). D'autres mutations changent la charge électrique, par exemple les mutations  $\text{Gln}_{91\text{Mb}} \longrightarrow \text{Glu}_{90\beta}$  ou  $\text{Asp}_{85\alpha}$  et  $\text{Pro}_{100\text{Mb}} \longrightarrow \text{Asp}_{99\beta}$  ou 94 $\alpha$ .

Ces changements de structure primaire entre myoglobine et hémoglobine peuvent expliquer en partie les différences d'affinité pour l'oxygène, notamment l'allure des courbes de dissociation de l'oxy-hémoglobine et de l'oxymyoglobine, car de tels changements modifient

l'affinité de l'hème pour la globine. A l'appui de cette hypothèse il faut rappeler l'exemple de l'hémoglobine GUN HILL (voir Chapitre I) où une délétion F9 - FG1-4 de 5 acides aminés de la chaîne  $\beta$  supprime la fixation de l'hème par cette chaîne. Le cas des hémoglobines pathologiques YAKIMA et KEMPSEY étudiées par JONES *et al.* (125 a) et NOVY *et al.* (125 b) est également très intéressant : le résidu d'acide aspartique G1 ou 99 de la chaîne  $\beta$  est remplacé dans l'hémoglobine YAKIMA par un résidu d'histidine et dans l'hémoglobine KEMPSEY par un résidu d'asparagine. Selon ces auteurs, ces modifications entraîneraient des changements de structure secondaire et tertiaire affectant l'affinité de l'hémoglobine pour l'oxygène. L'oxyhémoglobine YAKIMA donne en effet une courbe de dissociation hyperbolique qui se superpose presque à celle de la myoglobine. Il ne faut cependant pas négliger une autre explication possible à cette différence d'affinité pour l'oxygène entre hémoglobine et myoglobine, qui est l'interaction entre les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  au cours de la saturation en oxygène, interaction inexistante dans le cas de la myoglobine, constituée d'un seul type de chaîne (sous forme monomère). Le comportement de l'hémoglobine H ou  $\beta_4$ , constituée de 4 chaînes  $\beta$  associées, est à cet égard significatif : la courbe de dissociation de l'oxyhémoglobine correspondante est hyperbolique comme celle de l'oxymyoglobine (BENESCH *et al.*) (125 c).

Ces deux explications apparemment différentes sont peut-être néanmoins conciliables : en effet, les changements de structures primaires peuvent modifier simultanément l'affinité de la chaîne correspondante pour l'hème (et par suite pour l'oxygène) et l'interaction entre chaînes  $\alpha$  et  $\beta$ . Cette modification de l'interaction entre chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  a été invoquée notamment par CHARACHE *et al.* (125 d) dans le cas de l'hémoglobine CHESAPEAKE, dans laquelle le résidu d'arginine FG4 de la chaîne  $\alpha$ (92) est remplacé par un résidu de leucine.

Au total, si l'on compare myoglobine et hémoglobine de Cheval, on note 35 correspondances entre la chaîne  $\alpha$  et la myoglobine et 36 entre la chaîne  $\beta$  et la myoglobine. La comparaison de la myoglobine du Cachalot avec l'hémoglobine de Cheval ne révèle guère plus de ressemblances : respectivement 36 et 35.

TABLEAU XIV

CORRESPONDANCE DE SEQUENCE D'AMINO-ACIDES ENTRE LES CHAINES  $\alpha$  ET  $\beta$  DE L'HEMOGLOBINE DE CHEVAL ET LA MYOGLOBINE DE CHEVAL ET DE CACHALOT (voir Zuckerkandl) (125)

$\alpha$	Val	Leu	Ser	Ala	Ala	Asp	Lys	Thr	Asn	Val	Lys	Ala	Ala	Trp	Ser	Lys	Val	Gly	Gly	His	Ala	Gly	Glu	Tyr
Hb	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
$\beta$	Val	Glu	Leu	Ser	Gly	Glu	Glu	Lys	Ala	Ala	Val	Leu	Ala	Leu	Trp	Asp	Lys	Val	Asn		Glu	Glu	Glu	Val
Cheval	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19		20	21	22	23
Mb Cheval	Gly	Leu	Ser	Asp	Gly	Glu	Trp	Gln	Gln	Val	Leu	Asn	Val	Trp	Gly	Lys	Val	Glu	Ala	Glu	(Val	Ala	Gly	His
Mb Cachalot	Val	Leu	Ser	Glu	Gly	Glu	Trp	Gln	Leu	Val	Leu	His	Val	Trp	Ala	Lys	Val	Glu	Ala	Asp	Val	Ala	Gly	His
lot	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24

$\alpha$	Gly	Ala	Glu	Ala	Leu	Glu	Arg	Met	Phe	Leu	Gly	Phe	Pro	Thr	Thr	Lys	Thr	Tyr	Phe	Pro	His	Phe	Asp	Leu
Hb	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
$\beta$	Gly	Gly	Glu	Ala	Leu	Gly	Arg	Leu	Leu	Val	Val	Tyr	Pro	Trp	Thr	Gln	Arg	Phe	Phe	Asp	Ser	Phe	Gly	Asp
Cheval	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47
Mb Cheval	Gly	Gln	Asp	Ile	Leu	Ile	Arg	Leu	Phe	Thr	Gly	His	Pro	Glu	Thr	Leu	Glu	Lys	Phe	Asp	Lys	Phe	Lys	His
Mb Cachalot	Gly	Gln	Asp	Ile	Leu	Ile	Arg	Leu	Phe	Lys	Ser	His	Pro	Glu	Thr	Leu	Glu	Lys	Phe	Asp	Arg	Phe	Lys	His
lot	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48



TABLEAU XIV (suite)

Hb	α	Ser	His	Gly	Ser	Ala	Glu	Val	Lys	Gly	His(*)	Gly	Lys	Lys	Val	Ala	Asp	Ala	Leu	Thr	Asn						
		49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68						
Cheval	β	Ser	Asp	Pro	Gly	Ala	Val	Met	Gly	Asn	Pro	Lys	Val	Lys	Val	Leu	His	Ser	Phe	Gly	Glu						
		49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	
Mb Cheval		Lys	Thr	Glu	Ala	Glu	Met	Lys	Ala	Ser	Glu	Asp	Leu	Lys	Lys	His(*)	Gly	Thr	Val	Val	Leu	Thr	Ala	Leu	Gly	Gly	
		50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	
Mb Cachalot	α	Lys	Thr	Glu	Ala	Glu	Met	Lys	Ala	Ser	Glu	Asp	Leu	Lys	Lys	His(*)	Gly	Val	Thr	Val	Leu	Thr	Ala	Leu	Gly	Ala	
		50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	
Hb Cheval	β	Ala	Val	Ala	His	Val	Asp	Asp	Met	Pro	Asn	Ala	Leu	Ser	Ala	Leu	Ser	Asp	Leu	His(**)	Ala	His	Lys	Leu	Arg	Val	Asp
		69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94
Mb Cheval	β	Gly	Val	His	His	Leu	Asp	Asn	Leu	Lys	Gly	Thr	Phe	Ala	Ala	Leu	Ser	Glu	Leu	His(*)	Cys	Asp	Lys	Leu	His	Val	Asp
		74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99
Mb Cachalot	α	Ile	Leu	Lys	Lys	Lys	Gly	His	His	Glu	Ala	Glu	Leu	Lys	Pro	Leu	Ala	Gln	Ser	His(*)	Ala	Thr	Lys	His	Lys	Ile	Pro
		75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100

(\*) Histidine distale

(\*\*) Histidine proximale (voir Chapitre I)



TABLEAU XIV (fin)

Hb	Cheval	$\alpha$	Pro Val /sn Phe Lys Leu Leu Ser His Cys Leu Leu Val Thr Leu Ala Ala His Leu Pro Ala Glu Phe Thr Pro Ala	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
		$\beta$	Pro Glu /sn Phe Arg Leu Leu Gly Asn Val Leu Ala Leu Val Val Ala Arg His Phe Gly Lys Asp Phe Thr Pro Glu	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125
Mb	Cheval		Ile Lys Tyr Leu Glu Phe Ile Ser Asp Ala Ile Ile His Val Leu His Ser Lys His Pro Gly Asn Phe Gly Ala Asp																										
			Ile Lys Tyr Leu Glu Phe Ile Ser Glu Ala Ile Ile His Val Leu His Ser Arg His Pro Gly Asn Phe Gly Ala Asp	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126

Hb	Cheval	$\alpha$	Val His Ala Ser Leu Asp Lys Phe Leu Ala Ser Val Ser Thr Val Leu Thr Ser Lys Tyr Arg	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141
		$\beta$	Leu Gln Ala Ser Tyr Gln Lys Val Val Ala Gly Val Ala Asp Ala Leu Ala His Lys Tyr His	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146

Mb	Cheval		Ala Gln Cly Ala Met Thr Lys Ala Leu Glu Leu Phe Arg Asn Asp Ile Ala Ala Lys Tyr Lys Glu Leu Gly Phe Glu Gly																										
			Ala Gln Cly Ala Met Asn Lys Ala Leu Glu Leu Phe Arg Lys Asp Ile Ala Ala Lys Tyr Lys Glu Leu Gly Tyr Gln Gly	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152



TABLEAU XV  
 EVOLUTION DES COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES DES MYOGLOBINES  
 ET DES HEMOGLOBINES DANS LES DIFFERENTES ESPECES

	MYOGLOBINES				HEMOGLOBINES		
	Primates	Mammifères terrestres	Mammifères marins	Poissons	Mammifères	Poissons	Invertébrés
NP/B	1,26	1,32	1,06	1,80	1,70	2,07	2,73
B/H	2,40	2,33	3,15	1,96	1,51	1,41	0,88

NP : amino-acides non polaires (Phe, Val, Ile, Leu)

B : amino-acides basiques (Arg, His, Lys)

H : amino-acides hydroxylés (Thr, Ser)

TABLEAU XVI  
 EVOLUTION DE LA COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DANS  
 LES DIFFERENTES CHAINES DE L'HEMOGLOBINE

	$\alpha$	$\beta$	$\gamma$	$\delta$
NP/B	1,52	1,86	1,91	1,91
B/H	1,29	2,25	1,05	2,09



Du point de vue de l'évolution, ces résultats signifient que la différenciation Myoglobine-Hémoglobine a été très précoce, beaucoup plus précoce que la différenciation des espèces.

