

N°

50376
1972
170

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

50376
1972
170

MÉMOIRE PRÉSENTÉ
A L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I
POUR OBTENIR
LE TITRE DE DOCTEUR DE 3^e CYCLE EN BIOCHIMIE

par

Viviane DUMUR



STRUCTURE DE LA MYOGLOBINE DE CHIEN
ETUDE DES HYDROLYSATS TRYPSIQUES

Membres du Jury : MM. J. MONTREUIL Président

M. DAUTREVAUX Rapporteur

G. BISERTE

M^{lle} G. SPIK



030 023033 9

Soutenu le 2 Novembre 1972

Mme	SCHWARTZ Marie-Hélène	Mathématiques
M.	TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M.	TRIDOT Gabriel	Chimie Minérale Appliquée
M.	VAILLAND Jean	Mathématiques
M.	VIDAL Pierre	Automatique
M.	VIVIER Emile	Biologie Animale
M.	WATERLOT Gérard	Géologie et Minéralogie
M.	WERTHEIMER Raymond	Physique Générale

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

M.	BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M.	DELHAYE Michel	Chimie Physique et Minérale 1er Cycle
M.	FLATRES Pierre	Géographie
M.	LEBRUN André	Electronique
M.	LINDER Robert	Botanique
M.	LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M.	PARREAU Michel	Mathématiques
M.	PRUDHOMME Rémy	Sciences Economiques
M.	SCHILTZ René	Physique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M.	BELLET Jean	Physique
M.	BODARD Marcel	Biologie Végétale
M.	BOILLET Pierre	Physique
M.	DERCOURT Jean-Michel	Géologie
M.	DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M.	GOUDMAND Pierre	Chimie
M.	LANDAIS Jean	Chimie Organique
M.	LOUCHEUX Claude	Chimie Macromoléculaire
Mlle	MARQUET Simone	Mathématiques
M.	PROUVOST Jean	Minéralogie

MAITRES DE CONFERENCES ET CHARGES DES FONCTIONS

M.	ADAM Michel	Economie Politique
M.	ANDRE Charles	Mathématiques et Statistiques
M.	ANGRAND Jean-Pierre	Géographie
M.	AUBIN Thierry	Mathématiques Pures
M.	BEGUIN Paul	Mécanique des Fluides
M.	BILLARD Jean	Physique
M.	BKOUCHE Rudolphe	Mathématiques
M.	BOILLY Bénoni	Zoologie
M.	BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale.
M.	BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M.	BRIDOUX Michel	Chimie (Béthune)
M.	BRUYELLE Pierre	Géographie et Aménagement Spatial
M.	CAPURON Alfred	Biologie Animale
M.	CARREZ Christian	Analyse Numérique
M.	CHOQUET Marcel	Biologie Appliquée
M.	CORDONNIER Vincent	Informatique
M.	CORTOIS Jean	Physique

M.	COULON Jean-Paul	Electrotechnique
M.	DEBRABANT Pierre	Instrumentation Physique
M.	ESCALG Bertrand	Physique
Mme	EVARD Micheline	Chimie (I.U.T.)
M.	FAIDHERBE Jacques	Psychophysiologie
M.	FONTAINE Jacques	Génie Electrique
M.	FROELICH Daniel	Chimie
M.	GAMBLIN André	Géographie
M.	GOBLOT Rémi	Mathématiques
M.	GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M.	GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M.	GRUSON Laurent	Mathématiques
M.	GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M.	HERMAN Maurice	Physique
M.	HUARD DE LA MARRE Pierre	Mathématiques Appliquées
M.	JOLY Robert	Biologie (Amiens)
M.	JOURNEL Gérard	Physique Appliquée
Mlle	KOSMANN Yvette	Mathématiques
M.	KREMBEL Jean	Biochimie
M.	LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Générale
M.	LACOSTE Louis	Biologie Végétale
M.	LAURENT François	Automatique
M.	LAVAGNE Pierre	Gestion
Mlle	LEGRAND Solange	Mathématiques
M.	LEHMANN Daniel	Mathématiques
Mme	LEHMANN Josiane	Mathématiques
M.	LENTACKER Firmin	Géographie et Aménagement Spatial
M.	LEROY Jean-Marie	Chimie (E.N.S.C.L.)
M.	LEROY Yves	Electronique
M.	LHENAFF Renée	Géographie
M.	LOCQUENEUX Robert	Physique
M.	LOUAGE Francis	Mesures Industrielles
M.	MAES Serge	Physique
Mme	MAILLET Monique	Sciences Economiques
M.	MAIZIERES Christian	Automatique
M.	MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques
M.	MESSELYN Jean	Physique
M.	MIGEON Michel	Instrumentation Chimique
M.	MONTEL Marc	Physique
M.	MONTUELLE Bernard	Biologie Végétale
M.	MUSSCHE Guy	Economie et Sociologie d'Entreprises
M.	NICOLE Jacques	Chimie Analytique (E.N.S.C.L.)
M.	NOWOGROCKI Guy	Chimie (Amiens)
M.	OUZIAUX Roger	Construction Mécanique
M.	PANET Marius	Physique Industrielle
M.	PAQUET Jacques	Géotechnique
M.	PARSY Fernand	Mathématiques Appliquées
M.	PECQUE Marcel	Chimie (Béthune)
M.	PERROT Pierre	Chimie
M.	PONSOLLE Louis	Chimie
M.	POVY Jean-Claude	Automatique non linéaire
M.	RACZY Ladislas	Physique Industrielle et Radioélectrique
Mme	RENVERSEZ Françoise	Sciences Economiques
M.	ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M.	ROYNETTE Bernard	Mathématiques
M.	SALMER Georges	Radio-Electrique et Electronique
M.	SEGUIER Guy	Electronique
M.	SIMON Michel	Psychologie
M.	SLIWA Henri	Chimie Organique
M.	SMET Pierre	Physique

M.	SOMME Jean	Géographie
Mlle	SPIK Geneviève	Biochimie
M.	THOMAS Daniel	Chimie Minérale Appliquée
M.	TOULOTTE Jean-Marc	Informatique
M.	TREANTON Jean-René	Psychologie
M	VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M.	VILETTE Michel	Génie Mécanique
M.	WATERLOT Michel	Géologie
Mme	ZINN JUSTIN Nicole	Mathématiques

--oo 0 oo--

AVANT-PROPOS

Ce travail a été effectué au Laboratoire de Chimie Biologique de la Faculté de Médecine de Lille.

A cette occasion, nous sommes heureux de pouvoir exprimer notre profonde gratitude et notre respectueux attachement à Monsieur le Professeur BOULANGER qui a bien voulu nous accueillir dans son Laboratoire auquel nous sommes fières d'appartenir et nous a ainsi permis de réaliser ce travail.

Nous remercions vivement Monsieur le Professeur MONTREUIL, qui nous a fait profiter de la très grande clarté de son enseignement, de nous avoir fait le grand honneur de présider ce jury de Thèse. Veuillez trouver ici l'expression de toute notre reconnaissance.

A notre Directeur de Travail, Monsieur le Professeur DAUTREVAUX. Vous êtes l'instigateur de ce travail qui vous tient à coeur. Vous nous faites profiter de vos vastes connaissances scientifiques, vous nous conseillez, nous encouragez, vous êtes toujours disponible et patient. Nous espérons avoir fait de notre mieux pour ne pas trop vous décevoir. Que ce travail soit l'expression de notre vive admiration et de notre infinie gratitude.

Nous prions Monsieur le Professeur BISERTE dont nous apprécions les inépuisables connaissances scientifiques et la bonté, de trouver ici l'expression de notre profonde gratitude pour le grand honneur qu'il nous fait en acceptant de participer au Jury de notre Thèse. Qu'il nous soit permis de lui exprimer toute notre admiration et notre reconnaissance.

Nous adressons nos vifs remerciements et notre profonde gratitude à Mademoiselle le Professeur SPIK pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de participer au Jury de notre Thèse.

Nous remercions également Monsieur HAN, Maître de Recherches au CNRS, de son aide précieuse dans notre travail : sa connaissance approfondie de la Chimie des Protéines, ses conseils avisés nous ont été d'un très grand secours. Sa présence met de la bonne humeur dans notre Laboratoire.

Nous remercions très vivement tous nos amis du Laboratoire en particulier ceux du Labo DE dont nous apprécions la présence quotidienne, l'aide et la franche amitié, Mesdames MORANDI et NABIAS, Madame DEMOUVEAU et Mademoiselle HEMEZ, Messieurs PICQUE et VANDEPERRE dont l'aide nous a été précieuse.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION

CHAPITRE I

GENERALITES

A - LES MYOGLOBINES DE MAMMIFERES

4

1. Les sources
2. Méthodes générales de préparation et application à la myoglobine de Chien.
 - a) Principes des méthodes
 - b) Préparation de la myoglobine de Chien
 - c) Critères de pureté
3. Composition générale en acides aminés
 - a) Composition en acides aminés de la myoglobine de Mammifères.
 - b) Composition en acides aminés de la myoglobine de Chien.
 - c) Acides aminés terminaux.
4. Structure primaire générale

B - METHODES GENERALES DE DETERMINATION DE LA STRUCTURE COVALENTE DES MYOGLOBINES

17

1. Introduction
2. Différentes stratégies utilisées dans l'étude des myoglobines
 - a) La myoglobine de Cachalot
 - b) La myoglobine de Cheval
 - c) Les myoglobines de Marsouin et de Phoque
 - d) Les myoglobines de l'Homme et du Gibbon.
 - e) La myoglobine de Kangourou
 - f) Les myoglobines de Boeuf et de Mouton.

C - CONCLUSION

CHAPITRE II

L'HYDROLYSE TRYPSIQUE DE LA MYOGLOBINE DE CHIEN

A - ETUDE DES HYDROLYSATS TRYPSIQUES

28

1. Conduite de l'hydrolyse trypsique
 - a) spécificité de l'enzyme
 - b) Mode opératoire :
 - dénaturation du substrat
 - hydrolyse trypsique
2. Cartes peptidiques
 - a) Modalités de chromatographie et d'électrophorèse
 - b) Révélation multiples
 - c) Résultats.

B - FRACTIONNEMENT PREPARATIF DES HYDROLYSATS TRYPSIQUES

32

1. Chromatographie sur colonne de résine
 - a) Préparation de la colonne
 - b) Chromatographie
 - c) Régénération de la résine
2. Etablissement de la courbe d'élution
 - a) Réaction à la ninhydrine
 - b) Réactions spécifiques
3. Contrôles d'homogénéité et étapes de purifications éventuelles
4. Résultats.

CHAPITRE III

ETUDE DES PEPTIDES TRYPSIQUES

40

1. Composition en acides aminés
 - a) Hydrolyse totale acide
 - b) Hydrolyse totale enzymatique
2. Acides aminés N terminaux
 - a) Technique
 - b) Chromatographie des Dansyl amino-acides sur couche mince de gel de silice.
 - c) Chromatographie sur feuille de polyamide

3. Comportement en électrophorèse et chromatographie sur papier.
4. Dégradation récurrente d'EDMAN
5. Autres techniques utilisées :
 - a) hydrolyse des liaisons histidyl par la N Bromosuccinimide
 - b) hydrolyse d'un peptide tryptique par la thermolysine
 - c) cinétique d'hydrolyse par l'aminopeptidase M
 - d) cinétique d'hydrolyse par les carboxypeptidases
 - e) méthode de TURNER

CHAPITRE IV

RESULTATS

49

1. Séquence 17 - 31
2. Séquence 32 - 34
3. Séquence 35 - 45
4. Séquence 46 - 47
5. Séquence 48 - 50
6. Séquence 51 - 56
7. Séquence 57 - 63
8. Séquence 64 - 69
9. Séquence 70 - 77
10. Séquence 78 - 79
11. Séquence 80 - 89
12. Séquence 90 - 96
13. Séquence 97 - 102
14. Séquence 119 - 133
15. Séquence 134 - 139
16. Séquence 140 - 145
17. Séquence 146 - 147
18. Séquence 148 - 153

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

INTRODUCTION

De toutes les molécules protéiques, la myoglobine est celle qui est actuellement la mieux connue ; elle suscite néanmoins encore actuellement un grand nombre de travaux justifiés par la connaissance que nous avons de sa structure.

La myoglobine de Cachalot est d'abord la première molécule protéique dont on ait pu déterminer à la fois la structure covalente et la conformation ; actuellement c'est encore la seule dont la structure conformationnelle par diffraction des rayons X ait été déterminée au pouvoir de résolution de 1,4 Å permettant la mise en évidence et la localisation de tous ses atomes constitutifs.

La connaissance simultanée des structures covalentes et conformationnelle était déjà très importante sur le plan théorique car elle permettait de visualiser et de préciser la nature des interactions et des forces inter atomiques assurant le maintien de la conformation ; les travaux qu'elle a permis dans ce domaine sont innombrables et ont permis notamment de vérifier directement sur cette protéine les différentes méthodes d'étude conformationnelle utilisées jusqu'alors : la mesure du taux d'hélicité de la myoglobine de Cachalot réalisée par spectrophotométrie en ultraviolet (ROSENHECK et DOTY - 1) ou par dispersion rotatoire (HARRISSON et BLOUT-2) ont ainsi donné des valeurs (respectivement 82 et 75 p. 100) très proches des valeurs obtenues par le décompte direct des résidus disposés dans une hélice, tel qu'on peut le faire en partant de la structure tridimensionnelle. L'utilisation des réactifs alkylants, se fixant électivement sur certains types de résidus disposés à la surface de la molécule protéique a également pu être vérifiée sur la myoglobine de Cachalot.

Les études structurales qui avaient été réalisées sur la myoglobine de Cachalot avaient, par la rigueur de leurs conclusions, établi que c'était uniquement la structure covalente, donc un certain enchaînement en amino-acides qui était responsable de la conformation. L'étude réalisée sur l'hémoglobine par PERUTZ (3) a cependant montré que les chaînes α et β de l'hémoglobine équine présentaient une frappante similitude de conformation avec la myoglobine de Cachalot, bien qu'une vingtaine de résidus seulement soient communs aux trois protéines ; on pouvait dès lors se demander si, sur les quelques 150 résidus que comportent ces structures, seules quelques dizaines n'avaient pas un rôle privilégié dans un mode de repliement de la chaîne peptidique compatible avec les propriétés de liaisons caractéristiques de ces protéines : seule l'étude de la structure covalente de plusieurs myoglobines pourra montrer quelles sont les substitutions d'aminoacides permettant de garder cette propriété.

Chaîne polypeptidique unique, la myoglobine, par ses caractéristiques structurales s'est également révélée être un remarquable modèle utilisable pour la mise au point de nouvelles techniques d'étude des enchaînements en aminoacides : c'est sur la myoglobine de Cachalot (EDMUNDSON - 4) qu'a été utilisé initialement le bromure de cyanogène dans la coupure des liaisons méthionyl des protéines et c'est sur la myoglobine de baleine qu'a été réalisée la première dégradation automatique par la méthode des phénylthiohydantoïnes.

L'étude de la structure covalente de la myoglobine de Chien peut donc se justifier en partie par ces considérations. C'est surtout en fait l'aspect phylogénétique de cette étude qui a orienté notre choix, car seules jusqu'ici avaient été étudiées des myoglobines de cétacés, de primates, de pinnipèdes et d'ongulés : premier carnivore étudié pour sa myoglobine, celle-ci montrera certainement des substitutions intéressantes montrant de façon plus précise la place de ce mammifère dans l'évolution biochimique.

CHAPITRE I

GENERALITES

A - LES MYOGLOBINES DE MAMMIFERES

1 - Les sources

La myoglobine est un chromoprotéide ferroporphyrinique jouant le rôle de transporteur intracellulaire d'oxygène dans le tissu musculaire qui en est l'un des plus gros consommateurs. KAGEN et al.(5) ont essayé de localiser la myoglobine à l'intérieur de la myofibrille : ils ont utilisé pour cela des anticorps fluorescents et mis en évidence la fluorescence au niveau du sarcolemme. De fortes concentrations en myoglobine sont présentes près de la membrane cellulaire du muscle strié auquel la myoglobine, confère sa caractéristique. La concentration est variable non seulement en fonction de l'espèce, mais aussi du type et de l'activité physiologique de l'animal. KENDREW et al. (6) ont observé chez les Mammifères que la concentration en myoglobine était beaucoup plus élevée chez les Mammifères marins (Cétacés, Pinnipèdes) que chez les Mammifères terrestres. D'autre part, chez ces derniers selon DRABKIN (7) elle est plus élevée chez les grands Mammifères (Cheval) ou les Mammifères à course rapide que chez les petits Mammifères. Enfin, LAWRIE (8) a observé que pour un même animal, sa concentration était plus élevée dans les muscles à contractions lentes et répétées (coeur des grands Mammifères, muscles des animaux de course) que dans les muscles à contraction rapide (coeur des petits Mammifères) (Tableau I)

2 - Méthodes générales de préparation et application à la myoglobine du Chien.

a) Principes des méthodes

Plusieurs méthodes ont été utilisées pour isoler la myoglobine. La méthode à l'acétate de plomb a été utilisée par THEORELL (16) pour isoler la myoglobine humaine ; l'acétate de plomb permet la précipitation des protéines musculaires non hémiques et les chromoprotéines restent en solution : il est alors nécessaire de procéder à une seconde purification par ultrafiltration ou par la carboxyméthyl-cellulose (Tableau II). La méthode à l'éthanol et les ions métalliques a été utilisée par HARDMAN (47) pour isoler la myoglobine de Cachalot : la

TABLEAU I

QUANTITE DE MYOGLOBINE PRESENTE DANS LES
MUSCLES

	ESPECES	SOURCES	Mb en mg/g de tissu frais	REFERENCES
MAMMIFERES MARINS	Cachalot	muscles squelettiques	30-35	HARDMAN <u>et al.</u> (9)
	Dauphin	muscles squelettiques	35	EICHELBERGER (10)
	Phoque	muscles squelettiques	77	ROBINSON (11)
MAMMIFERES TERRESTRES	Cheval	muscles squelettiques	7,3	DRABKIN (12)
	Boeuf	coeur	4,5	PERKOFF <u>et al.</u> (13)
		muscles squelettiques	10,8	PERKOFF <u>et al.</u> (13)
	Lama	muscles squelettiques	5,4	REYNAFARTE (14)
Antilope	muscles squelettiques	2	PERKOFF <u>et al.</u> (13)	
MAMMIFERES	Lapin		1,3	PERKOFF <u>et al.</u> (13)
			0,2	LAWRIE (15)
	Hamster		0,8-3,1	PERKOFF <u>et al.</u> (13)
Rat		0,9	DRABKIN (12)	



TABLEAU II - ISOLEMENT ET PURIFICATION DE QUELQUES MYOGLOBINES DE MAMMIFERES

MYOGLOBINES		ISOLEMENT	PURIFICATION	REFERENCES
PRIMATES	Humaine adulte	Acétate de plomb Sulfate d'ammonium 80 à 100 p. 100	Ultrafiltration ou DEAE-cellulose cristallisation Electrophorèse sur gel	THEORELL (16) PERKOFF <u>et al.</u> (17) ROSSI-FANELLI (18) DRABKIN (19) BOULTON <u>et al.</u> (20)
	Humaine foetale	Sulfate d'ammonium 60 à 80 p. 100 saturation	Ultrafiltration Cristallisation	JONXIS-WADMAN (21) SINGER (22) BOYER (23)
	Singe	Sulfate d'ammonium 80 à 80 p. 100 saturation	DEAE-cellulose Cristallisation Electrophorèse sur gel	ZMRAHL (24) HUDGINS (25) BOULTON <u>et al.</u> (26)
PINNI-PEDES	Phoque	Sulfate d'ammonium 75-96 p. 100 saturation	CM-cellulose cristallisation	HAPNER <u>et al.</u> (27) RUMEN (28)
CETACES	Baleine Finback Baleine	Acétate de plomb Sulfate d'ammonium 75-90 p. 100 saturation	CM-cellulose cristallisable	ATASSI <u>et al.</u> (30) EDMAN-BEGG (31) SCHMID (32)
	Cachalot	Ethanol/ions Zn Sulfate d'ammonium 75-90 p. 100 saturation	Amberlite IRC 50 G75 ou CM-cellulose SE-Sephadex cristallisable	EDMUNDSON (33) ATASSI (34) HARDMAN (35)
	Dauphin	Sulfate d'ammonium 75-90 p. 100 saturation	CM-cellulose cristallisable	KARADZOVA (36)
	Marsouin	Sulfate d'ammonium 75-90 p. 100 saturation	CM-cellulose cristallisable	HAPNER <u>et al.</u> (37)

TABLEAU II (suite)

ONGULES	Boeuf	Sulfate d'ammonium 84-96 p. 100 saturation	cristallisable	BERNARD (38) LEWIS-SCHEIGERT (39)
	Chameau	Sephadex G75	CM-cellulose ou SE-Sephadex cristallisable	AWAD-KOTITE (40)
	Cheval	Sulfate d'ammonium 83-94 p. 100 saturation	G75 ou IRC 50 ou CM-cellulose - DEAE- cellulose cristallisable	BERNARD <u>et al.</u> (41) AKESON <u>et</u> THEORELL (42) BOARDMAN <u>et</u> ADAIR (43)
	Mouton	Sulfate d'ammonium 83-94 p. 100 saturation		BERNARD <u>et al.</u> (44) BEZNAK (45)
MARSU- PIAUX	Kangourou	Sulfate d'ammonium 70 p. 100 saturation	SE-Sephadex CM-cellulose	AIR <u>et</u> THOMSON (46)



myoglobine est précipitée sous forme de complexe Zn-myoglobine ; une dialyse permet d'éliminer les ions métalliques. BOYER et al. (48) ont extrait la myoglobine humaine à partir de biopsies musculaires par ultrafiltration : la myoglobine soumise à l'ultrafiltration passe à travers la membrane hémiperméable ; contrairement aux protéines de plus haut poids moléculaire comme l'hémoglobine et la sérumalbumine. La méthode du relargage par le sulfate d'ammonium a été enfin utilisée par de très nombreux auteurs et est fondée sur la grande différence de solubilité existant entre la myoglobine et les autres protéines tissulaires de poids moléculaire plus élevé. La solubilité de la myoglobine varie selon les différentes espèces animales étudiées, la zone de relargage étant en général comprise entre 75 et 98 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium. Il est important de choisir une zone de relargage étroite pour obtenir une myoglobine pure car l'hémoglobine et la myoglobine ont des courbes de précipitation qui se chevauchent. Lorsque la myoglobine est contaminée par l'hémoglobine ou d'autres protéines, il est nécessaire de la purifier : on a utilisé soit la gel-filtration (Sephadex G 50 ou G 75), soit les échangeurs d'ions (résines échangeuses d'ions, carboxyméthylcellulose et carboxyméthyl Sephadex, Sulfoéthyl Sephadex, DEAE-cellulose, DEAE Sephadex), soit la cristallisation : cette dernière méthode a l'avantage de permettre l'obtention d'une myoglobine pure et, si les cristaux sont suffisamment gros, l'étude de sa structure par diffraction des rayons X.

b) Préparation de la myoglobine de Chien.

L'isolement de la myoglobine de Chien s'est avéré difficile en raison non seulement du caractère particulièrement instable de celle-ci, mais aussi à cause de sa grande solubilité. Elle est en effet trop sensible aux variations de température, de pH, à la nature des agents qui favorisent sa dénaturation pour que certaines méthodes de fractionnement, par l'acétate de plomb (THEORELL et de DUVE (49) ou par l'éthanol et les ions métalliques à basse température (HARDMAN et al.) (50) aient pu lui être appliquée avec succès. Nous avons donc repris la méthode par le relargage au sulfate d'ammonium (BOARDMAN et ADAIR) (51) que nous avons dû cependant aménager en fonction de la grande sensibilité de notre myoglobine.

1°) Principe

La myoglobine de Chien est extraite des muscles squelettiques par relargage au sulfate d'ammonium entre 83 et 98 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium. En raison de la proportion importante de protéines non héminiques dans l'extrait musculaire, il est nécessaire d'enrichir préalablement l'extrait en protéines héminiques avant isolement de la myoglobine : cet enrichissement est suivi au cours de la préparation par mesure du rapport des densités optiques à 409 m μ et 278 m μ . En raison d'autre part de la relative instabilité de la myoglobine de chien, on évite au maximum son contact avec des solutions en sulfate d'ammonium proches de la saturation et nous avons préféré concentrer les solutions de myoglobine par lyophilisation plutôt que par relargage à saturation en sulfate d'ammonium.

2°) Préparation

§ Isolement de la myoglobine

α) Extraction de la myoglobine

Les chiens ont été obtenus auprès du Refuge de la S.P.A. ; ils sont transportés au Laboratoire immédiatement après abattage au refuge. Du fait de ce mode d'obtention, les races phénotypes sont de nature très diverses. Après avoir été dépecés et vidés, les chiens sont rapidement découpés et on recueille la majeure partie des tissus musculaires. Ils sont hachés à l'aide d'un hachoir électrique (type HU8 Moulinex) puis broyés à l'Ultra-Turrax (type TP 1812) en présence d'eau distillée saturée en oxyde de carbone (2 litres par kg de viande) : la myoglobine de Chien se révèle en effet très instable et il est nécessaire de l'isoler sous forme de carbonyl-myoglobine. l'oxyde de carbone est préparé sous une hotte ventilée par action de l'acide sulfurique concentré sur le formiate de sodium : le gaz formé est mis à barboter dans la solution que l'on désire saturer. La suspension de purée tissulaire est saturée à nouveau en oxyde de carbone puis laissée en chambre froide à 4°C pendant toute une nuit. Le lendemain, on centrifuge à 4 000 t/mi pendant 30 minutes et on filtre le surnageant afin d'éliminer les particules grasses ; la filtration est faite à l'aide d'un filtre Buchner sur une double couche de papiers Whatman n° 1 et n° 3. On procède ensuite à une nouvelle saturation en oxyde de carbone.

