Numéro d'ordre : 267

10376 1913 17

50376 1973 1**7** 

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

### THĖSE

présentée à l'Université de Lille l pour l'obtention du grade de DOCTEUR ÉS SCIENCES NATURELLES

OPTION BIOCHIMIE

par

Pierre SAUTIÈRE

# Détermination de la structure primaire

d'histones



GRK-histone de thymus de Veau GRK-histone de thymus de Porc GRK-histone de chloroleucémie du Rat ALK-histone de thymus de Veau

présentée le 24 Février 1973 devant la Commission d'Examen

MM. J. MONTREUIL, Président

- G. BISERTE, Rapporteur
- M. DURCHON
- G. MARCHIS-MOUREN

MILE M. CHAMPAGNE

Ce travail a été réalisé à l'Unité N° 16 de Recherches sur la Biochimie des Protéines Normales et Pathologiques de l' I.N.S.E.R.M. (Directeur : Professeur Paul BOULANGER), sous la direction de Monsieur le Professeur Gérard BISERTE. A ma femme,

A mes enfants,

A mon père,

A la mémoire de ma mère,

A mon beau-père,

A toute ma famille,

A mes amis.

### A MON PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur Jean MONTREUIL

Professeur de Chimie Biologique à l'Université des Sciences et Techniques de Lille 1.

Chef du Département de Biochimie Cellulaire de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille.

Ma vocation de chercheur s'est éveillée en suivant votre enseignement que vos qualités pédagogiques rendent si clair et si attrayant. C'est avec vous qu'en 1956, j'ai effectué à l'Institut du Cancer, ma première préparation d'histones.

Votre bienveillance à mon égard et l'intérêt constant que vous portez à mes recherches me sont précieux.

Je vous suis très reconnaissant de l'honneur que vous me faites en acceptant de présider le Jury de cette thèse.

### Monsieur le Professeur Gérard BISERTE

## Professeur de Biochimie Pathologique à la Faculté de Médecine de Lille. Directeur de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille.

Vous représentez pour moi le Maître, c'est-à-dire celui qui enseigne, celui qui accueille et écoute avec bienveillance, celui qui aide et qui conseille, celui qui fait confiance, celui dont on aime suivre l'exemple.

Soyez assuré de ma profonde reconnaissance et de mon respectueux attachement. Monsieur le Professeur Maurice DURCHON

Professeur de Zoologie Générale et Appliquée.

Vous m'avez donné de précieux conseils pour l'orientation future de mes recherches.

J'ai trouvé auprès de vos collaborateurs un accueil enthousiaste et très efficace.

Je vous en remercie vivement et vous prie de croire en mon profond respect.

Monsieur le Professeur Guy MARCHIS-MOUREN

Professeur de Chimie Biologique à la Faculté des Sciences de Marseille.

Vos qualités scientifiques et humaines, l'originalité de vos recherches ont suscité mon admiration.

Je vous suis reconnaissant d'avoir accepté de juger cette thèse.

Mademoiselle Madeleine CHAMPAGNE

Maître de Recherches au CNRS

Laboratoire de Biophysique de l'Université Louis Pasteur à Strasbourg.

Votre autorité scientifique dans le domaine des histones me fait réclamer votre indulgence pour juger ce travail.

Je vous remercie et vous prie de croire en mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Paul BOULANGER

Professeur de Biochimie Médicale

Directeur de l'Unité de Recherches n°16 de l'INSERM sur la Biochimie des Protéines Normales et Pathologiques.

Vous avez toujours été pour moi un Maître bienveillant auprès duquel j'ai trouvé compréhension et appui sans réserve.

Soyez assuré de ma profonde gratitude et de mon respectueux attachement.

A Monsieur le Professeur Michel DAUTREVAUX

Professeur de Biochimie Médicale.

Tu as toujours été pour moi un exemple et j'ai souvent bénéficié de tes conseils éclairés.

Je t'en remercie vivement.

A tous ceux qui m'ont aidé :

Madame Marie-Dominique LAMBELIN-BREYNAERT, Madame Lucile ENDL-DUPAS, Mademoiselle Danièle TYROU, Monsieur Bernard LAINE, Mademoiselle Arlette MARTINAGE, Madame Denise BELAICHE-MAYEUR, Mademoiselle Annie HEMEZ.

J'ai largement bénéficié de votre aide au cours de la réalisation de cette thèse.

Votre gentillesse, votre dynamisme et votre enthousiasme ont contribué à créer dans le laboratoire une atmosphère de chaude amitié propice à un travail fructueux.

Veuillez trouver entre ces lignes l'expression de ma gratitude.

Monsieur Yves MOSCHETTO,

J'ai trouvé auprès de toi et du service de micro-analyse que tu dirigeais une aide très précieuse pour la réalisation de ce travail. Je t'en remercie vivement. Monsieur le Professeur Agrégé Jacques MIZON,

Le sujet de recherches que nous avons en commun fait souvent naître de fructueux échanges et renforce les liens d'une profonde amitié qu'une communauté de formation et de goût a suscitée.

Madame Anny DUHAUT-LEGRAND, Mademoiselle Odile MOREAU,

Vous m'avez gentiment apporté votre précieux concours pour le fractionnement des peptides.

Je vous en remercie vivement.

Monsieur Claude VANDEPERRE,

Ton aide m'a été très précieuse pour la réalisation et la présentation de ce travail.

Sois assuré de mon amitié.

Monsieur Pierre RUFFIN,

Je te suis reconnaissant de l'aide que tu m'as généreusement apportée en effectuant de nombreuses analyses d'amino-acides.

Mademoiselle Thérèse HUART,

Votre serviabilité et votre savoir-faire se concrétisent dans la présentation de cette thèse.

Soyez assurée de ma profonde gratitude et de mon amitié.

A tous mes Amis de l'Unité des Protéines et du Laboratoire de Biochimie.

### DOYENS HONORAIRES

### MM. H. LEFEBVRE, M. PARREAU

### PROFESSEURS HONORAIRES

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BEGHIN, BROCHARD, CAU, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, DEHEUVELS, DEHORNE, DEHORS, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LELONG, Mme LELONG, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, NORMANT, PARISELLE, PASCAL, PAUTHENIER, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, WIEMAN, ZAMANSKI.

### PRESIDENT DE L'UNIVERSITE

### DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

M. René DEFRETIN

Professeur de Biologie Marine Directeur de l'Institut de Biologie Maritime et Régionale de Wimereux

#### PROFESSEURS TITULAIRES

BACCHUS Pierre	Astronomie
BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Générale
BECART Maurice	Physique
BIAYS Pierre	Géographie
BLOCH Vincent	Psychophysiologie
BONNEMAN Pierre	Chimie et Physico-Chimie Industrielle
BONTE Antoine	Géologie Appliquée
BOUGHON Pierre	Mathématiques
BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
CAPET Marcel-Francis	Institut de Préparation aux Affaires
CELET Paul	Géologie
CONSTANT Eugène	Physique Industrielle-Electronique
	BACCHUS Pierre BEAUFILS Jean-Pierre BECART Maurice BIAYS Pierre BLOCH Vincent BONNEMAN Pierre BONTE Antoine BOUGHON Pierre BOURIQUET Robert CAPET Marcel-Francis CELET Paul CONSTANT Eugène

M. CORSIN Pierre M. DECUYPER Marcel M. DEFRETIN René M. DELATTRE Charles M. DURCHON Maurice M. FAURE Robert M. FOURET René M. GABILLARD Robert M. GEHU Jean-Marie M. GLACET Charles M. GONTIER Gérard M. GUILLAUME Jean M. HEUBEL Joseph M. JOLY Robert Me LENOBLE Jacqueline M. LOMBARD Jacques M. MONTARIOL Frédéric M. MONTREUIL Jean M. POUZET Pierre Me SCHWARTZ Marie-Hélène M. TILLIEU Jacques M. TRIDOT Gabriel M. VAILLANT Jean M. VIDAL Pierre M. VIVIER Emile M. WERTHEIMER Raymond M. ZEYTOUNIAN Radyadour

Paléobotanique Mathématiques Générales **Biologie Marine** Géologie Générale Zoologie Générale et Appliquée Mécanique Physique Radio-Electricité-Electronique Institut Agricole Chimie Organique Mécanique Biologie Végétale Chimie Minérale Biologie (Amiens) Physique Expérimentale Sociologie Chimie Appliquée Chimie Biologique Informatique Analyse Supérieure Physique Théorique Chimie Mathématiques Automatique Biologie Animale Physique Mathématiques

### PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

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

#### PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean M. BILLARD Jean M. BODARD Marcel M. BOILLET Pierre M. DERCOURT Jean-Michel M. DEVRAINNE Pierre M. GOUDMAND Pierre M. GRUSON Laurent M. GUILBAULT Pierre M. LACOSTE Louis M. LANDAIS Jean M. LEHMANN Daniel M. LOUCHEUX Claude M. MAES Serge Mle MARQUET Simone M. MONTEL Marc M. PANET Marius M. PROUVOST Jean

Physique Physique Botanique Physique Géologie Chimie Minérale Chimie Physique Mathématiques Biologie **Biologie** Chimie Mathématiques Chimie Physique Mathématiques Physique **I.E.E.A**. Minéralogie

### MAITRES DE CONFERENCES

M.ADAM Michel M. ANDRE Charles M. ANGRAND Jean-Pierre M. ANTOINE Philippe M. AUBIN Thierry M. BART André M. BEGUIN Paul M. BKOUCHE Rudolphe M. BOILLY Bénoni M. BONNEMAIN Jean-Louis M. BONNOT Ernest M. BOSCQ Denis M. BRIDOUX Michel M. BRUYELLE Pierre M. CAPURON Alfred M. CARREZ Christian M. CORDONNIER Vincent M. CORTOIS Jean M. COULON Jean M. DEBOURSE Jean-Pierre M. DEBRABANT Pierre M. DELAUNAY Jean-Claude M. DOUKHAN Jean-Claude M. DRIEUX Baudouin M. DYMENT Arthur M. ESCAIG Bertrand

Economie Politique Sciences Economiques Géographie Mathématiques Mathématiques Biologie Mécanique des Fluides Mathématiques Biologie Biologie Végétale Biologie Végétale Mathématiques Chimie Géographie et Aménagement Spatial **Biologie** Animale I.E.E.A. Informatique Physique I.E.E.A. Sciences Economiques et Sociales Sciences Appliquées Sciences Economiques et Sociales Physique I.E.E.A. Mathématiques Physique

(et chargés de fonctions)

M. FONTAINE Jacques M. FROELICH Daniel M. GAMBLIN André M, GOBLOT Rémi M. GOSSELIN Gabriel M. GRANELLE Jean-Jacques M. GUILLAUME Henri M. HERMAN Maurice M. JOURNEL Gérard Mle KOSMANN Yvette M. KREMBEL Jean M. LABLACHE COMBIER Alain M. LAURENT François M. LAVAGNE Pierre Mle LEGRAND Denise Mle LEGRAND Solange Me LEHMANN Josiane M. LENTACKER Firmin M. LEROY Yves M. LHENAFF René M. LOCQUENEUX Robert M. LOUAGE Francis Me MAILLET Monique M. MAIZIERES Christian M. MALAUSSENA Jean-Louis M. MERIAUX Emile M. MESSELYN Jean M. MIGEON Michel M. PAQUET Jacques M. PARSY Fernand M. PECQUE Marcel M. PERROT Pierre M. PERTUZON Emile M. PONSOLLE Louis M. POVY Jean-Claude M. RACZY Ladislas Me RENVERSEZ Françoise M. ROUSSEAU Jean-Paul M. ROY Jean-Claude M. SALMER Georges M. SEGUIER Guy M. SIMON Michel M. SLIWA Henri M. SMET Pierre M. SOMME Jean Mle SPIK Geneviève M. TOULOTTE Jean-Marc M. TREANTON Jean-René M. VANDORPE Bernard M. VILETTE Michel M. WATERLOT Michel Me ZINN JUSTIN Nicole

Génie Electrique Sciences Appliquées Géographie Mathématiques Sociologie Sciences Economiques Sciences Economiques et Sociales Physique Sciences Appliquées Mathématiques Chimie Chimie Automatique Sciences Economiques et Sociales Mathématiques Mathématiques Mathématiques Géographie et Aménagement Spatial Electronique Géographie Physique Sciences Appliquées Sciences Economiques 1.E.E.A. Sciences Economiques et Sociales Sciences de la Terre Physique Chimie (Sciences Appliquées) Sciences Appliquées Mathématiques Chimie Chimie Biologie Chimie (Valenciennes) Sciences Appliquées Physique Sciences Economiques et Sociales Physiologie Animale Biologie Radio Electricité Electronique Electronique Psychologie Chimie Physique Géographie Chimie Biologique Sciences Appliquées Sciences Economiques et Sociales Chimie Physique Génie Mécanique Géologie Mathématiques