Il est vraisemblable que les différences observées entre la myoglobine et les chaînes  $\alpha$  ou  $\beta$  de l'hémoglobine sont très estompées dans les espèces inférieures.

A cet égard, la comparaison des compositions en amino-acides est intéressante car elle peut, à défaut de notre connaissance des structures marquer le sens de l'évolution de la myoglobine (Tableau XV). On remarque que le rapport des acides aminés non polaires (Phe, Val, Ile, Leu) aux acides aminés basiques diminue quand on passe des Poissons aux Mammifères marins et aux Primates ; inversement, le rapport des acides aminés basiques aux acides aminés hydroxylés augmente des Poissons aux Primates ; la seule exception est constituée par les Mammifères marins qui, lorsqu'on se fonde sur ces critères, paraissent plus évolués que les Primates : ceci s'explique peut-être par une évolution accélérée ayant permis un retour au milieu aquatique après une ère transitoire de vie terrestre. L'étude des chaînes de l'hémoglobine ne permet pas de déterminer avec certitude la chaîne la plus anciennement différenciée et phylogénétiquement la plus proche de la myoglobine. On constate cependant à l'examen des tableaux XV et XVI que la composition de la chaîne  $\beta$  est relativement proche de celle de la myoglobine des Poissons ; la teneur en proline de cette chaîne  $\beta$  (3 p. 100 contre 4,6 p. 100 pour la chaîne  $\alpha$ ) est aussi du même ordre de grandeur que celle des myoglobines (2,7 p. 100) ; ces analogies suggèrent un degré d'évolution comparable pour la chaîne  $\beta$  de l'hémoglobine et la myoglobine des Poissons, ce qui tendrait à prouver que la chaîne  $\beta$  est la chaîne ancestrale de l'hémoglobine. L'évolution des compositions en amino-acides, étudiée par ATASSI (126) chez les Primates, montre une diminution marquée du rapport basiques/hydroxylés dans la chaîne  $\beta$  lorsqu'on va des espèces les plus évoluées vers les moins évoluées : la similitude des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  serait de plus en plus marquée au fur et à mesure que

l'on s'abaisse dans l'échelle phylogénétique.

On peut donc envisager qu'il existe ou qu'il a existé des espèces chez lesquelles la différenciation entre les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  ou entre la chaîne  $\beta$  et la myoglobine ne s'est pas encore effectuée. De ce point de vue, la comparaison entre myoglobine et hémoglobine chez les espèces animales inférieures apparaît donc comme particulièrement intéressante.

Notre travail sur la myoglobine de Cheval ne constitue donc qu'une étape. Il nous a permis de mettre au point ou d'améliorer nos techniques de détermination des structures protéiques sur un substrat facile à préparer et à purifier. L'étude d'une myoglobine de Poisson ou d'Oiseau doit constituer la prochaine étape de nos recherches.

CHAPITRE VII

TECHNIQUES

A - PREPARATION ET CONTROLES DE PURETE DE LA MYOGLOBINE DE CHEVAL

1) Isolement de la myoglobine

a) Extraction de la myoglobine du tissu cardiaque

Le coeur de Cheval (poids 4 à 5 kg), prélevé dans 1'heure qui suit l'abattage, est transporté au laboratoire dans la glace.

Les tissus adipeux et conjonctif, les oreillettes et les artères coronaires sont éliminés et le tissu musculaire des ventricules est haché, puis broyé finement (\*) en présence d'eau distillée (6 litres pour 2 à 3 kg de viande hachée). On ajoute quelques gouttes de toluène et la purée tissulaire obtenue est abandonnée une nuit en chambre froide à 4°C. Dans le cas où l'on désire préparer la myoglobine sous forme de carbonylmyoglobine, on sature la purée tissulaire en oxyde de carbone préparé par action de l'acide sulfurique concentré sur le formiate de sodium. Le lendemain on centrifuge à 4000 t/min pendant 1 heure et on filtre le surnageant afin d'éliminer les particules grassieuses. La filtration est effectuée à l'aide d'un filtre Büchner de 30 cm de diamètre sur papier Whatman n° 1 et 3 (2 épaisseurs de Whatman n° 3 encadrant 1 épaisseur de Whatman n° 1). Au filtrat on ajoute de nouveau quelques gouttes de toluène. On procède éventuellement à une nouvelle saturation en oxyde de carbone.

b) Purification par précipitation des impuretés

La solution obtenue (volume approximatif de 6 litres) est ajustée à 83 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium : on ajoute par petites portions 562 g de sulfate d'ammonium solide par litre de solution (quantité calculée pour une température de 4-6°C), sous forte agitation. Pendant cette opération, le pH de la solution est maintenu aux environs de 7, par addition goutte à goutte d'ammoniaque concentrée, et finalement ajusté à 7.

---

(\*) Broyeur Ultra-Turrax type TP 1812

Après 1 à 2 heures d'agitation, l'hémoglobine et les autres impuretés non hémiques ont précipité et la solution est filtrée sur papier Whatman n° 1 (en double épaisseur). Cette opération dure plusieurs heures. La solution est refiltrée dans les mêmes conditions (la deuxième filtration est cependant beaucoup plus rapide que la première : 1 heure environ).

## 2) Obtention de la myoglobine pure

Le surnageant précédemment obtenu, qui est éventuellement saturé en oxyde de carbone, (volume approximatif : 7 à 8 litres) est alors ajusté à 94 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium dans les mêmes conditions que précédemment : on ajoute 77,5 g (\*) de sulfate d'ammonium par litre de solution sous forte agitation en maintenant le pH aux environs de 7 et en l'ajustant finalement à 7. La myoglobine précipite. Au bout de 2 heures le précipité peut être recueilli par filtration sur verre fritté (n° 3 ou 4) et lavé par 0,5 à 1 litre de solution de sulfate d'ammonium à 94 p. 100 de saturation (\*\*\*) ajustée à pH 7. Au cours de cette manipulation, il faut éviter soigneusement de laisser sécher le précipité sur le filtre.

La myoglobine obtenue est redissoute dans 800 ml à 1 litre d'ammoniaque 0,01 N ; elle est éventuellement saturée en oxyde de carbone, et dialysée en boudin de cellophane (4 à 5 boudins de 200 à 250 ml), contre 10 litres d'eau distillée changée quotidiennement, pendant 4 jours (\*\*\*).

Finalement, la solution de myoglobine est lyophilisée et la protéine est conservée au réfrigérateur dans des flacons soigneusement

---

(\*) Quantité calculée pour une température de 4-6°C.

(\*\*) A 1 litre d'eau il faut ajouter 662 g de sulfate d'ammonium.

(\*\*\*) Cellophane Viscora-Visking : boudin de 50 mm de diamètre.

bouchés.

On obtient ainsi en moyenne 1 g de myoglobine par kg de coeur brut.

### Cristallisation de la myoglobine

Lorsqu'on désire obtenir la myoglobine sous forme cristallisée, on redissout le précipité de myoglobine (3 à 4 g) dans 1 litre d'eau distillée et la solution obtenue est dialysée à 4°C pendant 15 jours à trois semaines contre 10 litres de solution saturée de sulfate d'ammonium ajustée à pH 7 (\*). Cette solution est changée deux fois, au bout de 24 et 48 heures de dialyse.

La myoglobine commence à cristalliser au bout de quelques jours.

### 3) Contrôles de pureté de la préparation

#### a) Electrophorèse de zones sur papier

L'homogénéité électrophorétique de la myoglobine est contrôlée en électrophorèse sur papier Schleicher et Schüll 2043a Mgl en tampon véronal de pH 8,9 (\*\*\*) pendant 9 heures sous 80 volts. On dépose 200 à 500 g de protéine sur la bande humide du côté cathodique à 8 cm du bord. Après la migration, les bandes sont séchées à température ambiante puis fixées 30 minutes à 100°C et enfin révélées par l'Amidoschwarz dans les conditions suivantes : les bandes sont trempées 3 minutes dans le colorant, puis dans des bains décolorants jusqu'à obtention d'un fond blanc (\*\*\*)

#### b) Chromatographie sur couche mince de gel de Sephadex. Technique de JOHANSSON et RYMO (127)

##### α) Préparation du gel

10 grammes de Sephadex G75 forme "fine" sont mis à gonfler dans

---

(\*) Solution à 720 g de sulfate d'ammonium pour 1 litre d'eau.

(\*\*) Tampon véronal de pH 8,9 : véronal sodé 20,26 g ; HCl 5 ml ; eau distillée qsp 2 litres.

(\*\*\*) Formule du colorant : 1 g d'Amidoschwarz, 10 ml d'acide acétique et 90 ml de méthanol ; mélanger ; laisser reposer une nuit et filtrer.  
Bain décolorant : 30 ml de phénol aqueux à 10 p. 100 d'eau ; 100 ml d'acide acétique, eau distillée qsp 1 litre.

150 ml de tampon TRIS-hydroxyméthylaminométhane 0,05 M, KCl 0,1 M de pH 7,5 (\*) pendant 5 heures. Le gel possède ainsi la consistance souhaitable pour être étalé sur les plaques de verre.

β) Préparation des plaques

Les plaques de verre de 20 x 40 cm sont nettoyées soigneusement à l'aide d'une solution concentrée de carbonate de sodium (25 g p. 100 ml), puis rincées abondamment à l'eau distillée et séchées avec soin. Elles sont dégraissées à l'alcool et à l'acétone avant l'usage.

Pour étaler le gel on utilise un appareillage spécial constitué d'un socle plan sur lequel sont placées les plaques de verre d'épaisseur égale. Une couche uniforme de Sephadex de 0,5 mm d'épaisseur est déposée au moyen d'un applicateur mobile (\*\*).

10 à 15 minutes après l'étalement, les plaques sont prêtes à l'emploi. Elles peuvent être conservées plusieurs jours dans un récipient saturé en vapeur d'eau avant d'être utilisées.

γ) Chromatographie

5 µl d'une solution protéique à 12 mg/ml sont déposés dans le gel sans perturber sa surface. Sur une plaque de 20 cm de large on peut réaliser quatre dépôts à 4 cm du bord supérieur de la plaque.