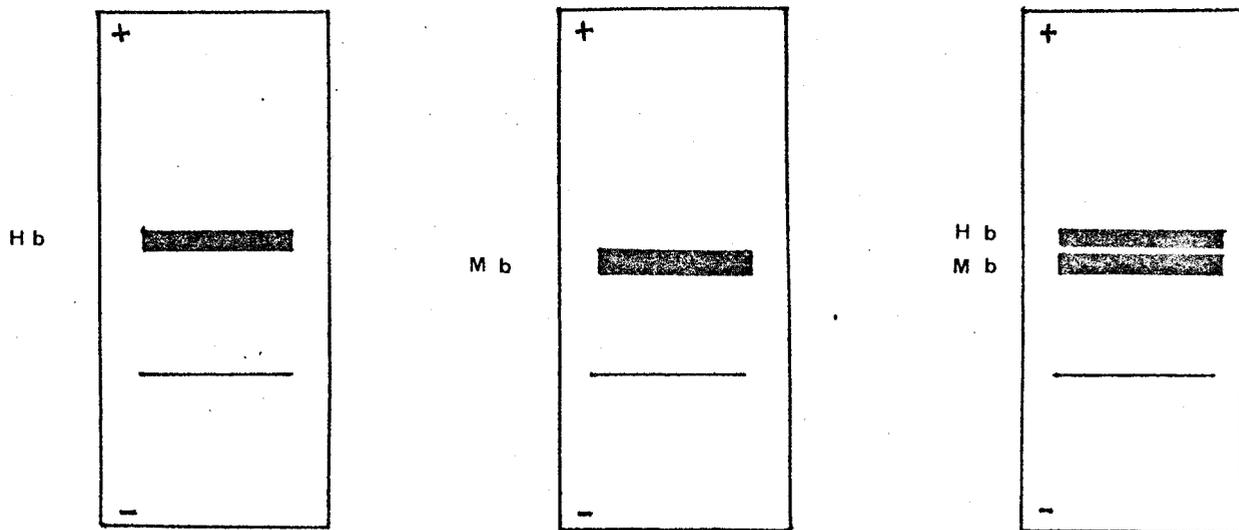


FIGURE 2

SCHEMA D'ELECTROPHOREGRAMMES SUR PAPIER A pH 8,9 DE LA MYOGLOBINE ET DE L'HEMOGLOBINE DE CHIEN

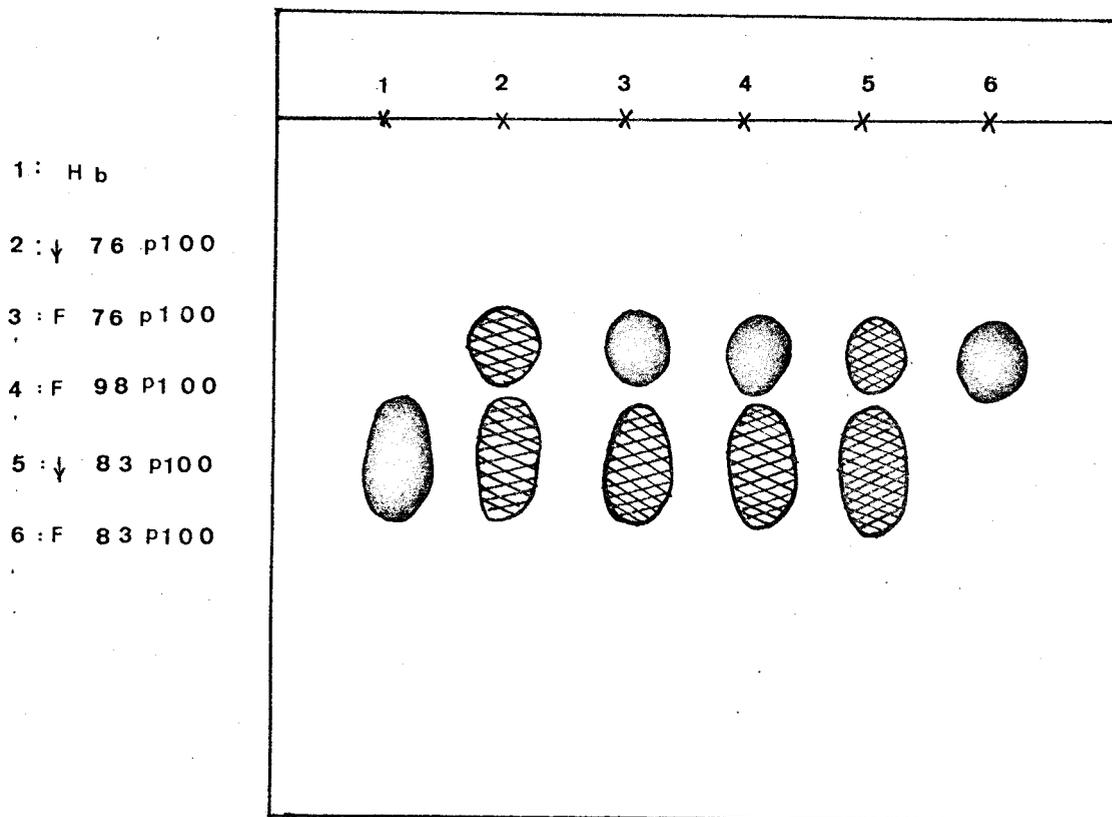


FIGURE 3

CHROMATOPLAQUE DE GEL DE FILTRATION SUR SEPHADEX G75 AU COURS DE L'ISOLEMENT DE LA MYOGLOBINE DE CHIEN.



β) Premier fractionnement par relargage au $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$

La solution obtenue est ajustée à 76 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium par addition par petites portions de 498 g de sulfate d'ammonium par litre de solution sous forte agitation (quantité calculée pour une température de 4°C).

Le pH du milieu est maintenu aux environs de 7 par addition d'ammoniaque concentré. Après 2 à 3 heures d'agitation, une grande partie de l'hémoglobine et des autres protéines non hémiques ont précipité : la solution est filtrée par deux fois sur un filtre de papier Whatman n° 1. Le filtrat obtenu est à nouveau saturé en oxyde de carbone et ajusté à 98 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium dans les mêmes conditions que précédemment : on ajoute 158 g de sulfate d'ammonium par litre de solution sous forte agitation en ajustant le pH à 7. Au bout de plusieurs heures, le précipité est recueilli sur un filtre de verre fritté n° 3 et lavé par une solution saturée de sulfate d'ammonium de pH 7. Le précipité est alors redissous dans 500 ml environ d'ammoniaque 0,01 N saturé en oxyde de carbone et dialysé en boudin de cellophane contre de l'eau distillée que l'on change plusieurs fois par jour pendant deux jours.

γ) Deuxième fractionnement : obtention de la myoglobine pure

L'adialysat est saturé en oxyde de carbone et ajusté à 83 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium dans les mêmes conditions que précédemment (pH 7 - 4°C) par addition de 562 g par litre d'adialysat. Le précipité qui contient l'hémoglobine est rejeté ; la myoglobine reste en solution dans le filtrat qui est mis en dialyse contre de l'eau distillée changée plusieurs fois pendant deux jours. Finalement, on lyophilise cette solution et on évite ainsi une seconde précipitation à 98 p. 100 de saturation dont l'action est particulièrement dénaturante. On obtient ainsi en moyenne 0,7 à 0,8 g de myoglobine par kilo de muscles. Au cours de ce fractionnement, on suit l'enrichissement des préparations en chromoprotéides par mesure des densités optiques des diverses solutions à 409 m : le rapport de ces deux densités optiques respectives est, pour la myoglobine ou l'hémoglobine voisin de 5. L'hémoglobine ne précipite intégralement à 83 p. 100 de

saturation en sulfate d'ammonium que si sa proportion dans le mélange de protéine est telle que ce rapport des densités optiques est supérieur à 2 : le deuxième fractionnement n'est mis en oeuvre que si cette condition est réalisée. Le schéma de la figure 1 illustre la méthode de fractionnement que nous utilisons.

c) Critères de pureté

Electrophorèse de zone sur papier

Elle est réalisée sur papier Schleicher et Schüll 2043 a Mg1 dans un tampon véronal de pH 8,9 pendant 9 heures sous 80 volts. On dépose 200 à 500 µg de protéine sur la bande humide du côté cathodique à 8 cm du bord. Elle est révélée par l'Amidoschwarz. Les zones correspondant à la myoglobine et à l'hémoglobine de Chien sont cependant assez mal séparées l'une de l'autre (Figure 2).

Electrophorèse sur acétate de cellulose

L'homogénéité de la préparation est contrôlée en électrophorèse sur acétate de cellulose à pH 8,6 sous 250 volts pendant 15 minutes. La révélation est faite au rouge Ponceau et montre pour le filtrat du deuxième fractionnement une bande unique de myoglobine.

Chromatographie sur couche mince de Sephadex : technique de JOHANSSON-RYMO (52)

Une couche uniforme de 1 mm d'épaisseur de Sephadex G75 forme "Superfine" gonflé dans du tampon Trishydroxyméthylaminométhane 0,05 M et KCl 0,1 M de pH 7,5 est étalée sur une plaque de verre de 20 x 40 cm ; 5 µl d'une solution protéique à 12 mg/ml sont déposés sur le gel. La chromatographie descendante (plaque inclinée à 10° par rapport à l'horizontal) est poursuivie en chambre humide à 20° pendant 15 heures avec le tampon Tris-KCl de pH 7,5. Après séchage à l'étuve à 100°C la plaque est révélée directement par l'Amidoschwarz selon la même technique que celle qui est utilisée pour les électrophorèses sur papier (Figure 3).

Amino-acide N-terminal

L'absence d'hémoglobine dans la préparation de la myoglobine de Chien peut être vérifiée par identification des amino-acides N-terminaux par la méthode des dinitrophénylaminoacides (DNP) ; nous

verrons que, pour la myoglobine de Chien, l'acide aminé N-terminal est le glyco-colle alors que pour l'hémoglobine c'est la valine. Les conditions d'hydrolyse des DNP-protéines utilisées dans cet essai détruisent totalement le DNP-glyco-colle : l'absence de DNP-N-terminal visible est donc la preuve de l'absence de contaminants protéiques possédant un acide aminé N-terminal autre que le glyco-colle.

3 - Composition générale en acides aminés

a) Composition en acides aminés de la myoglobine des Mammifères

La composition en acides aminés de nombreuses espèces animales a été déterminée ; cette composition n'a en fait qu'une valeur indicative qui doit obligatoirement être confirmée par la détermination de la structure covalente en raison de l'imprécision actuelle du dosage des amino-acides (1 à 3 p. 100). Nous avons rassemblé dans le Tableau III la composition en acides aminés de la myoglobine de quelques vertébrés en nous limitant aux compositions précises déduites des déterminations de structure, ce qui permet la distinction des amides (glutamine et asparagine) des aminoacides dicarboxyliques (acides glutamique et aspartique). Pour toutes les myoglobines nous observons des teneurs très élevées en acide glutamique, en leucine et en lysine (environ 20 résidus de chaque) et des teneurs très basses en arginine, en tyrosine, en méthionine et en tryptophane (2 à 4 résidus de chaque). Il faut noter d'autre part la présence d'isoleucine à un taux de toute façon plus élevé que celui de la chaîne gamma de l'hémoglobine. Il faut noter enfin l'absence de cystéine dans les myoglobines de Mammifères, bien qu'un résidu ait cependant été mis en évidence chez les Primates (en particulier chez l'Homme, le Gibbon et le Chimpanzé).

b) Composition en acides aminés de la myoglobine de Chien

L'enlèvement de l'hème de la myoglobine a été réalisé selon la technique de BISERTE et HOLLEMAN (62) par l'acétone chlorhydrique ; dans cette technique on dénature au préalable la protéine par l'éthanol et le chlorhydrate de guanidine. Le dosage des acides aminés a été réalisé par chromatographie sur colonne de résine polystyrène sulfonée à l'aide d'un appareil automatique TECHNICON à l'aide de la technique d'élution en 24 heures : deux temps d'hydrolyse 24 et 72 heures ont été utilisés et deux chromatogrammes ont été réalisés sur chacun des deux hydrolysats de la globine : les taux de sérine et de thréonine

TABLEAU III - COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DE LA MYOGLOBINE DE QUELQUES VERTEBRES

(Les compositions indiquées ont été déduites des séquences en amino-acides)

	PRIMATES		PINNIPÈDE	CETACÉES			ONGULES			MARSUPIAUX
	Homme	Gibbon	Phoque	Cachalot	Dauphin	Marsouin	Cheval	Boeuf	Mouton	Kangourou
	HERRERA et LEHMAN (53)	HERRERA (54)	BRADSHAW (55)	EDMUNSON (56)	KARADZOVA (57)	BRADSHAW (55)	DAUTREVAUX (58)	HAN (59)	HAN (60)	AIR et THOMPSON (61)
Ac. aspartique	8	8	9	6	9	6	7	7	7	9
Asparagine	3	3	2	2	1	4	3	5	5	3
Thréonine	4	4	5	5	5	6	7	5	5	5
Sérine	7	8	7	6	5	5	5	6	6	6
Ac. glutamique	13	14	14	14	12	14	13	14	14	13
Glutamine	8	7	3	5	5	4	6	3	4	7
Proline	5	5	4	4	4	4	4	3	3	3
Glycocolle	15	14	12	11	11	14	15	12	14	14
Alanine	12	12	14	17	18	15	15	20	17	14
1/2 cystine	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Valine	7	7	6	8	7	6	7	9	9	6
Méthionine	3	3	2	2	2	2	2	2	3	3
Isoleucine	8	8	8	9	9	8	9	6	6	9
Leucine	17	17	19	18	18	19	17	16	17	16
Tyrosine	2	2	2	3	2	2	2	2	2	1
Phénylalanine	7	7	7	6	7	7	7	7	7	9
Lysine	20	20	19	19	20	20	19	19	18	21
Histidine	9	9	13	12	13	12	11	13	12	10
Arginine	2	2	5	4	3	3	2	2	2	2
Tryptophanne	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
TOTAL	153	153	153	153	153	153	153	153	153	153



TABLEAU IV

COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DE LA MYOGLOBINE DE CHIEN

	<u>Moles/g de globine</u>			Par molécule P.M. 16 000	Valeurs arrondies
	24 h	72 h	Moyenne		
Asp	896	918	907	14,99	15
Thr	453	438	459*	7,60	7 à 8
Ser	501	428	537	8,88	9
Glu	1226	1210	1218	20,12	20
Pro	166	198	182	3,01	3
Gly	818	840	829	13,70	14
Ala	730	641	686	11,33	11
Val	324	396	396**	6,54	6 à 7
Met	89	103	96	1,60	2
Ile	339	428	428**	7,07	7
Leu	1038	1058	1048	17,31	17
Tyr	104	124	114	1,89	2
Phe	360	386	373	6,16	6
Lys	1184	1230	1207	19,95	20
His	558	532	545	9,00	9
Arg	151	-	151	2,50	2 à 3
Trp	-	-	-	1,70***	2
					153

* Valeurs extrapolées au temps 0 de l'hydrolyse en tenant compte d'une destruction linéaire en fonction du temps.

** Seules les valeurs obtenues par 72 h d'hydrolyse ont été retenues.

*** Dosage par la méthode de SPIES et CHAMBERS.



ont été calculés par extrapolation linéaire au temps zéro de l'hydrolyse pour tenir compte de leur destruction ; de même les valeurs obtenues à partir des hydrolysats de 72 heures ont seules été retenues dans le cas de la valine et de l'isoleucine. Le tryptophane a été dosé par la méthode de SPIES et CHAMBERS (63). L'examen du tableau IV montre que, par rapport aux myoglobines d'autres espèces, la teneur en acide aspartique et asparagine est relativement élevée (15 au lieu de 8 à 12 chez les autres espèces) ; inversement, la teneur en alanine se révèle plus basse que celle de toutes les autres myoglobines (11 au lieu de 13 à 20 pour les autres espèces). Les valeurs obtenues pour les autres acides aminés sont par contre sensiblement analogues à celles des autres espèces.

c) Acides aminés terminaux

Le glycolle a été identifié en position N-terminale dans la plupart des myoglobines ; exceptionnellement (Baleine, Cachalot), la valine est retrouvée en cette position.

L'acide aminé N-terminal de la myoglobine de Chien a été déterminé par la méthode des dinitrophénylaminoacides de SANGER. Le DNP acide aminé N-terminal est identifié au moyen du système chromatographique bidimensionnel sur papier décrit par BISERTE et al. (64) ; après hydrolyse de 24 heures à 105°C par HCl 5,6 N, aucun DNP acide aminé N-terminal ne peut être mis en évidence ; après hydrolyse de 8 heures, par contre, on identifie le DNP-glycolle, qui est détruit complètement après une hydrolyse de 24 heures.

L'acide aminé C-terminal a été déterminé par hydrazinolyse selon la technique de DAUTREVAUX (65) : nous avons obtenu le glycolle comme dans toutes les myoglobines actuellement connues.

4 - Structure primaire générale

La comparaison de la composition en acides aminés des myoglobines de plusieurs Mammifères nous laissait prévoir une étroite parenté entre celles-ci. Cette parenté apparaît plus évidente encore à l'examen comparatif des structures actuellement connues (Cachalot, Marsouin, Dauphin, Cheval, Boeuf, Mouton, Kangourou, Gibbon et Homme). Cette comparaison a d'ailleurs permis d'établir une structure générale des myoglobines, construite par alignement des acides aminés les plus fréquemment représentés à chaque position dans les myoglobines. Le Schéma de la figure 4 est adapté de cette séquence et fait état des

FIGURE 4

1	5	10	15	20	25
Gly-Leu-Ser-Asp-Gly-Glu-Trp-Gln-Leu-Val-Leu-Asn-Val-Trp-Gly-Lys-Val-Glu-Ala-Asp-Val-Ala-Gly-His-Gly-					
Val	Glu Ala	His Gln	His Ile Ala	Thr Leu Gly	
		Ala	Ala	Pro Ile	
				Ile Gly	
				Pro	
30	35	40	45	50	
Gln-Asp-Val-Leu-Ile-Arg-Leu-Phe-Lys-Gly-His-Pro-Glu-Thr-Leu-Glu-Lys-Phe-Asp-Lys-Phe-Lys-His-Leu-Lys-					
Lys Glu Ile	Thr Ser		Arg		
55	60	65	70	75	
Thr-Glu-Ala-Glu-Met-Lys-Ala-Ser-Glu-Asp-Leu-Lys-Lys-His-Gly-Asn-Thr-Val-Leu-Thr-Ala-Leu-Gly-Gly-Ile-					
Ser	Asp Asp	Arg Arg	Asp Val	Ala	
			Ala	Asn	
			Thr		
			Val		
			Ile		



80	85	90	95	100
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-				
Asp	Asn Val Thr His	Glu	Asn	Val Gln
Gln	Ile			
105	110	115	120	125
Ile-Lys-Tyr-Leu-Glu-Phe-Ile-Ser-Glu-Ala-Ile-Ile-His-Val-Leu-His-Ser-Hys-His-Pro-Gly-Asn-Phe-Gly-Ala-				
Phe	Asp Cys	Gln Ile Gln Ala Arg	Ala Ala Glu	Ala
			Ser Gln	
			Asp	
130	135	140	145	150
Asp-Ala-Gln-Gly-Ala-Met-Asn-Lys-Ala-Leu-Glu-Leu-Phe-Arg-Asn-Asp-Ile-Ala-Ala-Lys-Tyr-Lys-Glu-Leu-Gly-Phe-Gln-Gly				
Ala	Ser	Lys	Met	Thr Asn
	Lys	His	Ala	Ser Glu
				Glu
				Val Phe Tyr His

FIGURE 4

Structure générale des myoglobines. Les possibilités de substitutions actuellement reconnues sont indiquées en dessous du résidu le plus fréquemment retrouvé. Ces résultats tiennent compte des 8 myoglobines dont la séquence a été entièrement déterminée : Cachalot (EDMUNDSON - 66), Cheval (DAUTREVAUX - 67), Marsouin et Phoque (BRADSHAW et GURD - 68), Boeuf (HAN - 69), Dauphin (KARADJOVA - 70), Homme (ROMERO-HERRERA et LEHMAN - 71), Gibbon (ROMERO-HERRERA et LEHMAN - 72), Kangourou (AIR et THOMPSON - 73 et 74) et Mouton (HAN - 75). Des éléments des structures partielles des myoglobines de la Baleine (EDMAN et BEGG - 76) et du Porc (FLOC'H, DAUTREVAUX et HAN - 77) ont également été utilisés. La structure de la myoglobine de Chimpanzé (ROMERO-HERRERA et LEHMAN - 72 bis) s'intègre parfaitement dans ce schéma général.



séquences en amino-acides actuellement déterminées avec certitude. Dans la structure générale des myoglobines on constate la répartition inégale de certains acides aminés le long de la chaîne polypeptidique : dans la myoglobine de Cheval, on note ainsi l'accumulation des résidus de lysine ou d'arginine en certains endroits (7 entre les résidus 42 et 63, 7 entre les résidus 77 et 102, 5 entre les résidus 133 à 147) créant ainsi des zones basiques dans la chaîne peptidique : centres basiques I et II situés entre les résidus 62 et 64 d'une part et les résidus 77 et 82 d'autre part assurent notamment les liaisons proximale et distale de la globine avec l'hème, grâce aux résidus d'histidine.

Inversement, cette répartition laisse des zones qui sont presque totalement dépourvues de ces acides aminés basiques mais où s'accumulent certains résidus à caractères hydrophobes comme l'isoleucine, la valine ou les acides aminés aromatiques : on trouve ainsi entre les résidus 99 et 115 de la myoglobine de Cheval, 5 résidus d'isoleucine (sur les 7 contenus dans la molécule), 2 résidus de leucine, 1 de valine, 1 de tyrosine et de phénylalanine, soit 10 résidus à caractère nettement hydrophobe sur les 16 de la séquence. Cette répartition explique que certains enzymes protéolytiques tels que la trypsine laissent subsister de larges segments inattaquables par l'enzyme (pas de lysine ni d'arginine) et peu solubles dans les zones de pH utilisées habituellement pour le fractionnement peptidique : ces segments représentent ce que EDMUNDSON (78) appelle le "core", mélange peptidique insoluble riche en acides aminés à caractère hydrophobe et inattaqué par la trypsine.

B - METHODES GENERALES DE DETERMINATION DE LA STRUCTURE COVALENTE DES MYOGLOBINES.

1 - Introduction

La détermination de la séquence en acides aminés d'une myoglobine dont la structure est relativement simple puisqu'elle est constituée d'une chaîne unipeptidique de 153 acides aminés, ne peut cependant être réalisée par l'utilisation d'un seul type d'hydrolyse : il est nécessaire d'utiliser au minimum deux types de coupure. Chacune prise séparément, permet de déterminer des séquences partielles correspondant aux différents peptides isolés ; c'est la comparaison des

séquences partielles obtenues qui permet d'enchaîner ces séquences les unes aux autres. Cette méthode qui semble relativement simple rencontre cependant de grandes difficultés. Le premier type de coupure utilisé en raison de la forte teneur en lysine et en arginine de la globine est l'hydrolyse trypsique : celle-ci ne permet malheureusement pas de récupérer la totalité des peptides libérés, car une partie de ceux-ci reste insoluble. Ces peptides insolubles résultent soit de l'absence sur certains segments de lysine ou d'arginine comme par exemple le segment N-terminal qui comprend 16 acides aminés sans lysine ni arginine, soit de l'accumulation dans ces segments d'acides aminés hydrophobes tels que la leucine, l'isoleucine, la valine, la proline ou la méthionine. Ce sont ces acides aminés qui tapissent l'intérieur de la cavité dans laquelle se trouve l'hème. Le segment comprenant les résidus 103 à 115 est particulièrement riche en ces acides aminés hydrophobes et est insoluble. Par contre, des coupures trypsiques anormales telles que celles qui se situent au niveau de la liaison leucyl des enchaînements Val-Leu-X permettant d'obtenir à partir d'un peptide insoluble deux peptides plus solubles : ainsi dans la myoglobine de Cheval le peptide trypsique 64 à 77 est insoluble mais peut libérer deux peptides plus petits, 64 à 69 et 70 à 77. Il faut signaler aussi que l'insolubilité de certains fragments peptidiques contenant de l'histidine peut disparaître par la carboxyméthylation préalable de la globine.

2 - Les différentes stratégies utilisées dans l'étude des myoglobines

a) La myoglobine de Cachalot

La première myoglobine étudiée fut la myoglobine de Cachalot : sa structure a été déterminée par EDMUNDSON et HIRS (79). Dans un premier stade fut déterminée la composition en acides aminés et la nature des acides aminés terminaux : la valine a été identifiée en position N-terminale par la méthode des dinitrophényl-aminoacides de SANGER et la carboxypeptidase a précisé la position de la glutamine en position C-terminale. Cette détermination de la nature des acides aminés terminaux est importante car ils ont dans l'étude des séquences une valeur de point de repère.

La détermination de la séquence en amino-acides de la myoglobine de Cachalot a été abordée par deux voies distinctes : la voie chimique représentée par l'hydrolyse trypsique (EDMUNDSON - 80) et la voie physique. Spectres de diffraction aux rayons X avec une résolution de 2 Å (KENDREW et al. - 81). Bien qu'incomplète en raison de la formation des peptides insolubles représentant environ 1/3 de la chaîne peptidique l'étude chimique a été, semble-t-il, très utile pour orienter l'identification des chaînes latérales en spectrographie de RX, car c'est dans la zone des cores, non accessibles à l'hydrolyse trypsique, que l'on relève le plus grand nombre d'erreurs ; cette étude préliminaire s'est avérée en fait très insuffisante sur ces deux points de vue : une détermination de la conformation avec une résolution de 1,4 Å (KENDREW - 82) d'une part, une révision de la stratégie de détermination des séquences d'autre part ont été nécessaires pour l'établissement définitif de cette structure (EDMUNDSON - 83). L'étude chimique de la séquence en acides aminés à ce stade fut entreprise par coupure chimique des deux liaisons méthionyl par le bromure de cyanogène (EDMUNDSON - 84) ; cette réaction coupe la liaison méthionyl en transformant ce résidu en lactone d'homosérine. Dans le cas de la myoglobine de Cachalot, trois peptides sont libérés dont l'un dépourvu d'homosérine est constitué par le fragment C-terminal ; les deux autres possèdent l'homosérine en position C-terminale : l'un est terminé à sa partie N-terminale par un résidu de valine, comme la myoglobine, c'est le fragment N-terminal ; l'autre possède la lysine en N-terminal, c'est le fragment médian. Chacun des trois fragments libérés peut être alors hydrolysé par la trypsine et la chymotrypsine : le problème du "core" trypsique n'est certes pas résolu puisqu'un insoluble important marque l'hydrolyse trypsique des segments N-terminal et médian, mais dans le cas de l'hydrolyse chymotrypsique, les peptides étudiés recouvrent la totalité de la séquence, à condition d'utiliser deux temps d'hydrolyse, 3 heures en général et 20 heures pour l'étude des peptides provenant des "cores" tryptiques. L'alignement des peptides chymotrypsiques dans chacun des trois segments ne pouvait évidemment se faire que dans la mesure où des peptides tryptiques recouvraient leurs séquences : c'est dire que cet alignement restait impossible au niveau des "cores" ; il faut également noter que le peptide N-terminal chymotrypsique 1-13, qui fait partie du core trypsique n'a pu être isolé en quantité suffisante pour que sa structure ait pu être déterminée. La solubilisation des 3 cores tryptiques et du core chymotrypsique (résidus 1 à 13)

a pu être obtenue après carboxyméthylation de la globine par le bromoacétate à pH 7 : cette technique découle d'une observation de BANASZAK et GURD (85) qui montrèrent que quelques-uns des peptides tryptiques de myoglobine sont beaucoup plus solubles si la globine a été préalablement carboxyméthylée. La carboxyméthylation de la globine bloque 8 résidus d'histidine sur les 12 et les transforme en carboxyméthyl histidine (1 résidu de 3-CM Histidine, 3 résidus de 1 CM-histidine et 4 résidus de 1-3 di-CM-histidine) ; l'hydrolyse tryptique de la globine ainsi carboxyméthylée, est comparée par chromatographie sur colonne de résine Dowex 50 X 2 à celui de la globine non carboxyméthylée : l'étude des peptides qui ont un comportement différent avant et après carboxyméthylation de la globine montre que ces peptides contiennent les résidus d'histidine n°s 12, 24, 48, 64, 81 ou 82, 113, 116 et 119 ; on remarque que les résidus 12, 64, 113 et 116 font partie des trois cores tryptiques et on peut supposer que l'introduction d'un groupement anionique dans ces peptides favorise leur solubilisation en milieu neutre ou alcalin. Il faut noter également que la concentration élevée en trypsine utilisée par EDMUNDSON (4 p. 100 par rapport à la CM-globine) accentue l'importance des coupures secondaires, notamment celles de type chymotryptique, ce qui favorise l'hydrolyse et la solubilisation du core.

b) La myoglobine de Cheval

La stratégie adoptée pour la myoglobine de Cheval par DAUTREVAUX, BOULANGER, HAN et BISERTE (86) a surtout été guidée par le souci d'obtenir un hydrolysate qui soit le plus simple possible et qui recouvre la totalité de la séquence ; la présence de 11 résidus d'acides aminés aromatiques (7 Phe + 2 Tyr + 2 Trp) et de 17 leucines, moins sensibles à l'action de la chymotrypsine les a incités à utiliser cet enzyme dans un premier temps plutôt que la trypsine qui peut exercer son action sur 19 liaisons lysyl et 2 liaisons arginyl, mais qui laisse subsister un core important ; la chymotrypsine commercialisée en 1964 contenait une activité tryptique non négligeable, ce qui a compliqué de façon considérable le plan de fractionnement mettant en jeu successivement la gel-filtration sur Sephadex, l'électrophorèse en film liquide et la chromatographie d'élution sur colonne de résine (DAUTREVAUX 87) : l'étude des quelques 70 peptides isolés (BOULANGER - 88) a ainsi permis de recouvrir la quasi-totalité de la séquence, à l'exception d'un déficit de 2 résidus d'acide glutamique, d'une valine et d'une

leucine correspondant à l'enchaînement 8 - 11 : Gln-Glu-Val-Leu : ce tétrapeptide est normalement libéré par la chymotrypsine mais le milieu alcalin requis pour cette hydrolyse favorise la cyclisation de la glutamine N-terminale en acide pyroglutamique ; dépourvu de fonction aminée libre, ce peptide n'est plus fixé par les résines à échange de cation, ni "révélé" par la ninhydrine et a de ce fait échappé à notre étude.

Ultérieurement, (DAUTREVAUX - 89) l'utilisation d'une chymotrypsine préalablement traitée par le TLCK (Tosyl-lysine-chlorométhylkétone ou 1-chloro-3-Tosyl-amido-7-amino-2-heptanone), a permis de limiter considérablement le nombre des coupures : environ 40 peptides seulement peuvent être isolés ; combinés aux précédents hydrolysats chymotrypsiques, ils permettent de recouvrir la totalité de la chaîne peptidique ; la séquence 77-86, qui comprend notamment 3 résidus de lysine et 2 d'histidine ne peut cependant être isolée car elle est fortement retenue par les résines à échange de cation en raison de son caractère fortement basique.