### TABLE DES MATIERES

0	P	a	g	es	
---	---	---	---	----	--

INTRODUCTION	1
CHAPITRE I :	
NOMENCLATURE DES HISTONES	5
CHAPITRE II :	
PREPARATION ET CARACTERISATION DES HISTONES	8
A) Préparation des histones	8
1) Préparation de la désoxyribonucléoprotéine	8
2) Extraction sélective des histones	9
3) Purification des histones	9
a) Obtention de la GRK-histone à partir de la fraction F <sub>2a1</sub> b) Obtention de l'ALK-histone à partir de la fraction F <sub>2a2</sub>	9 12
B) Caractérisation des histones	16
<ol> <li>Caractérisation des histones par leur composition en amino- acides</li> </ol>	16
2) Caractérisation des histones par leur migration électropho- rétique	16
3) Caractérisation des histones par leur solubilité	18

## CHAPITRE III :

DE	TER	MINATION	DE LA	STRUCTURE	PRIMAIRE	DES	HISTONES
4)	Cho	oix des métha	des	,			· · · · · · · · ·
B)	Hyo n <b>a</b> t	drolysesenzyr ive ou maléy	natiques lée	par les endop	eptidases d	e l'hi	stone
	1)	Maléylation	de l'ALK	-histone			• • • • • • • • • •
		<b>a</b> ) Principe d b) Avantages	e la mal de la m	éylation aléylation	• 0 0 • • • • • • • • • • •	• • • •	
	2) (	Conditions d	hydrolys	е			
	3)	Fractionneme	nt des hy	ydrolysats			· · · · · · · · · ·
		a) Chromatog b) Chromatog c) Cartes per	graphie d graphie d ptidiques	l'échange d'io le gel-filtrati	ons	• · • • •	
	4)	Purification of	des pepti	des			
C)	Etu	de des peptio	des				o • • • • • • •
	1)	Composition	en <mark>ami</mark> nc	-acides			
	2)	Déterminatio	n de l'ex	trémité NH <sub>2</sub>	-terminale p	oar do	insylation
	3)	Déterminatio	n de l'ex	trémité COO	H-terminal	е	
	4)	Dégradation	des pepti	ides par la mé	thode de Ec	dman	
D)	Co	upure au bror	mure de o	cyanogène (G	RK-histone	uniq	uement)
	1)	Modalités de produits de c	la coup livage .	ure spécifique	e et fraction	neme	nt des
	2)	Etude de l'oc histone	tadécapo	eptide COOH	l-terminal d	le la	GRK-
		a) Compositi b) Déterminc c) Hydrolyse	on en am ition de s trypsiqu	ino-acides l'extrémité N Je et chymotr	H <sub>2</sub> -termina ypsique : fr	le action	nne <mark>m</mark> ent
		et étude d	es peptic	les	0 0 6 6 6 0 6 6 0 6		

## CHAPITRE IV :

STRUCTURE PRIMAIRE DE LA GRK-HISTONE	32
A) Composition en amino-acides de la GRK-histone	33
B) Détermination de l'extrémité NH <sub>2</sub> -terminale de la GRK-histone	33
C) Détermination de l'extrémité COOH-terminale de la GRK- histone	35

D) Coupure de la GRK-histone par le bromure de cyanogène	35
1) Isolement et composition en amino-acides du peptide CN-2	<b>3</b> 5
2) Etude des peptides trypsiques du peptide CN-2	37
3) Alignement des peptides trypsiques du peptide CN-2	42
E) Etude des peptides trypsiques	44
F) Etude des peptides chymotrypsiques	60
G) Séquence en amino-acides de la GRK-histone	68

## CHAPITRE V :

STRUCTURE PRIMAIRE DE L'ALK-HISTONE	75
A) Composition en amino-acides de l'ALK-histone	76
B) Détermination de l'extrémité NH <sub>2</sub> -terminale de l'ALK-histone	76
C) Détermination de l'extrémité COOH-terminale de l'ALK- histone	78
D) Hydrolyses enzymatiques	80
1) Peptides trypsiques de l'ALK-histone native	80
2) Peptides trypsiques de l'ALK-histone maléylée	99
3) Peptides chymotrypsiques de l'ALK-histone native	109
4) Peptides chymotrypsiques de l'ALK-histone maléylée	119
5) Peptides obtenus par hydrolyse de l'ALK-histone avec la thermolysine	133
E) Séquence complète en amino-acides de l'ALK-histone	162

DISCUSSION GENERALE	69
---------------------	----

<b>BIBLIO GRAPHIE</b>	 174

### INTRODUCTION

En 1943, STEDMAN et STEDMAN (1) avancèrent l'hypothèse que les histones – protéines basiques associées au DNA dans les cellules somatiques – avaient un rôle répresseur sur l'activité du gène dans la cellule. Le fait que l'apparition des histones dans l'évolution coîncide, comme l'a souligné GEORGIEV (2), avec l'apparition d'un noyau bien défini (et des chromosomes) et avec la différenciation, n'est sans doute pas étranger à cette hypothèse qui reçut sa première preuve expérimentale en 1962, grâce aux travaux de HUANG et BONNER (3). Ces auteurs montrèrent que les histones inhibaient la synthèse du RNA. Entre temps, STEDMAN et STEDMAN avaient ouvert la voie vers un vaste champ d'investigations dont les histones et les autres constituants de la chromatine allaient être l'objet.

Les recherches entreprises aux environs de 1950 concernaient essentiellement la dissociation du complexe DNA - histones par les acides dilués (4) (5) ou par les sels neutres (6) et le fractionnement des histones ainsi obtenues (7) (8) (9) (10)(11) (12) (13). Très rapidement, on a pu démontrer que ces protéines de caractère basique marqué pouvaient se répartir en deux groupes très hétérogènes : l'un correspondant aux histones riches en lysine, l'autre aux histones riches en arginine. L'hétérogénéité de cette famille de protéines ressortait confusément de l'étude des histones totales ou fractionnées, en électrophorèse libre selon TISELIUS (7) (9) (14) (15) (16) (17) ou en ultracentrifugation (4) (10) (15) (16) (17) (18), ainsi que de la détermination des amino-acides en position  $NH_2$ -terminale (19) (20).

L'hétérogénéité se manifesta clairement quand l'avènement de supports nouveaux - gel d'amidon (21) (22) et gel de polyacrylamide (23) - permit la séparation électrophorétique des histones. Cette acquisition technique fut capitale pour le développement ultérieur des recherches sur les histones.

Ainsi s'imposa la nécessité de développer de nouvelles méthodes de fractionnement des histones qui s'orientèrent d'abord vers des procédés chromatographiques, utilisant, soit l'Amberlite CG 50, avec un gradient de chlorhydrate de guanidine à pH 6,8 (5) (24), soit la carboxyméthylcellulose, avec un gradient discontinu de pH (22) (25) (26). Ces différents procédés qui s'étaient révélés peu satisfaisants pour le fractionnement des histones totales firent bientôt place à des méthodes d'extraction sélective en milieu acide – acide trichloracétique (27) ou acide perchlorique (28) –, en milieu éthanolique (28) (29) (30), et plus tard en milieu salin (31) (32).

Les méthodes d'extraction sélective des histones furent essentiellement développées par JOHNS (28) (29) (30) à partir de la désoxyribonucléoprotéine de thymus de Veau, et leur acquisition a constitué une étape fondamentale dans l'étude de ces protéines.

Le fractionnement de JOHNS permet de séparer et de définir cinq fractions principales :  $F_1$ ,  $F_{2b}$ ,  $F_{2a1}$ ,  $F_{2a2}$  et  $F_3$ , qui se répartissent en deux groupes : histones riches en lysine :  $F_1$  et  $F_{2b}$ , histones riches en arginine :  $F_{2a1}$ ,  $F_{2a2}$  et  $F_3$ . L'hétérogénéité dont les premiers fractionnements chromatographiques et les premières études électrophorétiques avaient exagéré l'importance à cause des phénomènes d'agrégation, apparaît donc plus limitée.

Ces 5 fractions semblent exister dans toutes les cellules somatiques de mammifères, des oiseaux (\*), des poissons et des plantes. Selon JOHNS (35), la quantité de chaque fraction correspond approximativement à 20 p.100 du poids de DNA présent dans le tissu.

- 2 -

 <sup>(\*)</sup> Les érythrocytes d'oiseaux renferment une histone spécifique - histone F<sub>2c</sub> ou F<sub>V</sub> (33) (34) - dont les caractères de solubilité et les caractéristiques de la composition en amino-acides l'apparentent à la fraction F<sub>1</sub> (histones très riches en lysine).

Toutefois, l'électrophorèse en gel d'amidon (36) (37) (38) ou de polyacrylamide (37) (40) (41) (42) des fractions ainsi obtenues fait apparaître des contaminations croisées dans les histones riches en arginine et dans la fraction F<sub>2b</sub>.

Les méthodes d'extraction sélective employées seules ne permettent donc pas l'obtention d'histones pures : nous retrouvons là le problème auquel se heurtent les systèmes chromatographiques appliqués au fractionnement des histones totales.

Mais les fractions obtenues par la méthode de JOHNS se prêtent, en raison même de leur faible complexité par rapport aux histones totales, à des techniques de purification par chromatographie de gel-filtration ou d'échange d'ions. Dès 1965, de nombreux chercheurs s'étaient engagés dans cette voie décisive qui, en aboutissant à l'isolement d'histones pures, rendait possible l'étude de la structure primaire de ces protéines (36) (39) (40) (41) (43) (44) (45). FAMBROUGH et BONNER (46) ont élaboré une méthodologie différente qui associe un fractionnement chromatographique sur Amberlite CG 50 (24) avec une séparation électrophorétique préparative en gel de polyacrylamide et ces auteurs ont pu ainsi isoler les histones riches en arginine (histones III et IV) du thymus de Veau et de l'embryon de Pois.

Les recherches que nous avons entreprises depuis 1965 (36) (37) (47) pour l'élaboration d'une méthode chromatographique simple permettant d'obtenir des histones pures à partir des fractions de JOHNS  $F_{2a1}$ ,  $F_{2a2}$  et  $F_{2b}$  ont naturellement débouché sur la détermination de la séquence en amino-acides de deux histones riches en arginine, isolées du thymus de Veau : GRK-histone et ALK-histone (\*).

La connaissance de la structure primaire des histones de thymus de Veau ouvre des perspectives intéressantes pour l'étude des relations de ces protéines avec le DNA et les autres constituants de la chromatine. Elle constitue également une acquisition nécessaire aux études comparatives réalisées avec des histones homologues de tissus normaux ou cancéreux.

(\*) GRK-histone : histone riche en glycine, arginine et lysine.
 ALK-histone : histone riche en alanine, leucine et lysine.

Avec le thymus de Veau, matériel aisé à obtenir et source abondante d'histones, nous avons mis au point un protocole de fractionnement qui nous a permis d'obtenir la GRK-histone et l'ALK-histone, hautement purifiées. Ce protocole a été appliqué pour l'isolement des histones homologues à partir du thymus de Porc et de la tumeur de chloroleucémie du Rat (\*).

De même, la technique développée pour la séparation en chromatographie d'échange d'ions des peptides de l'hydrolysat trypsique de la GRK-histone de thymus de Veau, a été utilisée pour le fractionnement des hy drolysats enzymatiques obtenus à partir de la GRK-histone de thymus de **P**orc, de la GRKhistone de chloroleucémie et de l'ALK-histone de thymus de Veau.

La présentation de nos résultats comprend cinq parties :

1) La nomenclature des histones.

2) La préparation et la caractérisation des histones.

3) Les méthodes utilisées pour la détermination de la structure primaire des histones.

4) La structure primaire de la GRK-histone.

5) La structure primaire de l'ALK-histone.

(\*) Les tumeurs de chloroleucémie du Rat ont été fournies par l'Institut de Recherches sur le Cancer (59 - LILLE, FRANCE). La tumeur de chloroleucémie est un sarcome lymphoblastique transmis par implantation sous-cutanée d'un greffon dans la région dorso-lombaire de l'animal (Rat Wistar, 250 g).

### CHAPITRE I

### NOMENCLATURE DES HISTONES

Les histones se caractérisent par leur composition en amino-acides, leur migration électrophorétique en gel d'amidon ou en gel de polyacrylamide et leur solubilité.

La composition en amino-acides représente l'élément essentiel pour définir une histone, et c'est à partir de ce critère qu'une nouvelle nomenclature des histones a été proposée à la Gordon Research Conference sur les histones qui s'est tenue à Beaver Dam (Wisconsin – U.S.A.), en juillet 1972. Depuis 1962, les nomenclatures proposées pour les histones relevaient d'un système de fractionnement chromatographique (RASMUSSEN <u>et al</u>) (24) ou chimique (JOHNS) (29) (30).