La plaque est placée sur un chevalet mobile conçu de façon à ce qu'elle fasse un angle de 10° avec le plan horizontal. Un pont de papier Whatman 3 MM relie le réservoir de tampon à l'extrémité supérieure du gel.

---

(*) Tampon Tris : Trishydroxyméthylaminométhane	30 g
Chlorure de potassium	37,25 g
HCl 5,6 N qsp pH 7,5	(environ 30 ml)
Eau distillée	qsp 5 litres

(\*\*) Appareil DESAGA (Heidelberg)

Une bande de papier Whatman 1 est appliquée à l'extrémité opposée de la plaque de façon à régulariser le flux du tampon dans le gel. L'ensemble (plaque + réservoir à tampon) est placé dans une chambre humide et la chromatographie descendante est poursuivie pendant 15 heures. Ensuite, la plaque est séchée 30 minutes à 100°C et les protéines révélées par le colorant à l'Amidoschwarz précédemment décrit : le trempage dure 1 heure et la plaque est ensuite décolorée par des bains successifs de méthanol/acide acétique/eau (70:15:15).

c) Acide aminé N-terminal de la globine

Nous avons utilisé la méthode classique de SANGER (128).

α) Synthèse de la DNP-globine

La globine (25 à 30 mg) est dissoute dans 5 ml de solution de bicarbonate de sodium à 10 p. 100. On ajoute 10 ml de solution alcoolique de fluorodinitrobenzène (FDNB)(\*) à 5 p. 100 (vol/vol) préparée extemporanément. On maintient le mélange sous agitation magnétique pendant 2 à 3 heures à l'obscurité et à température ambiante. La solution est ensuite acidifiée par l'acide chlorhydrique concentré (jusqu'à cessation de l'effervescence) et le précipité de DNP-globine est lavé 2 ou 3 fois par l'acide chlorhydrique 0,05 N, 3 fois à l'alcool ou à l'acétone (\*\*)(jusqu'à surnageant incolore) puis à l'éther (1 fois) et séché.

β) Hydrolyse de la DNP-globine

La DNP-globine est hydrolysée totalement en tube scellé sous vide par l'acide chlorhydrique 6 N (\*\*\*) pendant 24 heures. L'hydrolysate dilué 4 fois est extrait 3 fois à l'éther privé de peroxydes (\*\*\*\*)

---

(\*) FDNB Merck

(\*\*) Dans tous nos essais, nous avons utilisé l'acétone commerciale préalablement redistillée dans les conditions suivantes : on élimine tête et queue de distillation et on recueille la fraction médiane qui distille à 56-57°C.

(\*\*\*) Acide chlorhydrique Merck à 37 p. 100 dilué de moitié par l'eau.

(\*\*\*\*) Ether sulfurique distillé 30 min à reflux sur chlorure stanneux, lavé par une solution aqueuse de carbonate de sodium à 20 p. 100, puis à l'eau distillée et finalement redistillé sur sulfate ferreux. On le conserve à l'abri de la lumière sur sulfate ferreux.

La phase étherée est lavée par un volume égal d'acide chlorhydrique 1 N puis évaporé à sec. Cet extrait étheré contient du dinitrophénol formé au cours de la dinitrophénylation, qui doit être éliminé avant la chromatographie par sublimation sous pression réduite à 70-80°C pendant 45 minutes (\*).

#### γ) Chromatographie

L'extrait étheré est alors soumis à une chromatographie ascendante sur papier Whatman n° 1 pendant 15 heures dans le système de BISERTE et OSTEUX (129) (Toluène/Pyridine/Monochlorhydrine du glycol/Ammoniaque 0,8 N ; 30:9:18:18). Après séchage, on effectue en deuxième dimension une chromatographie descendante pendant 15 heures dans le tampon phosphate 1,5 M de pH 6 préconisé par LEVY (130).

Remarque : Le DNP-glycocolle peut être totalement détruit dans les hydrolyses de 24 heures de la DNP-globine. En effectuant des hydrolyses de durée plus courte (8 à 16 heures), on retrouve le DNP-glycocolle accompagné de taches parasites qui correspondent à des DNP-peptides provenant d'une hydrolyse incomplète de la DNP-globine.

### B - HYDROLYSE CHYMOTRYPSIQUE

#### 1) Dénaturation préalable de la myoglobine

Afin de faciliter l'action enzymatique, la myoglobine est dénaturée avant l'hydrolyse chymotrypsique. Nous avons utilisé une technique de dénaturation douce par l'éthanol et le chlorhydrate de guanidine (BISERTE et HOLLEMAN) (131).

A une solution aqueuse de myoglobine à 10 mg par ml on ajoute du chlorhydrate de guanidine jusqu'à une concentration de 19,1 mg pour 1 ml (0,2 M) puis goutte à goutte 2 ml d'éthanol absolu pour 10 ml de solution. On laisse en contact toute une nuit sous agitation à température ambiante. Le lendemain on ajuste lentement la proportion d'éthanol à 3 volumes par volume de solution aqueuse de myoglobine et on continue l'agitation pendant 3 heures. L'addition de 6 volumes d'acétone précipite totalement la myoglo-

---

(\* ) Pompe rotative ALCATEL type 1025.

bine partiellement dénaturée que l'on recueille par centrifugation (à 5000 t/min pendant 5 à 10 minutes) et que l'on redissout dans la quantité minimum d'acide chlorhydrique 0,05 N (20 ml par gramme de globine). On ajoute sous forte agitation 8 volumes d'acétone contenant 2 p. 100 d'acide chlorhydrique concentré pour détacher l'hème. On centrifuge et répète cette opération deux fois. Enfin, on lave le précipité de globine à l'acétone. Après séchage sous le vide partiel d'une trompe à eau, on obtient une poudre grise, soluble dans l'eau.

### 2) Traitement de la chymotrypsine par le TLCK

200 mg de chymotrypsine cristallisée du commerce (\*) sont dissous dans 20 ml de tampon TRIS 0,01 M, de pH 6,0, 0,005 M en  $\text{CaCl}_2$  (\*\*) et soumis à une ultrafiltration à 4°C sur filtre Millipore 0,45  $\mu$ . Les pores laissent passer la chymotrypsine mais retiennent des impuretés insolubles représentant environ 10 p. 100 du poids initial mis en jeu. Au filtrat on ajoute 20 mg de TLCK (\*\*\*) préalablement dissous dans 2 ml de méthanol et on laisse l'incubation se poursuivre pendant 2 h 30 à température ambiante et sous agitation magnétique. La solution est ensuite à nouveau filtrée sur Millipore 0,45  $\mu$ , afin d'éliminer l'excès insoluble de TLCK, et dialysée une nuit à 4°C contre 2 litres d'acide chlorhydrique 0,01 N afin d'éliminer les ions métalliques bivalents, activateurs des carboxypeptidases A et B, qui peuvent éventuellement souiller les préparations de chymotrypsine. La solution d'enzyme est finalement lyophilisée et conservée à -15°C.

### 3) Hydrolyse chymotrypsique

Une solution aqueuse de globine (1 g pour 100 ml) partiellement dénaturée est tamponnée par addition de sesquicarbonate d'ammonium (concentration 1 g p. 100 ml). Le pH est ajusté à 9 par addition d'ammoniaque. On ajoute ensuite une quantité de chymotrypsine correspondant à un

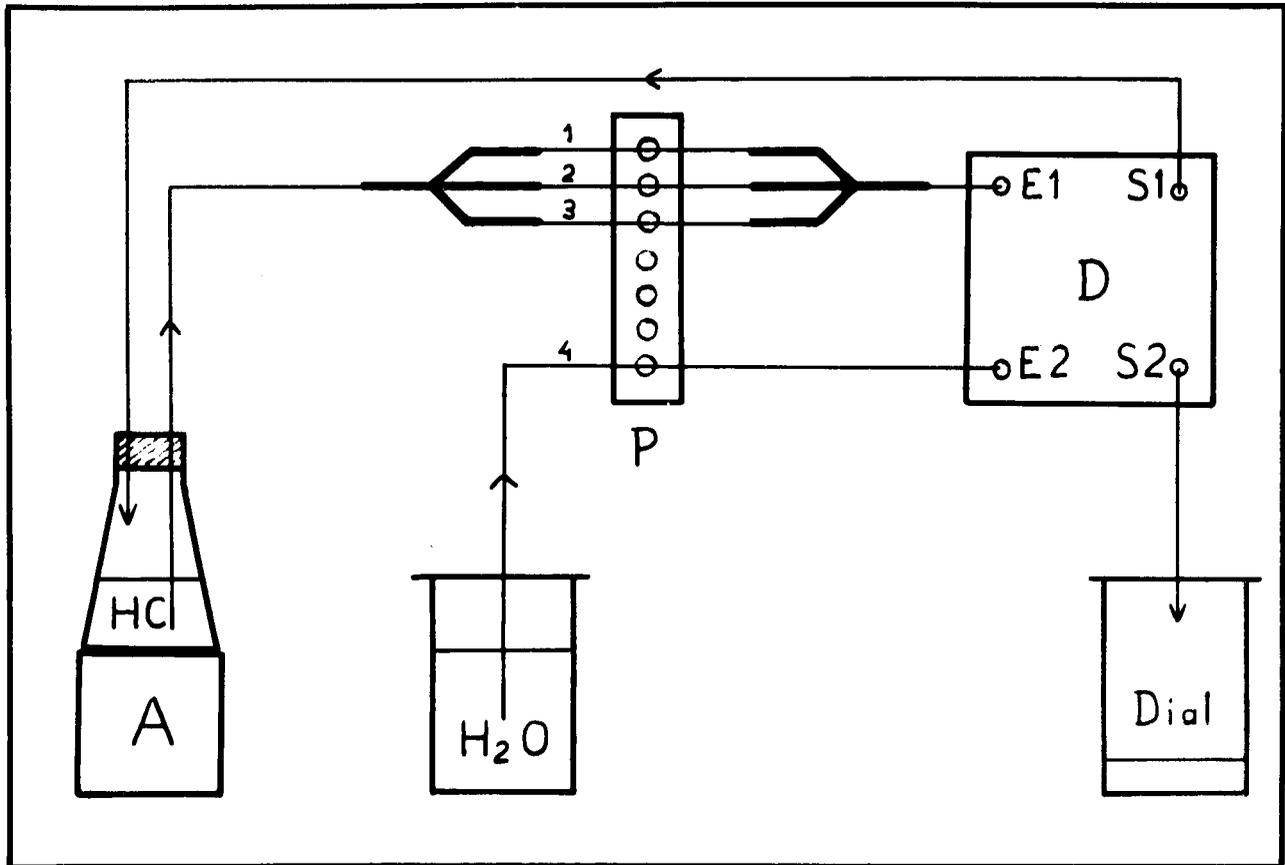
---

(\*) Chymotrypsine Worthington Biochemical Corporation, lot CD 537-40

(\*\*) Tampon TRIS : Tris                    122 mg  
                   $\text{CaCl}_2$                     55,5 mg  
                  Acide acétique            qsp pH 6,0  
                  Eau distillée                qsp 100 ml

(\*\*\*) Fournisseur : Mann Research Laboratories.