L'alignement des séquences chymotrypsiques, les unes par rapport aux autres n'était cependant possible qu'en combinant l'hydrolyse chymotrypsique avec un autre type d'hydrolyse comme l'hydrolyse trypsique les noyaux laissés inattaqués par cet enzyme leur interdisait a priori l'utilisation directe de la trypsine. L'hydrolyse trypsique a donc été réalisée non pas sur la globine mais sur chacun des trois peptides libérés par action du bromure de cyanogène (HAN - 90) et (DAUTREVAUX - 91) : dans ces conditions, la solubilité des peptides insolubles n'est pas accrue mais leur proportion par rapport au reste des peptides est augmentée, ce qui permet de les retrouver plus facilement au cours du fractionnement. De plus, l'utilisation de conditions d'hydrolyse trypsique plus efficaces, notamment une plus forte concentration en enzyme (4 p. 100 par rapport au substrat) permet une meilleure attaque de ces résidus insolubles, en favorisant les coupures secondaires. C'est ainsi notamment, que trois liaisons leucyl localisées chacune dans un des trois segments peptidiques insolubles sont hydrolysées par la trypsine : il s'agit dans les trois cas de liaisons du type Val-Leu-X (liaisons Leu-Asn en 11-12, Leu-Thr en 69-70 et Leu-His en 115-116).

Dans l'étude de la myoglobine humaine (HILL - 92), seules les hydrolyses trypsique et chymotrypsique ont été utilisées, à l'exclusion

de la coupure des liaisons methionyl par le bromure de cyanogène : de ce fait, de nombreuses incertitudes de séquence ont persisté, notamment au niveau des cores. La séquence en amino-acides de la myoglobine de Dauphin (KARADJOVA - 93) a par contre été déterminée complètement par l'utilisation simultanée de ces trois types d'hydrolyse.

La coupure chimique de la globine de myoglobine de Cheval par le bromure de cyanogène a été compliquée par l'existence d'une liaison Met-Thr (131-132) difficilement coupée par ce réactif : de ce fait il subsistera dans le milieu, après réaction, non seulement les trois peptides prévus mais également un peptide englobant les segments médians C-terminaux, ce qui a compliqué l'isolement de ces fragments (HAN - 94). De plus, le milieu HCl 0,1 N utilisé à cette époque pour réaliser la coupure a été à l'origine d'un certain nombre de coupures secondaires provoquant notamment la libération de lysyl-peptides ; ceux-ci ont été éliminés par une dialyse avant séparation des fragments par gel-filtration sur Sephadex. La méconnaissance de ces coupures secondaires en milieu HCl 0,1 M a ainsi conduit BLACK et LEAF (95) à des résultats erronés concernant la myoglobine de Cheval. Actuellement, l'utilisation d'acide formique à 70 p. 100 limite considérablement ces coupures secondaires tout en augmentant le rendement de coupure des liaisons Met-Thr ou Met-Ser.

Au cours de cette étude un problème important a dû être résolu d'une manière particulière ; il s'agit de la séquence Leu-lysyl-lysyl-lysyl-Gly (76-80). L'hydrolyse trypsique ne permet pas en effet de garder intacte la séquence Lys-Lys-Lys mais libère au contraire plusieurs peptides se chevauchant particulièrement :

Thr-Ala-Leu-Gly-Gly-Ile-Leu-Lys (70-77)

Lys-Lys-Gly-His-His-Glu-Ala-Glu-Leu-Lys-Pro-Leu Thr-Lys (78-96)

Lys-Gly-His-His- Thr-Lys (80-96)

Lys-Lys (78-79)

L'hydrolyse chymotrypsique ne permet pas non plus de prouver cette séquence : la coupure de la liaison Leu-Lys en 76-77 est totale et le peptide 77-89, très basique, ne peut être élué des résines échangeuses d'ions ; de plus, l'activité "trypsine libre" de la chymotrypsine est suffisante pour rompre la majeure partie des liaisons Lys-Lys

77-78 et 78-79, ce qui ne laisse que très peu du peptide 77-89. La solution de ce problème a été trouvée dans la guanidylation des résidus de lysine de la globine (HAN - 96) : le traitement de la globine par l'O.Méthyl isourée transforme en effet les résidus de lysine en homoarginine ; comme les liaisons homoarginyl sont insensibles à l'action de la trypsine, nous espérons qu'elles seraient donc respectées par l'activité "trypsine libre" de la chymotrypsine et que nous pourrions ainsi récupérer un peptide (77-86) contenant l'enchaînement des trois HomoArg : ce peptide a effectivement pu être isolé par électrophorèse sur papier à haut voltage et son étude a apporté la preuve de la séquence 76-86 et ainsi confirmé la structure partielle de la myoglobine de Cheval présentée en 1967 (DAUTREVAUX - 97).

c) Les myoglobines de Marsouin et de Phoque

Les myoglobines de Marsouin et de Phoque (BRADSHAW et GURD - 98) ont été étudiées par hydrolyse trypsique et chymotrypsique de la globine complètement carboxyméthylée ; c'est actuellement la deuxième grande stratégie utilisable dans le domaine des myoglobines : les peptides trypsiques insolubles sont dissous à pH 9 et fractionnés sur une résine à échange d'anions (Dowex 1 X 2) alors que les peptides solubles sont isolés sur une résine à échange de cations (Dowex 50 X 8). Les séquences insolubles ainsi isolées comprennent essentiellement le segment N-terminal 1-16 et le segment 103-118. L'avantage majeur de cette stratégie est de limiter les deux grandes voies d'approche à une hydrolyse trypsique et une hydrolyse chymotrypsique et d'éviter ainsi l'utilisation toujours délicate de la coupure au bromure de cyanogène. Cette stratégie semble n'être applicable que si les peptides résiduels, et en particulier le segment N-terminal, contiennent des résidus d'histidine : c'est le cas de la myoglobine de Phoque qui contient un résidu d'histidine en position 8 (BRADSHAW - 99) ; par contre, la séquence N-terminale de la myoglobine de Marsouin en est dépourvu, mais BRADSHAW et al. ont montré que le peptide insoluble N-terminal pouvait cependant être solubilisé à pH alcalin en raison de la carboxyméthylation du glycolle N-terminal. Si cette carboxyméthylation du glycolle N-terminal représente un avantage pour la solubilisation du core, elle interdit néanmoins toute étude de ce peptide par la méthode de dégradation récurrente d'EDMAN.

d) Les myoglobines de l'Homme et du Gibbon

Les myoglobines de l'Homme et du Gibbon ont été étudiées par HERRERA et LEHMAN (100 - 101). La trypsine a d'abord été utilisée mais elle laisse comme dans les autres myoglobines un résidu insoluble non attaqué par l'enzyme et qui correspond aux séquences 1-16, 64-77 et 103-118. Les deux premières séquences correspondent à des peptides tryptiques partiellement solubles ; la troisième est complètement insoluble et cette insolubilité totale est probablement due à l'existence d'un résidu de cystéine en position 110, qui par oxydation en cystine provoque la duplication de ce peptide. Les peptides 1-16 et 64-77 peuvent être complètement solubilisés par digestion pepsique du résidu insoluble. L'enchaînement 103-118 n'a pu être complètement déterminé qu'après aminoéthylation de la globine (CLEGG - 102), car la trypsine trouve dans la liaison S-aminoéthyl cystéinyl une nouvelle spécificité et libère alors ce fragment sous forme de deux peptides solubles comprenant les résidus 103 à 110 et 111 à 118. L'hydrolyse des peptides tryptiques par d'autres enzymes protéolytiques tels que la subtilisine, la chymotrypsine ou la thermolysine a été utilisée pour déterminer entièrement leur séquence. Ainsi, l'action de la thermolysine sur le peptide tryptique comprenant les résidus 17 à 31 libère cinq peptides différents qui permettent d'en établir la séquence. L'enchaînement les uns aux autres des divers peptides tryptiques a été réalisé par recouplement avec les données de la coupure chimique de la globine par le bromure de cyanogène suivie de l'hydrolyse chymotrypsique des fragments isolés par le bromure de cyanogène puis hydrolyse chymotrypsique.

e) Myoglobine de Kangourou

La myoglobine de Kangourou (AIR et THOMPSON - 103) a été étudiée par action du bromure de cyanogène sur la globine : quatre peptides sont isolés : le peptide N-terminal comprenant 55 résidus : BrCN 1 ; un peptide comprenant 76 résidus : BrCN 2 ; un peptide comprenant 11 résidus : BrCN 3 ; le peptide C-terminal comprenant également 11 résidus : BrCN 4. Un cinquième peptide, BrCN 5, composé des 22 résidus C-terminaux a permis de placer le peptide BrCN 3 par rapport à BrCN 2. La séquence de chaque peptide a été ensuite déterminée

indépendamment par des méthodes différentes.

La digestion par la chymotrypsine du peptide BrCN 2 libère 11 peptides. L'enchaînement de ces peptides est retrouvé par comparaison avec les peptides de l'hydrolysate de ce fragment tryptique. L'action de la N-bromosuccinimide ou encore la comparaison avec les myoglobines d'autres espèces déjà connues ont également été utilisées pour établir ces enchaînements.

La séquence du peptide BrCN 3 a été déterminée par hydrolyse tryptique en comparant les peptides tryptiques avec ceux isolés obtenus par hydrolyse tryptique du produit de maleylation de la globine : la maleylation permet de limiter la spécificité de la trypsine aux liaisons arginyl car l'anhydride maléique bloque les groupes ϵ -aminés de la lysine et donne une liaison maleyl amine très stable ; deux peptides maleylés ont été utilisés pour cette détermination : le premier peptide a la composition suivante : Lys-Lys-Ala-Leu-Glu-Leu-Phe-Arg ; le second peptide : His-Asp-Met-Ala-Ala-Lys(Tyr, Lys, Glu, Phe, Gly, Phe, Gln, Gly).

La composition du peptide BrCN 3 a permis d'établir par comparaison avec ces deux peptides la séquence :
Lys-Lys-Ala-Leu-Glu-Leu-Phe-Arg-His-Asp-HSer.

f) Les myoglobines de Boeuf et de Mouton

La détermination des myoglobines de Boeuf (DAUTREVAUX - 104) et de Mouton (HAN - 105) a été faite pour les 2/3 environ de la chaîne peptidique par comparaison des hydrolysats tryptiques avec ceux de la myoglobine de Cheval déjà connue ; le problème de l'alignement des peptides obtenus est fortement simplifié lorsqu'on se base sur une myoglobine de référence ; l'étude même de chaque peptide libéré est facilitée elle aussi par comparaison avec leur homologue dans la myoglobine de référence (comportement en chromatographie et électrophorèse, composition en acides aminés, dansyl amino acides N-terminal identique) : dans tous les cas où ces paramètres se révélaient identiques, on a considéré que les séquences en amino-acides étaient identiques ; la détermination directe des séquences n'a été effectuée que si le peptide présentait des caractères le distinguant de son homologue présumé dans la myoglobine de référence. La coupure par le bromure de cyanogène et l'hydrolyse chymotrypsique des fragments obtenus permet de vérifier l'alignement des peptides tryptiques libérés à partir de la globine

totale. L'hydrolyse chymotrypsique de ces fragments permet également l'étude des "cores", conjointement à leur hydrolyse trypsique : l'étude de ces peptides tryptiques se limite à leur identification par comparaison de leur comportement avec ceux isolés des hydrolysats tryptiques de globine totale et par détermination de leur composition en acides aminés.

C - CONCLUSION

La détermination de la structure primaire des myoglobines de Mammifères étudiées jusqu'à maintenant a été faite selon deux stratégies générales : soit la combinaison de l'hydrolyse trypsique et chymotrypsique sur la globine carboxyméthylée, soit la combinaison de l'hydrolyse trypsique de la globine à l'hydrolyse chymotrypsique des fragments isolés après coupure par le bromure de cyanogène. Enfin, la méthode comparative à l'aide d'une myoglobine de référence dont on a une connaissance parfaite est une stratégie non négligeable. Mais l'introduction récente des séquenceurs automatiques, selon la dégradation d'EDMAN nous laisse prévoir un bouleversement de ces stratégies utilisées il faut cependant noter que les résultats de cette méthode automatique sont actuellement limités à 60 résidus (myoglobine de Baleine (EDMAN et BEGG - 106)) ; c'est dire qu'elle ne permet que l'étude des séquences N-terminales plus ou moins larges et qu'elle ne pourra jamais constituer qu'une stratégie d'appoint permettant de se combiner par exemple à la coupure au bromure de cyanogène.

CHAPITRE II

L'HYDROLYSE TRYPSIQUE DE LA MYOGLOBINE DE CHIEN

A - ETUDE DES HYDROLYSATS TRYPSIQUES

1) Conduite de l'hydrolyse trypsique

a) Spécificité de l'enzyme

La trypsine hydrolyse spécifiquement les liaisons carboxyliques de la lysine et de l'arginine. Chaque peptide libéré par la trypsine (peptide trypsique") a donc la lysine ou l'arginine en position C-terminale. L'hydrolyse totale de la globine nous renseigne sur le nombre total des résidus de lysine et d'arginine de la molécule, aussi, pouvons-nous prévoir approximativement le nombre de peptides tryptiques à obtenir. Afin de faciliter l'action enzymatique, l'hydrolyse trypsique se fait sur la globine comme l'a préconisé BOULTON (107). D'autre part, nous utilisons un rapport enzyme/substrat supérieur à 2 p. 100 afin d'assurer à la fois une hydrolyse plus poussée et une meilleure reproductibilité de l'hydrolyse trypsique. En effet, certaines liaisons lysyl ou arginyl sont difficiles à rompre, notamment celles qui sont proches des résidus à caractère acide : on obtient alors des mélanges de peptides qui se chevauchent, comme ceux par exemple qui correspondent aux séquences Phe-Asp-Lys-Phe-Lys, Phe-Asp-Lys et Phe-Lys ; on peut également obtenir des fragments ayant la séquence Val-Leu en position C-terminale (voir plus loin).

b) Mode opératoire

α) Dénaturation du substrat

La dénaturation de la myoglobine de Chien est faite par une méthode douce à l'éthanol et au chlorhydrate de guanidine (BISERTE et HOLLEMAN - 108). A une solution aqueuse de myoglobine (10 mg/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, sous agitation régulière, 2 ml d'éthanol absolu pour 10 ml de solution ; on laisse en contact toute une nuit sous agitation à température ambiante. L'addition de 8 volumes d'acétone contenant 1 p. 1000 d'acide chlorhydrique concentré précipite totalement la globine partiellement dénaturée et laisse l'hémine en

solution. Le précipité recueilli après centrifugation est redissous sous agitation pendant 1 heure dans la quantité minimale d'acide chlorhydrique N/5. On ajoute ensuite 6 volumes d'acétone chlorhydrique pour précipiter complètement la globine et parfaire l'élimination de l'hème. On centrifuge et on recommence deux fois la même opération. Enfin, le précipité de globine est lavé à l'acétone anhydre. Après séchage sous le vide partiel d'une trompe à eau on obtient une poudre grise, soluble dans l'eau et qui représente la globine partiellement dénaturée.

β) Hydrolyse trypsique

'La trypsine traitée par le chlorure de diphénylcarbamylo* est dépourvue d'activité chymotrypsique. L'hydrolyse est réalisée sur 200 mg de globine dissous dans 20 ml d'une solution de sesquicarbonate d'ammonium à 1 p. 100 à pH 8,75. La trypsine dissoute dans 1 à 2 ml de solution de sesquicarbonate est ajoutée en une seule fois, de façon à obtenir un rapport Enzyme/Substrat de 4 p. 100. On laisse l'hydrolyse se poursuivre pendant 2 h 30 à 38°C sous agitation magnétique. L'hydrolyse est arrêtée par congélation à - 20°C ; l'hydrolysate est alors lyophilisé.

2) Cartes peptidiques

a) Modalités de chromatographie et d'électrophorèse

La séparation du mélange peptidique peut être réalisée par différentes méthodes. INGRAM (109) effectue une électrochromatographie bidimensionnelle sur papier Whatman 3 MM : l'électrophorèse est réalisée à pH 6,4 avec un tampon pyridine-acide acétique-eau (10 : 0,4 : 100) sous une tension de 19 volts/cm pendant 1 h 30. Il est nécessaire de refroidir la feuille afin d'éviter l'évaporation du tampon. La chromatographie ascendante est réalisée dans le solvant butanol-acide acétique-eau (3 : 1 : 1). JEGOROV, KEIL et SORM (110) réalisent une électrophorèse à haute tension (35 volts/cm) dans un tampon pyridine-acide acétique-eau (5 : 1 : 999) de pH 5,6 ; elle est suivie d'une chromatographie ascendante avec le solvant butanol-pyridine-acide acétique-eau (15 : 30 : 3 : 12) de WALEY et WATSON (111).

La méthode que nous avons utilisée est basée sur l'électrochromatographie bidimensionnelle préconisée par BISERTE, PLAQUET-SCHOONAERT, BOULANGER et PAYSANT (112) ; 2 à 3 mg d'hydrolysate trypsique

sont déposés sur une feuille de papier Whatman 3 MM (57 x 47 cm). L'électrophorèse est réalisée dans un appareil en toit, type Durrum, à pH 3,9 avec un tampon pyridine-acide acétique-eau (30 : 100 : 4870) sous 300 volts, pendant 7 heures. La chromatographie descendante est réalisée dans le solvant Butanol-acide acétique-eau (4 : 1 : 5) pendant 18 heures. Nous avons aussi utilisé pour la chromatographie descendante le système butanol-pyridine-acide acétique-eau (15 : 10 : 3 : 12) de WALEY et WATSON (113).

b) Révélations multiples

La révélation des peptides se fait tout d'abord avec un réactif à la ninhydrine à 1 p. 100 ou à 0,2 p. 100 dans l'acétone. Le réactif à 1 p. 100 permet de révéler par une coloration franche tous les peptides. La coloration est fixée par une solution de Kawereau. Le réactif à 0,2 p. 100 (BAGLIONI - 114), moins sensible, permet une décoloration du chromatogramme par un mélange d'acétone et d'HCl N (4 : 1), ceci permet, après avoir entouré d'un trait de crayon les peptides colorés en bleu violet par la ninhydrine, de réaliser sur le même chromatogramme plusieurs réactions spécifiques successives. Nous avons ainsi mis en évidence successivement sur un même électrochromatogramme préalablement révéler par la ninhydrine et décoloré :

- les peptides à méthionine selon la technique de TOENNIS et KOLB (115)
Le chromatogramme est trempé dans le mélange extemporané obtenu en ajoutant dans l'ordre :

- 4 ml de PtCl_6^{--} 0,002 M,
- 0,25 ml de KI 1 N
- 0,40 ml de HCl 2 N
- 76 ml d'acétone

Les peptides à méthionine apparaissent après quelques minutes sous forme de spots blancs sur fond rose. Ce réactif permet également la révélation des peptides à cystéine ou à cystine, mais la myoglobine de chien en est dépourvue comme la plupart des autres myoglobines.

- les peptides à tryptophane par le réactif d'Ehrlich selon la technique de SMITH (116) : le chromatogramme est trempé dans une solution fraîche à 0,1 p. 100 de p.diméthyl aminobenzaldéhyde dans l'acétone chlorhydrique (9 : 1) les peptides apparaissent sous forme de spots gris bleu sur fond jaune.

- les peptides à histidine par le réactif de PAULY selon la technique de BALDRIDGE et LEWIS (117) ; on pulvérise sur le chromatogramme le mélange extemporané à volumes égaux

- d'une solution d'acide sulfanilique à 1 g dans HCl concentré 8 ml et eau 100 ml ;

- d'une solution de NaNO_2 à 0,69 %. On laisse sécher et on pulvérise ensuite une solution aqueuse de CO_3Na_2 à 10 p. 100.

Les peptides à histidine apparaissent sous forme de spots rose rouge ; les peptides à tyrosine réagissent faiblement en donnant une coloration rose.

- les peptides à tyrosine sont mis en évidence sur un autre chromatogramme préalablement révélé à la ninhydrine puis décoloré par le mélange acétone-HCl : on utilise l' α -nitroso- β -naphtol selon la technique de ACHER et CROCKER (118) : on pulvérise sur le chromatogramme une solution à 0,1 p. 100 d' α -nitroso- β -naphtol dans l'éthanol à 95 p. 100. On sèche sous un courant d'air froid, puis on pulvérise une solution d'acide nitrique à 10 % dans l'eau. On chauffe alors 15 minutes à l'étuve à 100°C. Les peptides apparaissent sous forme de spots roses sur fond vert pâle.

- les peptides à arginine sont mis en évidence sur un troisième chromatogramme par le réactif de SAKAGUCHI selon la technique de JEPSON et SMITH (119) : le chromatogramme est trempé dans une solution acétonique de 8-hydroxyquinoléine à 0,1 p. 100. On laisse sécher puis on trempe à nouveau le chromatogramme dans une solution de BrONa (brome 0,2 ml et NaOH 0,5 N 100 ml) ; les peptides à arginine apparaissent sous forme de spots fugaces rouge-orange.

c) Résultats

Les cartes des peptides tryptiques de la myoglobine de Chien ainsi obtenues, permettent, par la méthode des "finger-prints" d'identifier avec une grande probabilité certaines séquences peptidiques de la myoglobine de Chien par rapport à la myoglobine de Cheval qui nous sert de témoin. Cette comparaison représentée à la figure 5 a été pour nous un guide utile dans notre étude des peptides libérés par la trypsine. Déjà un certain nombre de ceux-ci apparaissent identiques dans l'une et l'autre espèce : c'est le cas des taches numérotées A, B, C,

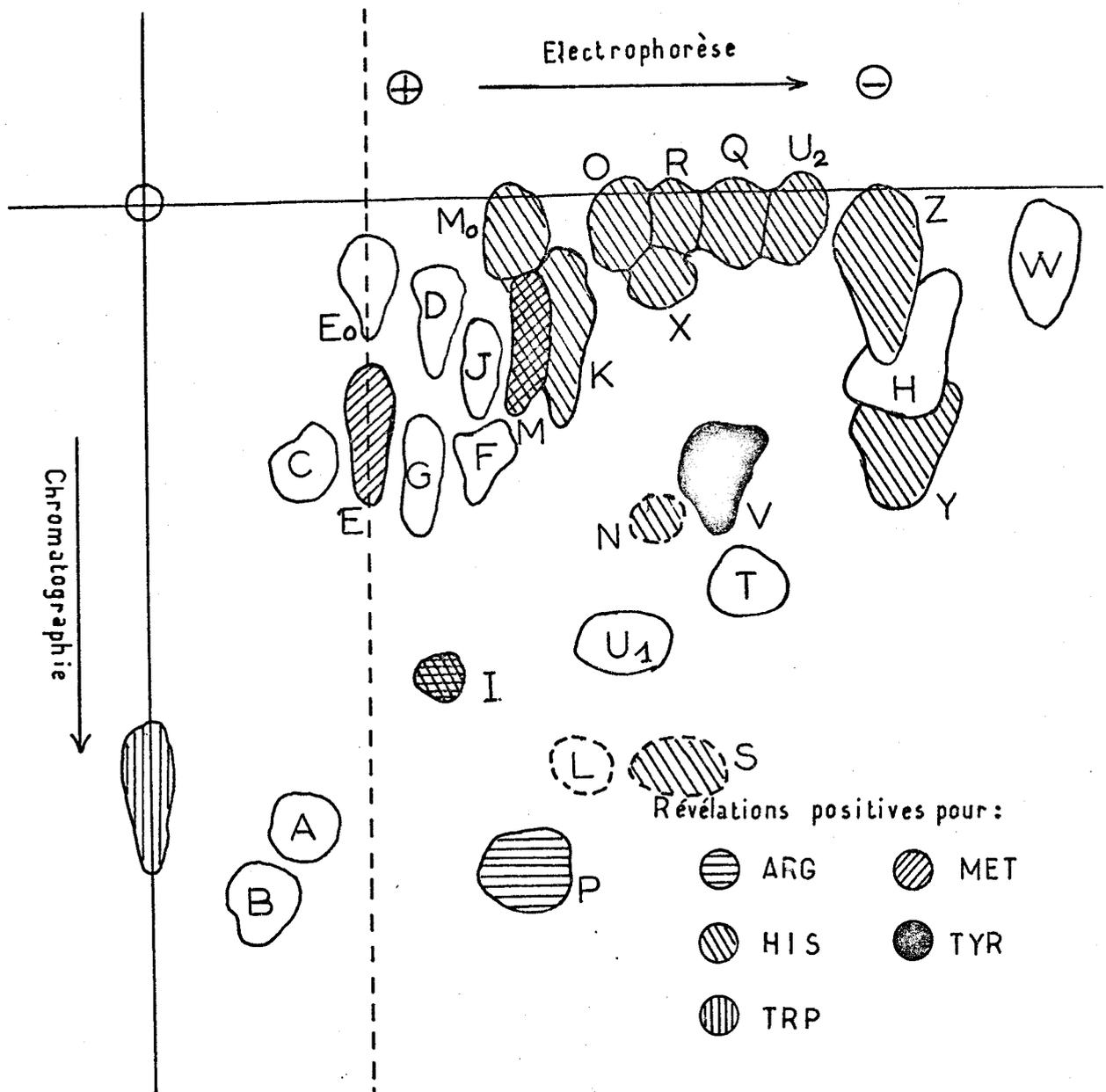


FIGURE 5

Carte peptidique obtenue avec un hydrolysate trypsique de myoglobine de Chien.

E_0 : Peptide à Met. SO

M_0 : Peptide à Met. SO

BUS
LILLE

D, G, P, T, V, W et Y sur le schéma de la figure 5 qui présentent un comportement électrochromatographique identique à celui de certains peptides tryptiques de la myoglobine de Cheval. L'identification probable de ces taches peptidiques est indiquée dans le tableau V.

B - FRACTIONNEMENT PREPARATIF DES HYDROLYSATS TRYPTIQUES

Le fractionnement préparatif des hydrolysats tryptiques de la globine de Chien est réalisé par chromatographie sur échangeurs d'ions : nous avons utilisé une colonne de résine polystyrène sulfoné à faible pourcentage de divinylbenzène (résine Chromobeads P Technicon) et l'élution a été faite au moyen de tampons pyridine-acide formique ou acétique de pH et de molarité croissants en pyridine (Figure 5 bis).

1) Chromatographie sur colonne de résine

a) Préparation de la colonne

La résine Chromobeads P en suspension dans un tampon pyridine 2 N - acide acétique de pH 5,0 (*) est versée à l'aide d'une ampoule dans la colonne (**) maintenue à une température de 50°C. On laisse la suspension se décanter par simple gravité toute une nuit. On enlève le surplus de résine par aspiration à la trompe à eau ; on enlève l'ampoule et on achève le tassage de la colonne par passage, sous pression (***) environ 20 kg par cm²) du tampon de pH 5 avec un débit de 0,6 ml par minute pendant deux heures. On équilibre ensuite la résine au pH désiré par passage pendant 2 à 3 heures du tampon initial utilisé pour la chromatographie (tampon pyridine 0,1 N de pH 2,90 (****))

(*) Tampon 2 M - pH 5,0

-Pyridine 644 ml
- acide acétique 400 ml qsp pH 5,0
- eau distillée qsp 4 litres

(**) Colonne Technicon 140 x 0,635 cm munie d'une jaquette à circulation d'eau.

(***) Pression obtenue à l'aide d'une pompe à pression positive MILTON ROY ou DOSAPRO.

(****) Tampon pyridine 0,1 N de pH 2,90

- Pyridine 40 ml
- acide formique 80 ml
- eau distillée 4,5 l
- acide formique dilué au 1/10 qsp pH 2,90
- eau distillée qsp 5 litres

TABLEAU V

PEPTIDES TRYPSIQUES DE LA MYOGLOBINE DE CHIEN
 IDENTIFIES PAR COMPARAISON AVEC LEUR HOMOLOGUE DE LA MYOGLOBINE
 DE CHEVAL

n°	SEQUENCE	RESIDUS
D	Phe-Asp-Lys	43 - 45
T	Phe-Lys	46 - 47
Y	His-Leu-Lys	48 - 50
W	Lys-Lys	78 - 79
P	Ala-Leu-Glu-Leu-Phe-Arg	134 - 139
G	Asn-Asp-Ile-Ala-Ala-Lys	140 - 145
C (*)	Asp-Asp-Ile-Ala-Ala-Lys	-
V	Tyr-Lys	146 - 147
A	Glu-Leu-Gly-Phe-Gln-Gly	148 - 153
B (*)	Glu-Leu-Gly-Phe-Glu-Gly	-

(*) Ces peptides proviennent respectivement de la désamidation accidentelle des peptides G et A.



FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE SUR CHROMOBEADS P

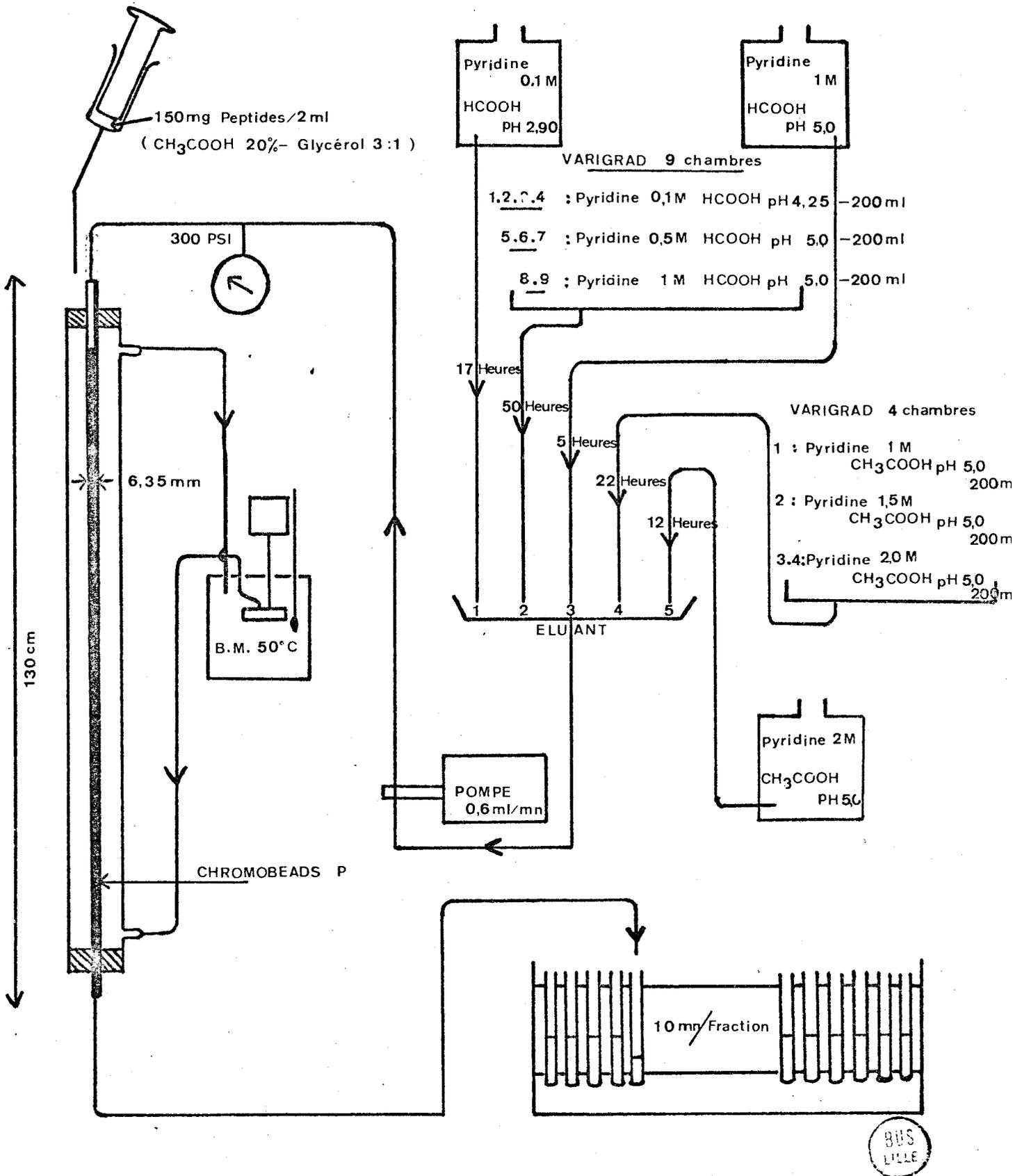


FIGURE 5 BIS

Conditions techniques du fractionnement des hydrolysats tryptiques de globine, de myoglobine de Chien sur colonne de résine à échange de cations.

au cours de cette opération la pression diminue jusqu'à 14 kg par cm² environ.

b) Chromatographie

L'hydrolysate tryptique (150 mg environ) lyophilisé est repris par 3 ml d'acide formique à 10 p. 100. Après homogénéisation du mélange, celui-ci est centrifugé et le surnageant est déposé à l'aide d'une seringue à la surface de la résine sous la couche de tampon. On branche alors la tête de la colonne et dès la mise en route de la pompe (0,6 ml par minute), l'échantillon pénètre dans la résine. L'élution de la colonne se fait à la température de 50°C par un gradient de pH et de concentration en ions pyridinium (Tableau VI).

Les gradients sont réalisés avec le Varigrad conçu par PETERSON et SOBER (120). L'effluent est recueilli au moyen d'un collecteur automatique de fractions (fractions de 6 ml ou 10 minutes). La pression en fin de chromatographie atteint 21 à 25 kg par cm².

c) Régénération de la résine

Après utilisation, la résine est soigneusement lavée par passage de NaOH 0,2 N : la saturation complète de la résine, donc l'élution totale des peptides et cations fixés sur la colonne, nécessite ce passage pendant environ 16 heures. La résine est alors régénérée par simple passage du tampon initial. La pression baisse alors jusqu'à environ 14 kg par cm². Après plusieurs chromatographies, lorsque la pression finale atteint ou dépasse 50 kg par cm², il est nécessaire de retasser la résine : celle-ci est complètement sortie de la colonne par pompage de tampon après avoir enlevé l'embout inférieur. On peut également, si on est pressé par le temps, détasser la résine par pompage de tampon dans le sens de bas en haut jusqu'à ce que la surface supérieure de la résine atteigne le niveau de l'embout supérieur. On laisse au repos trois à quatre heures et on tasse normalement par passage du tampon du haut vers le bas.

2) Etablissement de la courbe d'élution

a) Réaction à la ninhydrine

La courbe d'élution est établie par dosage automatique (autoanalyseur Technicon) à l'aide d'une réaction colorimétrique à la

SCHEMA DE MONTAGE DE L'ANALYSE AUTOMATIQUE AVEC LA NINHYDRINE

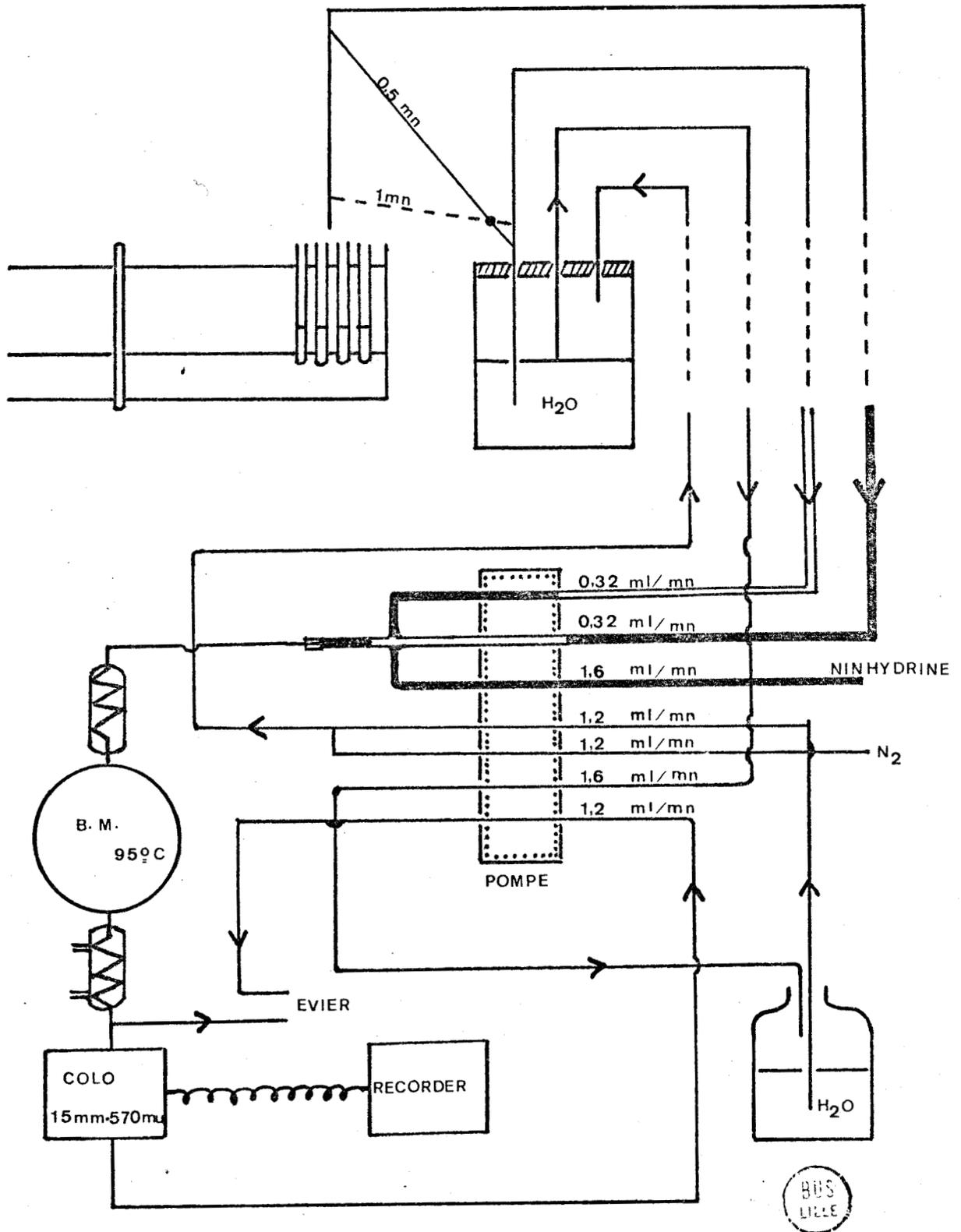


FIGURE 6

Montage réalisé pour l'établissement automatique des courbes d'éluion au moyen de la réaction à la ninhydrine.

ninhydrine (Figure 6) réalisée sur une partie aliquote (0,32 ml) de chaque fraction ; les tubes correspondant à un même pic de la courbe d'élution sont rassemblés et lyophilisés.

La réaction automatique à la ninhydrine réalisée sur un échantillonnage discontinu de fractions distinctes se heurte à un certain nombre de difficultés ; ainsi, le prélèvement d'air obligatoire entre chaque prélèvement des liquides contenus dans les tubes successifs du collecteur déséquilibre la circulation du flux liquide dans le bain-marie de réaction (95°C) et est responsable d'une ligne de base sinusoïdale (mais dont la période ne correspond pas à celle des prélèvements) ; de plus, l'air introduit dans le milieu déprime la réactivité du réactif en consommant une quantité importante d'hydrindantine, ce qui se traduit par un abaissement périodique de la ligne de base correspondant à l'intervalle de temps compris entre deux prélèvements successifs de liquide ; cette dépression de la ligne de base est en fait un avantage car il permet le repérage et le comptage des tubes sur la courbe d'élution : celle-ci prend en effet l'aspect d'une sinusoïde de même fréquence que celle des prélèvements d'échantillons.

Le déséquilibre de la circulation du flux liquide dans le système analytique dû à l'introduction de gaz dans le flux liquide est atténué quand on utilise la technologie utilisée par TECHNICON pour le dosage automatique des aminoacides mais reste un obstacle à l'établissement d'une courbe d'élution précise et reproductible. Dans la technologie Technicon, la colonne liquidienne est fragmentée par un bullage d'azote : selon la technique utilisée au laboratoire, l'introduction d'azote dans le système analytique est synchronisée avec le prélèvement des échantillons liquides et elle est remplacée par l'introduction d'eau distillée pendant le temps correspondant à l'intervalle de deux tubes successifs (prélèvement d'air).

L'utilisation d'une méthode automatique de détection des peptides au moyen de la ninhydrine constitue un gain de temps extrêmement important par rapport à la méthode manuelle (18 heures environ pour lire 600 tubes) ; elle permet surtout d'obtenir des courbes d'élution beaucoup plus sensibles, précises et reproductibles.

TABLEAU VI

TAMPONS ET GRADIENTS UTILISES POUR LA CHROMATOGRAPHIE
D'ELUTION DES PEPTIDES TRYPSIQUES DE MYOGLOBINE

TAMPONS :

Tampon a : tampon pyridine 0,1 M - acide formique de pH 2,90

Tampon b : tampon pyridine 0,1 M - acide formique de pH 4,25

Tampon d : tampon pyridine 1 M - acide formique de pH 5,00

Tampon e : tampon pyridine 2 M - acide acétique de pH 5,00

GRADIENTS :

Gradient E : gradient à 9 chambres de 200 ml chacune.

Chambres 1 - 2 - 3 - 4 : 200 ml de tampon b

Chambres 5 - 6 - 7 : mélange de 100 ml de tampon d et
100 ml d'eau distillée

Chambres 8 et 9 : 200 ml de tampon d

Gradient F : gradient à 4 chambres de 200 ml chacune

Chambres 1 et 2 : 200 ml de tampon d

Chambre 3 : mélange de 100 ml de tampon e et 100 ml d'eau
distillée

Chambre 4 : 200 ml de tampon e

PROGRAMME D'ELUTION

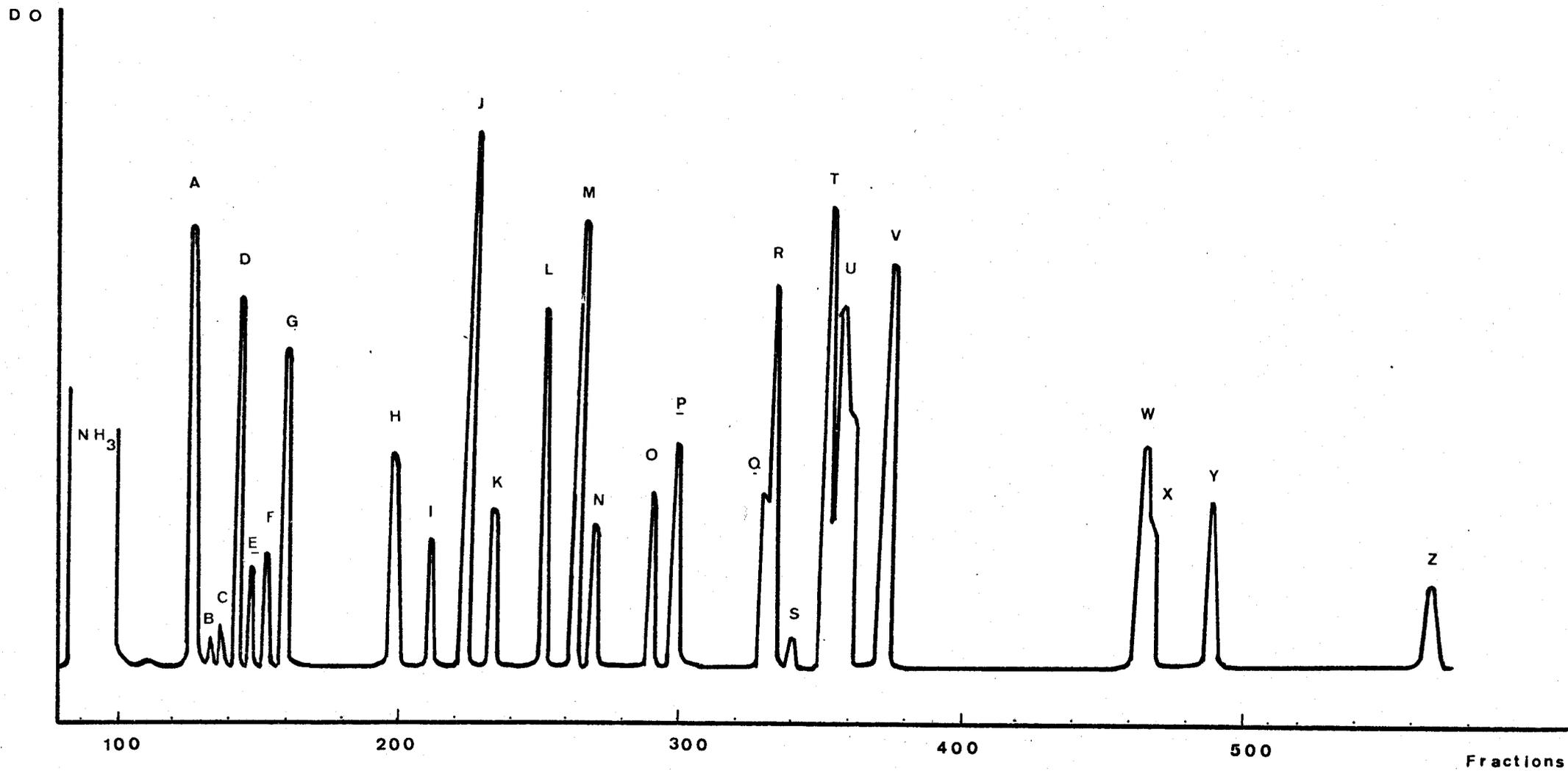
de 0 à 16 heures : tampon a (environ 580 ml)

de 16 à 66 heures (environ) : gradient E (1800 ml)

de 66 à 70 heures : tampon d (environ 144 ml)

de 70 à 92 heures (environ) : gradient F (800 ml)

de 92 à 100 heures : tampon e (environ 290 ml)



805
L14E

FIGURE 9

COURBE D'ELUTION DES HYDROLISATS TRYPSIQUES DE GLOBINE DE MYOGLOBINE DE CHIEN.

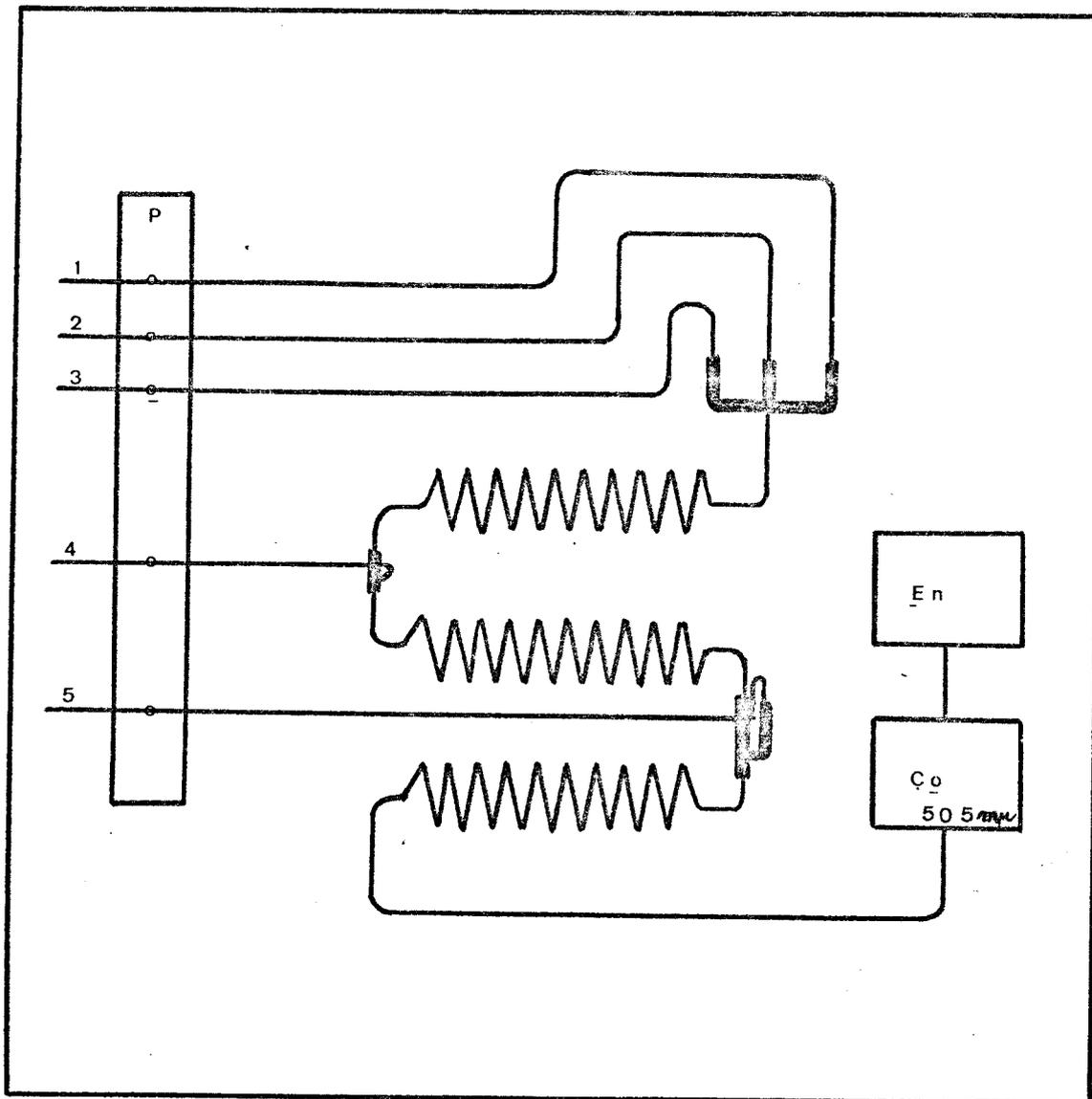
REACTION A LA NINHYDRINE.

Pour les conditions, d'élution, se référer à la figure 5 bis.

1. Pompage d'échantillon (tuyau noir : 0,32 ml/mn)
2. Pompage d'air (tuyau orange : 0,42 ml/mn)
3. Pompage de la solution de CO_3Na_2 2 M (tuyau vert : 2 ml/mn)
4. Pompage de la solution de nitrite de sodium 0,35 %
(tuyau jaune : 1,20 ml/mn)
5. Pompage de la solution d'acide sulfanilique (*)
(tuyau jaune : 1,20ml/mn)
* solution d'acide sulfanilique : 0,5 p 100 d'acide sulfanilique
dans HCl 0,5 N

Co : colorimètre (filtres à 505 m μ , cuve de 6 mm)

En : Enregistreur



305
LILLE

FIGURE 7

MANIFOLD UTILISE POUR LA REACTION DE SAKAGUCHI
(méthode automatique).

1. Pompage d'échantillon (tuyau noir : 0,32 ml/mn)
2. Pompage d'air (tuyau rouge : 0,80 ml/mn)
3. Pompage d'eau distillée (tuyau bleu : 1,60 ml/mn)
4. Pompage de la solution de 8 hydroxyquinoléine
(tuyau vert : 2 ml/mn)
5. Pompage de la N Bromosuccinimide (tuyau jaune : 1,20 ml/mn)

Co (colorimètre - filtre 505 mu)

En Enregistreur

P Pompe proportionnante

* Solution de la 8 hydroxyquinoléine :

- 20 ml de la solution de 8 hydroxyquinoléine à 1 P. 100 dissous dans le méthanol
- 375 ml de NaOH 8 N
- QSP 1l d'H₂O distillée.

* * Solution de N Bromosuccinimide :

0,1 % de NBS dans l'eau (préparée extemporanément).

b) Réactions spécifiques

Afin de repérer les peptides à arginine, nous avons effectué la réaction de SAKAGUCHI de façon automatique grâce à la méthodologie décrite par la Compagnie Technicon (Figures 7 et 8). La réaction de PAULY, adaptée à l'autoanalyseur Technicon, nous a permis de repérer également les peptides à histidine.

3) Contrôles d'homogénéité et étapes de purifications éventuelles

La vérification de l'homogénéité des peptides est faite par la méthode classique d'électrochromatographie sur papier décrite par PLAQUET, BISERTE et BOULANGER (121).

Chaque fraction peptidique lyophilisée est reprise dans 2 ml d'eau bidistillée : 100 μ l de cette solution sont déposés sur une feuille de papier Whatman n° 3. Dans une première dimension, on effectue une électrophorèse en toit dans un tampon pyridine-acide acétique-eau (60 : 200 : 9740) de pH 3,9 sous 600 volts pendant 7 heures ou 450 volts pendant 16 heures. La migration se fait de la cathode vers l'anode. La feuille est ensuite séchée puis soumise dans une deuxième direction à une chromatographie descendante dans le solvant de PARTRIDGE (122) (n-butanol- acide acétique-eau (4 : 1 : 5). Le développement est réalisé au moyen de la phase organique tandis que la phase aqueuse sert à la saturation de la cuve (phase saturante). La durée de la chromatographie est de 18 heures environ à 20°C.

Après séchage, la révélation du peptide se fait par trempage du chromatogramme dans la ninhydrine à 0,1 p. 100 et chauffage à l'étuve à 100°C pendant 10 minutes. Après avoir encerclé d'un trait de crayon la tache, le chromatogramme est éventuellement décoloré par le mélange HCl N/acétone puis on effectue des réactions spécifiques de certains acides aminés tels que l'arginine, la tyrosine, l'histidine ou la méthionine. Le peptide est homogène si nous n'obtenons qu'une seule tache sur le chromatogramme : l'expérience obtenue au laboratoire dans le domaine des myoglobines nous permet cependant de considérer certaines fractions comme homogènes, bien que la tache majeure soit accompagnée de plusieurs taches mineures : c'est notamment le cas de fractions que nous savons devoir correspondre à des peptides de faible poids moléculaire.

Purification sur papier

Lorsque la fraction peptidique est hétérogène, il est nécessaire de purifier les peptides qu'elle contient, soit par la méthode d'électrophorèse préparative, soit par la méthode de chromatographie préparative : le choix de l'une ou l'autre méthode se fera selon la position des peptides sur l'électrochromatogramme.

L'électrophorèse préparative se fait sur une feuille de papier Arches 304 (40 cm) dans une cuve en toit avec un tampon pyridine-acide acétique de pH 3,9 ; la migration dure 6 heures sous une différence de potentiel de 500 volts.

Les peptides à purifier sont dissous dans 0,5 ml d'eau bidistillée et la totalité de la solution est déposée sur toute la longueur (sauf 5 cm de chaque côté) d'un trait perpendiculaire au champ électrique et situé du côté anodique (à 10 cm de l'extrémité).

Après séchage de la feuille, on trouve de chaque côté de l'électrophorégramme une bande de 0,5 cm de largeur qu'on révèle à la ninhydrine à 1 p. 100 afin de repérer la ou les bandes correspondant aux peptides à purifier. On peut alors les découper et les éluer avec HCl N/100.

La chromatographie préparative se fait sur du papier Whatman n° 3 préalablement lavé par une solution d'acide acétique N/100. La chromatographie descendante est réalisée dans la phase organique du solvant butanol-acide acétique-eau (4 : 1 : 5). La durée de la chromatographie est de 18 heures. La solution de peptides à purifier est déposée en un trait régulier. Après séchage de la feuille, on découpe des bandes latérales que l'on révèle à la ninhydrine. Les peptides sont élués par HCl N/100. L'homogénéité des peptides séparés est à nouveau vérifiée par électrochromatographie.

4) Résultats-

Le schéma de la figure 9 représente la courbe d'élution obtenue avec l'hydrolysate trypsique de la myoglobine de Chien ; sur ce schéma, seule la courbe de réactivité de l'effluent avec la ninhydrine a été représentée afin de ne pas surcharger inutilement le dessin. La numérotation des pics a été réalisée dans l'ordre de leur élution ; elle correspond à celle qui a été adoptée pour l'identification des taches de la figure 5.

CHAPITRE III

ETUDE DES PEPTIDES TRYPSIQUES

ETUDE DES PEPTIDES TRYPSIQUES

La structure des peptides trypsiques est déterminée après leur isolement et la vérification de leur pureté : successivement, on détermine leur composition en amino-acides et leur acide aminé N-terminal. Dans certains cas, l'identité de ces résultats avec ceux qu'on peut déduire de la structure de peptides analogues isolés de myoglobines connues suffit à l'établissement de leur séquence ; on confirme cependant celle-ci en vérifiant l'identité de leur comportement respectif en électrophorèse et en chromatographie sur papier. Bien souvent, la composition en acides aminés est originale, bien que présentant une certaine analogie avec celle des peptides trypsiques isolés d'autres myoglobines : cette analogie nous a souvent guidé dans la détermination directe de leur séquence en amino-acide en orientant notre choix des méthodes d'étude.