Chaque fraction considérée à tort comme une entité protéique s'est révélée plus ou moins hétérogène à l'analyse électrophorétique en gel d'amidon ou de polyacrylamide. C'est pourquoi, en 1968, quand STARBUCK <u>et al</u> (39) isolèrent à partir des fractions  $F_{2a}$  et  $F_3$  du thymus de Veau deux histones riches en arginine satisfaisant aux critères de pureté électrophorétiques et chimiques, ils adoptèrent une nouvelle nomenclature fondée sur les caractéristiques de la composition en amino-acides des histones. Ils ont ainsi décrit une GAR-histone (Glycine-rich, Arginine-rich) et une AL-histone (Arginine-rich, Lysine-rich). Nous avons nous-mêmes adopté cette nomenclature (40) (41). En 1971, HAYASHI et IWAI (48) introduisent une quatrième nomenclature également fondée sur les caractéristiques de la composition en amino-acides des histones. Avec le code japonais à deux lettres, la GAR-histone devient l'AG-histone, tandis que l'AL-histone demeure l'AL-histone avec une signification différente : (Alaninerich, Leucine-rich).

Il apparut donc indispensable d'établir une nomenclature <u>unique</u> pour les histones. Cette nomenclature utilise un code à 3 lettres qui désignent dans l'ordre décroissant les amino-acides les plus abondants dans l'histone considérée. Les différentes nomenclatures des histones sont rassemblées dans le tableau 1.

Bien que ne ralliant pas encore tous les suffrages, la nouvelle nomenclature proposée à la Gordon Research Conference a le mérite de clarifier la situation et de faire ressortir l'appartenance d'une histone au groupe des histones riches en arginine ou au groupe des histones riches en lysine.

Nous avons adopté cette nomenclature pour la présentation de notre travail.

### TABLEAU I

### Nomenclature des histones du thymus de Veau

RASMUSSEN et al (24)	JOHNS (29)( <b>30</b> )	STARBUCK <u>et al</u> (39) SAUTIERE <u>et al</u> (40)(41)	HAYASHI et IWAI (48)	Nomenclature (Gordon Re- search Confe- rence, 1972)(*)
la, lb	۴	-	LA riche en Lysine et en Alanine	КАР
IIb <sub>2</sub>	F <sub>2b</sub>	-	LS riche en Lysine et en Sérine	KAS
llbl	F <sub>2a2</sub>	AL riche en Arginine et en Lysine	AL riche en Alanine et en Leucine	ALK
<u>i</u> îî	F <sub>3</sub>	-	AA riche en Arginin et en Alanine	ARE e
IV	<sup>F</sup> 2a 1	GAR riche en Glycine et en Arginine	AG riche en Arginine et en Glycine	GRK

(\*) A = Alanine ; R = Arginine ; E = Acide glutamique ; G = Glycine ;
 L = Leucine ; K = Lysine ; P = Proline ; S = Sérine.

•

### CHAPITRE II

### PREPARATION ET CARACTERISATION DES HISTONES

### A) PREPARATION DES HISTONES

La préparation des histones est réalisée en trois étapes :

- Préparation de la désoxyribonucléoprotéine
- Extraction sélective des histones
- Purification des histones

### 1) Préparation de la désoxyribonucléoprotéine

La préparation de la désoxyribonucléoprotéine est fondée sur son insolubilité en milieu NaCl 0,14 <u>M</u>. Elle est effectuée à + 4°C et en présence de disopropylfluorophosphate ou de bisulfite de sodium (49) pour inhiber toute activité protéolytique.

Dans le cas du thymus, tissu pauvre en cytoplasme et métaboliquement peu actif, la désoxyribonucléoprotéine est obtenue directement par homogénéisation du tissu en milieu NaCl 0,14 M.

Dans le cas des autres tissus où le matériel cytoplasmique est plus abondant, la désoxyribonucléoprotéine est préparée à partir des noyaux cellulaires préalablement isolés et purifiés. 2) Extraction sélective des histones

L'extraction sélective des histones est réalisée à + 4°C en traitant la désoxyribonucléoprotéine par un solvant approprié.

La méthode de fractionnement des histones à laquelle JOHNS a attaché son nom, repose sur la solubilité particulière des histones riches en arginine en milieu éthanolique à 80 p.100 et sur l'extraction sélective par l'acide perchlorique à 5 p.100 des histones très riches en lysine (fraction F<sub>1</sub>) qui, parmi toutes les histones, sont les plus faiblement liées au DNA.

Dès 1960, JOHNS <u>et al</u> (50) avaient décrit une méthode de préparation des histones riches en arginine par extraction directe du thymus avec un mélange éthanol – HCI<u>N</u> – eau (70  $\pm$  25  $\pm$  5 ; v/v). En 1964, JOHNS (29) proposait un procédé de fractionnement des histones du thymus de Veau (méthode 2 de JOHNS) qui a été et demeure largement utilisé, non seulement pour la préparation des histones du thymus de Veau, mais aussi pour la préparation des histones d'autres tissus et d'autres espèces. Cette méthode de JOHNS, schématisée dans le tableau II aboutit à séparer les histones en quatre fractions  $\pm$  F<sub>1</sub>, F<sub>2b</sub>, F<sub>2a</sub> et F<sub>3</sub>. La composition en amino-acides de ces différentes fractions est présentée dans le tableau III. Enfin, en 1967, JOHNS (30) a décrit une méthode d'extraction sélective de la fraction F<sub>2a</sub> par le mélange éthanol – chlorhydrate de guanidine à 40 p.100 pH 7 (3  $\pm$  1 ; v/v). Les sous-fractions F<sub>2a 1</sub> et F<sub>2a2</sub> sont obtenues à partir de cet extrait par précipitation différentielle à l'acétone.

Nous avons préparé ainsi les fractions F<sub>2a1</sub> et F<sub>2a2</sub> des histones de thymus de Veau, de thymus de Porc et de tumeur de chloroleucémie du Rat.

3) Purification des histones

a) Obtention de la GRK-histone (\*) à partir de la fraction F2a1

Outre la GRK-histone qui en constitue le composant majeur, la fraction F<sub>2a1</sub> renferme de l'ALK-histone et des traces d'ARE-histone. La présence

(\*) Rappel des abréviations (voir tableau | page 7) :

GRK-histone : histone riche en glycine, arginine et lysine. ALK-histone : histone riche en alanine, leucine et lysine. ARE-histone : histone riche en alanine, arginine et acide glutamique.



∞ 10 <del>•</del>

### TABLEAU III

## COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DES FRACTIONS D'HISTONES OBTENUES PAR LA METHODE DE JOHNS

(en moles d'amino-acides pour 100 moles d'amino-acides) (29)(30)

Amino-acides	F ,	F <sub>2b</sub>	F2a2	<sup>F</sup> 2a 1	F <sub>3</sub>
ASP	2,5	5,0	6,6	5,2	4,2
THR	5,6	6,4	3,9	6,3	6,8
S ER	5,6	10,4	3,4	2,2	3,6
GLU	3,7	8,7	9,8	6,9	11,5
PRO	9,2	4,9	4,1	1,5	4,6
GLY	7,2	5,9	10,8	14,9	5,4
ALA	24,3	10,8	12,9	7,7	13,3
CYS/2	والمترين	-	traces	traces	1,0
VAL	5,4	7,5	6,3	8,2	4,4
MET	-	1,5	traces	1,0	1,1
ILE	1,5	5,1	3,9	5,7	5,3
LEU	4, 5	4,9	12,4	8,2	9,1
TYR	0,9	4,0	2,2	3,8	2,2
РНЕ	0,9	1,6	0,9	2,1	3,1
LYS	26,8	14,1	10,2	10,2	9,0
HIS	-	2,3	3,1	2,2	1,7
ARG	1,8	6,9	9,4	12,8	13,0
<b>€</b> -N-Méthyl Lys	-	-	-	1,2	1,0
Rapport LYS/ARG	14,88	2,01	1,08	0,89	0,76



d'ALK-histone dans la fraction  $F_{2a1}$  est vraisemblablement dûe à une précipitation incomplète de cette histone qui est le composant majeur de la fraction  $F_{2a2}$ .

La fraction F<sub>2a1</sub> est donc soumise à une chromatographie de gelfiltration sur colonne de Sephadex G-100 équilibrée et éluée avec HCl 0,01 <u>N</u>. La courbe d'élution obtenue en mesurant la densité optique de l'éluat à 230 nm est présentée dans la Figure 1 A.

La fraction majeure (pic 2) qui apparaît comme une bande homogène à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide à pH 4,5 (Figure 1 B), correspond à la GRK-histone. La fraction mineure (pic 1) correspond à l'ALK-histone.

## b) Obtention de l'ALK-histone à partir de la fraction F2a2

La fraction  $F_{2a2}$  dont l'ALK-histone est le composant majeur, contient également de la GRK-histone et de l'ARE-histone. La présence de GRK-histone dans la fraction  $F_{2a2}$  est probablement dûe à un phénomène d'entraînement lors de la précipitation de l'ALK-histone.

Bien que discrète, la présence de l'ARE-histone rend insuffisant un simple passage de la fraction F<sub>2a2</sub> sur colonne de Sephadex G-100 pour obtenir l'ALK-histone pure.

C'est pourquoi, la fraction F<sub>2a2</sub> est soumise à une chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Biorex-70 équilibrée en tampon phosphate 0,1 <u>M</u> de pH 6,8. Le diagramme de ce fractionnement est présenté dans la Figure 2.

Le pic 1, élué avec une concentration de chlorhydrate de guanidine de 10 p.100, correspond à l'ALK-histone. Le pic II, élué avec un tampon phosphate contenant 40 p.100 de chlorhydrate de guanidine, correspond à un mélange de GRK-histone et d'ARE-histone qui constitue environ 30 p.100 de la fraction F<sub>2a2</sub>.

L'ALK-histone obtenue après chromatographie d'échange d'ions renferme encore un contaminant mineur de taille moléculaire élevée. L'élimination de ce contaminant par chromatographie de gel-filtration sur colonne de Sephadex G-100 équilibrée et éluée avec HCI 0,01 N (Figure 3 A) mène à l'obtention de

### FIGURE 1

<u>Fig. 1 A</u> : Chromatographie de gel-filtration de la fraction F<sub>2a1</sub> sur colonne de Sephadex G-100. Elution HCI 0,01 N.

- Fig. 1 B : Electrophorèse en gel de polyacrylamide à pH 4,5 de la GRK-histone obtenue par chromatographie de gel-filtration de la fraction F<sub>2a 1</sub> sur colonne de Sephadex G-100. Migration : 1 heure
   Coloration : Amidoschwarz
   1 : F<sub>2a 1</sub> (20 µg)
  - 2 : ALK-histone (20 µg)
  - 3 : GRK-histone (20 µg)







l'ALK-histone hautement purifiée qui apparaît comme une bande homogène à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide à pH 4,5 (Figure 3 B).

#### B) CARACTERISATION DES HISTONES

### 1) Caractérisation des histones par leur composition en amino-acides

Les histones se distinguent des autres protéines par leur teneur élevée en amino-acides basiques (lysine et arginine). Elles sont dépourvues de tryptophane et renferment peu d'amino-acides aromatiques. A l'exception de l'AREhistone, elles ne contiennent pas de cystéine. Les dérivés &-N-méthylés de la lysine (mono- et di-) sont présents uniquement dans les histones riches en arginine (GRK-histone et ARE-histone).

Les histones se distinguent les unes des autres par les caractéristiques de leur composition en amino-acides (Tableau IV). Le rapport Lysine/Arginine est un critère précieux dont les valeurs sont comprises entre 0,72 pour les histones riches en arginine et 15,2 pour la KAP-histone très riche en lysine.

Les histones KAP, ALK et GRK ont un résidu de sérine N-acétylée à leur extrémité NH<sub>2</sub>-terminale.

#### 2) Caractérisation des histones par leur migration électrophorétique

La séparation électrophorétique des histones en gel d'amidon (47) ou en gel de polyacrylamide (23) (56) s'effectue à pH bas (pH 3, 1; pH 4,5; pH 2,9)et en milieu urée 4 <u>M</u> ou 6 <u>M</u>; dans ces conditions, l'agrégation des histones est évitée et leur identification est aisée.

La migration des histones, dans l'ordre croissant de leur mobilité relative, est : KAP-histone, ARE-histone, KAS-histone, ALK-histone et GRK-histone. L'ARE-histone migre sous forme de 3 fines bandes qui correspondent à des degrés différents d'acétylation de cette protéine (57) (58).