RIS  
LILLE

FIGURE 34  
DIALYSE DE L'HYDROLYSAT CHYMOTRYPSIQUE DE LA GLOBINE

- HC : Hydrolysate chymotrypsique
- A : Agitateur magnétique
- P : Pompe proportionnante
- 1,2,3 : Tuyaux "pourpres" (débit 2,5 ml/min pour chaque tuyau)
- 4 : Tuyau blanc (débit 0,6 ml/min)
- E1 : Entrée de la solution d'hydrolysate
- S1 : Sortie de la solution d'hydrolysate
- E2 : Entrée de l'eau distillée
- S2 : Sortie de l'eau distillée
- Dial : Solution de peptides dialysables
- D : Dialyseur

c) Remplissage de la colonne

A l'aide d'un entonnoir surmontant la colonne (entonnoir à rodage mâle), on verse la suspension de Sephadex et on la laisse se décanter dans la colonne par simple gravité. Une fois achevée cette opération (après plusieurs heures) on laisse couler le tampon pour tasser le gel, pendant une nuit environ. On enlève ensuite le surplus de gel par siphonnage. Le tassage de la colonne est achevé en aspirant le tampon à la sortie de la colonne au moyen d'une pompe proportionnante (\*), avec un débit identique à celui qui sera utilisé lors de la chromatographie.

d) Chromatographie

L'hydrolysate dialysé et lyophilisé est redissous dans le tampon pyridine 0,1 N-acide acétique de pH 4,9 (250 à 300 mg pour 2 ml), puis centrifugé afin d'éliminer les particules insolubles. On laisse couler le tampon surmontant le gel à travers la colonne jusqu'à ce qu'il en affleure la surface et à l'aide d'une seringue, garnie d'une aiguille à ponction lombaire dont la pointe a été sciée, on dépose sur cette surface la solution d'hydrolysate chymotrypsique dialysé ; lorsque cette solution est entièrement absorbée par le gel, on regarnit de tampon le haut de la colonne, on branche le réservoir de tampon sur la tête de la colonne ainsi que la pompe proportionnante à la sortie de la colonne et l'effluent est envoyé à un collecteur automatique (\*\*\*) au moyen d'un cathéter (\*\*\*). Le réservoir de tampon est placé 30 à 50 cm au dessus de la tête de la colonne, la pompe au niveau du bas de la colonne. Le collecteur doit être situé à un niveau inférieur à celui du réservoir. Le débit assuré par la pompe doit être légèrement inférieur au débit spontané de la colonne (débit en l'absence de pompe); dans ces conditions la pompe a pour seul effet de freiner le débit et de le régulariser

---

(\*) Pompe Technicon : débit 0,6 ml par minute.

(\*\*) Collecteur Technicon ; fonctionnement au temps : 10 minutes par tube.

(\*\*\*) Cathéter Biotrol n° 4 ou 5

à une valeur constante dans le temps, malgré l'évolution du tassement et des différences de niveau.

### 3) Electrophorèse préparative en film liquide

L'appareil utilisé est l'appareil ELPHOR-VAP construit par BENDER et HOBEIN (Munich).

Les conditions expérimentales sont les suivantes :

- Concentration peptidique : 300 à 400 mg dans 15 ml de tampon (tampon d'électrophorèse).
- Débit de la solution peptidique : 2,6 à 2,8 ml/heure.
- Débit du tampon : 114 ml/heure.
- Le tampon d'électrophorèse est un tampon pyridine 0,033 M-acide acétique 0,156 M de pH 3,9.
- Le tampon d'électrode est un tampon pyridine 0,1 M-acide acétique 0,468 M de pH 3,9.
- L'injection du tampon d'électrophorèse entre les deux plaques de verre (film liquide de 0,5 mm d'épaisseur) se fait par six trous. Dans les trous 1 et 6 on injecte le tampon d'électrode, dans les quatre autres le tampon d'électrophorèse trois fois plus dilué.
- La solution peptidique est introduite au point d'injection n° 5, (\*) du côté anodique.
- La tension aux bornes est de 1350 volts, soit 27 volts par cm, l'intensité est de 165 mA ; la température est maintenue à 5°C.

### 4) Dosage automatique des fractions à l'autoanalyseur

Les réactions de FOLIN-LOWRY, de SAKAGUCHI et de PAULY sont effectuées à l'aide des "manifolds" décrits dans les techniques publiées par la Compagnie Technicon (adaptées à l'utilisation de colorimètres à

---

(\*) Les points d'injection de la solution peptidique sont différents de ceux du tampon.

cuves non tubulaires). Pour la réaction à la ninhydrine et celle de SPIES et CHAMBERS (pour le tryptophane) nous avons utilisé les deux montages décrits à propos des figures 35 et 36.

5) Chromatographie sur échangeur d'ions

a) Chromatographie sur Dowex 50W X 2

α) Préparation de la colonne

La résine préalablement tamisée selon la méthode hydraulique de HAMILTON (voir Chapitre IV) est mise en suspension dans le tampon initial de la chromatographie, chauffée au bain-marie à 60°C et, à l'aide d'une ampoule de remplissage spéciale, versée dans la colonne maintenue à 50°C (\*). On laisse décanter une nuit et on élimine l'excédent de résine par aspiration à la trompe à eau. La résine est alors tassée sous pression de 0,5 kgp par cm<sup>2</sup> (\*\*\*) avec un débit de 0,6 ml par minute.

β) Chromatographie

La colonne est maintenue à 40°C. Le tampon qui surmonte la résine est éliminé avant le dépôt d'échantillon. Le mélange peptidique est dissous dans 1 à 2 ml du tampon initial de chromatographie, centrifugé pour éliminer les particules insolubles et déposé à la surface de l'échangeur d'ions. On le laisse s'absorber par simple gravité puis on rince par 1 ml de tampon ; on regarnit ensuite de tampon la partie supérieure de la colonne et on branche alors la tête spéciale (\*\*\*) reliée à la pompe.

Les tampons, avant d'être pompés, circulent dans un dégazeur maintenu à 60°C, ce qui évite la formation de bulles gazeuses dans la résine du fait de la chute de pression entre le haut et le bas de la colonne.

---

(\*) Colonne de 130 cm de long et 0,9 cm de diamètre à jaquette de circulation d'eau. Elle comporte à sa partie supérieure un rodage sphérique normalisé de 18 mm de diamètre sur lequel s'adaptent à la fois l'ampoule spéciale de remplissage et une "tête" à rodage correspondant par laquelle arrivent les tampons éluants.

(\*\*) Pression obtenue à l'aide d'une pompe Milton Roy modèle 1-B-29 : pression maximum 70 kgp/cm<sup>2</sup> ; débit maximum 144 ml/heure (30 tours/min).

(\*\*\*) Tête de colonne à rodage sphérique normalisé : 18 mm de diamètre extérieur, 2 mm de diamètre intérieur (voir note (\*)).