1°) Composition en amino-acides

a) Hydrolyse acide totale

La composition en acides aminés de chaque peptide est déterminée après hydrolyse chimique par de l'acide chlorhydrique 5,6 N, en tube scellé sous vide à 105°C pendant 24 heures.

§ Technique de l'hydrolyse

Dans un tube à hydrolyse, on ajoute à 2 ml de la solution peptidique (0,05 à 0,3 Mole) 2 ml d'acide chlorhydrique concentré (acide chlorhydrique à 32 % Merck) et une goutte de phénol aqueux (solution de phénol saturée d'eau) pour éviter la destruction de certains acides aminés oxydables tels que la tyrosine. La solution obtenue est congelée dans un mélange acétone-neige carbonique et soigneusement dégazée sous vide avant de sceller le tube sous vide. On laisse 24 heures à 105°C, l'hydrolysate est alors dilué avec de l'eau bidistillée, puis lyophilisé. La composition en amino-acides de chaque hydrolysate est déterminée à l'aide d'un analyseur automatique d'acides aminés (type JEOL 5 AH).

b) Hydrolyse totale enzymatique

Lorsque la composition de l'hydrolysats révèle la présence d'acides aminés dicarboxyliques (acide aspartique et acide glutamique) nous devons effectuer une hydrolyse enzymatique totale de 24 heures par la leucine aminopeptidase, afin de distinguer les deux amides (glutamine et asparagine) des deux acides aminés dicarboxyliques correspondants

§ Technique de l'hydrolyse

Le peptide est repris par de l'eau bidistillée ; à 0,5 ml de cette solution (0,5 à 1 μ mole) on ajoute 0,5 ml de tampon véronal 0,1 M de pH 8,5 et 0,5 ml de $MnCl_2$ 0,01 M ; 100 μ l d'une solution de leucine aminopeptidase (LAP SIGMA, lot 98B 1750) sont additionnés au mélange. On met le tout au bain-marie à 38°C pendant 24 heures. L'hydrolyse est arrêtée en portant le mélange au bain-marie bouillant pendant 3 minutes puis en refroidissant sous un courant d'eau froide ; on filtre sur un tampon de laine de verre et on lyophilise. Les amides sont identifiées par électrochromatographie bidimensionnelle ; l'électrophorèse est réalisée sur papier Whatman n° 3 dans un milieu à pH 2,4 (acide acétique N) pendant 15 heures sous 400 volts dans une cuve en toit (système DURRUM) ; la chromatographie est réalisée dans le système n-butanol-acide acétique-eau-pyridine (15 : 3 : 12 : 10) pendant 18 heures : après avoir été séché à l'air libre, l'électrochromatogramme est révélé par une solution acétonique de ninhydrine à 1 p. 100. L'hydrolysats enzymatique est dosé à l'analyseur d'acides aminés (type JEOL) lorsque plusieurs résidus d'acides aminés dicarboxyliques sont mis en évidence dans l'hydrolysats total acide.

Enfin, une étude cinétique est nécessaire pour repérer la place de ces résidus dans la séquence. On ajoute alors à la solution peptidique, avant l'hydrolyse, une quantité connue de norleucine. Des prélèvements sont effectués à des temps variables au cours de l'hydrolyse et les acides aminés sont dosés à l'autoanalyseur.

2°) Acides aminés N-terminaux

La détermination de l'acide aminé N-terminal dans chaque peptide tryptique est effectuée par la méthode des dansyl amino-acides de GRAY et HARTLEY (123) : méthode très sensible qui ne nécessite que 2 à 5 nanomoles de peptide. La fonction α -aminée de l'acide N-terminal du peptide réagit en milieu alcalin avec le chlorure de dansyl : le dansyl-peptide obtenu libre par hydrolyse acide un dansyl-aminoacide,

composé fluorescent en lumière U.V.

a) Technique

10 μ l de la solution peptidique (2 à 5 nanomoles dissous dans 10 μ l d'eau) sont placés dans un petit tube de verre (20 mm x 6 mm diamètre) ; on ajoute 10 μ l de solution de bicarbonate de sodium 0,2 M et 20 μ l de solution acétonique du chlorure de l'acide 1-diméthyl-amino-naphtalène-5-sulfonique (chlorure de dansyl), à 1 mg par ml. Le mélange est laissé à réagir pendant une heure à l'obscurité au bain-marie à 45°C puis desséché à 60°C en présence d'acide sulfurique, de soude et d'anhydride phosphorique. Le résidu sec est repris par 50 μ l d'HCl 5,6 N et le tube à dansylation est placé dans un tube à hydrolyse scellé dont le tiers inférieur, isolé par un étranglement est rempli d'HCl 5,6 N ; on porte à l'étuve à 105°C pendant 5 heures au minimum. L'hydrolysate est ensuite séché comme précédemment puis repris par un mélange acétone-acide acétique (3 : 2) afin d'identifier par chromatographie le dansyl-amino-acide N-terminal.

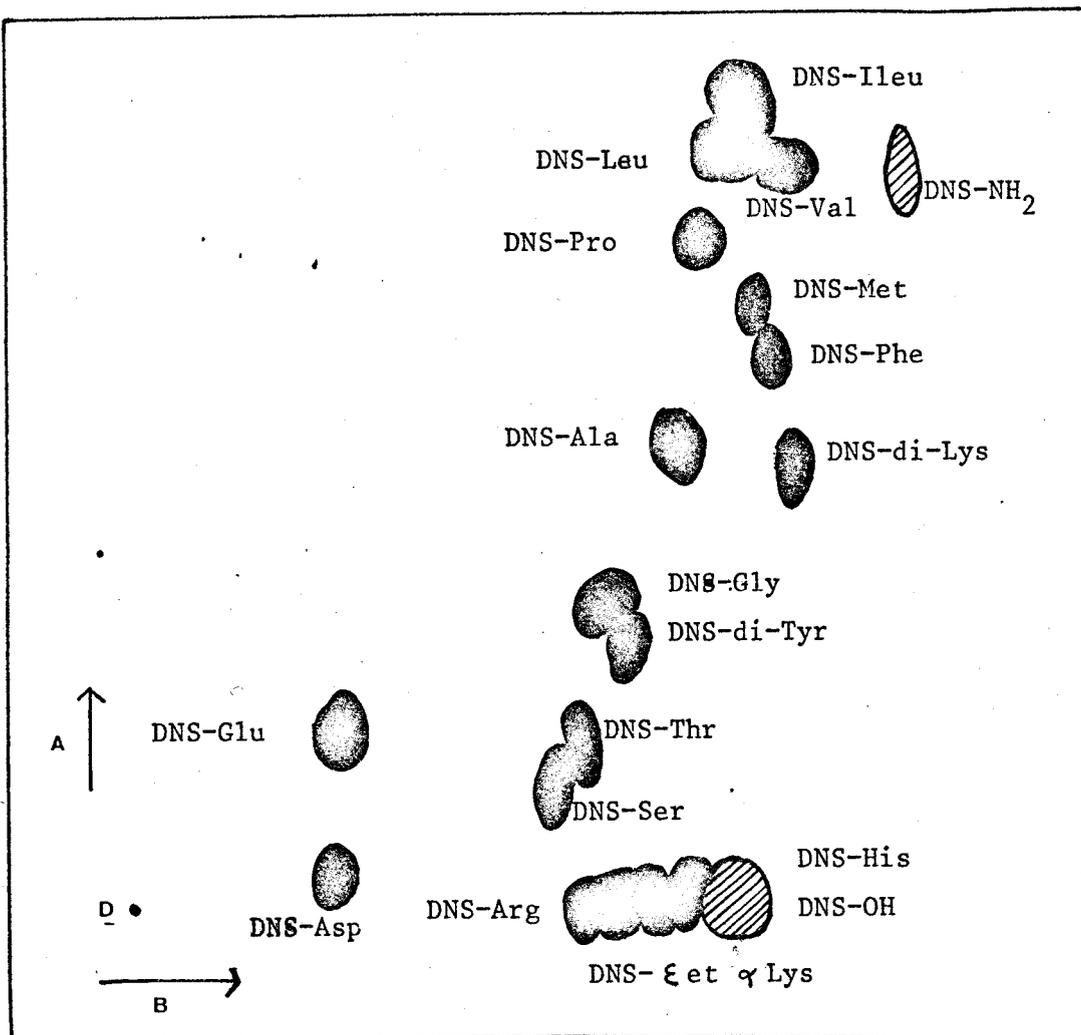
b) Chromatographie des Dansyl-amino-acides sur couche mince de gel de silice

Nous avons utilisé la technique de Gros et LABOUESSE (124). 25 g de gel de silice en suspension dans 50 ml d'eau sont étalés en une couche de 0,25 mm d'épaisseur sur cinq plaques de verre 20 x 20 cm. On laisse sécher les plaques plusieurs heures à la température ambiante, puis on active avant utilisation par un séjour de 1 heure à l'étuve à 100°C. L'hydrolysate est déposé à 3 cm de chacun des bords de la plaque. La migration dans le premier système solvant : benzène/pyridine/acide acétique (80 : 20 : 5) se fait perpendiculairement au sens d'étalement du gel. La plaque est réactivée 10 minutes à 100°C après la première migration. La deuxième migration (dans un sens perpendiculaire à la première) est réalisée dans le système solvant toluène/chloro-2-éthanol/ammoniaque (30 : 50 : 20). Chaque migration dure 45 à 75 minutes environ (Figure 10).

c) Chromatographie sur feuille de polyamide

Cette chromatographie a l'avantage sur la précédente d'être plus rapide et plus sensible. Des feuilles plastiques (15 x 15 cm)

Benzène / Pyridine / Acide acétique (80 : 20 : 5) (40 mm)



Toluène / Chlore 2 éthanol / Ammoniaque (30 : 50 : 20) (25-65 mm)

FIGURE 10

CARTE CHROMATOGRAPHIQUE DES DANSYL-AMINO-ACIDES
SUR COUCHE MINCE DE GEL DE SILICE D'APRES GROS
ET LABOUESSE (124).



recouvertes de micropolyamide sur les deux faces (Schleicher et Schüll) sont découpées en neuf fragments carrés de 5 cm de côté. Ces feuilles sont manipulées avec précaution car le revêtement de polyamide est assez fragile. Elles peuvent être utilisées sur les deux faces. 2 μ l de la solution du dansyl peptide repris par 15 μ l d'acétone et 10 μ l d'acide acétique sont déposés dans un angle à 3 mm de chacun des bords de la plaque.

La chromatographie est réalisée dans les deux ou trois solvants successifs décrits par HARTLEY (125) : la première migration est réalisée dans l'acide formique à 1,5 % (v/v) dans l'eau et dure environ 10 minutes. La deuxième migration réalisée perpendiculairement à la première dans le solvant benzène/acide acétique (9 : 1) dure 15 à 20 minutes environ. La troisième migration réalisée dans le même sens que la précédente utilise le solvant acétate d'éthyle/méthanol/acide acétique (20 : 1 : 1) et dure environ 15 minutes ; cette troisième migration est nécessaire pour séparer certains groupes d'acides aminés tels que les groupes sérine-thréonine, acide aspartique-acide glutamique, histidine-lysine et arginine (figure 11).

3°) Comportement en électrophorèse et chromatographie sur papier

La chromatographie sur colonne nous a permis de définir certaines identités entre des peptides d'hydrolysats de myoglobine de Cheval, de Mouton et de Chien : la comparaison du comportement électrophorétique et chromatographique sur papier de ces peptides et la détermination de la composition en amino-acides conduisent à une quasi-certitude quant à l'identité des fractions peptidiques. Les techniques utilisées ont été décrites précédemment : elles sont toujours appliquées en une seule dimension avec utilisation de témoins latéraux.

4°) Dégradation récurrente d'EDMAN (126)

La séquence en amino-acides des peptides tryptiques a été déterminée par la méthode récurrente d'Edman : la fonction α -aminée du peptide est condensée en milieu alcalin avec le phénylisothiocyanate pour former un phénylthiocarbamyl-peptide ; celui-ci est traité en milieu acide anhydre (acide trifluoroacétique), ce qui permet la rupture de la liaison peptidique terminale et la formation d'une

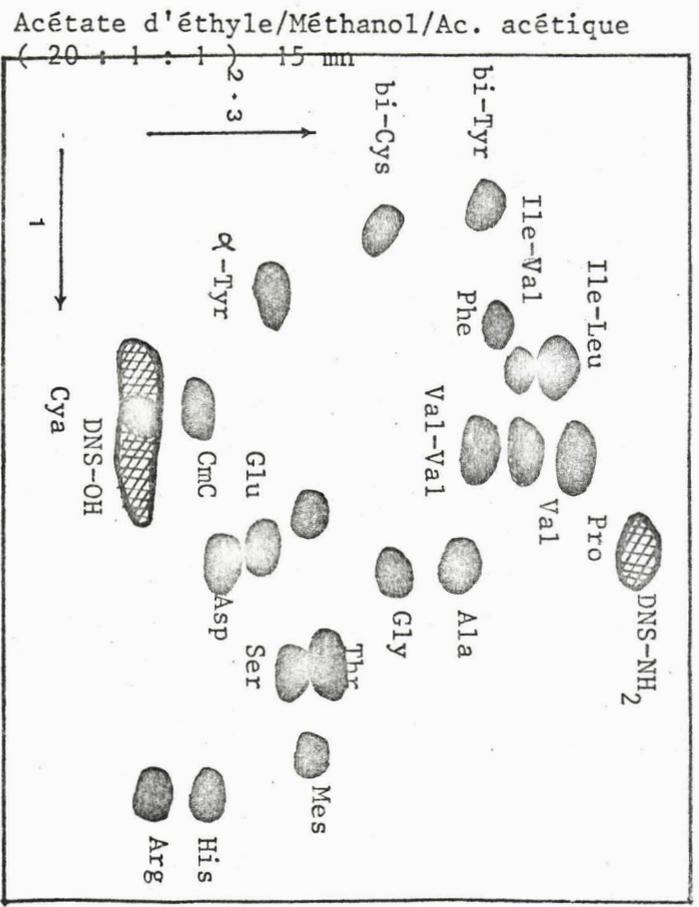
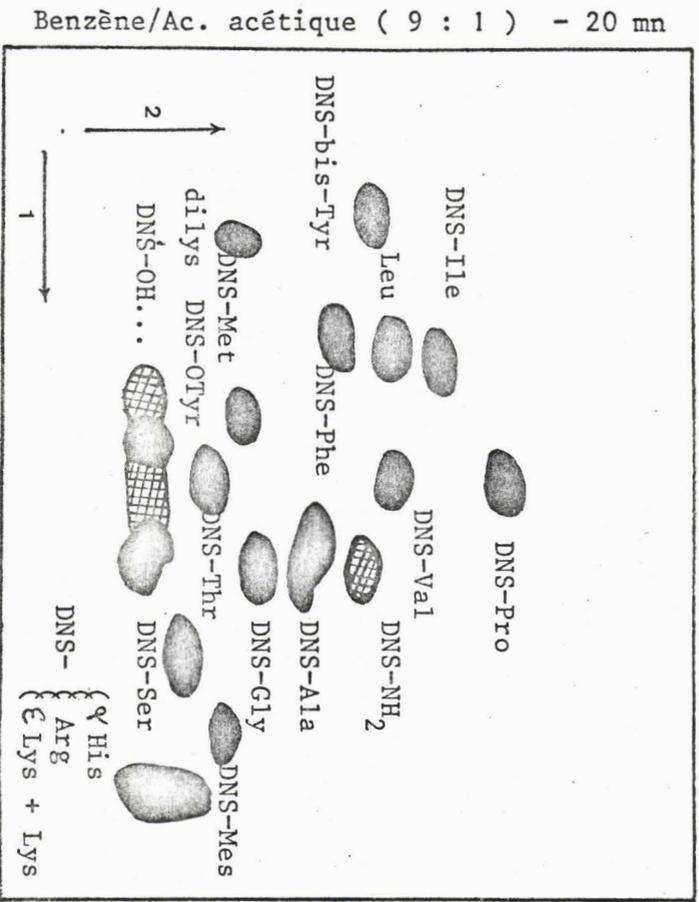
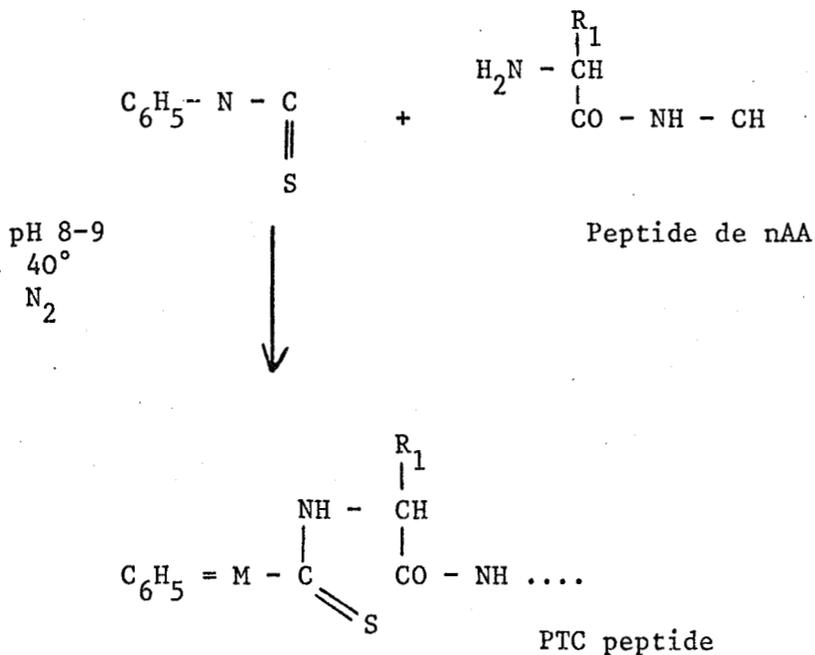


FIGURE 11

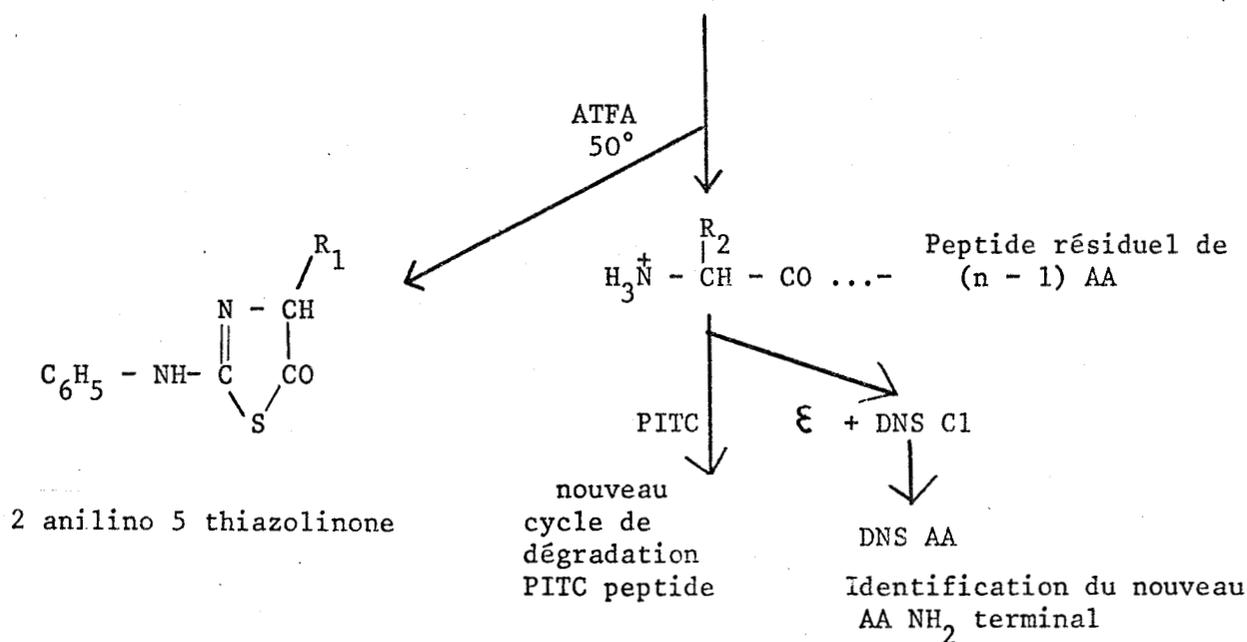
CARTE CHROMATOGRAPHIQUE DES DANSYL-AMINO-ACIDES SUR PLAQUES DE POLYAMIDE D'APRES HARTLEY (123).

- Cya : Acide cystéique
- Cmc : S-carboxy-méthyl-cystéine
- Mes : Méthionine sulfone

1° - REACTION DE CONDENSATION EN MILIEU ALCALIN



2° - REACTION DE CLIVAGE EN MILIEU ACIDE ANHYDRE



3° - REACTION DE CONVERSION EN MILIEU ACIDE DILUE
80°

Identification du PhénylThiohydantoïne AA

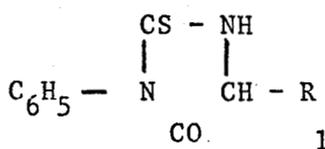


FIGURE 12

Schéma de la réaction de dégradation récurrente d'Edman associée à la méthode des dansyl aminoacides.

anilinothiazolinone aux dépens de l'acide aminé N-terminal (Figure 12). Cette thiazolinone est extraite du milieu réactionnel et ainsi séparée du peptide résiduel : celui-ci peut à nouveau être utilisé pour une étape dégradative ultérieure après que son acide aminé N-terminal ait été identifié par la méthode des dansyl-amino-acides.

§ Technique

- - - - -

200 μ l de la solution peptidique sont prélevés (environ 200 nanomoles) et placés dans un tube conique spécial. On ajoute 200 μ l de pyridine Merck, de manière à ce que le pH soit compris entre 8 et 9 et 15 μ l de phénylthiocyanate ; on agite et on laisse le mélange sous azote dans un bain-marie à 45°C pendant 1 heure et demie : on obtient un phénylthiocarbamyl peptide qu'on dessèche sous vide à 60° en présence de P₂O₅ et NaOH ; lorsque le résidu est huileux, on ajoute 50 μ l d'alcool éthylique et on sèche à nouveau. On ajoute au résidu sec 200 μ l d'acide trifluoroacétique anhydre, on agite et on laisse pendant 30 minutes au bain-marie à 45°C. Après un nouveau séchage sous vide en présence de pastilles de soude, le résidu est repris avec 200 μ l d'eau bidistillée et 1 ml d'acétate de butyle afin d'extraire la phénylthiohydantoïne formée. Après avoir bien agité le mélange, on le centrifuge pour "casser" l'émulsion et on élimine la phase supérieure organique ; cette extraction est répétée deux fois. On sèche sous vide la phase aqueuse résiduelle et on reprend par 200 μ l d'eau, on prélève 5 μ l pour la détermination de l'acide aminé N-terminal par la méthode des dansyl. Après cette identification, on peut recommencer un nouveau cycle de dégradation sur les 195 μ l qui restent.

5°) Autres techniques utilisées

Lorsqu'un peptide comprend un grand nombre de résidus, la méthode récurrente d'Edman ne permet pas de déterminer la séquence totale de ce peptide. Il faut alors faire appel à d'autres méthodes, soit des coupures chimiques, soit des coupures enzymatiques, afin de scinder le peptide et de le simplifier. Lorsque le peptide comprend dans sa séquence un résidu d'histidine, on peut couper cette liaison histidyl par la N-bromo-succinimide.

a) Hydrolyse des liaisons histidyl par la NBS (N-bromosuccinimide)

Le protocole expérimental est celui de SHALTIEL et PATCHORNIK (127) adapté par HAN et al. (128)

La N-bromosuccinimide coupe sélectivement les peptides au niveau des liaisons histidyl à pH 3,3 (figure 13)

§ Technique

- - - - -

Le peptide (0,5 Mole) est dissous dans 6 ml de tampon pyridine-acide acétique-eau (2 : 20 : 38) de pH 3,3 ; la N-bromosuccinimide est dissoute dans le même tampon (10,7 mg pour 10 ml). Aux 6 ml de solution peptidique on ajoute 0,7 ml de la solution de NBS par résidu 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, puis on porte le mélange à 100°C pendant 1 heure en tube scellé. La solution est finalement lyophilisée. Les peptides libérés sont ultérieurement isolés par électrophorèse sur papier puis identifiés par leur Dansyl-amino-acide terminal et leur composition en acides aminés.

b) Hydrolyse d'un peptide tryptique par la thermolysine

La thermolysine est une protéase dont la spécificité est différente des autres protéases agissant en milieu alcalin : elle hydrolyse principalement les liaisons peptidiques comportant le groupe aminé de résidus d'acides aminés hydrophobes tels que la valine, la leucine, l'isoleucine, la phénylalanine et à un degré moindre l'alanine, le glycolle, la méthionine, la cystéine, l'histidine, la tyrosine et la thréonine. Nous avons utilisé cet enzyme pour déterminer la structure d'un peptide tryptique ne contenant pas de résidu d'histidine (peptide tryptique 119-131) et ne pouvant être entièrement déterminé sans difficulté par la méthode récurrente d'EDMAN.

§ Technique expérimentale

- - - - -

* Préparation de la solution thermolysine

La méthode utilisée est celle de MATSUBARA (129). La thermolysine (Crist. 6000/PU/mg - MERCK) est dissoute dans un tampon Tris-HCl 0,01 M de pH 8,00 contenant du Cl_2Ca 0,01 M et ajusté à pH 8,0 avec CH_3COOH 0,2 N. La concentration finale de la solution est de 2 mg/ml

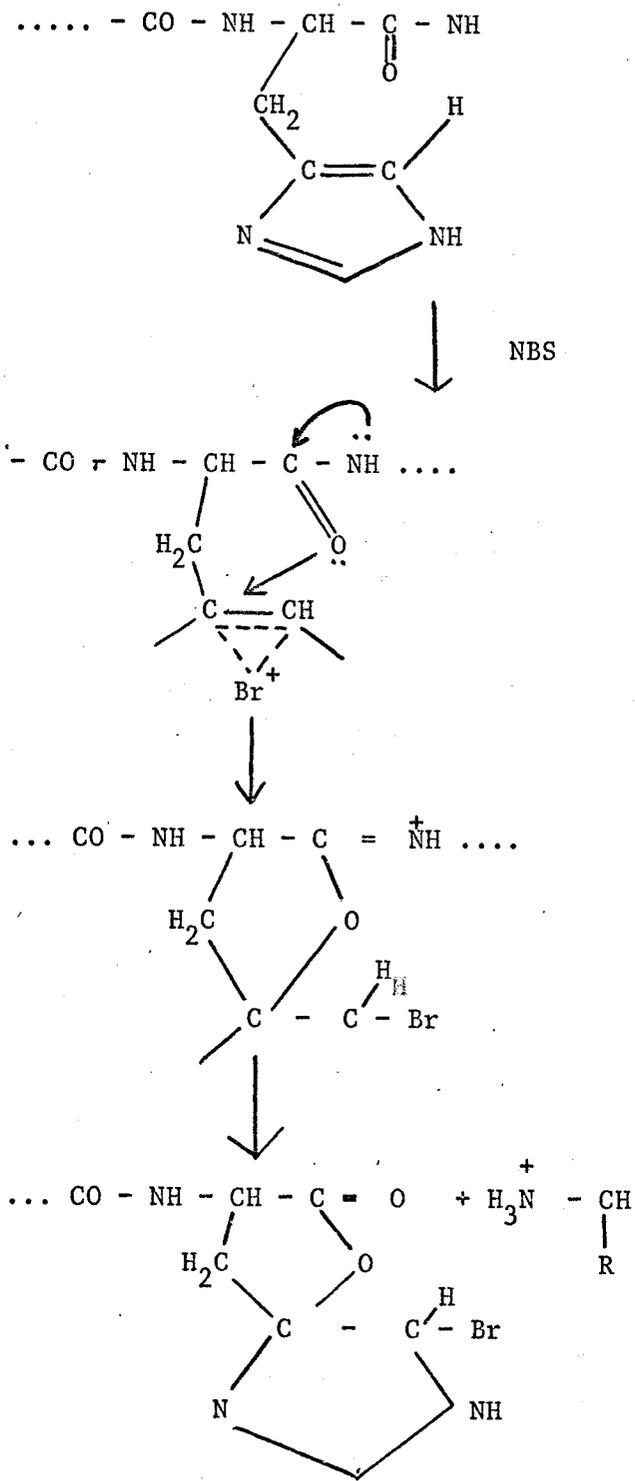


FIGURE 13

SUSCEPTIBILITE DES LIAISONS HISTIDYL VIS à VIS DU NBS



de tampon. La solution peut être conservée congelée à une température de -10° à -20°C pendant un mois environ.