### TABLEAU IV

## COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DES CINQ HISTONES ISOLEES DU THYMUS DE VEAU

#### KAS KAP ALK GRK ARE fraction I AMINO-ACIDES (45)(52)(53) (51)(54)(55) ASP 4 8 6 5 5 THR 11 8 5 7 10 14 4 2 5 SER 13 GLU 7 10 15 12 6 PRO 20 6 5 Ĵ 6 GLY 7 17 7 13 14 ALA 18 56 13 7 17 CYS/2 2 0 9 9 VAL **] ]** 8 6 MET 0 2 1 2 7 ILEU 2 6 6 6 LEU 8 6 8 12 16 TYR ] 5 3 4 3 2 4 PHE 1 1 2 20 LYS 61 10 11 14 3 HIS 0 4 2 2 ARG 4 8 14 18 12 2 E-N-Méthyl Lys ---\_ l 212 129 102 135 Nb de résidus 125 31 27 33 Basiques 65 30 Acides 11 16 20 11 20 15,2 2,5 0,78 0,72 Rapport LYS/ARG 1,16 Basiques Rapport Acides 5,90 1,93 1,50 2,45 1,65 ALA Acétyl-SER PRO Acétyl-SER Acétyl-SER N-terminal LYS LYS GLY ALA C-terminal LYS 14.005 11.282 15.324 Poids moléculaire 21.000 13.774

#### (en nombre de résidus par molécule d'histone)

803

#### 3) Caractérisation des histones par leur solubilité

La KAP-histone est extraite sélectivement de la désoxyribonucléoprotéine, soit par l'acide perchlorique à 5 p.100 (28) ou l'acide trichloracétique à 5 p.100 (27), soit par NaCl 0,35 <u>M</u>. Extraites en bloc de la désoxyribonucléoprotéine par HCl 0,2 <u>N</u> ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2 <u>N</u>, les histones peuvent être extraites soit en groupe, soit isolément, suivant leur caractère de solubilité. Ainsi, la KAP-histone est la seule histone qui soit soluble dans l'acide perchlorique ou trichloracétique à 5 p.100 (27) (28) ou dans NaCl 0,35 <u>M</u> (31). L'ALK-histone, la GRK-histone et l'ARE-histone sont solubles dans le mélange éthanol - HCl 1,25 <u>N</u> (4 : 1; v/v). L'ALK-histone et la GRK-histone sont également solubles dans le mélange éthanol - chlorhydrate de guanidine à 40 p.100 pH 7 (3 : 1; v/v), tandis que l'ARE-histone est insoluble.

Ce caractère de solubilité dans l'éthanol chlorhydrique commun aux histones riches en arginine (GRK-histone et ARE-histone) et à l'ALK-histone nous incite à classer cette dernière parmi les histones riches en arginine, plutôt qu'à la considérer comme une histone riche en lysine.

### CHAPITRE III

### DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES HISTONES

- A) CHOIX DES METHODES.
- B) HYDROLYSES ENZYMATIQUES PAR LES ENDOPEPTIDASES DE L'HISTONE NATIVE OU MALEYLEE.
- C) ETUDE DES PEPTIDES.
- D) COUPURE AU BROMURE DE CYANOGENE (GRK-HISTONE UNIQUEMENT).
## A) CHOIX DES METHODES

La stratégie que nous avons adoptée pour la détermination de la structure primaire de la GRK-histone est fondée sur l'étude des peptides trypsiques de la protéine native à laquelle nous avons associé l'étude des peptides chymotrypsiques et l'étude de l'octadécapeptide COOH-terminal obtenu par coupure de la protéine avec le bromure de cyanogène, au niveau de son unique résidu de méthionine.

Le plan d'étude de la structure primaîre de l'ALK-histone est différent : en premier lieu, parce que l'absence de méthionine dans cette histone nous a împosé l'utilisation exclusive de méthodes enzymatiques pour la coupure de la chaîne peptidique ; en second lieu, parce que l'étude des peptides trypsiques et chymotrypsiques de la protéine s'est trouvée fortement limitée par la précipitation d'un abondant matériel insoluble qui apparaît au cours de l'hydrolyse de l'ALK-histone par la trypsine ou la chymotrypsine. La maléylation de la protéine avant l'hydrolyse trypsique ou chymotrypsique n'a pas résolu complètement ce problème lié à la présence de nombreux résidus d'amino-acides hydrophobes dans l'ALK-histone. Un troisième type d'hydrolyse s'imposait donc, pour lequel le choix de la thermolysine était nécessaire.

L'étude des peptides trypsiques des histones riches en arginine constitue une étape importante dans la détermination de la structure primaire dans ces protéines. Cette étude nous fournit en outre, des éléments de comparaison entre les histones homologues de différents tissus et de différentes espèces, ou entre les histones de type différent, isolées d'un même tissu. Ces études comparatives sont menées dans le cadre d'une méthodologie bien standardisée, fondée sur la chromatographie d'échange d'ions, dont nous exposerons les modalités dans le paragraphe B de ce chapitre.

# B) <u>HYDROLYSES ENZYMATIQUES PAR LES ENDOPEPTIDASES</u> (<u>TRYPSINE, CHYMOTRYPSINE ET THERMOLYSINE</u>) <u>DE</u> L'HISTONE NATIVE OU MALEYLEE

1) Maléylation de l'ALK-histone

a) Principe de la maléylation

Parmi les méthodes de blocage de la fonction &-aminée des résidus de lysine utilisées pour limiter la spécificité de la trypsine aux liaisons arginyl-X (\*), la maléylation décrite par BUTLER et al (59) constitue une technique précieuse.

L'anhydride maléique réagit spécifiquement en milieu alcalin et à 0°C avec les groupes aminés libres des protéines et des peptides. Les dérivés maléylés des hydroxy-amino-acides, de la tyrosine, de la cystéine et de l'histidine sont, si toutefois ils se forment, instables en milieu neutre ou alcalin. La spécificité de cette réaction est telle qu'un gros excès d'anhydride maléique peut être utilisé pour assurer une substitution complète des groupes aminés libres d'une protéine ou d'un peptide.

Le mécanisme de la réaction est le suivant :

 $\begin{array}{c} 0 \\ || \\ CH - C \\ || \\ CH - C \\ || \\ 0 \end{array} \qquad 0 + H_2N - R \xrightarrow{pH 9, 0} 0 C \qquad CH - C - O^- \\ || \\ 0^{\circ}C \qquad CH - C - NH - R \\ || \\ 0 \qquad 0 \end{array}$ 

Cette réaction est réversible et la démaléylation complète est obtenue en maintenant le milieu réactionnel à pH 3,5 et à 40°C pendant 40 heures.

(\*) X représente tous les amino-acides sauf la proline.

Le mécanisme catalytique possible de cette réaction est montré dans le schéma suivant :



La réaction implique une attaque intramoléculaire du groupe carboxylique non ionisé sur le groupe carbonyle de la liaison amide voisine. A pH acide, le groupe maléylé est ainsi éliminé sous forme anhydride et est ensuite hydrolysé en acide maléique.

# b) Avantages de la maléylation

Les avantages de cette méthode sont multiples : la maléylation est complète ; elle accroît la solubilité des protéines et des peptides en milieu alcalin, et ceci est particulièrement net dans le cas des histones. L'acétylation et la dinitrophénylation donnent par contre des dérivés insolubles ou difficilement solubles.

Par les modifications de charge électrique qu'elle introduit dans la protéine, la maléylation provoque un changement de la structure conformationnelle de la macromolécule, permettant ainsi une action plus efficace et plus complète des enzymes protéolytiques, tels que la trypsine et la chymotrypsine. Cet avantage se retrouve dans la succinylation et la citraconylation.

Enfin, la maléylation est totalement réversible. Ce caractère de réversibilité est partagé avec la trifluoroacétylation et la citraconylation, mais non avec la succinylation. Les conditions générales d'hydrolyse des histones natives ou maléylées, par la trypsine, la chymotrypsine ou la thermolysine, sont rassemblées dans le tableau V.

L'arrêt de ces différentes hydrolyses enzymatiques est réalisé par acidification de l'hydrolysat jusqu'à pH 3,5. Les hydrolysats d'histone native sont immédiatement lyophilisés après acidification, tandis que les hydrolysats d'histone maléylée sont démaléylés à pH 3,5 et à 40°C, pendant 40 heures, avant d'être soumis à la lyophilisation.

## 3) Fractionnement des hydrolysats

## a) Chromatographie d'échange d'ions

Les hydrolysats enzymatiques de la GRK-histone et de l'ALK-histone sont fractionnés sur une colonne de Chromobeads P (résine Technicon de type Dowex 50 X 2), avec des tampons volatils à base de pyridine utilisés en gradient continu de molarité et de pH. La concentration en pyridine croît de 0,1 <u>M</u> à 2 <u>M</u>, tandis que le pH croît de 2,9 à 5,0. Les peptides basiques encore fixés sur la colonne après le passage du gradient, sont élués avec du tampon pyridine 2 <u>M</u> - acide acétique de pH 5,0.

La détection des peptides s'effectue successivement par la réaction à la ninhydrine, la réaction de SAKAGUCHI (arginine) et la réaction de PAULY (histidine, tyrosine) sur des aliquotes prélevées automatiquement dans chaque fraction de l'éluat.

Cette méthode de fractionnement par chromatographie d'échange d'ions a été mise au point à partir d'expériences effectuées sur des colonnes d'Aminex A 4 ou A 5 (Biorad) avec un gradient discontinu de molarité et de pH (SAUTIERE <u>et al</u>) (60). Maintenant bien standardisée, elle constitue la base de nos études comparatives réalisées sur les hydrolysats trypsiques d'histones homologues (SAUTIERE et al) (40) (61). TABLEAU V

CONDITIONS DES HYDROLYSES ENZYMATIQUES DE LA GRK-HISTONE ET DE L'ALK-HISTONE

Γ			
Durée de l'hydrolyse	4 heures	2 heures	45 minutes 4 heures
Rapport Enzyme/ Substrat	1/50	1/50	1/100
Température	37 ° C	37 °C	40°C
L L	8, 0	8,0	8,0
ALK -hîstone	natîve maléylée	native maléylée	native
GRK-histone	native	native	I
Enzyme	TRYPSINE (traîtée par le TPCK)(¥)	CHYMO TRYPSINE	THERMOLYSINE

(★) TPCK : L-1-tosylamido~2-phényléthyl chlorométhyl kétone.

BUS



## b) Chromatographie de gel-filtration

La chromatographie de gel-filtration sur colonne de Sephadex G 25 F en milieu acide acétique 0,2  $\underline{N}$  a été utilisée pour le fractionnement des peptides chymotrypsiques de la GRK-histone de thymus de Veau (62). La détection des peptides s'effectue par lecture des densités optiques à 230 nm et à 278 nm de chaque fraction de l'éluat.

## c) Cartes peptidiques

Les fractions correspondant à chaque pic du diagramme d'élution sont rassemblées, lyophilisées à l'aide d'un "Rotary Evapo Mix" (Buchler) et dissoutes dans 2 ml d'acide acétique à 10 p. 100. Chaque fraction peptidique ainsi obtenue est soumise à un contrôle d'homogénéité par chromatographie et électrophorèse sur papier Whatman 3 MM, en présence de marqueurs externes (rouge de phénol pour la chromatographie, mélange d'amino-acides : acide aspartique, tyrosine et arginine, pour l'électrophorèse). Ces amino-acides témoins permettent une identification plus aisée des peptides de caractère acide, neutre ou basique. Les témoins tyrosine et arginine permettent en outre le contrôle des colorations spécifiques utilisées pour identifier les peptides qui renferment ces amino-acides.

Les peptides sont localisés sur l'électrochromatogramme avec le réactif ninhydrine – cadmium. Les peptides non révélés ou faiblement révélés par la ninhydrine sont mis en évidence par la réaction de RYDON et SMITH. Pour les peptides renfermant de l'arginine, de l'histidine, de la méthionine ou de la tyrosine, les colorations spécifiques suivantes sont utilisées : réaction à la phénanthrène-quinone (arginine), réaction de PAULY (histidine, tyrosine), réaction à l'iodoplatinate (méthionine) et réaction à l'antroso-B-naphtol (tyrosine).

Pour l'identification sur papier des peptides contenant de l'arginine, nous avons préféré la réaction à la phénanthrène-quinone décrite par YAMADA et ITANO (63), à la réaction de SAKAGUCHI, d'un usage très répandu. Les avantages de la réaction à la phénanthrène-quinone sont les suivants : simplicité d'exécution ; grande sensibilité – les peptides contenant de l'arginine présentent une fluorescence bleue intense sous un rayonnement U.V. de 366 nm – ; et surtout grande stabilité - la fluorescence ainsi obtenue persiste plusieurs mois, alors que la coloration rouge de la réaction de SAKAGUCHI est très fugace -.

## 4) Purification des peptides

La purification éventuelle des peptides est réalisée par électrophorèse ou chromatographie ou par les deux méthodes associées sur papier lavé à l'acide acétique.

## C) ETUDE DES PEPTIDES

#### 1) Composition en amino-acides

La composition en amino-acides des peptides est établie avec un Analyseur d'amino-acides sur des hydrolysats de 24 heures et éventuellement de 72 heures, réalisés à 110°C en tubes scellés sous vide en milieu HCI 5,7 <u>N</u> additionné d'une goutte d'une solution de phénol à 1 p.100 pour empêcher une dégradation excessive de la tyrosine.

Pour la mise en évidence des dérivés &-N-méthylés de la lysine, les amino-acides basiques sont séparés sur une colonne d'Aminex A 4 (Biorad) de 50 x 0,635 cm, équilibrée et éluée à 60°C avec un tampon citrate de sodium 0,35 N pH 5,15.