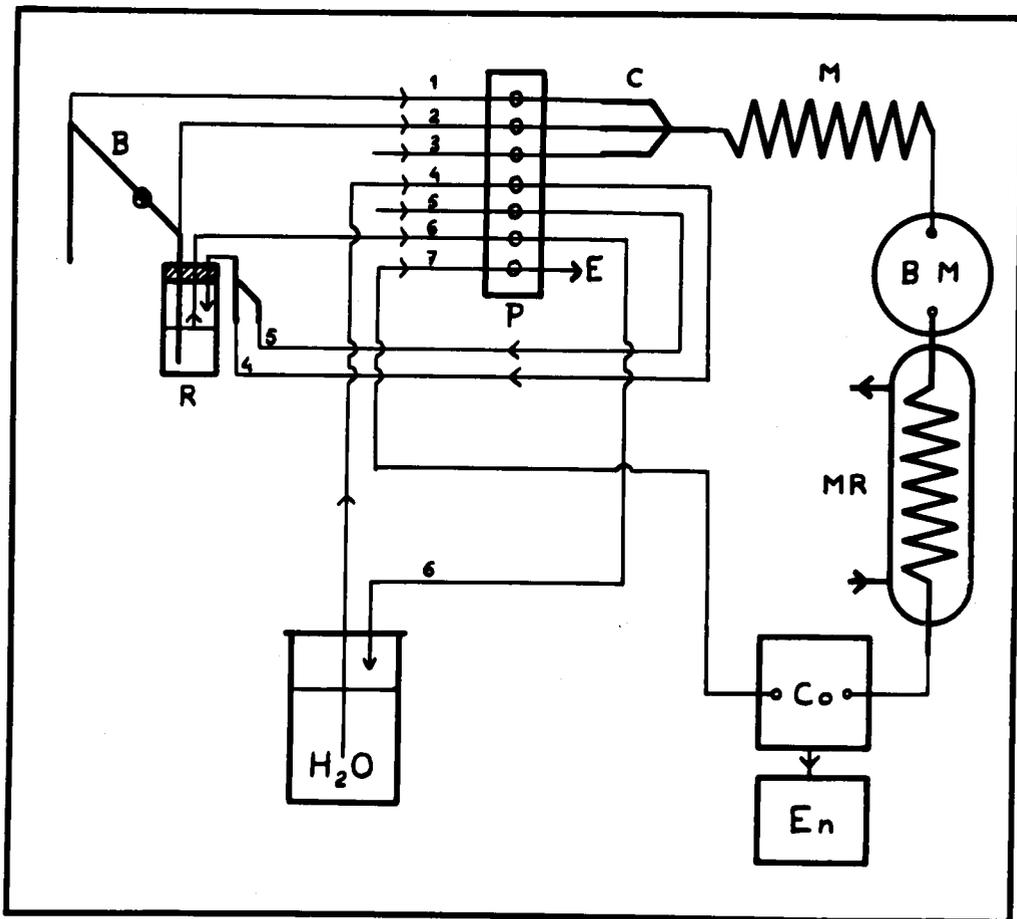


FIGURE 36

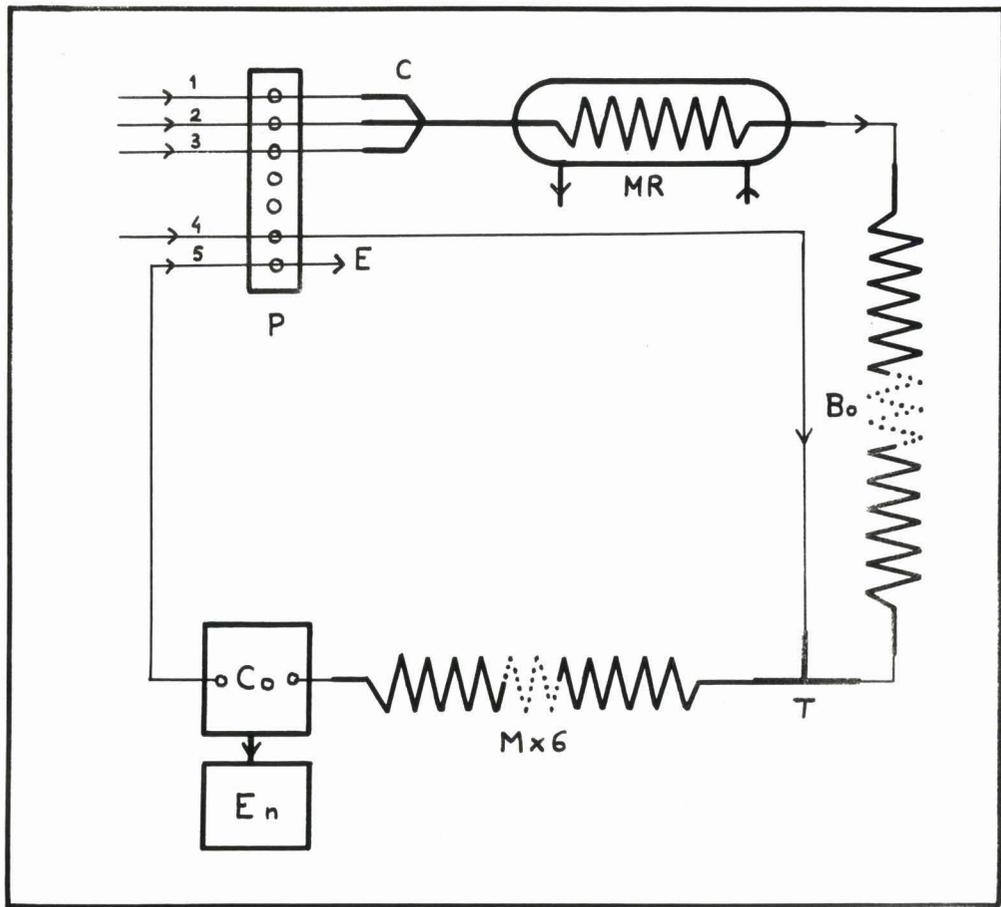
DOSAGE AUTOMATIQUE TUBE A TUBE A L'AUTOANALYSEUR POUR LA REACTION DE SPIES ET CHAMBERS

- P = Pompe proportionnante ;  
1 = Pompage d'échantillon (tuyau noir, débit 0,32 ml par minute) ;  
2 = Pompage d'air (tuyau noir) ;  
3 = Pompage du réactif au p.diméthylaminobenzaldéhyde (\*) (tuyau acidflex, débit 1,2 ml par minute) ;  
4 = Pompage (tuyau noir) d'une solution de nitrite de sodium à 0,04 g p. 100 ml d'eau (préparation extemporanée) ;  
C = "Cactus" à 2 branches capillaires 1 et 2 ;  
MR = Bobine de refroidissement à circulation d'eau ;  
Bo = Bobine de délai en verre, soit 450 cm de tube de verre de 3 mm de diamètre (environ 17 minutes de trajet) ;  
T = T capillaire dans la branche nitrite de sodium ;  
MX 6 = 6 bobines de mélange ;  
Co = Colorimètre (filtres à 660 m $\mu$  ; cuve tubulaire de 15 mm d'épaisseur) ;

Comme pour la figure 35, à l'entrée du colorimètre, un "T débulleur" permet l'envoi direct à l'évier de l'excès de liquide et des bulles d'air ;

- En = Enregistreur ;  
5 = Retour de colorimètre vers l'évier (E) (tuyau acidflex, débit 1,2 ml par minute).

(\*) Formule du réactif : p.diméthylaminobenzaldéhyde 0,3 g pour 100 ml d'acide sulfurique à 60 p. 100 (en volume).



L'effluent de la colonne est envoyé au collecteur de fractions (collecteur Technicon fonctionnant au temps - 10 minutes par tube) au moyen d'un cathéter, type Biotrol n° 4 ou 5.

γ) Régénération de la résine

Après la chromatographie, la résine est retirée de la colonne par aspiration à la trompe à eau en vue de sa régénération. Celle-ci se fait par lavage en vase cylindrique par l'acide chlorhydrique 1 N pendant 1 heure sous agitation magnétique, puis par l'eau, jusqu'à neutralité du surnageant, enfin par le tampon initial utilisé pour la chromatographie. La résine est alors prête pour un nouveau cycle. Il n'est pas possible d'effectuer cette régénération dans la colonne en raison de la contraction de la résine en fin de chromatographie, du fait de la forte concentration en pyridine : le volume final de la résine est d'environ 60 p. 100 de celui qui est noté au début de la chromatographie. Au cours de la régénération, le retour à une concentration nulle en pyridine et à un pH acide provoque une augmentation de volume de la résine : dans la colonne, cette expansion provoquerait au fur et à mesure de la régénération une augmentation considérable de la pression pouvant entraîner l'éclatement de la colonne ou des conduits.

b) Chromatographie sur Chromobeads P

α) Préparation de la colonne

La résine est mise en suspension dans le tampon pyridine 2,0 N - acide acétique de pH 5,0 (\*) et versée à l'aide d'une ampoule dans la colonne (\*\*) maintenue à 50°C. On la laisse décanter une nuit par gravité, puis on se débarrasse de l'excédent de résine par aspiration à la trompe à eau, on enlève l'ampoule et on tasse la résine sous pression (\*\*\*) (environ 20 kgp par cm<sup>2</sup>) avec un débit de 0,6 ml par minute pendant 2 heures. On équilibre ensuite la résine au pH désiré par pompage pendant

---

(\*) Formule du tampon : pyridine : 644 ml  
acide acétique : 400 ml + qsp pH 5,00 (environ 40 ml)  
eau distillée qsp 4 litres

(\*\*) Colonne Technicon 140 x 0,635 cm à jaquette de circulation d'eau

(\*\*\*) Pression obtenue à l'aide d'une pompe Milton Roy (voir plus haut).

2 à 3 heures du tampon initial utilisé pour la chromatographie (tampon pyridine 0,1 N de pH 2,90 ou 4,25) (\*). Pendant cette opération, la pression diminue jusqu'à 14 kgp par cm<sup>2</sup> environ.

### β) Chromatographie

Le mélange peptidique est dissous dans 0,5 ml du tampon initial de la chromatographie. On ajoute après dissolution 0,5 ml de sirop de saccharose à 30 g pour 100 ml ou mieux 0,5 ml de glycérine. Après homogénéisation, le mélange est déposé directement à l'aide d'une seringue à la surface de la résine sous la couche de tampon. On branche alors la tête de colonne et, dès la mise en route de la pompe, l'échantillon pénètre dans la résine. Cette méthode est beaucoup plus commode et rapide que celle utilisée pour la Dowex 50W X 2.

Remarque : Pour les peptides basiques en électrophorèse préparative en film liquide (exemple des fractions S2E3 ou S2E2) on peut indifféremment dissoudre les mélanges peptidiques dans le tampon initial de la chromatographie ou dans l'eau. Pour les fractions neutres, au contraire, il faut dissoudre les peptides dans le tampon initial et acidifier par l'acide formique jusqu'à obtention d'un pH inférieur à celui du tampon (par exemple 2,5 pour le tampon de pH 2,90).

Comme dans le cas de la Dowex 50W X 2 les tampons, avant d'être pompés, circulent dans un dégazeur maintenu à 60°C, ce qui évite la forma-

#### (\*) Formule du tampon pyridine 0,1 N de pH 2,90 :

Pyridine 40 ml,  
Acide formique pur 80 ml,  
Eau distillée 4,5 litres,  
Acide formique dilué au 1/10 qsp pH 2,90 (environ 70 ml),  
Eau distillée qsp 5 litres.

#### Formule du tampon pyridine 0,1 N de pH 4,25 :

Pyridine 32 ml,  
Acide formique pur 10 ml,  
Eau distillée 3,5 litres,  
Acide formique dilué au 1/10 qsp pH 4,25 (environ 65 ml),  
Eau distillée qsp 4 litres.

tion de bulles gazeuses dans la résine du fait de la chute de pression très importante entre le haut et le bas de la colonne.

γ) Régénération de la résine

La pression en fin de chromatographie atteint normalement 21 à 25 kgp par  $\text{cm}^2$ . La variation de volume de la résine au cours de la chromatographie est très faible. On peut donc régénérer la résine dans la colonne par simple pompage du tampon initial de la nouvelle chromatographie. Pendant la régénération, la pression baisse jusqu'à environ 14 kgp par  $\text{cm}^2$ . Au bout de 5 ou 6 chromatographies, il est nécessaire de détasser la résine, car la pression finale atteint ou dépasse 30 kgp par  $\text{cm}^2$ , et la régénération ne permet pas de retrouver une pression de 14 kgp par  $\text{cm}^2$ .