* Hydrolyse thermolysique

Le peptide (0,5 à 1 M) est dissous dans une solution de sesquicarbonat d'ammonium à 1 p. 100 et ajustée à pH 8,0 avec de l'ammoniaque. A la solution peptidique, on ajoute un aliquot de la solution de thermolysine permettant un rapport enzyme/substrat égal à 1/50 en poids et on laisse l'hydrolyse se développer pendant 4 heures à 37°C sous agitation. L'hydrolysate est ensuite lyophilisé.

L'hydrolysate est fractionné par couplage électrochromatographique sur papier dans les conditions qui ont été exposées pour l'étude de l'hydrolysate trypsique ; après développement du chromatogramme, celui-ci est séché à l'air libre et révélé par une solution acétonique de ninhydrine à 0,2 g p. 1000 (10 minutes à l'étuve à 100°C). Les taches qui apparaissent sont découpées, lavées à l'éther pour éliminer l'excès de ninhydrine, cousues sur une languette de papier filtre (Whatman 3) et éluées avec HCl N/100.

c) Cinétique d'hydrolyse par l'aminopeptidase M

L'aminopeptidase M (Rohm-Haas "Labo-Service, Wavrin) plus récemment isolée (WACHSMUTH et al. - 130) remplace avantageusement la leucineaminopeptidase : elle n'a pas besoin d'ions métalliques, elle est plus stable vis-à-vis de la température, du pH et elle hydrolyse toutes les liaisons peptidiques du côté N-terminal à l'exception de la proline.

α) Technique de l'hydrolyse

Le peptide (0,5 à 1 Mole) est dissous dans du tampon bicarbonate d'ammonium R.P. 0,1 M à pH 8,0. A 1 ml de la solution peptidique, on ajoute 100 μ l de la solution d'aminopeptidase M (soit 0,7 mg d'enzyme) dans un tube conique. Après agitation, l'hydrolyse est effectuée à 38°C pendant 24 heures. L'hydrolysate est lyophilisé. Comme pour la leucineaminopeptidase, les amides sont mis en évidence par électrochromatographie ou dosés à l'autoanalyseur JEOL.

β) Etude cinétique

On incorpore à la solution peptidique précédente une quantité connue de Norleucine 0,1 mM avant l'hydrolyse. Des prélèvements sont effectués à des temps variables au cours de l'hydrolyse. Les acides aminés libérés sont dosés à l'autoanalyseur JEOL.

d) Cinétique d'hydrolyse par les carboxypeptidases

Les carboxypeptidases A et B ont été utilisées pour l'étude des séquences C-terminales. Elles hydrolysent les acides α-aminés de configuration L ayant une fonction carboxylique libre. L'activité de la carboxypeptidase est nulle si l'acide aminé C-terminal est la Proline, l'hydroxyproline, la lysine et l'arginine ou si l'acide aminé qui le précède est l'acide glutamique ou la proline. La carboxypeptidase B hydrolyse les peptides dont le résidu C-terminal est la lysine, l'arginine ou l'ornithine.

α) Cinétique d'hydrolyse par la carboxypeptidase A

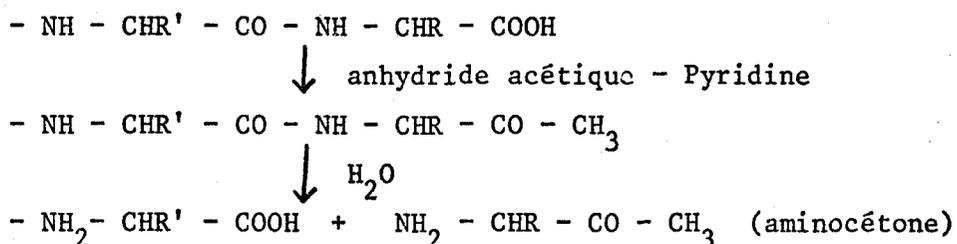
On prélève 5 μl de la suspension commerciale de DFA carboxypeptidase A (Sigma, lot 124 B 1850, concentration 50 mg/ml) que l'on dilue au 1/10ème au moyen d'une solution de chlorure de lithium à 100 g/l. Après un séjour d'une nuit à 4°C, le peptide est dissous dans 2 ml de tampon acétate d'ammonium 0,1 M de pH 7,5 et placé 20 minutes à 37°C. On ajoute alors 10 μl de la solution de DFP carboxypeptidase A et une quantité connue de Norleucine ; l'hydrolyse est réalisée à 37°C et des prélèvements sont effectués à des temps variables déterminés en fonction de la séquence C-terminale. L'hydrolyse est arrêtée par addition de quelques gouttes d'acide formique. L'hydrolysats est lyophilisé. Les acides aminés libérés sont dosés au JEOL.

β) Cinétique d'hydrolyse de la carboxypeptidase B

On prélève 10 μl de la suspension commerciale de DFP-carboxypeptidase B (Sigma, lot 17 B 1070 ; suspension à 10 mg/ml) que l'on dilue au moyen d'une solution de chlorure de lithium à 100 g/l. L'hydrolyse est réalisée dans les mêmes conditions que l'hydrolyse par la carboxypeptidase A.

e) Méthode de TURNER

On peut également déterminer l'acide aminé porteur du groupement α -carboxylique libre par l'élégante méthode de TURNER et SCHMERZLER (131). Cette technique utilise une réaction décrite par DAKIN et WEST (132). Le peptide est chauffé à 150°C avec de l'anhydride acétique en présence de pyridine pendant 2 à 3 heures. Si le produit de réaction est hydrolysé, l'hydrolysate ne contient plus l'acide aminé porteur du groupement α -carboxylique libre. La suite des réactions est la suivante :

§ Technique

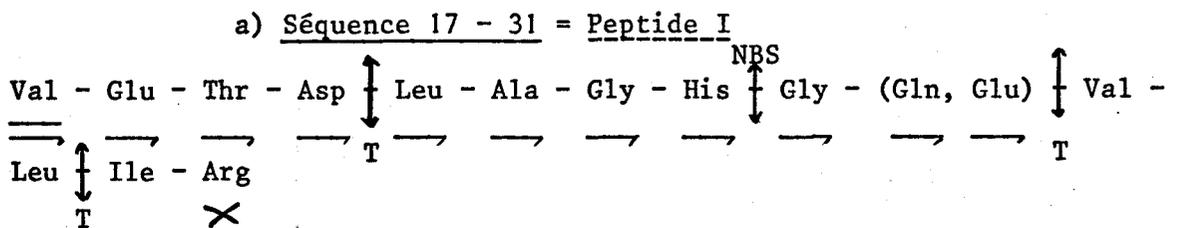
Dans un tube à hydrolyse contenant le peptide (100 nanomoles environ) on ajoute successivement 0,75 ml d'anhydride acétique et 0,50 ml de pyridine. Le tube est alors scellé et laissé 2 à 3 heures dans une étuve à 150°C. Le mélange est ensuite évaporé. Le peptide est alors repris par de l'eau, séché à nouveau et dissous dans 3 ml d'HCl 5,6 N à 110°C pendant la nuit. L'hydrolysate est évaporé et soumis à une chromatographie bidimensionnelle butanol/acide acétique/H₂O (4 : 1 : 5) pendant 36 heures pour la première dimension et phénol, aqueux pendant 20 heures pour la seconde dimension perpendiculaire à la première. Le chromatogramme séché à l'air puis à l'étuve est révélé à la ninhydrine à 1 p. 100.

CHAPITRE IV

RESULTATS



Les résultats obtenus dans ce chapitre concernent l'ensemble des peptides solubles de l'hydrolysate tryptique ; les peptides ont été présentés les uns après les autres d'après leur position dans la chaîne polypeptidique de la myoglobine, cette position étant déduite de leur structure, par analogie avec les peptides homologues isolés des myoglobines de cheval, de boeuf ou de mouton. Les différentes étapes de cette détermination ont été schématisées selon les indications du tableau VII. Dans la majorité des cas la lysine ou l'arginine a été placée en position C terminale uniquement en raison de la spécificité d'action de la trypsine.



- Action de la N-Bromo succinimide :

En vue de compléter la détermination de séquence de ce peptide, et notamment pour en préciser la séquence C terminale, celui-ci a été soumis à l'action de la N-Bromo succinimide : trois fractions peptidiques peuvent être mise en évidence par électrophorèse sur papier à pH 3,9 (figure 14) ; les deux fractions les plus cathodiques IN.B et IN.C donnent une réaction positive vis à vis du réactif de SAKAGUCHI et contiennent donc de l'Arginine ; la position du peptide initial se situe entre les taches IN.B et IN.C. La faible quantité de matériel disponible ne nous a permis que la localisation de la glutamine sur les fragments IN.A et IN.C après hydrolyse totale par la leucine amino peptidase :

Fraction IN.A : Asp : 0,85 - Thr : 0,75

Glu : 0,95 - Gly : 0,88 - Ala : 1,6

Val : 1,09 - Leu : 0,93

Fraction IN.C : Arg : 0,62 - Amide : 0,75

Glu : 0,85 - Gly : 1,31 - Val : 1,12

Ile : 1,03 - Leu : 1,32

Ces résultats montrent la présence du résidu de glutamine en position 26 ou 27.

La fraction IN.B correspond au peptide initial non coupé dont le résidu d'histidine a été modifié par la N Bromo succinimide, ce qui explique la différence de comportement électrophorétique de cette fraction avec le peptide initial ; la détermination de sa composition en acides aminés confirme cette hypothèse en montrant notamment l'absence d'histidine :

Arg : 1,10 - Asx : 1,34 - Thr : 0,91

Glu : 2,74 - Gly : 2,21 - Ala : 1,73

Val : 2,34 - Ile : 0,98 - Leu : 1,74

His : 0

- Hydrolyse par la thermolysine :

Environ 800 nanomoles du peptide ont été soumises à une hydrolyse par la thermolysine : par couplage sur papier d'une électrophorèse à pH 3,9 et d'une chromatographie dans le système butanol-acide acétique, 4 taches peptidiques IT.A, IT.B, IT.C et IT.D peuvent être mises en évidence après révélation à la ninhydrine (figure 15) : l'une d'elle (IT.D) donne en outre une réaction positive au réactif de Sakagachi et deux (IT.B et IT.C) donnent une réaction positive au réactif de PAULY. Les quatre tâ-

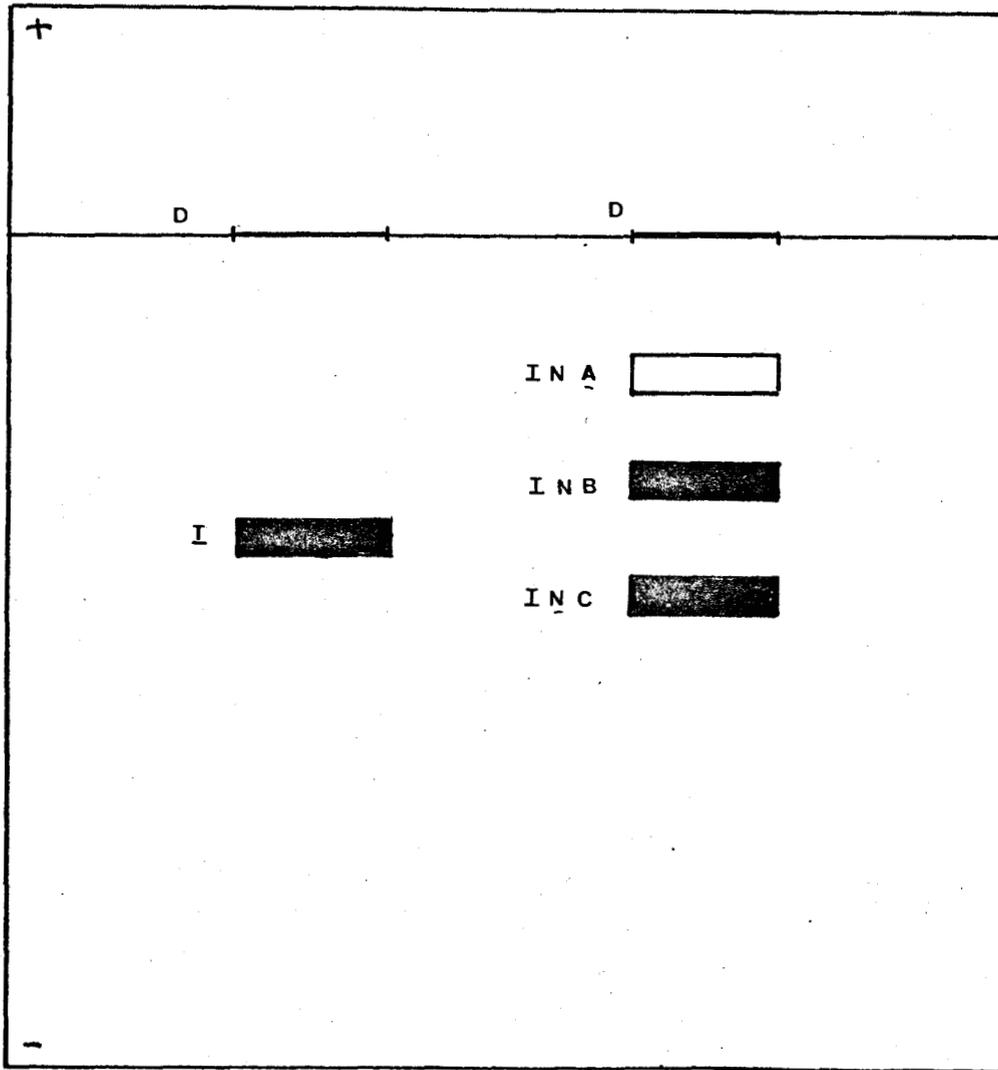


FIGURE 14



Electrophorèse sur papier à pH 3,9 du peptide I avant et après action de la N-Bromo succinimide.

■ : réaction de SAKAGUCHI positive

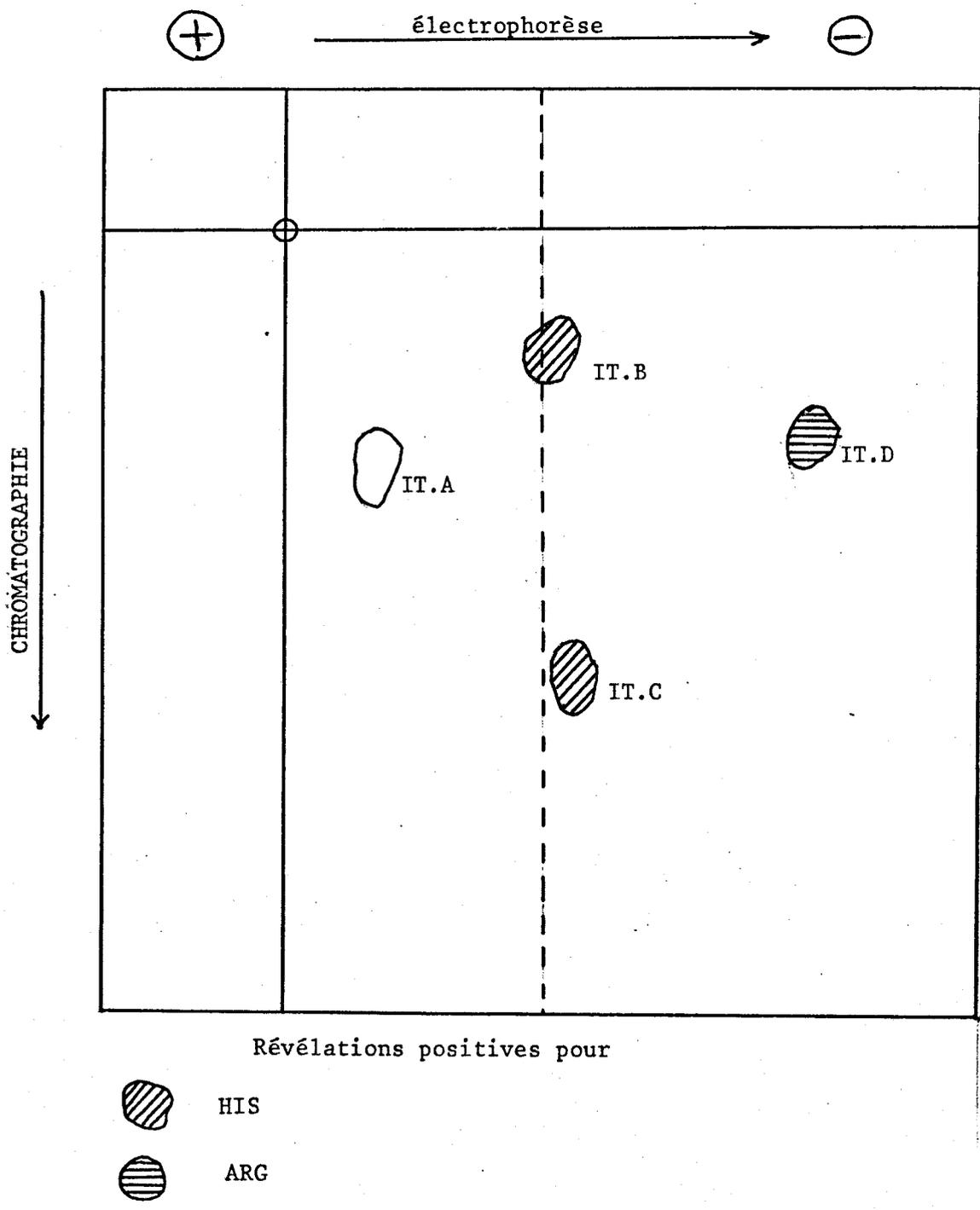


FIGURE 15

Electrochromatographie de l'hydrolysate thermolysique du peptide I.



ches ont été éluées du papier au moyen d'une solution aqueuse d'acide acétique à 8 % : la composition en acides aminés et le dansyl acide aminé N terminal de chacun des peptides ont été déterminés et sont indiqués au tableau VIII.

Compte tenu des résultats déjà connus, la structure de chacun de ces peptides peut être écrite de la façon suivante :

. Séquence 17 - 20 : peptide IT.A

Val - Glu - Thr - Asp

. Séquence 21 - 27

Leu - Ala - Gly - His - Gly - (Gln, Glu)

. Séquence 21 - 29

Leu - Ala - Gly - His - Gly - (Gln, Glu) - (Val, Leu)

. Séquence 30 - 31

Ile - Arg
X

Les peptides IT.B. et IT.C ont en outre été soumis à l'action de la carboxypeptidase A, en vue de préciser la séquence C terminale du peptide I (séquence 26 à 29).

Dans un premier temps, le peptide IT.C a été traité à pH 7,5 par la carboxypeptidase pendant respectivement 1/2 heure, 1 heure et 2 heures : l'examen du tableau IX montre que la quasi-totalité de la leucine est libérée en 1/2 heure et que la valine est libérée beaucoup plus lentement ; les faibles quantités de glutamine, d'acide glutamique et de valine retrouvées après 1/2 heure d'hydrolyse ont été considérées comme représentant la concentration de base du milieu et défalquées des valeurs trouvées après 1 heure et 2 heures d'hydrolyse.

Pour accélérer la libération de la valine subterminale, nous avons dans une deuxième expérience utilisé des conditions analogues à celles qui avaient été utilisées pour la myoglobine de cheval (DAUTREVAUX - 133).

L'enzyme est dans un premier temps incubé en présence du peptide à pH 7,5 pendant 1/2 heure, ce qui permet (tableau X) la libération de la leucine ; le pH est alors abaissé à 5,5 de façon à permettre au bout de 24 heures la libération de la Valine et d'une petite quantité d'acide glutamique ; au bout de ce temps, le pH est ramené à 7,5, ce qui permet la libération d'une petite quantité d'acide glutamique et de glutamine. Ces résultats montrent de façon non ambiguë l'enchaînement C terminal Val-Leu du peptide IT.C ; l'enchaînement Gln-Glu est par contre moins bien mis en évidence dans cette action de la carboxypeptidase A, peut-être parce que nous n'avons pas procédé à de nouvelles additions d'enzyme après chaque

TABLEAU VIII

COMPOSITION EN ACIDES AMINES ET ACIDE AMINE N TERMINAL
DES PRODUITS D'HYDROLYSE THERMOLYTIQUE DU PEPTIDE I

	IT.A	IT.B	IT.C	IT.D
His		0,83	1,11	
Arg				1,00
Asx	0,86			
Thr	1,05			
Glx	1,08	1,98	1,97	
Gly		2,08	1,95	
Ala		1,13	1,05	
Val	0,57		0,96	
Ile				0,23 (*)
Leu		0,78 (*)	1,23 (*)	
DNS	Val	leu	leu	Ile
Séquence	17 - 20	21 - 27	21 - 29	30 - 31

(*) Le taux de récupération de l'acide aminé N terminal est toujours très faible car l'isolement du peptide a été réalisé après révélation à la ninhydrine.



TABLEAU IX

ACTION DE LA CARBOXYPEPTIDASE A

SUR LE PEPTIDE IT.C (pM 7,5)

	NANO MOLES D'ACIDES AMINES LIBEREES			POURCENTAGE DE LIBERATION DES ACIDES AMINES (*)		
	1/2 H	1 H	2 H	1/2 H	1 H	2 H
Gln	2,23	2,26	2,61			2 %
Glu	2,41	2,40	3,13			4 %
Val	3,30	5,47	9,56		12 %	33 %
Leu	18,58	18,67	18,77	99 %	99,5 %	100 %

(*) Nous avons estimé que 100 % de la leucine était libérée en 2 heures.



TABLEAU X

ACTION DE LA CARBOXYPEPTIDASE A

SUR LE PEPTIDE IT.C

(1/2 h à pH 7,5 puis 24 H à pH 5,5 et 12 H à pH 7,5)

:	: NANOMOLES D'ACIDES AMINES :			: POURCENTAGE DE LIBERATION :		
:	: LIBEREES :			: DES ACIDES AMINES (*) :		
:	:	:	:	:	:	:
:	:	:	:	:	:	:
:	Gln	: 2,44	: 2,44	: 4,38	:	: 10 %
:	:	:	:	:	:	:
:	Glu	: 4,29	: 5,14	: 5,78	:	: 4,6 %
:	:	:	:	:	:	: 8 %
:	Val	: 4,41	: 16,11	: 18,66	:	: 63,5 %
:	:	:	:	:	:	: 100 %
:	Leu	: 18,23	: 18,56	: 18,56	:	: 98 %
:	:	:	:	:	:	: 100 %
:	:	:	:	:	:	:



changement de pH ; nous devons cependant signaler que l'action de la carboxypeptidase A sur le peptide IT.B, terminé par l'enchaînement Gln - Glu (ou Glu - Gln) n'a permis la libération d'aucun amino-acide. Le pH 5,5 a été retenu pour la libération de la valine en raison de la présence probable d'un résidu d'acide glutamique avant la valine en tenant compte des résultats de GREEN et STAHMANN (134) concernant l'action de la carboxypeptidase sur l'acide glutamique : il est cependant possible que le milieu acide favorise la libération de l'acide glutamique et non pas celle de l'acide aminé qui le suit.

b) Séquence 32 - 34 = Peptide U₁

Leu - Phe - ~~Lys~~

- Composition en acides aminés

Lys : 1,24 - Leu : 0,86 - Phe : 0,91

- Dansyl amino acide N terminal : Leu

c) Séquence 35 - 45 = Peptides O, K et D

Asn - His - Pro - Glu - Thr - Leu - Asp - Lys - Phe - Asp - Lys

Cette séquence est en fait retrouvée sous forme de trois peptides : outre le peptide O (séquence 35 - 45), nous avons pu en effet isoler le peptide K (séquence 35 - 42) et le peptide D (séquence 43 - 45). Ce chevauchement des séquences est dû à une hydrolyse incomplète de la liaison lysyle en 42 - 43 en raison probablement de la présence simultanée de résidus d'acide aspartique en position 41 et 44 ; dans les autres myoglobines, le résidu 41 est un résidu d'acide glutamique et le ralentissement de l'action de la trypsine s'exerce alors au niveau de la liaison lysyle 45 - 46 (présence du peptide Phe - Asp - Lys - Phe - Lys en position 43 - 47 retrouvée dans d'autres myoglobines, mais non dans la myoglobine de Chien où l'hydrolyse de la liaison 45 - 46 semble complète).

1. Séquence 35 - 42 : Peptide K

Asn - His - Pro - Glu - Thr - Leu - Asp - Lys
~~→~~ → → → → → → ~~X~~

α - Composition en acides aminés

Lys : 1,04 - His : 0,97 - Asp : 1,96
 Thr : 1,04 - Glu : 1,15 - Pro : 1,00 - Leu : 0,92

β - Dansyl amino acide N terminal : Asp

γ - Dégradation récurrente d'EDMAN : elle a permis la détermination complète de la séquence

δ - Hydrolyse par l'aminopeptidase M. Une hydrolyse par l'aminopeptidase M de 24 heures a donné la composition suivante :

Lys : 1,17 - Asp : 1,23 - Thr : 0,72
 Amides : 0,99 - Glu : 0,86 - Leu : 0,97

Si nous comparons la composition obtenue après hydrolyse de 24 heures par l'HCl 5,6 n, nous remarquons que l'histidine et la proline n'ont pas été libérées et nous avons donc supposé que l'aminopeptidase M n'avait pas hydrolysé la liaison His - Pro (43 - 44) et libéré cette séquence sous forme d'un dipeptide : une hydrolyse de 24 heures par de l'HCl 5,6 n de l'hydrolysate enzymatique confirmait cette hypothèse par les résultats suivants :

Lys : 1,11 - His : 0,78 - Asp : 1,72 - Thr : 1,02
 Glu : 1,18 - Pro : 1,00 - Leu : 1,19

D'autre part, la présence simultanée d'un résidu d'acide aspartique et d'un résidu d'asparagine a nécessité une cinétique d'hydrolyse : l'aminopeptidase M a libéré au bout d'une demi-heure l'asparagine seule.

2. Séquence 43 - 45 : Peptide D

Phe - Asp - Lys
~~→~~ → ~~X~~

α - Composition en acides aminés

Lys : 1,14 - Asp : 1,01 - Phe : 0,95

β - Dansyl amino acide N terminal : Phe

γ - La comparaison avec le peptide analogue de la myoglobine de cheval par électrophorèse à haute tension à pH 1,8 et par électrochromatographie (3,9 - butanol acide acétique - eau) confirme la séquence ainsi que l'absence d'asparagine.

3. Séquence 35 - 45 : Peptide O

Asn - His - Pro - Glu - Thr - Leu - Asp - Lys - Phe - Asp - Lys

α - Composition en acides aminés :

Lys : 1,97 - His : 0,95 - Asp : 2,95 - Thr : 0,99
Glu : 1,04 - Pro : 0,90 - Leu : 1,09 - Phe : 0,99

β - Dansyl amino acide N terminal : Asp

d) Séquence 46 - 47 : Peptide T

Phe - Lys

α - Composition en acides aminés :

Lys : 1,16 - Phe : 0,84

β - Dansyl amino acide N terminal : Phe

e) Séquence 48 - 50 : Peptide Y

His - Leu - Lys

α - Composition en acides aminés

Lys : 1,07 - His : 1,13 - Leu : 0,80

β - Dansyl amino acide N terminal : His

f) Séquence 51 - 56 : Peptide E

Thr - Glu - Asp - Glu - Met - Lys

γ - Composition en acides aminés

Lys : 1,19 - Asp : 0,96 - Thr : 0,94
Glu : 2,05 - Met : 0,85

β - Dansyl amino acide N terminal : Thr
(obtenu seulement après hydrolyse de 5 heures du peptide)

γ - Dégradation récurrente d'EDMAN. Elle nous a permis d'établir la séquence complète de ce peptide. Après dansylation de la Méthionine du peptide résiduel obtenu à l'étape 4 de la dégradation, nous avons, par chromatographie obtenu deux tâches qui correspondaient l'une à la DNS-Méthionine, l'autre à la DNS-Méthionine sulfone.

δ - Hydrolyse par la leucine amino-peptidase. Composition en acides aminés :

Lys : 0,96 - Asp : 1,0 - Thr : 0,99 - Glu : 2,08 - Met : 0,97

- Ce peptide donne une réaction positive aux réactifs de la méthionine.

g) Séquence 57 - 63 : Peptide F et J

1. Séquence 57 - 62 : Peptide F

Gly - Ser - Glu - Asp - Leu - Lys
 \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow \rightarrow

α - Composition en acides aminés :

Lys : 1,20 - Asp : 0,93 - Ser : 0,87

Glu : 0,97 - Gly : 1,00 - Leu : 1,03

β - Dansyl amino acide N terminal : Gly .