Alors que dans les conditions normales d'hydrolyse totale acide, le ou les groupes méthyle fixés sur la fonction **E**-aminée de la lysine sont stables, le groupe acétyle fixé sur cette fonction est labile.

Il importe donc, lorsqu'un peptide montre une composition en aminoacides et un comportement en chromatographie d'échange d'ions sur colonne et en électrochromatographie sur papier qui laissent supposer la présence du dérivé  $\varepsilon$ -N-acétylé de la lysine, de soumettre un tel peptide à une hydrolyse totale enzymatique par l'aminopeptidase M à pH 8,0 et à 40°C pendant 24 heures ou 48 heures (De LANGE <u>et al</u>) (54). L'hydrolysat est analysé avec l'Analyseur d'amino-acides. La  $\varepsilon$ -N-acétyl-lysine, de caractère acide, est éluée entre la proline et la glycine. Pour la détermination de l'asparagine et de la glutamine, les peptides sont hydrolysés par l'aminopeptidase M dans les conditions décrites plus haut pour l'identification de la &-N-acétyl-lysine. Les amino-acides présents dans l'hydrolysat sont séparés en électrochromatographie sur papier.

# 2) Détermination de l'extrémité NH2-terminale par dansylation

La dansylation des peptides est effectuée suivant le protocole recommandé par GRAY et HARTLEY (64). Les dansyl-peptides sont ensuite hydrolysés en milieu HCI 5,7 N, pendant 18 heures à 105°C.

Les dansylamino-acides sont identifiés sur couche mince de gel de silice, soit en chromatographie monodimensionnelle selon la technique de STEHELIN et DURANTON (65), avec un seul système solvant, soit en chromatographie bidimensionnelle avec les systèmes solvants l et II préconisés par GROS et LABOUESSE (66).

## 3) Détermination de l'extrémité COOH-terminale

La détermination de l'extrémité COOH-terminale des peptides isolés des différents hydrolysats endopeptidasiques de GRK-histone ou d'ALK-histone a été effectuée soit par hydrolyse avec les carboxypeptidases A ou B, soit par hydrazinolyse. Le ou les amino-acides libérés sont identifiés avec l'Analyseur d'amino-acides ou en électrochromatographie sur papier.

L'hydrazinolyse a parfois été utilisée sur un peptide déjà soumis à l'action des carboxypeptidases A et B, lorsque l'action de ces enzymes se trouve limitée par la proximité d'un résidu de proline ou par l'obtention d'un dipeptide.

Cette méthode a également été appliquée pour identifier le radical acétyle fixé sur la fonction®-aminée terminale de la GRK-histone et de l'ALKhistone.

L'acétylhydrazide est séparée en chromatographie sur papier dans le système solvant butanol-1 – acide acétique – eau (5 : 1 : 4 ; v/v), selon la technique d'ANDREAE (67) et révélée avec le réactif d'ANDREAE (67) préparé extemporanément (solution aqueuse de chlorure ferrique à 1 p.100 – solution aqueuse de ferricyanure de potassium à 1 p.100 ; 1 : 1 ; v/v). La dégradation récurrente des peptides par la méthode de Edman est réalisée suivant le schéma :



Après chaque cycle de dégradation, l'amino-acide libéré peut être identifié directement sous forme de son dérivé PTH- ou indirectement en déterminant la composition en amino-acides du peptide résiduel (méthode soustractive) (HIRS, MOORE et STEIN) (69).

Associée à la dégradation de Edman selon le protocole décrit par GRAY

et HARTLEY (70), la dansylation permet l'identification de l'amino-acide en position NH<sub>2</sub>-terminale, dans le peptide résiduel qui apparaît après chaque cycle de dégradation : la séquence de la plupart des peptides que nous avons étudiés a été déterminée avec cette méthode.

La méthode soustractive a été employée chaque fois par exemple que la présence dans un même peptide de résidus d'isoleucine, de leucine et de valine rendait difficile leur identification sous forme de dérivés dansylés, ces dérivés étant généralement mal séparés.

L'identification directe du PTH-amino-acide par chromatographie sur couche mince de gel de silice (JEPPSSON et SJÖQUIST) (71) a été réservée à l'identification du PTH-acide aspartique et de la PTH-asparagine, quand acide aspartique et asparagine étaient présents dans le même peptide.

# D) <u>COUPURE AU BROMURE DE CYANOGENE</u> (GRK-HISTONE UNIQUEMENT)

# 1) Modalités de la coupure spécifique et fractionnement des produits de clivage

La GRK-histone ne renferme qu'un résidu de méthionine au niveau duquel l'action du bromure de cyanogène s'exerce sélectivement suivant le schéma suivant.



Peptidylhomosérine lactone

Thiocyanate de méthyle

La coupure de la GRK-histone avec le bromure de cyanogène est réalisée selon la méthode de GROSS et WITKOP (72) en milieu acide formique à 70 p.100. Les produits de clivage sont ensuite fractionnés par chromatographie de gel-filtration sur une colonne de Sephadex G-100 (SAUTIERE <u>et al</u>) (60). Un contrôle électrophorétique en gel de polyacrylamide selon la méthode de REISFELD (23) est effectué en fin de réaction et sur les fractions obtenues en chromatographie de gel-filtration.

## 2) Etude de l'octadécapeptide COOH-terminal de la GRK-histone

Les différentes étapes de la détermination de la séquence en aminoacides de ce peptide peuvent se résumer ainsi :

## a) Composition en amino-acides

- Hydrolyse totale acide (HC15,7 N) pendant 24 heures et 72 heures.

- Hydrolyse totale enzymatique (trypsine et aminopeptidase M) pendant 24 heures.

# b) Détermination de l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale

par la méthode de dinitrophénylation en milieu triméthylamine à 4 p.100, selon la méthode décrite par MATSUBARA et SMITH (73). Le DNP-peptide est hydrolysé en tube scellé sous vide par HCI 5,7 N à 105°C pendant 16 heures. Le DNP-amino-acide ainsi libéré est identifié en chromatographie bidimensionnelle sur papier Whatman 1, selon la méthode recommandée par LEVY (74), avec le système solvant de BISERTE et OSTEUX (75) pour la première dimension (chromatographie ascendante) et le tampon phosphate Na 1,5 <u>M</u> ou 2,5 <u>M</u> pour la seconde dimension.

# c) Hydrolyses trypsique et chymotrypsique : fractionnement et étude des peptides

Les méthodes utilisées sont celles qui ont été présentées dans les paragraphes B et C de ce chapître. Nous voudrions toutefois souligner dès maintenant que l'action brève de la TPCK-trypsine, réalisée par une hydrolyse de 30 minutes, permet d'établir sans ambiguïté la séquence complète du peptide C-terminal de la GRK-histone, alors qu'une hydrolyse de 4 heures induit un élément d'incertitude qui nécessite, pour être éliminé, le recours à un autre type d'hydrolyse enzymatique, en l'occurence à l'hydrolyse chymotrypsique. Nous reviendrons sur ce point d'une façon plus détaillée, dans la présentation et la discussion de nos résultats.

## CHAPITRE IV

#### STRUCTURE PRIMAIRE DE LA GRK-HISTONE

- A) COMPOSITION EN AMINO-ACIDES.
- B) DETERMINATION DE L'EXTREMITE NH2-TERMINALE.
- C) DETERMINATION DE L'EXTREMITE COOH-TERMINALE.
- D) COUPURE AU BROMURE DE CYANOGENE : ETUDE DE L'OCTADECAPEPTIDE COOH-TERMINAL.
- E) ETUDE DES PEPTIDES TRYPSIQUES.
- F) ETUDE DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES.
- G) SEQUENCE EN AMINO-ACIDES.

Les résultats présentés dans ce chapitre ont été acquis sur la GRKhistone isolée de trois tissus différents : thymus de Veau, thymus de Porc et tumeur de chloroleucémie du Rat.

Toutefois, comme ces trois histones homologues ont une structure primaire identique, nous utiliserons souvent pour la concision et la clarté de l'exposé, le terme GRK-histone, sans préciser l'origine de la protéine.

#### A) COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DE LA GRK-HISTONE

La composition en amino-acides de la GRK-histone, établie sur des hydrolysats de 24 heures et de 72 heures, est présentée dans le tableau VI.

La GRK-histone est caractérisée par un taux élevé d'arginine et de glycine et la présence d'un résidu de lysine méthylée sur son groupe &-aminé. Elle renferme un résidu de méthionine et peut donc être soumise à l'action du bromure de cyanogène contrairement à l'ALK-histone.

La GRK-histone se caractérise aussi par la présence d'un seul résidu de proline et de 2 résidus de sérine : elle se différencie en cela, des autres histones où les taux de proline et de sérine sont nettement plus élevés. (tableau IV p.17)

La GRK-histone ne contient pas de cystéine et son rapport tyrosine/ phénylalanine est 2 : elle se différencie sur ces points avec l'ARE-histone qui contient 2 résidus de cystéine et dont le rapport tyrosine/phénylalanine est 0,75.

# B) <u>DETERMINATION DE L'EXTREMITE NH2</u>-<u>TERMINALE DE LA</u> GRK-HISTONE

Un résidu de sérine acétylée sur son groupe «-aminé occupe la position NH2-terminale dans la GRK-histone. (\*)

L'acétylation des groupes  $NH_2$ -terminaux dans les histones du thymus de Veau a été suggérée dès 1961 par PHILLIPS (76) et mise en évidence par le même auteur (77) en 1963. Cinq ans plus tard, PHILLIPS (78) isola de l'hydrolysat trypsique des fractions  $F_{2a1}$  et  $F_{2a2''}$  le même peptide – N-acétyl-Ser-Gly-Arg – qu'il identifia à la séquence  $NH_2$ -terminale de ces deux fractions. Nous avons contrôlé par la méthode de dinitrophénylation décrite par PHILLIPS (19) et par la méthode au cyanate de STARK et SMYTH (79) l'absence d'une fonction

(★) La N-acétyl-sérine est également en position NH<sub>2</sub>-terminale dans l'ALKhistone et la KAP-histone de thymus de Veau.

## TABLEAU VI

# COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DE LA GRK-HISTONE DE THYMUS DE PORC

Amino-acides	Valeurs moyennes obtenues à partir des hydrolysats de 24 et 72 heures - exprimées	Nombre de résidus		
Ainno-derdes	en moles pour 100 moles d'amino-acides	calculés (乗)	assumés	
Acide aspartique	5,17	5,23	5	
Thréonine	6,67	6,75	7	
Sérine	2 , 60	2,64	2 (**)	
Acide glutamique	6,71	6,79	6 (≋⊛)	
Proline	1,22	1 , 24	1	
Glycine	16,77	16,97	17	
Alanine	7,10	7,18	7	
1/2 Cystine	0	0	0	
Valine	8, <b>3</b> 1	8,41	9 (**)	
Méthionine	0,76	0,76	1	
lsoleucine	5,44	5,50	6 (**)	
Leucine	7,79	7,88	8	
Tyrosine	3,82	3,87	4	
Phénylalanine	1,92	1,94	2	
Lysine	9,66	9,77	10	
€-N-méthyl-lysine	0,97	1,00	1	
Histidine	1,80	1,82	2	
Arginine	13,17	13,33	14 (★★)	
Total	99,88		102	

Rapport Lysine/Arginine : 0,78

Rapport Amino-acides basiques/Amino-acides acides : 2,45

Poids moléculaire calculé : 11.282 Amino-acide NH<sub>2</sub>-terminal bloqué : N-acétyl-sérine Amino-acide COOH-terminal : Glycine

(\*) Le nombre de résidus d'amino-acides a été calculé sur la base de 2 résidus de phénylalanine.

(\*\*) Valeurs retenues à partir de la séquence.

∝-aminée libre à l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale de la GRK-histone. Comme De LANGE <u>et al</u> (54), nous avons retrouvé les résultats de PHILLIPS en identifiant le peptide N-acétyl-Ser=Gly-Arg dans l'hydrolysat trypsique de la GRKhistone isolée du thymus de Veau (80), du thymus de Porc (61) et de la tumeur de chloroleucémie du Rat (40).

# C) DETERMINATION DE L'EXTREMITE COOH-TERMINALE DE LA GRK-HISTONE

La séquence COOH-terminale (-Gly-Gly) de la GRK-histone a été établie par une étude cinétique de l'hydrolyse de la protéine par la carboxypeptidase A (60). Une hydrolyse de 40 minutes libère 2 moles de glycine par mole de protéine, ainsi que des traces de thréonine, leucine, tyrosine et phénylalanine.

# D) COUPURE DE LA GRK-HISTONE PAR LE BROMURE DE CYANOGENE : ETUDE DE L'OCTADECAPEPTIDE COOH-TERMINAL CN-2

1) Isolement et composition en amino-acides du peptide CN-2

Le bromure de cyanogène coupe la GRK-histone au niveau de son unique résidu de méthionine. Les 2 fragments ainsi obtenus sont séparés par chromatographie de gel-filtration sur Sephadex G-100, en milieu HCI 0,01 <u>M</u> (Figure 4 A).