6) Electrochromatographie sur papier

Les peptides isolés ont été contrôlés du point de vue de leur homogénéité par les techniques classiques d'électrophorèse et de chromatographie sur papier décrites par PLAQUET, BISERTE et BOULANGER (132).

En première dimension (\*) d'une feuille de papier Whatman n° 1 ou 3 on effectue une électrophorèse en toit à pH 3,9 en tampon pyridine-acide acétique-eau (60:200:9740) (\*\*). En deuxième dimension, on effectue une chromatographie descendante pendant 18 heures dans le système solvant n-butanol-acide acétique-eau (4:1:5).

Les fractions hétérogènes ont parfois été purifiées par ces mêmes techniques. Nous avons alors utilisé du papier Whatman n° 3 préalablement lavé successivement par les deux phases, aqueuse et organique, du solvant précédent.

Pour les purifications chromatographiques, ce même solvant a été utilisé en chromatographie descendante pendant 18 à 24 heures. Pour

(\*) Il s'agit de la plus grande dimension de la feuille.

(\*\*) Durée : 7 heures sous 600 volts ou 15 heures sous 400 volts.

les séparations électrophorétiques, nous avons employé la technique d'électrophorèse en toit avec le tampon précédent de pH 3,9 ou avec des tampons pyridine-acide acétique-eau (200:8:1792) de pH 6,5 ou acide formique-acide acétique-eau (5:15:80) de pH 1,7. Les voltages mis en oeuvre sont de l'ordre de 400 à 600 volts pendant 5 à 7 heures.

L'électrophorèse à haut voltage a également été utilisée avec l'appareil GILSON GME : les feuilles de papier Whatman n° 1 sont trempées dans le tampon d'électrophorèse (\*), essorées entre deux feuilles de papier-filtre, puis laissées à l'air pendant 15 minutes à température ambiante. On dépose sur un trait de départ à 12 cm du bord de la feuille (côté anodique) 25 à 50  $\mu$ l de solution peptidique (concentration : 1 mg par ml environ). La migration dure 20 minutes dans le sens de la plus grande dimension de la feuille. La tension est de 5000 volts avec une intensité de 250 mA.

#### D - TECHNIQUES D'ETUDE DES SEQUENCES PEPTIDIQUES

##### 1) Hydrolyse totale et composition en amino-acides

Le peptide (0,2 à 0,5  $\mu$ Mole) est hydrolysé par l'acide chlorhydrique 6 N (\*\*\*) (4 ml) en tube scellé sous vide (\*\*\*) à 105°C pendant 24 heures. La composition en acides aminés est déterminée par une méthode de dosage automatique (Autoanalyseur Technicon).

##### 2) Acide aminé N-terminal

###### a) Méthode des DNP-amino-acides de SANGER

Ainsi que nous l'avons vu au Chapitre V, nous avons utilisé soit la méthode à la triméthylamine de SANGER et THOMPSON (133), soit la

---

(\*) Tampon acide formique-acide acétique-eau (5:15:80) de pH 1,7

(\*\*) Acide chlorhydrique Merck à 37 p. 100 dilué de moitié par l'eau distillée au moment de l'emploi.

(\*\*\*) Tube de 30 cm de long et de 14 mm de diamètre intérieur en verre pyrex.

méthode au bicarbonate de sodium dans le cas des peptides à amino-acides basiques et aromatiques.

α) Méthode à la triméthylamine

Le peptide (0,2 à 0,5 μMole) est dissous dans 1 ml de solution de triméthylamine à 1 p. 100. On ajoute 2 ml d'éthanol contenant 10 μl de 1-fluoro-2-4-dinitrobenzène (FDNB) (\*) et on laisse en contact 2 à 3 heures à l'obscurité sous agitation magnétique à température ambiante. L'alcool est ensuite éliminé soit par distillation sous pression réduite, soit plus simplement par évaporation à l'évaporateur rotatif à 40°C. La solution aqueuse de peptide, réalcalinisée par addition de quelques gouttes de solution de triméthylamine, est extraite à l'éther redistillé (3 fois), pour éliminer l'excès de FDNB (\*\*). La phase aqueuse, concentrée à l'évaporateur rotatif (jusqu'au volume de 2 à 3 ml), est hydrolysée par un égal volume d'acide chlorhydrique (Merck à 37 p. 100) en tube scellé sous vide, à 105°C pendant 24 heures. L'hydrolysate est soumis à la chromatographie des DNP-amino-acides (voir paragraphe A).

β) Méthode au bicarbonate de sodium

Le peptide est dissous dans 1 ml de solution de bicarbonate de sodium à 10 g/100 ml. La dinitrophénylation est conduite de la même façon que précédemment.

Remarque : Dans le cas de peptides à lysine ou histidine, la dinitrophénylation est effectuée à 37°C.

b) Méthode des DANSYL-amino-acides (GRAY et HARTLEY) (134)

Technique de WOODS et WANG (135)

α) Dansylation du peptide

La solution de peptide (1 à 2 nano moles dans 10 μl d'eau) est placée dans un tube de verre spécial (\*\*\*) . On ajoute 10 μl de solution de

---

(\*) FDNB Merck.

(\*\*) Au cours de cette extraction de l'excès de FDNB, les deux peptides contenant des acides aminés basiques et aromatiques peuvent passer dans la phase étherée par suite de l'ionisation insuffisante du milieu. Pour ces peptides, la méthode au bicarbonate est de beaucoup préférable.

(\*\*\*) Tube Teswell Warner-Chilcott : 26 mm de long, 5 mm de diamètre intérieur.

bicarbonate de sodium 0,2 M et 20  $\mu$ l de solution acétonique de chlorure de l'acide 1-diméthyl-amino-naphtalène-5-sulfonique (chlorure de DANSYL) (\*) à 1 mg pour 1 ml. On bouche le tube avec une feuille de papier paraffiné (\*\*\*) et on laisse en contact 2 à 6 heures à l'obscurité et à température ambiante. Le tube est ensuite placé dans un dessiccateur en présence d'acide sulfurique et son contenu évaporé à sec sous vide partiel (trompe à eau). On introduit ensuite dans le tube 50  $\mu$ l d'acide chlorhydrique 6 N et on hydrolyse à 105°C pendant 16 heures. Pour cette opération le tube peut être soit scellé directement, ce qui représente de grandes difficultés techniques en raison de ses dimensions très réduites, soit placé dans la partie supérieure d'un tube (\*\*\*) dont le tiers inférieur, isolé par un étranglement est rempli d'acide chlorhydrique 6 N.

L'hydrolysate est séché dans un dessiccateur en présence de pastilles de soude sous vide partiel (trompe à eau), puis repris dans 50  $\mu$ l d'un mélange acétone-acide acétique (3 : 2) en vue de la chromatographie.

### B) Chromatographie des DANSYL-amino-acides

Nous avons utilisé la chromatographie en couche mince sur gel de silice G. Merck.

25 g de gel en suspension dans 50 ml d'eau sont étalés (\*\*\*\*) en une couche de 0,25 mm d'épaisseur sur cinq plaques de verre de 20 x 20 cm juxtaposées. On laisse sécher les plaques plusieurs heures à température ambiante, puis 1 heure à 100°C (avant l'usage).

L'hydrolysate est déposé à 3 cm de chacun des bords de la plaque. La migration dans le premier système solvant se fait perpendiculairement au sens d'étalement du gel.

---

(\*) Chlorure de DANSYL Sigma : Solution conservée à l'obscurité et à 4°C.

(\*\*) Parafilm "M" Marathon American Can Company

(\*\*\*) Tube de verre Pyrex de 20 cm de long et 14 mm de diamètre intérieur.

(\*\*\*\*) Appareil identique à celui utilisé pour le Sephadex (Voir paragraphe A.31).

La plaque est réactivée 10 minutes à 100°C après la première dimension et soumise à une deuxième migration (dans un sens perpendiculaire à la première). Avant la migration, on laisse la plaque se saturer dans la cuve en vapeur de solvant pendant 30 minutes. Chaque migration dure de 45 à 75 minutes environ.

Nous avons utilisé les systèmes solvants décrits par SEILER et WIECHMANN (136).

En première dimension un solvant acétate de méthyle-isopropanol ammoniacale concentrée (45:35:20), en deuxième dimension un solvant chloroforme-méthanol-acide acétique (75:20:5) ou chloroforme-acétate d'éthyle-méthanol-acide acétique (30:50:20:1).

### 3) Hydrazinolyse

Nous avons utilisé une technique dérivée de celle de NIU et FRAENKEL-CONRAT (137). Le peptide (0,5  $\mu$ Mole) en solution dans l'eau est placé dans un tube conique spécial (\*), évaporé à sec en dessiccateur sous vide en présence de soude en pastilles, puis séché pendant une journée sous vide poussé (\*\*\*) en présence d'anhydride phosphorique. On ajoute 1 ml d'hydrazine à 98 p. 100 et on place le tube conique dans un tube à essai que l'on scelle. L'ensemble est maintenu pendant une nuit (16 heures) à l'étuve à 70°C. Le contenu du tube est ensuite évaporé à sec sous vide en présence d'acide sulfurique, repris par 1 ml d'eau et centrifugé ; le surnageant est extrait 3 fois par 1 ml de benzaldéhyde (afin d'éliminer au maximum les hydrazides). L'excès de benzaldéhyde est extrait à l'éther (1 ml) et la phase aqueuse est séchée sous vide sur soude en pastilles. On reprend ensuite par 0,5 ml d'eau et on identifie l'acide-amino C-terminal par les techniques d'électrophorèse et de chromatographie déjà décrites.

---

(\*) Tube de 10 mm de diamètre intérieur et de 9 cm de long, dont 2 cm de partie conique et 2 cm de rodage (rodage femelle) à bouchon rodé.

(\*\*) Pompe à huile ALCATEL (type 1025).

#### 4) Méthode d'EDMAN

Nous avons utilisé une technique analogue à celles de SMITH (138) et de KÖNIGSVERG (139).