γ - Hydrolyse par la leucine aminopeptidase

Les résidus d'acides aminés de l'hydrolysate de 24 heures par la LAP ont été déterminés par électrochromatographie sur papier (pH 2,4 pour l'électrophorèse et chromatographie dans le système Butanol/acide acétique/eau) : nous avons vérifié l'absence d'asparagine et de glutamine.

2. Séquence 57 - 63 : Peptide J

Le peptide J, libéré par action de la trypsine au niveau des liaisons 56 - 57 et 63 - 64, subit ultérieurement une nouvelle action de l'enzyme au niveau de la liaison 62 - 63 en libérant le peptide F et la lysine libre (Pic H de la courbe d'élution de la figure 9)

¶ - Composition en acides aminés

Lys : 2,11 - Asp : 1,03 - Ser : 0,88

Glu : 1,02 - Gly : 0,95 - Leu : 0,98

β - Dansyl amino acide N terminal : Gly

h) Séquence 64 - 77 : Peptides N, L et S

Trois peptides recouvrent cette séquence qui correspond à l'un des trois résidus insolubles après hydrolyse trypsique : la coupure anormale du peptide S par la trypsine au niveau de la liaison leucyle 69 - 70 a permis la libération des deux peptides N et L et a favorisé ainsi l'étude de cette séquence.

1. Séquence 64 - 69 : Peptide N

His - Gly - Asn - Thr - Val - Leu

κ - Composition en acides aminés

His : 0,76 - Asp : 1,02 - Thr : 0,90

Gly : 1,26 - Val : 1,06 - Leu : 0,99

β - Dansyl amino acide N terminal : His

γ - Dégradation récurrente d'EDMAN :

Elle nous a permis de déterminer la séquence totale de ce peptide. L'acide aminé C terminal de ce peptide trypsique est paradoxalement la leucine ; κ cette action anormale de la trypsine sera discutée dans la conclusion.

δ - L'identification de cette séquence a été réalisée également par analogie avec le peptide correspondant de la myoglobine de mouton : même migration en électrochromatographie (pH 3,9 - Butanol/acide acétique/eau) et en électrophorèse à haute tension à pH 1,8 (acide formique à 8 % dans l'eau).

ε - Hydrolyse par la leucine amino peptidase :

Une hydrolyse de 24 heures par la LAP a donné la composition suivante :

His : 0,93 - Thr ; 1,09 - Amide : 1,09

Gly : 1,18 - Val : 0,71 - Leu : 1,0

L'absence d'acide aspartique nous permet d'identifier l'amide comme étant l'asparagine.

2. Séquence 70 - 77 : Peptide L

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

9 - Composition en acides aminés

Lys : 1,27 - , Thr : 0,97 - Gly : 2,00
Ala : 1,18 - Ile : 0,80 - Leu : 1,78

β - Dansyl amino acide N terminal : Thr

γ - Dégradation récurrente d'EDMAN : elle nous a permis de déterminer la séquence complète de ce peptide.

3. Séquence 64 - 77 : Peptide S

His - Gly - Asn - Thr - Val - Leu - Thr - Ala - Leu - Gly - Gly -
Ile - Leu - ~~Lys~~

γ - Composition en acides aminés :

Lys : 1,20 - His : 1,09 - Asp : 1,23
Thr : 1,78 - Gly : 2,93 - Ala : 1,28
Val : 0,75 - Ile : 0,82 - Leu : 2,89

β - Dansyl amino acide N terminal : His

En raison de sa faible solubilité, ce peptide n'a pas été retrouvé dans tous les fractionnements de l'hydrolysats tryptique ; il ne s'y trouve d'ailleurs jamais qu'à l'état de traces.

i) Séquence 78 - 79 : Peptide W

Lys - Lys

L'identification de ce peptide qui ne contient que de la lysine a été réalisée en électrochromatographie par comparaison avec le peptide Lys - Lys isolé de l'hydrolysats tryptique de myoglobine de cheval.

j) Séquence 79 - 96 : Peptides U₂, R et X

Cette séquence est représentée par trois peptides : deux d'entre eux, U₂ et R proviennent de l'hydrolyse anormale pour la trypsine d'une liaison leucyle (liaison 89 - 90)

1. Séquence 80 - 89 : Peptide U₂

Gly - His - His - Glu - Ala - Glu (Leu, Lys, Pro, Leu)

γ - Composition en acides aminés :

Lys : 1,03 - His : 2,09 - Glu : 1,86 - Pro : 0,89
 Gly : 1,02 - Ala : 1,00 - Leu : 1,94

L'absence de glutamine dans l'hydrolysate pour la LAP a été vérifiée par électrochromatographie sur papier.

β - Dansyl amino acide : Gly

γ - La dégradation récurrente d'EDMAN a permis de déterminer les six premiers résidus de ce peptide ; la présence de deux résidus d'histidine en position 81 et 82 ne nous a pas permis de conduire la dégradation jusqu'au résidu 88 ou 89 en raison du faible rendement de la réaction de couplage au niveau des résidus d'histidine.

δ - L'enchaînement C terminal du peptide U₂ (86 - 89) a pu être déterminé entièrement grâce à deux peptides qui ont été isolés des hydrolysats thermolytiques de la globine totale : nous avons, en effet, pu isoler par chromatographie d'élution sur colonne de résine à échange de cations, deux peptides présentant une composition identique en amino acides :

* Peptide "e" : Lys - Pro - Leu

. composition en amino acides :

Lys : 1,09 - Pro : 0,90 - Leu : 1,01

. Dansyl amino acide N terminal : Lys

. Après traitement du peptide par la méthode de TURNER, seuls la lysine et la proline peuvent être mis en évidence par chromatographie bidimensionnelle dans les systèmes Butanol - acide acétique et phénol - ammoniacal c'est donc la leucine qui est en position C terminale

* Peptide "1" : Leu (Pro, Lys)

. composition en amino acides :

Lys : 1,04 - Pro : 0,97 - Leu : 0,99

. Dansyl amino acide N terminal : Leu

L'intégration de ces deux peptides dans la structure du peptide U² permet donc de préciser la séquence 86 à 89 : Leu - Lys - Pro - Leu

2. Séquence 90 - 96 : Peptide R

Ala - Gln - Ser - His - Ala - Thr - Lys

α - Composition en acides aminés :

Lys : 1,20 - His : 1,08 - Thr : 0,93

Ser : 0,88 - Glu : 1,00 - Ala : 1,90

- Hydrolyse par l'aminopeptidase M

Après une hydrolyse de 24 heures, nous avons obtenu la composition suivante qui nous a permis d'identifier la glutamine :

Lys : 1,06 - His : 0,84 - Thr : 1,02

Ser + amides : 1,64 - Ala : 1,92

Remarque : le peptide des amidé a été mis en évidence par électrochromatographie (Peptide Q)

- Dansyl amino acide N terminal : Ala

- L'identification a été faite en électrochromatographie (3,9 - Butanol / acide acétique / eau) par analogie avec le peptide correspondant de la myoglobine de cheval.

3. Séquence 79 - 96 : Peptide X

Lys - Gly - His - His - Glu - Ala - Glu (Leu, Lys, Pro, Leu) - Ala - Gln - Ser - His - Ala - Thr - Lys

- Composition en amino acides :

Lys : 2,77 - His : 3,06 - Thr : 0,95

Ser : 1,09 - Glu : 2,93 - Pro : 1,16

Gly : 1,14 - Ala : 2,93 - Leu : 1,97

- Dansyl amino acide N terminal : Lysine

Ce peptide n'existe qu'en faible quantité dans les hydrolysats tryptiques de globine ; il est élué des colonnes de résines mélangé au peptide W (Lys - Lys) ce qui a nécessité son isolement par électrophorèse sur papier. Il provient d'une coupure mineure de la liaison Lys - Lys en 78 - 79 libérant en outre la séquence 64 ou 70 à 78 ; la présence de lysine libre (fraction 4) dans l'hydrolysat est en partie due à l'hydrolyse ultérieure de la séquence 64 ou 70 à 78 au niveau de la liaison Lys - Lys en 77 - 78.

k) Séquence 97 - 102 : Peptide Z

His - lys - Ile - Pro - Val - Lys

- Composition en acides aminés :

Lys : 1,82 - His : 0,86 - Pro : 1,25

Val : 1,03 - Ile : 1,04

- Dansyl amino acide N terminal : His

- Dégradation récurrente d'EDMAN :

Elle nous a permis d'identifier la séquence complète de ce peptide : celle-ci a été compliquée par la proximité des tâches de DNS - Val et de DNS - Ile sur les microplaques de polyamide ; l'utilisation d'un témoin interne de DNS - Val ou de DNS - Ile a cependant permis une identification certaine des deux dansyls.

1) Séquence 119 - 133 : Peptide M

His - Ser - Gly - Asx - Phe - (His, Ala, Asx, Ala, Glx, Thr, Ala) -
Met - Lys - Lys → →

- Composition en amino acides :

Lys : 1,13 - His : 2,10 - Asp : 1,98 -
 Thr : 0,96 - Ser : 0,98 - Glu : 1,06
 Gly : 1,10 - Ala : 2,94 - Met : 0,83
 Phe : 0,93

Contrairement au peptide homologue des myoglobines de cheval ou de boeuf, ce peptide ne comporte que 14 résidus, ce qui laisse supposer la présence d'un résidu de lysine en position 133 : l'isolement des hydrolysats thermolytiques de globine du peptide Met - Lys - Lys confirme cette hypothèse.

- Dansyl amino acide N terminal : His

- La dégradation récurrente d'EDMAN nous a permis de déterminer l'enchaînement des 5 premiers résidus. Le 7ème est en outre représenté par Ala et le 8ème par ASX ou Glx.

La faible quantité de ce matériel isolé après hydrolyse tryptique ne nous a pas permis de pousser davantage l'étude de ce peptide. Les analogies de structure qui doivent obligatoirement exister entre la myoglobine de Chien et celle d'autres espèces comme le Cheval, le Boeuf ou le Mouton nous permettent de postuler une structure provisoire ; l'isolement de certains peptides provenant de l'hydrolyse thermolytique de globine confirme cette vue. La figure 16 résume cette structure.

119 120 125 130 133

CHEVAL His - Pro - Gly - Asn - Phe - Gly - Ala - Asp - Ala - Gln - Gly - Ala - Met - Thr - Lys

BOEUF His - Pro - Ser - Asn - Phe - Ala - Ala - Asp - Ala - Gln - Gly - Ala - Met - Ser - Lys

MOUTON His - Pro - Ser - Asn - Phe - Gly - Ala - Asp - Ala - Gln - Gly - Ala - Met - Ser - Lys

CHIEN His - Ser - Gly - Asn - Phe - (His, Ala, Asx, Ala, Glx, Thr, Ala) - Met - Lys - Lys

His - Ser - Gly - Asn - Phe - (His, Ala, Asx, Ala, Glx, Thr, Ala, Met) - Lys

Ser Gly Asn His, Ala Asx Ala Glx Thr Ala

Ala Asx Ala Glx Thr Ala

Ala Asx Ala Glx Thr Met - Lys - Lys

FIGURE 16

SEQUENCE PROVISOIRE DES ACIDES AMINES DE LA SEQUENCE 119 - 133



m) Séquence 134 - 139 : Peptide PAla - Leu - Glu - Leu - Phe - Arg

- Composition en acides aminés

Arg : 1,08 - Glu : 1,02 - Ala : 0,95

Leu : 1,98 - Phe : 0,99

- Dansyl amino acide N terminal : Ala

- Dégradation récurrente d'EDMAN :

Elle nous a permis de déterminer la séquence complète de ce peptide; Il a d'autre part le même comportement en électrochromatographie (pH 3,9 - Butanol:/ acide acétique / eau) que le peptide analogue de la myoglobine de cheval.

n) Séquence 140 - 145 : Peptide GAsn - Asp - Ile - Ala - Ala - Lys

- Composition en acides aminés :

Lys : 1,16 - Asp : 1,81 - Ala : 1,99 - Ile : 1,00

- Dansyl amino acide N terminal : Asx

- Dégradation récurrente d'EDMAN

Elle nous a permis de déterminer la séquence complète de ce peptide :

Asx - Asx - Ile - Ala - Ala - Lys

- Hydrolyse par l'aminopeptidase M :

Une hydrolyse de 24 heures libère les résidus d'acides aminés suivants qui nous a permis d'identifier l'acide aspartique et l'asparagine :

Lys : 1,00 - Asp : 1,05 - Amides : 0,93

Ala : 2,02 - Ile : 0,99

Une hydrolyse d'une heure libère l'asparagine, ce qui nous permet d'établir la séquence Asn - Asp.....

Le dosage des acides aminés libérés a cependant posé un problème thermique analogue à celui posé par l'hydrolyse du peptide O par l'aminopeptidase M (tableau XI).

Il semble ici également que la liaison Asp - Ile n'ait été que difficilement rompue par l'aminopeptidase M et que le dipeptide Asp - Ile ait été libéré intact par l'enzyme dans un premier temps.

TABLEAU XI

ACIDES AMINES LIBERES DU PEPTIDE G

PAR ACTION DE L'AMINOPEPTIDASE M

	1 H	2 H	24 H
Asn	0,23	0,32	0,93
Asp	0,02	0,08	1,05
Ile	0,02	0,06	0,99
Ala	0,25	0,52	2,02
Lys	0,14	0,27	1,00
:	:	:	:



Remarque : Le peptide desamidé Asp - Asp... a été identifié par électrochromatographie (Peptide C)

o) Séquence 146 - 147 : Peptide V

Tyr - Lys

- Composition en acides aminés :

Lys : 1,15 - Tyr : 0,95

- Dansyl amino acide N terminal : Tyr

La réaction à l' α nitroso β naphthol est positive.

p) Séquence 148 - 153 : Peptide A

Glu - Leu - Gly - Phe - Gln - Gly

- composition en acides aminés

Glu : 1,93 - Gly : 2,15 - Leu : 0,99 - Phe : 0,93

- Dansyl amino acide N terminal : Glu

- L'identification de ce peptide a été faite par analogie avec le peptide de la myoglobine de cheval par électrochromatographie (3,9 et Butanol / acide acétique / eau) et par électrophorèse à haute tension à pH 1,8.

- Par hydrazinolyse, nous avons déterminé le glycofolle en position C terminale.

- Hydrolyse par la L. Amino Peptidase :

Après action de 24 heures, le dosage des acides aminés a donné les résultats suivants :

Amides : 0,41 - Glu : 1,16

Gly : 1,95 - Leu : 1,00 - Phe : 0,87

La diminution de 1 résidu au niveau de l'acide glutamique est évidemment en faveur de la présence d'un résidu de glutamine dans ce peptide ; le faible taux de glutamine dans l'hydrolysate s'explique par chauffage accidentel au milieu d'hydrolyse, ce qui a pu provoquer sa cyclisation en acide pyrrolidone carboxylique.

- Le peptide désamidé a également été retrouvé dans l'hydrolysate (peptide B), ce qui confirme la présence d'un résidu de glutamine dans le peptide A.

DISCUSSION ET CONCLUSION

1. SEQUENCE PARTIELLE DES ACIDES AMINES DE LA MYOGLOBINE DE CHIEN.

A partir des résultats que nous avons obtenus dans l'étude de la structure des peptides tryptiques, il est possible de présenter une séquence partielle hautement probable des amino-acides de la myoglobine de Chien en alignant ces peptides tryptiques les uns à la suite des autres par comparaison avec la chaîne peptidique d'autres myoglobines déjà connues. Dans cette opération, nous postulons implicitement qu'il existe entre les myoglobines d'espèces animales voisines beaucoup plus de ressemblances que de différences ; c'est ce que nous avons admis en attribuant la séquence à des peptides dont la composition en acides aminés ainsi que le groupe N terminal se révélaient identiques à ceux de peptides de myoglobines de Cheval, de Boeuf ou de Mouton ayant un comportement identique sur colonne de résine ou sur papier. La séquence partielle obtenue, représentée à la figure 17 recouvre environ les 2/3 de la chaîne peptidique et seules les séquences en amino-acides de deux enchaînements, particulièrement hydrophobes dans les autres myoglobines, ont échappé à notre étude ; il s'agit de la séquence N terminale 1 - 16, qui comporte les deux résidus de tryptophane et de la séquence 103 à 118 qui, dans les autres myoglobines, contient la quasi-totalité des résidus d'isoleucine. Une troisième séquence hydrophobe, représentée par les résidus 64 à 77, a par contre, pu être déterminée par l'étude des peptides L, N et S ; en raison de leur faible solubilité, ceux-ci ne sont pas retrouvés de façon constante sur les courbes d'élution ; il faut remarquer également (voir plus loin) que ces peptides ne peuvent être retrouvés dans la fraction soluble que grâce à l'hydrolyse anormale par la trypsine de la liaison leucyl-thréonine (69 - 70).

Dans la séquence en amino-acides de la myoglobine de Chien, on peut remarquer plusieurs éléments structuraux intéressants, notamment le caractère répétitif de certaines séquences :

- Asp - Lys - Phe en 41 - 43 et 44 - 46
- Thr (Ser) - Glu - Asp en 51 - 53 et 58 - 60
- Leu (Met) - Lys - Lys en 61 - 63, 76 - 78 et 131 - 133
- Asp (Glu) - Leu - Lys en 60 - 62 et 85 - 87
- Ala - Glu - Ser (Thr) en 90 - 92 et 127 - 129.

Ces répétitions sont peut-être fortuites mais elles peuvent également être le lointain témoin des duplications successives de gènes dont l'aboutissement a été la myoglobine.

2. ACTION DE LA TRYPSINE

Certaines liaisons lysyl ne sont qu'incomplètement hydrolysées par la trypsine ; c'est le cas de la liaison Lys - Phe en 42 - 43 ou de la liaison Lys - Lys en 62 - 63, cela explique que certaines séquences puissent être représentées par plus d'un peptide tryptique (figure 15). Certaines liaisons lysyles ne semblent pas, par contre, être hydrolysables par la trypsine, soit parce qu'il s'agit d'une liaison lysyl-proline (89 - 90) soit en raison de l'accumulation même des résidus de lysine (78 - 79) ; la stabilité vis à vis de la trypsine de la liaison Lys - Ile en 98 - 99 s'explique peut-être par la présence d'un résidu de proline en position 100, associée à celle de deux résidus hydrophobes (Ile 99 et Val 101). On constate en outre que certaines liaisons peptidiques sont anormalement hydrolysées par la trypsine : il s'agit essentiellement de la liaison leucyle située dans l'enchaînement Val - Leu - Thr (68 - 70) dont la sensibilité vis à vis de la trypsine avait déjà été signalée à propos des myoglobines de cheval, de boeuf et de mouton et la liaison leucyle située dans l'enchaînement Pro - Leu - Ala (88 - 90). On trouve dans la myoglobine de cheval un enchaînement identique et pourtant ce type de coupure n'avait pas été observé ; on peut expliquer cette différence en fonction de la nature des trypsines utilisées, trypsine - TPCK dans le cas de la myoglobine de cheval et trypsine - DPCC (*) ce qui orienterait différemment les spécificités de l'enzyme.

* Trypsine DPCC : trypsine traitée par le chlorure de diphenylcarbamyloxy.

3. COMPARAISON AVEC D'AUTRES MYOGLOBINES

Bien qu'encore partielle, la séquence en amino-acides de la myoglobine de Chien peut néanmoins être comparée à celle d'autres myoglobines déjà connues ; la figure 18 compare ainsi les séquences connues de la myoglobine de Chien et des différentes myoglobines connues avec la myoglobine de Cachalot.

La myoglobine de Cachalot a été choisie comme type de myoglobines pour des raisons essentiellement historiques ; en fait, cette myoglobine présente des particularités de structure qui la distinguent assez nettement des autres myoglobines : si elle partage ainsi avec le Dauphin le fait de posséder la valine en position N terminale alors que toutes les autres myoglobines ont le glyco-colle en cette position, elle présente seule la particularité d'avoir un résidu d'histidine en 12 (Gln dans les autres espèces), d'arginine en 45 au lieu de Phe ; la présence d'Alanine en 15, Isoleucine en 28, serine en 35, alanine en 74 est également une particularité que la myoglobine de Cachalot ne partage guère qu'avec le Dauphin. Malgré ces caractères propres à chaque espèce, les myoglobines présentent un grand nombre de ressemblances qui sont d'autant plus nettes que les comparaisons sont effectuées à l'intérieur d'un même ordre et surtout d'une même famille animale ; ces caractéristiques de groupes sont représentés au tableau XII et permettent de définir des éléments représentatifs de la myoglobine de chaque groupe. La myoglobine de Chien ne présente aucune des caractéristiques de groupe ainsi définies et s'individualise donc en tant que myoglobine de carnassier. Les comparaisons qu'on peut réaliser entre ce qu'on connaît de la myoglobine de Chien(*) montre non seulement son individualité par rapport aux myoglobines de Cétacés, de Primates et d'Ongulés, mais aussi une certaine parenté avec la myoglobine de Phoque vis à vis de laquelle elle ne présente que 11 différences (au lieu de 17 à 22 en moyenne avec les autres groupes) ; la détermination de la structure complète de la myoglobine de Chien confir-

(*) La séquence 1 - 16 a été déterminée (HAN - 146), indépendamment de notre travail de thèse à l'aide d'un séquenceur automatique selon la méthode d'EDMAN et BEGG (147).

TABLEAU XII

CARACTERES DISTINCTIFS DES MYOGLOBINES

SELON LE GROUPE ANIMAL

NUMERO	NATURE DU RESIDU					
	DANS LES MYOGLOBINES EN GENERAL	CETACES	ONGULES	PRIMATES	CHIEN	
4-	Asp	<u>Glu</u>	Asp	Asp		
22	ala	Ala	Ala	<u>Pro</u>	Ala	
27	Glu	<u>Asp</u>	Glu	Glu	Glu	
34	Lys	Lys	<u>Thr</u>	Lys	Lys	
66	Asx, Val, Ile	Val, Asx	Asn	<u>Ala</u>	Asn	
109	Glu	Glu	<u>Asp</u>	Glu		
110	Ala	Ala	Ala	<u>Cys</u>		
118	Lys	Arg	Lys	Lys		
132	Lys, Asn	Asn	Ser, Thr	Lys	Lys	



mera peut-être cette parenté relative et permettra la localisation encore prématurée, de la myoglobine de Chien sur un arbre phylogénétique construit en utilisant l'élégante méthode de FITCH et MARGOLIASH (148).

La recherche de la structure hypothétique d'une molécule ancestrale commune à toutes les myoglobines de mammifères est évidemment facilitée par la connaissance d'un plus grand nombre de structure : à chaque position dans la séquence l'acide aminé choisi a été soit celui rencontré le plus fréquemment dans les diverses myoglobines (Gly en 74 et non Ala ou Asn) soit celui permettant par une mutation ponctuelle d'être remplacé par tous les autres : par exemple en 140, Asn codé par AAU ou AAC plutôt que Lys ou His car susceptible d'être remplacé grâce à une mutation ponctuelle par Lys (AAA ou AAG) ou par His (CAU ou CAC). La connaissance plus exacte de cette forme ancestrale et sa comparaison avec la molécule de myoglobine de Chien pourra être également un élément important de l'étude phylogénique des myoglobines.

4. CONCLUSIONS

Dans ce travail, nous avons donc déterminé partiellement l'enchaînement des acides aminés de la myoglobine de Chien. Les méthodes d'étude que nous avons utilisé représentent en fait la première étape de la stratégie mise au point au laboratoire pour l'étude des myoglobines (DAUTREVAUX - 149) et celle-ci devra être complétée par l'étude des hydrolysats enzymatiques des fragments libérés par action du BrCN ; l'action de la thermolysine sur la globine, qui fait l'objet du mémoire de notre Diplôme d'Etudes et de Recherches en Biologie Humaine, complètera et confirmera les données obtenues.

Cette étude sur la structure covalente de la myoglobine de Chien ne peut cependant se concevoir que dans une étude d'ensemble plus ambitieuse en vue de préciser l'évolution de cette globine comparée dans différentes espèces mais également en vue de comparer l'évolu-

tion de la myoglobine de la même espèce. Chez les espèces supérieures telles que les Mammifères, toutes les comparaisons Myoglobine - Hémoglobine réalisées jusqu'ici montrent l'énorme différence de structure primaire qui sépare ces deux types de protéine (environ 20 ressemblances seulement entre myoglobine et chaînes de l'hémoglobine) : ces différences devraient s'atténuer dans les espèces moins évoluées comme les poissons, à condition d'éliminer certaines espèces comme la Lamproie qui ne possède qu'un seul type de chaîne, c'est à dire chez qui la distinction Hémoglobine - Myoglobine ne s'est pas encore réalisée. Nous avons l'intention dans une future thèse de Doctorat d'Etat d'étudier la myoglobine et l'hémoglobine du thon rouge (*Thunnus thynnus*), ce qui nous permettra une comparaison plus valable des chaînes et apportera entre les Mammifères et les Oiseaux d'une part, la Lamproie d'autre part un maillon important dans la lignée évolutive de la myoglobine.

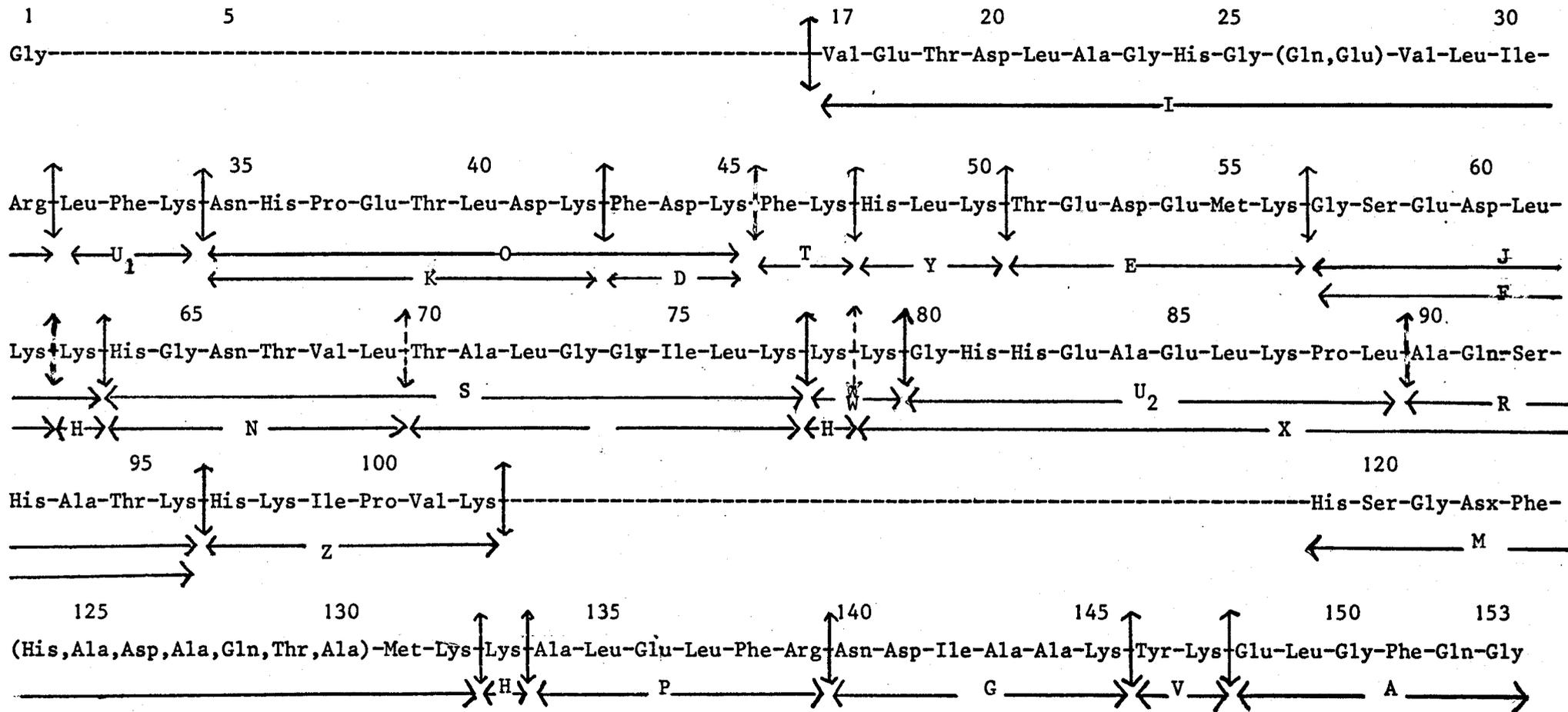
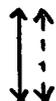


FIGURE 17

SEQUENCE PARTIELLE DES ACIDES AMINES DE LA GLOBINE DE CHIEN



Points d'action majeurs et secondaires de la Trypsine.