Ainsi qu'en témoigne l'électrophorèse en gel de polyacrylamide (Figure 4 B), le pic 1 correspond au fragment NH<sub>2</sub>-terminal CN-1 contaminé par la GRK-histone non coupée par le bromure de cyanogène : la bande la plus rapide correspond au fragment CN-1, la bande la plus lente correspond à la GRK-histone.

Le fragment COOH-terminal (peptide CN-2) est élué dans le pic 2. Homogène en électrophorèse sur papier à pH 3,6, le peptide CN-2 a un carac-



tère légèrement basique : son  $R_{F}$  par rapport à l'arginine est 0,50.

La composition en amino-acides du peptide CN-2, établie sur des hydrolysats de 24 heures et de 72 heures est présentée dans le tableau VII.

Le taux de clivage de la GRK-histone par le bromure de cyanogène, calculé à partir de l'analyse des amino-acides, est de 70 p.100.

Le peptide CN-2 ne contient pas d'homosérine et correspond, par conséquent, à la partie COOH-terminale de la GRK-histone.

Le peptide CN-2 contient 2 des 4 résidus de tyrosine et 1 des 2 résidus de phénylalanine présents dans la GRK-histone.

La comparaison des valeurs de 24 heures et de 72 heures pour la valine fait ressortir la présence d'une liaison Val-Val dans le peptide CN-2.

L'acide aspartique et la glutamine ont été identifiés dans un hydrolysat enzymatique total du peptide CN-2 obtenu par action conjuguée de la trypsine et de l'aminopeptidase M à 37°C pendant 48 heures.

L'acide aspartique a été identifié en position NH<sub>2</sub>-terminale par la méthode de dinitrophénylation.

#### 2) Etude des peptides trypsiques du peptide CN-2

L'hydrolyse trypsique du peptide CN-2 à pH 8,0 et 37°C, pendant 30 minutes, libère 4 peptides qui sont ensuite séparés par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Chromobeads P (Figure 5).

Les peptides trypsiques du peptide CN-2 sont libellés CN-2T et numérotés de 1 à 3, à partir de l'extrémité COOH-terminale du peptide CN-2; leur composition et leur séquence en amino-acides sont présentées respectivement dans les tableaux VIII et IX.

La détermination des séquences a été généralement effectuée avec la technique de dégradation de Edman associée à la méthode de dansylation.

La séquence NH<sub>2</sub>-terminale Asp-Val-Val du peptide CN-2-T-3 a toutefois été déterminée avec trois cycles de dégradation de Edman utilisée en méthode soustractive.

# TABLEAU VII

# COMPOSITION EN AMINO-ACIDES

# DU PEPTIDE COOH-TERMINAL CN-2 DE LA GRK-HISTONE

(exprimée en rapports molaires par rapport à la lysine)

Amino-acides	Valeurs moyennes	Nombre de résidus
Acide aspartique	1,0	1
Thréonine	1,0	1
Homosérine	0	0
Acide glutamique	1,1	1
Glycine	3,7	4
Alanine	1,0	1
Valine	<u>0,9</u> (24h). <u>1,7</u> (72h)	2
Leucine	1,9	2
Tyrosine	1,8	2
Phénylalanine	0,9	1
Lysine	1,0	1
Arginine	1,9	2
Total		18

DIAGRAMME D'ELUTION DES PEPTIDES TRYPSIQUES DU PEPTIDE CN-2 DE LA GRK-HISTONE FRACTIONNES SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P



## TABLEAU VIII

# COMPOSITIONS EN AMINO-ACIDES

# DES PEPTIDES TRYPSIQUES OBTENUS A PARTIR DU PEPTIDE CN-2

Amino-acides	CN-2-T-1	CN-2-T-2	CN-2-T-3	CN-2-T-3a
Acide aspartique			1,0(1)	1,0(1)
Thréonine	1,2(1)			
Acide glutamique		0,8(1)		
Glycine	3,0(3)	1,1(1)		
Alanine			1,0(1)	1,1
Valine			1,7 (2)	1,6(2)
Leucine	1,2(1)		0,9(1)	1,2(1)
Tyrosine	1,1(1)		1,0(1)	0,7 (1)
Phénylalanine	1,0(1)			
Lysine			1,0(1)	1,0(1)
Arginine		1,0(1)	1,0(1)	

(exprimées en rapports molaires)(\*)

(\*) Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de résidus assumés.

#### TABLEAU IX

SEQUENCES DES PEPTIDES TRYPSIQUES DU PEPTIDE CN-2 CN-2-T-1 Thr - Leu - Tyr - Gly - Phe - Gly - Gly CN-2-T-2 (\*) Glp - Gly - Arg CN-2-T-3 Asp - Val - Val - Tyr - Ala - Leu - Lys - Arg CN-2-T-3a Asp (Val , Val , Tyr , Ala , Leu) Lys

Les méthodes utilisées pour la détermination de la séquence des peptides sont indiquées de la façon suivante :

Dansylation ---- placé au-dessus du résidu d'amino-acide.

Dégradation de Edman --->

Hydrolyse par les carboxypeptidases A et B

Hydrazinolyse ---- placé au-dessous du résidu d'amino-acide.

,

(\*) Glp : acide pyroglutamique.

Ce peptide dérive du peptide Gln - Gly - Arg par cyclisation de la glutamine en acide pyroglutamique.

Asp - Val - Val - Tyr - Ala - Leu - Lys - Arg

Composition	۱ " 0	1,7	ĩ <sub>//</sub> 0	1 " 0	0,9	١,0	1,0
Cycle 1	<b>0</b> <sub>@</sub> <b>7</b>	6 ا	0, 8	1,3	0,9		1,0
Cycle 2	0 / 5	1,0	0, 8	1,3	0,9		1 " 0
Cycle 3	0,2	<u>0,3</u>	0, 8	١, ٥	1 / 0		1 / 0

L'obtention du peptide CN-2-T-3 avec le peptide CN-2-T-3a et l'arginine libre (CN-2-T-3b) fait apparaître une séquence Lys-Arg à l'extrémité COOH-terminale du peptide CN-2-T-3.

Dans le peptide CN-2-T-3a, la position COOH-terminale de la lysine a été déduite de la spécificité de la trypsine.

Dans le peptide CN-2-T-2, la glutamine en position NH<sub>2</sub>-terminale, s'est cyclisée en acide pyroglutamique. Une élution précoce de la colonne d'échangeur d'ions et une migration anodique en électrophorèse sur papier à pH 3, 6 soulignent le caractère acide du peptide ainsi obtenu.

Ce peptide isolé pur de la fraction 1, ne donne pas de réaction avec la ninhydrine. Il est toutefois aisément localisé par le réactif de Sakaguchi ou le réactif à la phénanthrène-quinone. Sa séquence a été déterminée après une hydrolyse par la carboxypeptidase B à 40°C, pendant 2 heures, suivie d'une hydrazinolyse et identification des amino-acides ainsi libérés en électrochromatographie sur papier.

3) Alignement des peptides trypsiques du peptide CN-2

La séquence du peptide CN-2 est présentée dans le tableau X.

Le peptide CN-2-T-3 possède à son extrémité NH<sub>2</sub>-terminale, le seul résidu d'acide aspartique que renferme le peptide CN-2 et qui a été identifié à l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale du peptide CN-2, par la méthode de dinitrophénylation.

Le peptide CN-2-T-3 constitue donc la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide CN-2.

- 42 -

TABLEAU X







La position du peptide CN-2-T-1 à l'extrémité COOH-terminale du peptide CN-2 se déduit de la spécificité de la trypsine : le peptide CN-2-T-1 ne contient pas de lysine ou d'arginine ; elle se confirme par la présence de la séquence Gly-Gly à son extrémité COOH-terminale : cette séquence correspond en effet à la séquence COOH-terminale de la GRK-histone établie d'après les données de l'hydrolyse de la protéine par la carboxypeptidase A.

L'ordre CN-2-T-3 - CN-2-T-2 - CN-2-T-1 dans la séquence du peptide CN-2 découle logiquement de l'ensemble de ces résultats.

#### E) ETUDE DES PEPTIDES TRYPSIQUES

Le diagramme d'élution des peptides trypsiques de la GRK-histone fractionnés sur colonne de Chromobeads P, est présenté dans la figure 6 et montre la séparation des peptides en 15 fractions.

Les fractions indiquées par des traits pleins sont numérotées suivant leur ordre d'élution de la colonne. Les peptides trypsiques désignés par Tsont numérotés suivant leur position dans la séquence de la protéine (Tableau XV page 69).

La composition et la séquence en amino-acides de chaque peptide sont respectivement présentées dans les tableaux XI et XII.

#### Peptide T-1 (résidus 1 à 3) :

N-acétyl-Ser-Gly-Arg

Le peptide T-1 est obtenu pur dans la fraction 1. Le blocage du groupe «-aminé terminal par un radical acétyle confère à ce peptide un caractère acide marqué qui se manifeste par une élution précoce de la colonne d'échangeur d'ions et par une migration anodique en électrophorèse sur papier à pH 3,6.

Le peptide T-1 ne réagit pas avec la ninhydrine, mais peut être localisé par la réaction spécifique du résidu d'arginine avec le réactif de Sakaguchi ou le réactif à la phénanthrène-quinone.



Ā	
Ч	
₹	

# COMPOSITIONS EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES TRYPSIQUES DE LA GRK-HISTONE DE THYMUS DE PORC $\overline{\times}$

(en rapports molaires par rapport à la lysine ou à l'arginine) (≉)

T-9 T-10	2,1 (2)	1,0 (1) 0,9 (1)	0 8 (1)	1 ° 0 (1)	1, 0 (1) 0, 9 (1)
8-1	2,0(2) 0,9(1) 1,0(1) 1,2(1) 1,0(1)	0,9 (1)	2 <sup><i>v</i></sup> 9 (3)	1,0 (1)	0,7 (1)
T7		0, 8 (1)	0,9 (1)	0,8 (1)	1,0 (1)
T-6				1,0 (1)	1,0 (1)
T-5	2,1 (2)	1 % 2 (1)		1,0 (1)	1,0(1)
T-4	2,0 (2)		0, 8 (1)	1 ° 0 (1)	
T-3	1,8 (2)			(1) 0 '1	
T-2	1,0 (1)			1 ° 0 (1)	c
[-]	1,2 (1) 1,1 (1)				1,0 (1)
Amino-acides	Acide aspartique Thréonine Sérine Acide glutamique Proline Glycine	Valîne Méthîonîne	Isoleucine Leucine Tyrosine	Phénylalani'ne Lysine &=N–méthyllysine Histidine	Arginine

•

TABLEAU XI (suite)

COMPOSITIONS EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES TRYPSIQUES DE LA GRK-HISTONE DE THYMUS DE PORC

*	
l'arginine)	
ά	
лo	
ı İysine	
-	
÷	
par rappor	
es	ſ
ai	
0 E	
_ts_	-
rappoi	
(en	+

								( ma)		
Amino-acides	T-11	T-12	T-13 ( <del>**</del> )	T-14	T-15	T-16 ( <del>***</del> )	T-17	T-18	Nb total de résidus	GRK - histone
Acide aspartique			1 , 3 (1)	1,1 (1)		1, 1 (1)				v
Thréonine	0,9 (1)			2,1 (2)		2 °0 (2)		1 0 (1)	) [	, r
Sérine	0,9 (1)					·			, c	ر ر
Acide glutamique	2,1 (2)		1,3 (1)	1,1 (I)			0,9 (1)		v v	ч ч
Proline					-				) <u>-</u>	) <u>-</u>
Glycine	1,0(1)	1,0(1)		<del></del>			1,0(1)	2 ,9 (3)	- 1	- 11
Alanîne				2,0 (2)		2,3 (2)	•		. ~	. ~
Valine		1,1(1)	2,0 (2)	0,9 (1)		2,7 (3)			、 O	0
Méthionine			· <u>· · · · · · · · · · · · · · · · · · </u>			0,9 (1)			•	
lsoleucine	1,9 (2)		0,9 (1)			·		<del></del>	- ~	- ~
Leucine	1,0(1)	1°1 (1)	(1) 1 '1	af nie weniko dage		0,9 (1)		1_0 (1)	) α	ο α
Tyrosine	0,8 (1)			0,9 (1)		0,7 (1)			) 4	> ¬
Phénylalanine			j <sup>°</sup> ľ (1)						- ~	۰ ۱
Lysine		1,0 (1)	- · · · · ·	1,0 (1)	0, 9 (1)	1,0(1)				- 01
E-N-méthyllysine							<u></u>		)	2 -
Hîstîdîne				0,9 (1)					- ~	- c
Arginîne	1,0 (1)		1,0(1)		1 , 0 (1)		1 , 0 (1)		<b>1</b> ;	7 P
Nombre de résidus	6	4	ω	10	2	13	° N	7	66	02
(*) Les chiffres ent	ra naranth	àcae india								

BILE

<sup>(★★)</sup> Les valeurs de la valine et de l'isoleucine sont obtenues à partir d'un hydrolysat de 72 h du peptide T=13。 (★★★) La valeur de la valine est obtenue à partir d'un hydrolysat de 72 h du peptide T=16。 (★★★★) Valeurs exprimées en rapports molaires par rapport à la leucine.