Le peptide (0,5  $\mu$ mole) dissous dans 0,5 ml d'eau est placé dans un tube analogue à celui qui est utilisé pour la technique d'hydrazinolyse. On ajoute 100  $\mu$ l de solution aqueuse de triméthylamine à 25 p. 100 et 500  $\mu$ l de solution de phénylisothiocyanate à 2 p. 100 (vol/vol) dans la pyridine (\*). On laisse en contact 1 heure à 40°C sous barbotage d'azote, puis on rajoute 10  $\mu$ l de phénylisothiocyanate pur et laisse de nouveau 1 heure à 40°C sous barbotage d'azote. Puis après addition de 300  $\mu$ l d'eau, on extrait 5 fois par 1,5 ml de benzène (\*\*\*) pour éliminer l'excès de phénylisothiocyanate. Après chaque extraction, le tube est centrifugé pour accélérer la décantation. Le benzène résiduel est finalement éliminé par un barbotage d'azote à 30°C pendant 15 minutes. La phase aqueuse est alors séchée sous vide (\*\*\*) en présence de pastilles de soude.

Après séchage, on ajoute 2 ml d'acide trifluoroacétique anhydre et on laisse en contact 1 à 2 heures à 20-25°C. Après un nouveau séchage sous vide en présence de pastilles de soude, le contenu du tube est repris par 0,5 ml d'acide chlorhydrique 0,01 N. La phénylthiohydantoïne formée est extraite à l'éther saturé d'eau (4 fois 1 ml).

La phase aqueuse résiduelle est évaporée à sec sous vide en présence de soude en pastilles en vue d'un nouveau cycle : elle est reprise dans 0,5 ml d'eau et on en prélève 10 à 20  $\mu$ l pour déterminer par la méthode des DANSYL-amino-acides le nouveau résidu N-terminal.

---

(\*) Pyridine Merck

(\*\*) Benzène Merck

(\*\*\*) Le vide partiel de la trompe à eau a été utilisé pour toutes les opérations en dessiccateur nécessitées par cette technique.

5) Hydrolyse par la leucineaminopeptidase

a) Préparation de l'enzyme

10 mg de leucineaminopeptidase (\*) sont dissous dans 1 ml de Tampon Tris 0,1 M de pH 8,5 (\*\*). On ajoute 1 ml de solution de chlorure de manganèse 0,01 M (1,98 g p. 100 ml) et la solution enzymatique obtenue est conservée à - 15°C.

b) Hydrolyse

Une quantité de peptide de l'ordre de 1  $\mu$ mole en solution dans l'eau est lyophilisée et reprise dans 1 ml de tampon Tris 0,1 M de pH 8,5 ou mieux de véronal de pH 8,5 (\*\*\*) . On ajoute 1 ml de solution de chlorure de manganèse 0,01 M et on laisse le mélange 20 minutes à 37°C. On ajoute ensuite la solution de leucineaminopeptidase, en général 100  $\mu$ l, parfois 20 à 30  $\mu$ l si on désire limiter la vitesse d'hydrolyse. L'hydrolyse est effectuée à 37°C et sa durée varie de 5 minutes à 24 heures.

S'il s'agit d'une étude cinétique, une quantité connue de norleucine est incorporée à la solution peptidique avant l'hydrolyse. Des prélèvements sont effectués à des temps variables au cours de l'hydrolyse et les acides aminés libérés sont dosés à l'Autoanalyseur. L'hydrolyse est arrêtée par une ébullition de 5 minutes au bain-marie bouillant. La solution est ensuite filtrée sur papier Whatman n° 1 et lyophilisée.

6) Hydrolyse par les carboxypeptidases A et B

a) Préparation de l'enzyme

$\alpha$ ) Carboxypeptidase A

On prélève 5  $\mu$ l de la suspension commerciale de DFP-carboxy-

---

(\*) KOCH-LIGHT (lot 16 855) et SIGMA (lot 66 B 2570).

(\*\*) Formule du tampon :      Tris                    1,22 g  
                                  HCl dilué  
                                  au 1/2    qsp pH 8,5  
                                  Eau                    qsp 100 ml

(\*\*\*) Le Tris gêne en effet les migrations électrophorétiques des acides aminés et donne en outre à l'Autoanalyseur un pic au niveau de l'isoleucine.

Formule du tampon véronal :      Véronal sodé                    20,618 g  
                                  Acide chlorhydrique  
                                  (dilué au 1/2)    qsp    pH 8,5  
                                  Eau distillée    qsp                    1 litre

peptidaseA(\*) que l'on dilue dans 50  $\mu$ l de solution de chlorure de lithium à 10 g pour 100 ml. On laisse une nuit à 4°C (tube à DANSYL-amino-acide bouché par une feuille de Parafilm "M"). Le lendemain la solution enzymatique diluée est limpide et propre à l'emploi.

### β) Carboxypeptidase B

On prélève 10  $\mu$ l de suspension commerciale de DFP-carboxypeptidase B (\*\*\*) que l'on dilue dans 100  $\mu$ l de solution de chlorure de lithium à 10 g p. 100 ml. On procède ensuite comme pour la carboxypeptidase A.

#### b) Hydrolyse

Le peptide (1  $\mu$ Mole environ) est dissous dans 2 ml de tampon acétate d'ammonium 0,1 M de pH 7,5 (\*\*\*) et placé 20 minutes à 37°C. On ajoute alors la solution enzymatique, 5 à 10  $\mu$ l pour la carboxypeptidase A, 25  $\mu$ l pour la B, et on laisse incuber 24 heures à 37°C. De nouvelles additions d'enzyme sont effectuées au bout de 4 et 8 heures d'hydrolyse.

Des prélèvements sont faits à des temps variables. Les amino-acides libérés sont dosés à l'Autoanalyseur (\*\*\*\*) ou identifiés par électrochromatographie sur papier. L'hydrolyse est arrêtée par acidification par l'acide formique ou par simple congélation. L'hydrolysats est finalement lyophilisé.

### 7) Coupure chimique des peptides

Nous avons utilisé dans certains cas le clivage des liaisons histidyl par la N-bromosuccinimide selon la technique de SCHALTIEL et PATCHORNIK (140). Le peptide (0,4  $\mu$ Mole) est dissous dans 6 ml de tampon pyridine-acide acétique-eau (2:20:38) de pH 3,3.

La N-bromosuccinimide (NBS) est dissoute dans le même tampon (10,7 mg pour 10 ml). Aux 6 ml de solution peptidique on ajoute 0,7 ml

---

(\*) Sigma (lot 124 B - 1850) ; suspension à 100 mg pour 2 ml.

(\*\*) Sigma (lot 17 B 1070) ; suspension à 10 mg pour 1 ml.

(\*\*\*) Solution d'ammoniaque 0,2 M (1,65 ml d'ammoniaque concentrée pour 100 ml d'eau) ajustée à pH 7,5 par l'acide acétique. On mélange cette solution tamponnée à parties égales avec la solution aqueuse de peptide.

(\*\*\*\*) Dans ce cas, une certaine quantité de norleucine est incorporée à la solution peptidique avant l'hydrolyse, tout comme dans l'hydrolyse par la leucineaminopeptidase.

de la solution de NBS, ce qui correspond à 10 moles de NBS pour 1 mole d'histidine. On laisse en contact 15 minutes à température ambiante et on ajoute ensuite 10 mg d'imidazole pour détruire l'excès de NBS. On porte ensuite le mélange à 100°C pendant 1 heure (en tube scellé). La solution est finalement lyophilisée. Les peptides libérés sont ultérieurement isolés par chromatographie ou électrophorèse sur papier, puis identifiés par leur DANSYL-amino-acide terminal et leur composition en acides aminés (l'histidine, modifiée sous l'action de la NBS, ne peut plus être mise en évidence).

### 8) Hydrolyse pepsique des peptides

Le peptide (5  $\mu$ Mole) est dissous dans 1 ml d'acide formique à 5 p. 100 (pH 1,8). On ajoute 40  $\mu$ l d'une solution de pepsine (\*) à 5 mg pour 1 ml et on laisse l'incubation se poursuivre 24 heures à 37°C. (ACHER et CHAUVET) (141).

L'hydrolysate est ensuite lyophilisé. Les peptides libérés sont ensuite séparés par les techniques d'électrophorèse et de chromatographie sur papier et étudiés comme dans le cas de l'action de la NBS à la fois du point de vue de leur composition en amino-acides et de leurs résidus N- et C-terminaux.

---

(\*) Pepsine LIGHT.

BIBLIOGRAPHIE

- AKESON A. et THEORELL H., Arch. Biochem. Biophys., 1960, 91, 319 (16, 82).
- ATASSI M.Z., Nature, 1964, 202, 496 (86, 89, 95).
- ATASSI M.Z., J. Theoret. Biol., 1966, 11, 227 (126).
- ATASSI M.Z. et SAPLIN B.J., Biochem. J., 1966, 98, 82 (22, 84).
- AWAD E., CAMERON B. et KOTITE L., Nature, 1963, 198, 1201 (74).
- AWAD E. et KOTITE L., Biochem. J., 1966, 98, 909 (96).
- BENESCH R., RANNEY H.M., BENESCH R. et SMITH G.M., J. Biol. Chem., 1961, 236, 2926 (125 c).
- BERNARD S., HAVEZ R., DAUTREVAUX M. et BISERTE G., Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, 43, 1281 (31).
- BISERTE G. et HOLLEMAN J.W., Biochim. Biophys. Acta, 1959, 33, 143 (113 bis, 119 bis, 131).
- BISERTE G. et OSTEUX R., Bull. Soc. Chim. Biol., 1951, 33, 50 (129).
- BOARDMAN N.K. et ADAIR G.S., Nature, 1956, 177, 1078 (15, 73, 81).
- BOERHAVE M., Institutions de Médecine, I, p. 275, PARIS, 1739 (4).
- BOYER S.H., FAINER D.C. et NAUGHTON M.A., Science, 1963, 140, 1228 (72).
- BRADLEY T.B. Jr., WOHL R.C. et RIEDER R.F., Science, 1967, 157, 1581 (55).
- BROWN W.D., J. Food Sci., 1962, 27, 26 (70).
- BROWN W.D., MARTINEZ M. et OLCOTT M.S., J. Biol. Chem., 1962, 237, 81 (24).
- CANN J.R., Biochemistry, 1965, 4, 2368 (53).
- CHARACHE S.D., WEATHERHALL D.J. et CLEGG J.B., J. Clin. Investig., 1966, 45, 813 (125 d).
- CHAUVET J. et ACHER R., Bull. Soc. Chim. Biol., 1967, 49, 985 (141).
- DAUTREVAUX M. et BERNARD S., Bull. Soc. Chim. Biol., 1962, 44, 965 (17).
- DAUTREVAUX M., BOULANGER Y. et BISERTE G., Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, 43, 533 (112 bis).
- DAUTREVAUX M., HAN K.K., BOULANGER Y. et BISERTE G., Bull. Soc. Chim. Biol., 1967, 49, 1073 (119, 120, 122), et Bull. Soc. Chim. Biol., sous presse (113, 114, 121 bis, 123).