805
1965

CACHALOT	(135)	Val-Leu-Ser-Glu-Gly-Glu-Trp-Gln-Leu-Val-Leu-His-Val-Trp-Ala-Lys-Val-Glu-Ala-Asp-Val-Ala-Gly-His-Gly
MARSOUIN	(136)	Gly _____ Asn _____ Gly _____ Leu _____
DAUPHIN	(137)	_____
PHOQUE	(138)	Gly _____ Asp _____ His _____ Asn _____ Gly _____ Thr _____ Leu _____
CHEVAL	(139)	Gly _____ Asp _____ Gln _____ Asn _____ Gly _____ Ile _____
BOEUF	(140)	Gly _____ Asp _____ Ala _____ Asn-Ala _____ Gly _____
MOUTON	(141)	Gly _____ Asp _____ Asn-Ala _____ Gly _____
HOMME	(142)	Gly _____ Asp _____ Asn _____ Gly _____ Ile-Pro _____
GIBBON	(143)	Gly _____ Asp _____ Asn _____ Gly _____ Ile-Pro-Ser _____
CHIMPANZE	(144)	Gly _____ Asp _____ Asn _____ Gly _____ Ile-Pro _____
KANGOUROU	(145)	Gly _____ Asp _____ Asn-Ile _____ Gly _____ Thr _____ Glu-Gly _____
CHIEN		Gly _____ Asp _____ Asn _____ Asx-Ile _____ Gly _____ Thr _____ Leu _____
ANCETRE COMMUN		Gly-Leu-Ser-Asp-Gly-Glu-Trp-Gln-Leu-Val-Leu-Asn-Val-Trp-Gly-Lys-Val-Glu-Ala-Asp-Val-Ala-Gly-His-Gly

FIGURE 18

STRUCTURE COVALENTE DES MYOGLOBINES (1ère partie)

EDMUNDSON (135) - BRADSHAW (136,138) - KARADJOVA (137) - DAUTREVAUX (139,140) - HAN (141) - ROMERO HERRERA et LEHMANN (142, 143,144) - AIR et THOMPSON (145)





30

35

40

45

50

CACHALOT	(135)	Gln-Asp-Ile-Leu-Ile-Arg-Leu-Phe-Lys-Ser-His-Pro-Glu-Thr-Leu-Glu-Lys-Phe-Asp-Arg-Phe-Lys-His-Leu-Lys
MARSOUIN	(136)	----- Val ----- Gly ----- Lys -----
DAUPHIN	(137)	----- Gly ----- Lys -----
PHOQUE	(138)	----- Glu-Val ----- Lys -----
CHEVAL	(139)	----- Glu-Val ----- Thr-Gly ----- Lys -----
BOEUF	(140)	----- Glu-Val ----- Thr-Gly ----- Lys -----
MOUTON	(141)	----- Glu-Val ----- Thr-Gly ----- Lys -----
HOMME	(142)	----- Glu-Val ----- Gly ----- Lys -----
GIBBON	(143)	----- Glu-Val ----- Gly ----- Lys -----
CHIMPANZE	(144)	----- Glu-Val ----- Gly ----- Lys -----
KANGOUROU	(145)	Lys ----- Val ----- Gly ----- Lys -----
CHIEN	(146)	----- Glu-Val ----- Asn ----- Asp ----- Lys -----
ANCETRE COMMUN		Gln-Glu-Val-Leu-Ile-Arg-Leu-Phe-Lys-Ser-His-Pro-Glu-Thr-Leu-Glu-Lys-Phe-Asp-Lys-Phe-Lys-His-Leu-Lys

FIGURE 18

STRUCTURE COVALENTE DES MYOGLOBINES (2ème partie)

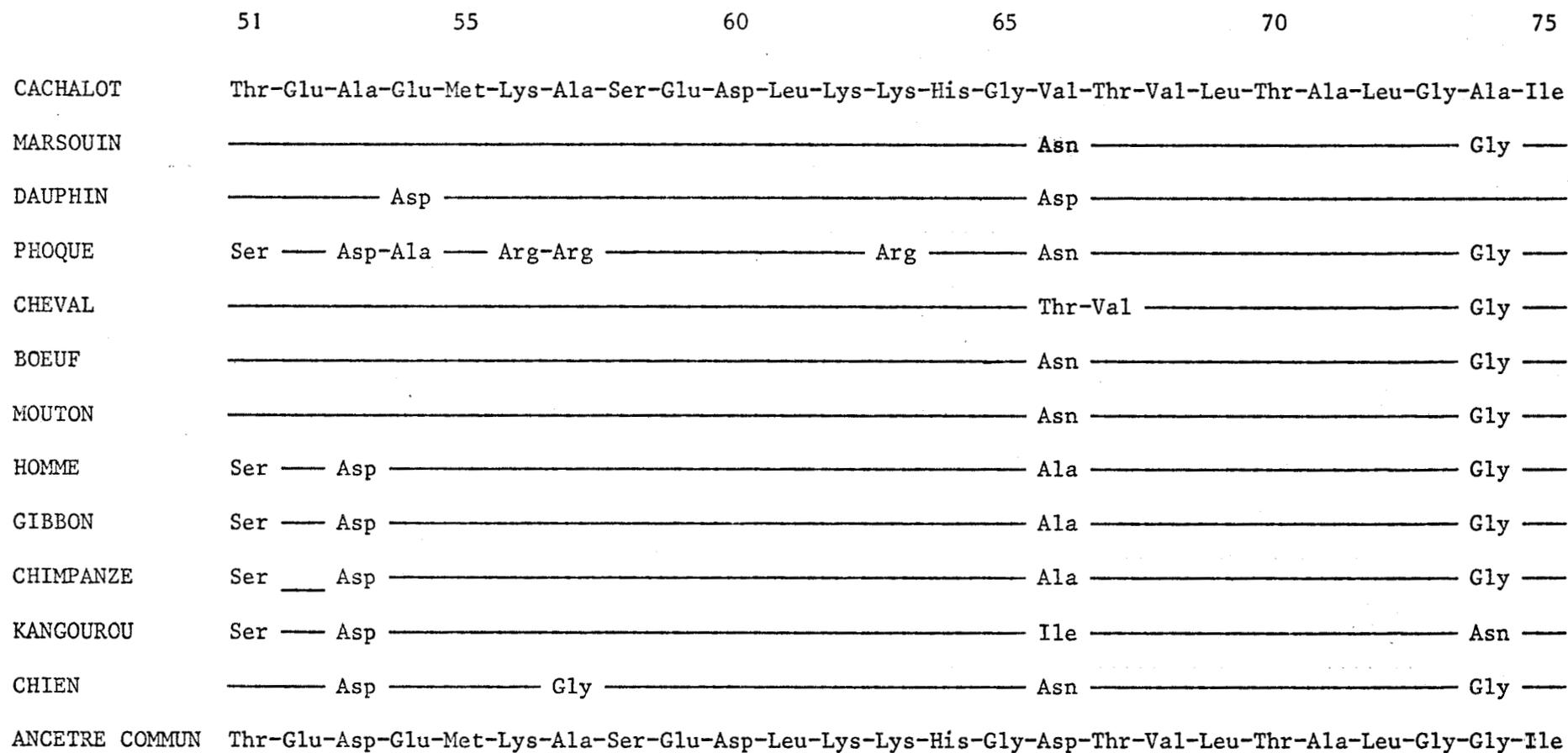


FIGURE 18

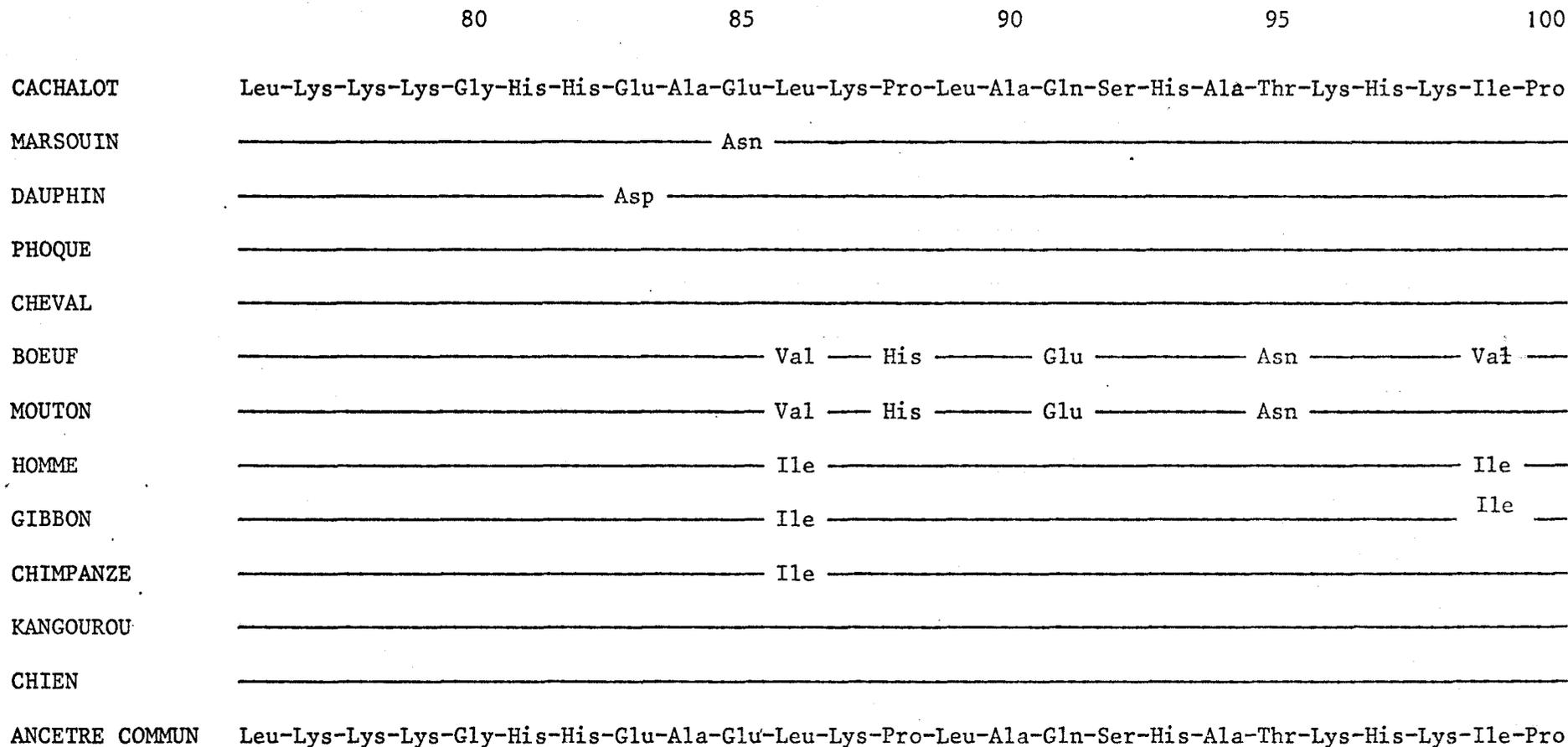


FIGURE 18

STRUCTURE COVALENTE DES MYOGLOBINES (4ème partie)



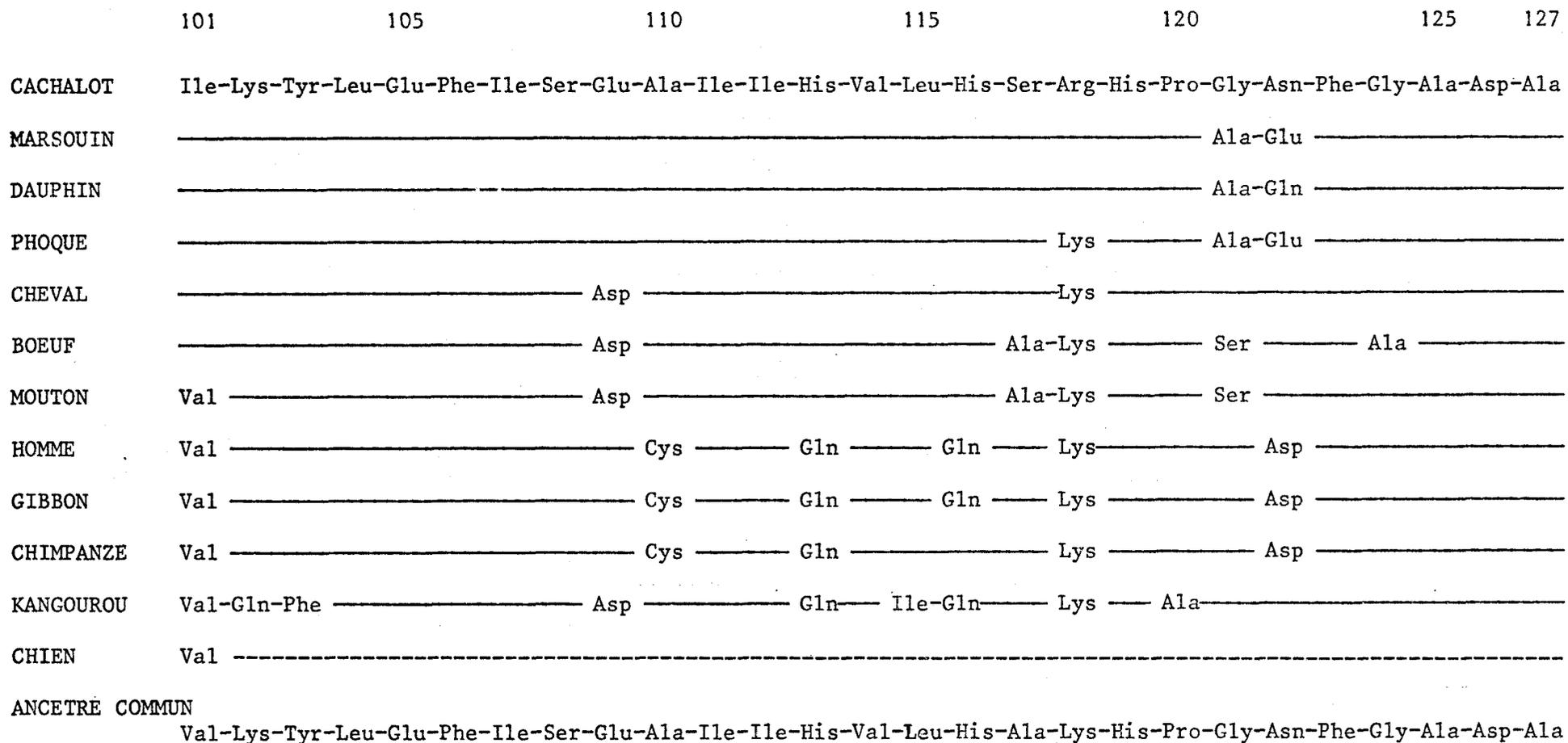


FIGURE 18

STRUCTURE COVALENTE DES MYOGLOBINES (5ème partie)



	128	130	135	140	145	150	153
CACHALOT	Gln-Gly-Ala-Met-Asn-Lys-Ala-Leu-Glu-Leu-Phe-Arg-Lys-Asp-Ile-Ala-Ala-Lys-Tyr-Lys-Glu-Leu-Gly-Tyr-Gln-Gly						
MARSOUIN	_____ Thr _____ Phe-His _____						
DAUPHIN	_____ Phe-His _____						
PHOQUE	Ala	Lys	_____	Asn	_____	_____	Phe-His
CHEVAL	_____	Thr	_____	Asn	_____	_____	Phe
BOEUF	_____	Ser	_____	Asn	Ala	Glu	Val
MOUTON	_____	Ser	_____	Asn	Met	Glu	Val
HOMME	_____ Met _____ Ser-Asn _____ Phe _____						
GIBBON	_____ Met _____ Ser-Asn _____ Phe _____						
CHIMPANZE	_____ Met _____ Ser-Asn _____ Phe _____						
KANGOUROU	Ala	Lys	_____	His	Met	_____	Phe
CHIEN	_____	Lys	_____	Asn	_____	_____	Phe
ANCESTRE COMMUN	Gln-Gly-Ala-Met-Asn-Lys-Ala-Leu-Glu-Leu-Phe-Arg-Asn-Asp-Ile-Ala-Ala-Lys-Tyr-Lys-Glu-Leu-Gly-Phe-Gln-Gly						



FIGURE 18

STRUCTURE COVALENTE DES MYOGLOBINES (FIN)

BIBLIOGRAPHIE

Les références bibliographiques sont données dans l'ordre alphabétique de leurs Auteurs. Les numéros entre parenthèse indiquent l'ordre d'apparition dans le texte.

- ACHER R. et CROCKER C.,
Biochim. Biophys. Acta, (1952, 9, 704 (118)
- AIR G.M. et THOMPSON E.O.P.
Aust. J. Biol. Sci., (1971), 24, 75 (61, 73,46,103)
- AIR G.M., THOMPSON E.O.P., RICHARDSON B.J. et C HARMAN G.B.
Nature, (1971), 229, 391 (74, 145)
- AKESON A. et THEORELL H.
Arch. Biochem. Biophys., (1960), 91, 319 (42)
- ATASSI M.Z. et SAPLIN B.J.
Biochem. J., (1966), 98, 82 (30, 34)
- AWAD E. et KOTITE L.
Biochem. J., (1966), 98, 909
- BAGLIONI C.
Biochem. Biophys. Acta, (1961), 48, 392 (114)
- BALDRIDGE R.C. et LEWIS H.B.
J. Biol. Chem., (1953), 202, 169 (117)
- BANASZAK L.J. et GURD F.R.N.,
J. Biol. Chem., (1964), 239, 1836 (85)
- BERNARD S., HAVEZ R., DAUTREVAUX M. et BISERTE G.
Bull. Soc. Chim. Biol., (1961), 43, 1281 (38, 41, 44)
- BEZNAK M.
Acta Chem. Scand., (1948), 2, 333 (45)
- BISERTE G. et HOLLEMAN J.W.,
Biochim. Biophys. Acta, (1959), 33, 143 (62, 108)
- BISERTE G, PLAQUET - SCHOONAERT T., BOULANGER P. et PAYSANT P.,
J. Chromat., (1960), 3, 25 (64, 112)
- BLACK J.A. et LEAF G.,
Biochem. J., (1965), 96, 693 (95)
- BOARDMAN N.K. et ADAIR G.S.,
Nature, (1956), 177, 1078 (43, 51)
- BOULANGER Y., DAUTREVAUX M., HAN K. et BISERTE G.
Bull. Soc. Chim. Biol., (1968), 50, 1651 (88)
- BOULTON F.E., HUNTSMANN R.G., LORKIN P.A. et LEHMAN H.
Nature, 1969, 223, 832 (20, 107)

- BOYER S.H., FAINER D.C. et NAUGHTON M.A.
Science, (1963), 140, 1228 (23, 48)
- BRADSHAW R.A., GARNER W.H. et GURD F.R.N.
J. Biol. Chem., (1969), 244, 2149 (99)
- BRADSHAW R.A. et GURD F.R.N.
J. Biol. Chem., (1969), 244, 2167 (55, 98)
- BRADSHAW R.A., KRETSINGER R.H. et GURD F.R.N.
J. Biol. Chem., (1969) 244, 2159 (68, 136, 138)
- CLEGG J.B., NAUGHTON M.A., WEATHERALL D.J.
J. Mol. Biol., 1966, 19, 91 (102)
- DAKIN H.D. et WEST R.J.
J. Biol. Chem. , (1928), 78, 91, 745 (132)
- DAUTREVAUX M.
"Recent developments in the chemical study of protein Structure" PREVIERO, PECHERE et COLETTI-PREVIERO Eds INSERM Paris (1971), 149 (149)
- DAUTREVAUX M., BOULANGER Y., HAN K. et BISERTE G.
Bull. Soc. Chim. Biol., (1961), 43, 1281 (65)
- DAUTREVAUX M., BOULANGER Y., HAN K., MOSCHETTO Y. et BISERTE G.
Bull. Soc. Chim. Biol., (1968), 50, 1637 (87)
- DAUTREVAUX M. , BOULANGER Y., HAN K. et BISERTE G.
Europ. J. Biochem. (1969), 11, 267 (67, 86, 89,97)(130)
- DAUTREVAUX M., HAN K, BOULANGER Y. et BISERTE G.
Bull. Soc. Chim. Biol. (1962), 44, 965 (58)
- DAUTREVAUX M., HAN K., BOULANGER Y; , BISERTE G.
Bull Soc. Chim. Biol., (1967), 49, 1073 (91)
- DAUTREVAUX M., HAN K., CHAILA X. et BISERTE G.
Bull. Soc. Chim. Biol., (1969), 51, 989 (104)
- DRABKIN D.L.,
J. Biol. Chem., (1950), 182, 317 (7, 12, 19)
- EDMAN P. et BEGG G.
European J. Biochem., (1967), 1, 80 (31, 76, 106, 126, 147)
- EDMUNDSON A.B.
Nature (1963), 198, 354 (66, 84, 135)
- EDMUNDSON A.B.
Nature (1965), 205, 883 (4,78,83)
- EDMUNDSON A.B. et HIRS C.H.W.
Nature (1961) 190, 663 (56, 79,80)

- EDMUNDSON A.B., et HIRS C.H.W.
J. Mol. Biol. (1962), 5, 663 (33)
- EICHELBERGER L., FECHTER E.S., GEILING E.M.K. et VOS B.J.
Science, (1939), 90, 443 (10)
- FITCH W.M. et MARGOLIASH E.
Science, (1967), 155, 279 (148)
- GRAY W.R. et HARTLEY B.J.,
Biochem. J. (1963), 89, 59 et 379 (123, 125)
- GREEN M. et STAHMANN M.A.
Journ. Biol. Chem. (1952), 197, 771 (134)
- GROS G. et LABOUESSE B.,
Europ. J. Biochem., (1969), 7, 463 (124)
- HAN K.
Résultats non publiés (147)
- HAN K., BOULANGER Y., DAUTREVAUX M., BISERTE G.
Bull. Soc. Chim., (1969), 51, 439 (90)
- HAN K., DAUTREVAUX M. et BISERTE G.
Annal. Pharm. Franç. (1966), 24, 649 (128)
- HAN K., DAUTREVAUX M., BOULANGER Y., MOSCHETTO Y. et BISERTE G.
Bull. Soc. Chim. Biol. (1966), 48, 371 (94)
- HAN K., DAUTREVAUX M., BOULANGER Y. et BISERTE G.
Febs Letters (1969), 3, 41 (96)
- HAN K., DAUTREVAUX M., CHAILA X. et BISERTE G.
Europ. J. Biochem. (1970), 16, 465 (59, 69, 140)
- HAN K., TETAERT D., DAUTREVAUX M., MOSCHETTO Y. et BISERTE G.
Febs Letters (1971), 15, 116 (60, 75, 105, 141)
- HAPNER K.D., BRADSHAW R.A., HARTZELLE G.R. et GURD F.R.N.
J. Biol. Chem. (1968), 243, 683 (27, 37)
- HARDMAN K.D., EGLAR E.M., RAY D.K., BANASZACK L.J. et GURD F.R.N.
J. Biol. Chem. (1966), 241, 432 (89, 35, 47, 50)
- HARRISON S.C. et BLOUT E.R.
J. Biol. Chem. (1965), 240, 299 (2)
- HARTLEY B.J.
Biochem. J. (1970), 119, 805 (125)
- HERRERA A.E.R., LEHMANN H.
Nature New Biology (1971), 232, 149 (100)
- HERRERA A.E.R., LEHMANN H.
Bioch. Biophys. Acta, (1971), 251, 482 (101)
- HILL R.L., HARRIS C.H., MAYLOR J.F. et SAMS W.M.
J. Biol. Chem (1969), 244, 2182 (92)

- HUDGINS P.C., WHORTON D.C.M., TOMOYOSHI DrT. et RIOPELLE Dr.A.J.,
Nature (1966), 212, 693 (25)
- INGRAM V.M.
Biochim. Biophys. Acta (1958), 28, 539 (109)
- JEGOROV C., KEIL B. et SORM F.
Coll. Czechoslov. Chem. Commun (1965), 30, 105 (110)
- JOHANSSON B.G. et RYMO L.
Acta Chem. Scand. (1955), 16, 599 (52)
- JO XIS J.H.P. et WADMAN S.K.
Nature (1952), 169, 884 (21)
- KAGEN L.J. et GUREVICH R.
J. of Histochem. and Cytochem. (1967), 15, 436 (5)
- KARADZOVA M., NEDKOV P.T., ATANASOV B. et KEIL B.
Collect. Czechoslov. Chem. Commun (1963), 28, 2969
(36, 57)
- KARADJOVA M., EDKOV P., BAKARDJIEVA A. et GENOV M.
Biochem. Biophys. Acta (1970), 221, 136 (70, 93, 137)
- KENDREW J.C., PARRISCH R.G., MARRACK J.R. et ORLANS E.S.
Nature, (1954), 174, 946 (6)
- KENDREW J.C.
Science (1963), 139, 1259 (82)
- KENDREW F.R.S., WATSON H.C., STRANBERG B.E., DICKERSON R.E., PHILLIPS D.C.
et SHORE V.C.
Nature, (1961), 190, 666 (81)
- LAWRIE R.A.,
J. Agric. Sci., (1950), 40, 356 (15)
- LAWRIE R.A.
Nature (1953), 171, 1069 (8)
- LEWIS U.J. et SCHWEIGERT B.S.,
J. Biol. Chem. (1955), 214, 647 (39)
- MATSUBARA H.
Biochem. Biophys. Res. Commun. (1966), 24, 427 (129)
- PARTRIDJE S.H.
Biochem.J. (1948), 42, 238 (122)
- PERKOFF G.T. et TYLER F.H.
J. Clin. Endocrinol. and Metabolism (1957) 17, 1395 (73)
- PERKOFF G.T., HILL R.L., BROWN D.M. et TYLER F.H.
J. Biol. Chem. (1962), 237, 2820 (17)
- PERUTZ M.F.
J. Mol. Biol., (1965), 13, 656 (3)

- PETERSON E.A. et SOBER H.A.
Anal. Chem., (1959), 31, 857 (120)
- PLAQUET R., BISERTE G et BOULANGER P.
Bull. Soc. Chim.Biol.(1962), 44,301 (121)
- REYNAFARTE B., MORRISON P.,
J. Biol. Chem. (1962) 237, 286 (14)
- ROBINSON D.
Science, 1939, 90, 276 (11)
- ROMERO-HERRERA A.E.R. et LEHMANN H.
Nature New Biology (1971), 232, 149 (53)(71, 142)
- ROMERO HERRERA A.E.R. et LEHMANN H.
Bioch. Biophys. Acta,(1972), 251, 482 (54,72,143)
- ROMERO HERRERA A.E. et LEHMANN H.
Biochim. Biophys. Acta (1972) 278, 62 (72 bis)
- ROSENHECK K. et DOTY P.
Proc. Natl. Acad. Sci. (1961), 47, 1775 (1)
- ROSSI FANELLI
In symposium on Protein Structure (1957) (18)
- RUMEN W.M.
Acta Chem. Scand., (1963) 13, 1542 (28)
- SCHMID K.
Helv. Chem. Acta (1949) 32, 1198 (32)
- SHALTIEL S. et PATCHORNIK
J. Amer. Chem. Soc. (1963), 85, 2799 (127)
- SINGER K., ANGELOPOULOS B. et RAMOT B.
Blood (1955), 10, 987 (22)
- SMITH I.
Nature (1953), 171, 43 (116, 119)
- SPIES J.R. et CHAMBERS D.C.
Anal. Chem. (1949) 21, 1240 (63)
- THEORELL H. et DE DUVE C.
Arch. Biochem. (1947), 12, 113 (16, 49)
- TOENNIS C. et KOLB J.J.
Anal. Chem (1961), 23, 189 (115)

TURNER R.A. et SCHMERZLER G.

J. Amer. Chem. Soc. (1954), 76, 949 (131)

WALEY S.G. et WATSON J.

Biochem. J., (1953), 55, 228 (111, 113)

ZMRAHL Z., JEGOROV C. et KEIL B.

Coll. Czechosl. Chem. Communic. (1964), 29, 943 (24)