### TABLEAU XII

# SEQUENCES EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES TRYPSIQUES DE LA GRK-HISTONE DE THYMUS DE PORC (\*)

(\*) Certains peptides trypsiques ont été soumis à une hydrolyse par la chymotrypsine ou la thermolysine, indiquée par les lettres Ch- ou Th-.



La signification des signes placés au-dessus ou en-dessous des résidus d'amino-acides est présentée dans le tableau IX page 41 .

Dans nos premiers travaux réalisés sur les peptides trypsiques de la GRK-histone de thymus de Veau (80), le peptide T-1 était contaminé par le peptide Glp-Gly-Arg (\*) dérivé du peptide T-17 : Gln-Gly-Arg, par cyclisation du résidu de glutamine en acide pyroglutamique. Le système gradient a été modifié pour étaler la zone d'élution des peptides acides et des peptides neutres : nous avons ainsi obtenu une bonne séparation des peptides N-acétyl-Ser-Gly-Arg et Glp-Gly-Arg, qui sont respectivement élués de la colonne dans les fractions 1 et 2.

La séquence du peptide T-1 a été établie après une hydrolyse par la carboxypeptidase B à 40°C pendant 2 heures, suivie d'une hydrazinolyse : les amino-acides ainsi libérés ont été identifiés en électrochromatographie sur papier.

L'acéthydrazide obtenue par action de l'hydrazine sur le groupe acétyle fixé sur la fonction «-aminée terminale a été identifiée selon la méthode d'ANDREAE (67).

La présence du groupe acétyle a par ailleurs été confirmée par étude du spectre de RMN. Le spectre de RMN a été effectué par COZZONE et MARCHIS-MOUREN (81) à qui nous avions adressé un échantillon du peptide T-1 (Figure 7).

## Peptide T-2 (résidus 4 et 5) :

Gly - Lys

Le peptide T-2 est localisé dans la fraction 7 avec l'arginine libre et les peptides T-5 et T-14. Il est obtenu pur par électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6, suivie d'une chromatographie préparative sur papier.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS-Gly.

(\*) Glp : acide pyroglutamique.

- 49 -





FIGURE 7

## Peptide T-3 (résidus 6 à 8) :

Gly-Gly-Lys

Le peptide T-3 est obtenu pur dans la fraction 12.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS-Gly

La séquence de ce peptide est évidente d'après la spécificité de la trypsine.

Peptide T-4 (résidus 9 à 12) : Gly-Leu-Gly-Lys

Le peptide T-4 est obtenu pur dans la fraction 8.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS-Gly

Dégradation de Edman : deux cycles de dégradation de Edman en couplage avec la méthode de dansylation ont permis d'établir la séquence du peptide T-4.

Peptide T-5 (résidus 13 à 17) : Gly-Gly-Ala-Lys(Ac)-Arg (\*)

<u>Peptide T-5a (résidus 13 à 16)</u> : Gly-Gly-Ala-Lys

Le peptide T-5 est localisé dans la fraction 7, avec l'arginine libre et les peptides T-2 et T-14 dont il est séparé en électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6.

La présence d'un résidu de lysine acétylée sur son groupe ɛ-aminé, a été établie en effectuant une composition en amino-acides après hydrolyse totale du peptide T-5 par l'aminopeptidase M pendant 24 heures à 40°C et à pH 8,0.

<sup>(\*)</sup> Lys(Ac) : e-N-acétyl-lysine.

Le groupe acétyle est labile dans les conditions de l'hydrolyse totale acide. Nous avons été amenés à le rechercher à cause du caractère neutre du peptide T-5 en chromatographie d'échange d'ions et en électrophorèse à pH 3,6, par rapport au peptide T-10 : Gly-Gly-Val-Lys-Arg, de caractère basique, dont la structure présente une analogie évidente avec celle du peptide T-5.

Dans l'ordre d'élution des amino-acides, la «-N-acétyl-lysine se place entre la proline et la glycine.

La présence de E-N-acétyl-lysine dans la GRK-histone de thymus de Veau a été démontrée en 1968 par GERSHEY, VIDALI et ALLFREY (82), au terme d'une expérimentation réalisée avec de l'acétate 1-<sup>14</sup>C, et confirmée en 1969 par De LANGE et al (54).

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS-Gly

Dégradation de Edman : Deux cycles de dégradation de Edman en couplage avec la méthode de dansylation ont permis d'établir la séquence du peptide T-5.

Le <u>peptide T-5a</u> est localisé dans la fraction 6 avec les peptides T-8 et T-18 dont il est séparé en chromatographie préparative sur papier.

> Composition: Gly, Ala, Lys 1,8 1,0 1,0

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS-Gly

Dégradation de Edman : deux cycles de dégradation de Edman en couplage avec la méthode de dansylation ont permis d'établir la séquence du peptide T-5a.

Le peptide T-5a résulte de la coupure de la liaison Lys-Arg par la lo 17 trypsine ; l'hydrolyse de cette liaison est subordonnée à l'existence d'une fonction **ɛ**-aminée libre dans le résidu de lysine en position 16. L'analyse des amino-acides effectuée après l'hydrolyse totale du peptide T-5a par l'aminopeptidase M à pH 8,0 et 40°C pendant 24 heures, a confirmé la présence d'un résidu de lysine non acétylée dans ce peptide.

Le taux d'acétylation de la GRK-histone de thymus de Porc au niveau du résidu de lysine en position 16 est de 50 p.100. Un taux d'acétylation identique a été trouvé par De LANGE <u>et al</u> (54) dans la GRK-histone de thymus de Veau, au niveau de ce même résidu, tandis qu'il est de l'ordre de 40 p.100 dans la GRK-histone de chloroleucémie du Rat (40).

#### Peptide T-6 (résidus 18 et 19) :

His-Arg

Le peptide T-6 est obtenu pur dans la fraction 16.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS-His

Peptide T-7 (résidus 20 à 23) : Lys(Me)-Val-Leu-Arg (☆)

Le peptide T-7 est obtenu pur dans la fraction 14.

La présence d'un dérivé €-N-méthylé de la lysine dans les histones riches en arginine a été établie par MURRAY (83) en 1964. La €-N-monométhyllysine et la €-N-diméthyl-lysine furent identifiées dans les histones par PAIK et KIM (84) en 1967.

En 1969, De LANGE <u>et al</u> (54) et OGAWA <u>et al</u> (85) identifièrent ces 2 dérivés dans la GRK-histone de thymus de Veau.

<u>Dégradation de Edman</u> : trois cycles de dégradation de Edman utilisée en méthode soustractive ont permis d'établir la séquence du peptide T-7.

Composition :	Val,	Leu,	Lys(Me),	Arg
	0,8	0,9	Ŏ, 8	1,0
ler cycle	1,0	1,0	0,2	0,9
2ème cycle	0,1	1,0	120	١,١
3ème cycle	19 <b>86</b>	0,1	<b></b>	1,0

Peptide T-8 (résidus 24 à 35) ;

Asp-Asn-Ile-Gln-Gly-Ile-Thr-Lys-Pro-Ala-Ile-Arg

Le peptide T-8 est localisé dans la fraction 6 avec le peptide T-5a et le peptide T-18 dont il est séparé en chromatographie préparative sur papier.

La présence d'un résidu d'asparagine et d'un résidu de glutamine a été établie après hydrolyse du peptide par l'aminopeptidase M pendant 24 heures.

(★) Lys(Me) : E -N-méthyl-lysine.

# Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS-Asp

Dégradation de Edman : quatre cycles de dégradation de Edman utilisée en méthode soustractive ont permis de déterminer la séquence NH<sub>2</sub>-terminale : Asx-Asx-Ile-GIn. La dégradation récurrente n'a pu être poursuivie au delà du 4ème cycle : le blocage de la réaction résulte de la cyclisation de la glutamine en acide pyroglutamique.

La séquence Asp-Asn a été définitivement établie par identification directe des PTH-amino-acides libérés en chromatographie sur couche mince de gel de silice dans les solvants V et IV de JEPPSSON et SJÖQUIST (71).

Hydrolyse par les carboxypeptidases A et B :

La séquence COOH-terminale : Ile-Arg a été établie par hydrolyse du peptide avec les carboxypeptidases A et B, à pH 8,0 et 40°C, pendant 6 heures.

Hydrolyse par la thermolysine :

L'hydrolyse du peptide T-8 par la thermolysine à pH 8,0 et 40°C pendant 8 heures, libère 4 peptides qui sont ensuite séparés en électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6.

Ces peptides sont, dans l'ordre croissant de mobilité cathodique :

<u>T-8-Th-1</u>	Asp-Asn
<u>T-8-Th-2</u>	lle-Gln-Gly
T-8-Th-3	Ile-Thr-Lys-Pro-Ala
<u>T-8-Th-4</u>	lle-Arg

Les données fournies par la dégradation de Edman du peptide T-8 permettent de déduire la séquence des peptides T-8-Th-1 et T-8-Th-2 et d'en déterminer la position dans la séquence du peptide T-8.

La séquence du peptide T-8-Th-3 a été déterminée avec trois cycles de dégradation de Edman en couplage avec la méthode de dansylation.

La séquence du peptide T-8-Th-4 est évidente d'après la spécificité de la thermolysine et confirme les résultats de l'hydrolyse du peptide T-8 par les carboxypeptidases A et B. Le peptide T-8-Th-4 doit être placé à l'extrémité COOH-terminale du peptide T-8. L'ensemble de ces résultats permet de placer sans ambiguité les peptides Th- dans l'ordre : Th-1 - Th-2 - Th-3 - Th-4 et de déterminer ainsi la séquence complète du peptide T-8 :

Asp - Asn - Ile - Gln - Gly - Ile - Thr - Lys - Pro - Ala - Ile - Arg T-8-Th-1- $\star$  T-8-Th-2  $-\star$  T-8-Th-3  $-\star$  T-8-Th-4

La séquence du peptide T-8 fait apparaître une liaison Lys-Pro résistante à l'hydrolyse trypsique. La position de la proline par rapport à l'alanine explique l'action limitée de la carboxypeptidase A.

<u>Peptide T-9 (résidus 37 à 39)</u> : Leu - Ala - Arg

Le peptide T-9 est obtenu pur dans la fraction 11.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS-Leu

Dégradation de Edman : Un cycle de dégradation de Edman suivi de la dansylation du peptide résiduel a permis de déterminer la séquence du peptide T-9.

Peptide T-10 (résidus 41 à 46) :

Gly - Gly - Val - Lys - Arg

Le peptide T-10 est obtenu pur dans la fraction 15.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS-Gly

<u>Dégradation de Edman</u> : Deux cycles de dégradation de Edman en couplage avec la méthode de dansylation ont déterminé la séquence NH<sub>2</sub>-terminale Gly – Gly – Val.

Hydrolyse par la carboxypeptidase B :

L'étude cinétique de l'hydrolyse du peptide T-10 par la carboxypeptidase B a déterminé la séquence COOH-terminale : Lys – Arg.

L'obtention du peptide T-10 fait ressortir la présence d'une liaison Lys-Arg qui résiste à l'hydrolyse trypsique pendant 2 heures à 37°C et pH 8,0.
faible quantité Veau (80), nous avons pu identifier le peptide Toutefois, dans l'hydrolysat trypsique de GRK-histone de thymus à côté du peptide Gly-Gly-Val-Lys-Arg. Gly-Gly-Val-Lys obtenu en de

lle 1 Ser L Gly - Leu - Ile - Tyr - Glu -G u -Thr -٨rg

dont il est séparé en électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6. Le peptide T-l1 est localisé dans la fraction 9 avec le peptide T-12

lyse du peptide par l'aminopeptidase M pendant 48 heures. La présence de 2 résidus d'acide glutamique a été établie après hydro-

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS-Ile

nale: Ile - Ser - Gly - Lev. en couplage avec la méthode de dansylation détermine la séquence NH2-termi-Dégradation de Edman : trois cycles de dégradation de Edman utilisé ወ

Hydrolyse\_par\_la\_chymotrypsine

pendant 4 heures, libère 4 peptides qui sont séparés en chromatographie préparative sur papier. L'hydrolyse du peptide T-11 par la chymotrypsine à pH 8,0 et 37°C

- Gly - Leu - Glu - Glu - Thr - - Thr - Ara

position mettent de déduire la séquence du peptide T-ll-Ch-l et d'en déterminer la à l'extrémité NH2-terminale du peptide T-11. Les données fournies par la dégradation de Edman du peptide T-ll per-

NH<sub>2</sub>-terminale, par la méthode de dansylation. chymotrypsine. Elle a été confirmée en identifiant l'isoleucine en La séquence du peptide T-ll-Ch-2a découle de la spécificité position de ā

dégradation de Edman utilisée en couplage avec la méthode de dansylation. La séquence du peptide T-11-Ch-2b a été établie avec 2 cycles de

La séquence du peptide T-11-Ch-2 a été déduite des données fournies par l'étude des peptides T-11-Ch-2a et T-11-Ch-2b. La position COOH-terminale du peptide Ch-2b est liée à la présence du résidu d'arginine situé à l'extrémité COOH-terminale du peptide T-11 d'après la spécificité étroite de la trypsine.