- DRABKIN D.L., J. Biol. Chem., 1950, 182, 317 (69).
- EDMAN P., Acta Chem. Scand., 1950, 4, 283 (35, 112).
- EDMAN P. et BERG G., European J. Biochem., 1967, 1, 80 (43, 124 bis).
- EDMUNDSON A.B., Nature, 1965, 205, 883 (3, 12, 33, 38, 40, 41, 102, 121).
- EDMUNDSON A.B., Nature, 1963, 198, 354 (41).
- EDMUNDSON A.B. et HIRS C.H.W., Nature, 1961, 190, 663 (20, 83).
- GONDKO R., SCHMIDT M. et LEYKO W., Biochim. Biophys. Acta, 1964, 86, 190.  
(75).
- GRAY W.R. et HARTLEY B.S., Biochem. J., 1963, 89, 59P et 379 (111, 134).
- GRATECOS D. et ROVERY M., Biochim. Biophys. Acta, 1967, 140, 410 (97 bis).
- HALEY E.E., CORCORAN B.J., DORER F.E. et BUCHANAN D.L., Biochemistry,  
1966, 5, 3229 (115).
- HALEY E.E. et CORCORAN B.J., Biochemistry, 1967, 6, 2669 (116).
- HAMILTON P.B., Anal. Chem., 1958, 30, 914 (107).
- HANNIG K., Z. Physiol. Chem., 1964, 338, 211 (105).
- HARDMAN K.D., EGLAR E.H., RAY D.K., BANASZAK L.J. et GURD F.R.N.,  
J. Biol. Chem., 1966, 241, 432 (68, 71, 94).
- HARRIS C.M., Thèse de Doctorat, 1965, Duke University, Michigan, U.S.A.,  
(44).
- HAUROWITZ F., Z. Physiol. Chem., 1935, 232, 125 (64).
- HAUROWITZ F. et HARDIN R.L., in The Proteins, edited by H. NEURATH ;  
Acad. Press. New-York, 1954, vol. 2A, p. 279 (57).
- HILL R., Proc. Roy. Soc., 1926, 100, 419 (58).
- HIRS C.H.W. et OLCOTT H.S., Biochim. Biophys. Acta, 1964, 82, 178 (26).
- HOLLEMAN J.W., Thèse de Doctorat de l'Université de Lille, 1958 (39).
- INGRAM V.M., Biochim. Biophys. Acta, 1955, 16, 599 (29, 36).
- JOHANSSON B.G. et RYMO L., Acta Chem. Scand., 1964, 18, 217 (127).
- JONES R.T., OSGOOD E.E., BRIMHALL B. et KOLER R.D., J. Clin. Investig.,  
1967, 46, 1840 (125 a).
- JÖRNVALL H., Acta Chem. Scand., 1967, 21, 1805 (117).
- KARADZOVA M., NETKOV P. et KEIL B., Coll. Czechoslov. Chem. Communic.,  
1964, 29, 551 (19, 32).

- KENDREW J.C., Science, 1963, 139, 1259 (1, 11, 42, 49).
- KENDREW J.C., in <sup>H</sup>Haemoglobin, edited by ROUGHTON F.J.W. et KENDREW J.C., London 1949, p.149 (76).
- KENDREW J.C., BODO G., DINTZIS H.M., PARRISH R.G., WYCKOFF M. et PHILLIPS D.C. Nature, 1958, 181, 662 (45, 46).
- KENDREW J.C., PARRISH R.G., MARRACK J.R. et ORLANS E.S., Nature, 1954, 174, 946 (66, 77).
- KONIGSBERG W. et HILL R.J., J. Biol. Chem., 1962, 237, 2547 (139).
- KONOSU S., HASHIMOTO K. et MATSUURA F., Bull. Jap. Soc. of Sci. Fisheries, 1958, 24, 563 (25).
- KOSSMAN R.J., FAINER D.C. et BOYER S.H., Symposia on quantitative Biology, 1964, 29, 375 (93).
- KOSTKA V. et CARPENTER F.H., J. Biol. Chem., 1964, 239, 1799 (101).
- LEVY A.L., Nature, 1954, 174, 126 (130).
- LEWIS U.J. et SCHWEIGERT B.S., J. Biol. Chem., 1955, 214, 647 (78).
- LOWRY O.R., ROSENBROUGH N.H., FARR A.L. et RANDALL R.J., J. Biol. Chem., 1951, 193, 265 (103).
- MÖRNER K.A.H., Nord. Med. Arkiv., 1897, 30, 1-8 (5).
- NEIL G.L., NIEMANN C. et HEIN G.E., Nature, 1966, 210, 903 (97).
- NIRENBERG M.W., LEDER P., BERNFELD M., BRIMACOMBE R., TRUPIN J., ROTTMAN F. et O'NEAL C., Proc. Nat. Acad. Sci. (N.Y.), 1965, 53, 1161 (124).
- NIU C.I. et FRAENKEL-CONRAT H., J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 5882 (137).
- NOVY M.J., EDWARDS M.J. et METCALFE J., J. Clin. Investig., 1967, 46, 1848 (125 b).
- O'HAGAN J.E., Nature, 1959, 183, 393 (56).
- PADIEU P., Communication personnelle (108).
- PAULING L., in <sup>H</sup>Haemoglobin, edited by ROUGHTON F.J.W. et KENDREW J.C., Butterworth, London, 1949, p. 57 (52).
- PAULING L. et CORYELL C.D., Proc. Natl. Acad. Sci., 1936, 22, 210 (50).
- PERKOFF G.T., HILL R.L., BROWN D.M. et TYLER F.H., J. Biol. Chem., 1962, 237, 2820 (13, 27, 37, 85, 88).

- PERUTZ M.F., Scientific Amer., 1964, 211, 64  
et Dansk Tidsskr. Farm., 1964, 38, 113 (2, 47).
- PERUTZ M.F., J. Mol. Biol., 1965, 13, 646 (54).
- PETERSON E.A. et SOBER H.A., Anal. Chem., 1959, 31, 857 (109).
- PLAQUET R., BISERTE G. et BOULANGER P., Bull. Soc. Chim. Biol., 1962, 44,  
301 (104, 132).
- QUINN J.R., PEARSON A.M. et BRUNNER J.K., J. Food Sci., 1964, 29, 422-429,  
(87, 91).
- RAY G.B. et PAFF G.H., Am. J. Physiol., 1930, 94, 521 (6).
- ROCHE J., DERRIEN Y. et VIEIL H., Bull. Soc. Chim. Biol., 1942, 24, 1016  
(9).
- ROSSI-FANELLI A., Arch. Sc. Biol., 1940, 24, 244 (10).
- ROSSI-FANELLI A., Journées Biochimiques Italo-franco-helvétiques,  
Naples, 1954 (59, 60).
- ROSSI-FANELLI A. et ANTONINI E., Arch. Biochem. Biophys., 1956, 65, 587  
(80).
- ROSSI-FANELLI A. et TRAVIA L., Bull. Soc. Ital. Biol. Sper., 1940, 15,  
484 (8).
- RUMEN N.M., Acta Chem. Scand., 1960, 14, 1217 (18).
- RUMEN N.M., Acta Chem. Scand., 1963, 13, 1542 (92).
- SANGER F., Biochem. J., 1945, 39, 507 (110, 128).
- SANGER F. et THOMPSON E.O.P., Biochem. J., 1953, 53, 353 (133).
- SCHMID K., Helv. Chem. Acta, 1949, 32, 1198 (21, 23, 24).
- SCHOELLMANN G. et SHAW E., Biochemistry, 1963, 2, 252 (100).
- SEILER N. et WIECHMANN J., Experientia, 1964, 15, 559 (136).
- SHALTIEL S. et PATCHORNIK A., J. Am. Chem. Soc., 1963, 85, 2799 (118, 140).
- SHAW E., MARES-GULA M. et COHEN W., Biochemistry, 1965, 4, 2219 (98).
- SHAW E. et SPRINGHORN S., Biochem. Biophys. Res. Communic., 1967, 27, 391  
(99).
- SMITH E.L. et KASPER C.B., J. Biol. Chem., 1966, 241, 3754 (138).

- SPIES J.R. et CHAMBERS D.C., Anal. Chem., 1949, 21, 1249 (106).
- THEORELL H., Biochem. Zeitschr., 1932, 252, 1 (7).
- THEORELL H., Biochem. Zeitschr., 1934, 268, 73 (31, 67).
- THEORELL H., Arkiv. Kemi. Mineral Geol., 1942, 16A, 14 (51).
- THEORELL H., Arkiv. Kemi. Mineral Geol., 1942, 16A, 3 (63).
- THEORELL H., Biochem. Z., 1934, 268, 46 (65).
- THEORELL H. et AGNER K., Arkiv. Kemi. Mineral Geol., 1942, 16A, 7 (62).
- THEORELL H. et ÅKESON A., Ann. Acad. Sci. Fennical, 1955, 60, 303 (79).
- THEORELL H. et EHRENBERG A., Acta Chem. Scand., 1951, 5, 823 (63a).
- WANG J.H., in "Oxygenases", O. HAYASHI, Editor, Acad. Press, N.Y., 1962,  
p. 484 (61).
- WATSON H.C. et KENDREW J.C., Nature, 1961, 190, 670 (48).
- WOODS K.R. et WANG K.T., Biochim. Biophys. Acta, 1967, 133, 369 (135).
- YAMAZAKI I., YOKOTA K.N. et SHIKAMA K., J. Biol. Chem., 1964, 239, 4151 (90).
- ZMRHAL Z., JEGOROV C. et KEIL B., Coll. Czechoslov. Chem. Communic.,  
1964, 29, 943 (14, 28).
- ZUCKERKANDL E., Scientific Amer., 1965, 212, 110 (125).