L'ensemble de ces résultats permet de placer les peptides Ch- dans l'ordre Ch-1 - Ch-2 et de déterminer ainsi la séquence complète du peptide T-11.

Peptide T-12 (résidus 56 à 59) :

Gly - Val - Leu - Lys

Le peptide T-12 est localisé dans la fraction 9 avec le peptide T-11 dont il est séparé en électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS-Gly.

Dégradation de Edman : deux cycles de dégradation de Edman en couplage avec la méthode de dansylation ont permis d'établir la séquence du peptide T-12.

Peptide T-13 (résidus 60 à 67) :

Val - Phe - Leu - Glu - Asn - Val - Ile - Arg

Le peptide T-13 est obtenu pur dans la fraction 9.

La présence d'un résidu d'asparagine et d'un résidu d'acide glutamique a été établie après hydrolyse du peptide par l'aminopeptidase M pendant 24 heures.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS-Val.

Dégradation de Edman : 6 cycles de dégradation de Edman utilisée en méthode soustractive ont déterminé la séquence du peptide T-13.

Composition	•	Asp , 1,3	Glu " 1.3	Val, 2,0	lle, 0,9	Leu, 1,1	Phe , 1,1	Arg 1,0
ler cycle		1,1	1,2	<u>1,0</u>	1,0	1,0	1,1	1,0
2ème cycle		1,2	1,1	1,1	1 " 0	0,9	<u>0,1</u>	1,0
3ème cycle		1,0	1,0	1,1	1,1	0,1	1980.	1,0
4ème cycle		1,0	0,3	0,9	0,9	çanı i	unan	1,0
5ème cycle		0,5		0,8	0,8		Camil 3	1,0
6ème cycle		-	-	0,4	0,9	80	- CRR	1,0

Peptide T-14 (résidus 68 à 77) :

Asp - Ala - Val - Thr - Tyr - Thr - Glu - His - Ala - Lys

Le peptide T-14 est localisé dans la fraction 7 avec l'arginine libre et les peptides T-2 et T-5 dont il est séparé en électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6.

La présence d'un résidu d'acide aspartique et d'un résidu d'acide glutamique a été établie après hydrolyse du peptide par l'aminopeptidase M pendant 48 heures.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS-Asp

Hydrolyse par la chymotrypsine :

L'hydrolyse du peptide T-14 par la chymotrypsine à pH 8,0 et 37°C pendant 6 heures, libère 2 peptides qui sont ensuite séparés en électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6.

Ces peptides sont dans l'ordre croissant de mobilité cathodique :

T-14-Ch-1	Asp -	- Ala -	Val -	Thr – Tyr
T-14-Ch-2	Thr -	Gĺu -	His -	Ala – Lys

La séquence de chaque peptide a été déterminée avec trois cycles de dégradation de Edman en couplage avec la méthode de dansylation.

La position du peptide Ch-1 à l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale du peptide T-14 est liée à la présence du résidu d'acide aspartique, aussi bien qu'à la spécificité de la chymotrypsine, tandis que la position du peptide Ch-2 à l'extrémité COOH-terminale du peptide T-14 est liée à la présence du résidu de lysine. Nous obtenons ainsi la séquence complète du peptide T-14 :

Peptide T-15 (résidus 78 et 79) :

Arg - Lys

Le peptide T-15 est obtenu pur dans la fraction 17.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS-Arg.

Peptide T-16 (résidus 80 à 91) :

Thr - Val - Thr - Ala - Met - Asp - Val - Val - Tyr - Ala - Leu - Lys

Le peptide T-16 est obtenu pur dans la fraction 5.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS-Thr.

Dégradation de Edman : quatre cycles de dégradation de Edman en couplage avec la méthode de dansylation ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale : Thr - Val - Thr - Ala - Met. Le reste de la séquence correspond à la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide COOH-terminal CN-2 obtenu par action du bromure de cyanogène sur la GRK-histone.

Peptide T-17 (résidus 93 à 95) : Glp - Gly - Arg (\*)

Ce peptide est isolé pur de la fraction 2.

La glutamine à l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale donne par cyclisation de l'acide pyroglutamique et conduit à l'obtention de ce peptide de caractère acide qui ne donne aucune réaction avec la ninhydrine. Il est toutefois aisément localisé par le réactif de Sakaguchi ou le réactif à la phénanthrène-quinone.

Ce peptide correspond au peptide CN-2-T-2 qui constitue un élément de la séquence du peptide COOH-terminal CN-2 de la GRK-histone.

(\*) Glp : acide pyroglutamique.

Peptide T-18 (résidus 96 à 102) :

Thr - Leu - Tyr - Gly - Phe - Gly - Gly

Le peptide T-18 est localisé dans la fraction 6 avec les peptides T-5a et T-8, dont il est séparé en chromatographie préparative sur papier.

Ce peptide est identique au peptide CN-2-T-1 situé à l'extrémité COOH-terminale du peptide CN-2 obtenu par action du bromure de cyanogène sur la GRK-histone : il constitue donc le peptide trypsique COOH-terminal dans la protéine.

### Lysine libre et arginine libre

La molécule de GRK-histone contient 4 liaisons lysyl-arginyl (résidus 16-17, 44-45, 77-78, 91-92), 2 liaisons arginyl-arginyl (résidus 35-36 et 39-40) et une liaison arginyl-lysyl (résidus 78-79), chacune de ces liaisons constituant l'élément d'un des 5 centres basiques rencontrés dans la chaîne peptidique (Tableau XVIp.71).

L'hydrolyse partielle de ces différentes liaisons par la trypsine entraîne la libération de lysine et d'arginine libres qui sont respectivement éluées dans les fractions 4 et 7. La lysine est obtenue pure directement, tandis que l'arginine est séparée des peptides T-2, T-5 et T-14, présents dans la fraction 7, par électrophorèse préparative sur papier suivie d'une chromatographie préparative sur papier.

# F) ETUDE DES PEPTIDES DE LA GRK-HISTONE DE THYMUS DE PORC OBTENUS PAR FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT CHYMOTRYPSIQUE SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P

Le fractionnement des peptides chymotrypsiques de la GRK-histone de thymus de Veau (62) a été réalisé par chromatographie de gel-filtration sur colonne de Sephadex G-25 équilibrée et éluée avec de l'acide acétique 0,2 <u>M</u>: les cinq fractions obtenues sont très hétérogènes et la purification des peptides très laborieuse. Pour la séparation des peptides chymotrypsiques de la GRKhistone de thymus de Porc (61), nous avons préféré à la chromatographie de gelfiltration, la chromatographie d'échange d'ions, sur résine Chromobeads P, avec le même système gradient de tampons pyridine – acide formique, pyridine – acide acétique utilisé pour le fractionnement des peptides trypsiques.

Le diagramme d'élution des peptides chymotrypsiques de la GRKhistone de thymus de Porc fractionnés sur colonne de Chromobeads P est présenté dans la figure 8 et montre la séparation des peptides en 4 fractions.

Les fractions indiquées par des traits pleins sont numérotées suivant leur ordre d'élution de la colonne. Les peptides chymotrypsiques sont désignés par Ch- et numérotés suivant leur position dans la séquence de la protéine (Tableau XV page 69).

La composition et la séquence en amino-acides de chaque peptide sont respectivement présentées dans les tableaux XIII et XIV.

Peptide Ch-2 (résidus 23 à 37) :

Arg-Asp-(Asn, Ile, Gln, Gly, Ile, Thr, Lys, Pro, Ala)- Ile-Arg-Arg-Leu

Le peptide Ch-2 est obtenu pur dans la fraction 5.

Dégradation de Edman :

Deux cycles de dégradation de Edman utilisée en méthode soustractive ont déterminé la séquence NH<sub>2</sub>-terminale : Arg - Asp.

Composition :	Asp ,	Thr 🦯	Glu	, Pro ,	Gly	, Ala ,	lle ,	Leu,	Lys,	Arg
	2,2	1,0	1,0	1,3	1,2	1 "2	3,1	1,0	1,0	3,2
ler cycle	2,0	1,0	1,0	1,3	1,1	١, ١	3,1	1,0	1,0	2,2
2ème cycle	1,1	1 @ 0	1 " 0	1,1	1,0	1,2	3,0	1,0	ι,Ο	2,0

Hydrolyse par les carboxypeptidases A et B :

L'hydrolyse du peptide Ch-2 par la carboxypeptidase A à 37°C pendant 2 heures libère une mole de leucine par mole de peptide. Après 2 heures d'hydrolyse par la carboxypeptidase A, le peptide est hydrolysé par la carboxypeptidase B à 37°C pendant 2 heures. L'analyse des amino-acides fait apparaître la libération d'une mole de leucine et de deux moles d'arginine par mole de peptide, sous l'action conjuguée des carboxypeptidases A et B. Deux séquences COOH-terminales possibles ressortent de ces données : Arg - 11e - Arg - Leu ou IIe - Arg - Arg - Leu.



TABLEAU XIII

COMPOSITIONS EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES DE LA GRK-HISTONE DE THYMUS DE PORC

# OBTENUS PAR FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT CHYMOTRYPSIQUE SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P

(exprimées en rapports molaires) (乗)

Amino-acides	Ch-2	Ch-6	Ch-7	Ch-8	Ch-11	Nb total de résidus	GRK-histone
Acide aspartique	2,2 (2)		1,8 (2)	1,0 (1)		5	2
Thréonine	1,0 (1)		0,9 (1)	2,9 (3)		5	2
Sérine							7
Acide glutamique	1,0 (1)		0,9 (1)	1,0 (1)		ო	Ŷ
Prolîne	1,3 (1)						
Glycine	1,2 (1)				3,0 (3)	4	17
Alanine	1,2 (1)		0,9 (1)	2,0 (2)		4	~
Valine		0,8 (1)	1,6 (2)	2,0 (2)		5	6
Méthionine			-	0,3 (1)			<b>,</b>
lsoleucine	3, 1 (3)		0,4 (1)			4	Ŷ
Leucine	1,0(1)		1,0 (1)			3	ω
Tyrosine			0,7 (1)	0,8 (1)		2	4
Phénylalanine		1,0(1)		-	1,0 (1)	2	2
Lysine	1,0 (1)	0,8 (1)		2,0 (2)		4	10
<b>E -</b> N-méthyllysine							
Histidine				0,8 (1)			2
Arginine	3,2 (3)		1,0 (1)	1,0 (1)		5	14
Nombre de résidus	15	3	11	15	4	48	102

(素) Les chiffres en pare¤thèses indiquent le nombre de résidus assumés.

805 1111

- 63 -

### TABLEAU XIV

SEQUENCES EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES DE LA GRK-HISTONE DE THYMUS DE PORC OBTENUS PAR FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT CHYMOTRYPSIQUE SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P (\*)

Ch-6 (résidus 59 à 61) Lys - Val - Phe

Ch-7 (résidus 62 à 72) Leu - Glu - Asn - Val - Ile - Arg - Asp - Ala - Val - Thr - Tyr

Ch-11 (résidus 99 à 102) Gly - Phe - Gly - Gly(OH)

(\*) La signification des signes placés au-dessus ou en-dessous des résidus d'amino-acides est présentée dans le tableau IX page 41.



Le peptide Ch-2 contient le seul résidu de proline présent dans la molécule de GRK-histone : il recouvre donc le peptide trypsique T-8 qui contient ce résidu et dont la séquence COOH-terminale Ala – Ile – Arg exclut la séquence Arg – Ile – Arg – Leu à l'extrémité COOH-terminale du peptide Ch-2.

Le résidu de leucine en position COOH-terminale dans le peptide Ch-2 ne peut provenir que du peptide T-8 qui est le seul peptide trypsique de la GRK-histone à posséder la leucine à l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale.

Le résidu d'arginine en position NH<sub>2</sub>-terminale dans le peptide Ch-2 peut provenir du peptide T-6 ou T-7, par coupure d'une liaison His - Arg ou Leu - Arg par la chymotrypsine. Le peptide Ch-2 permet de placer les peptides trypsiques T-7 (ou T-6), T-8 et T-9 dans l'ordre : (T-6 ou T-7) - T-8 - T-9.

Peptide Ch-6 (résidus 59 à 61) :

Lys - Val - Phe

Ce peptide est localisé dans la fraction 3 avec le peptide Ch-7 dont il est séparé en chromatographie préparative sur papier.

Dansylamino-acide NH2-terminal : di-DNS-Lys

La spécificité de la chymotrypsine permet de placer le résidu de phénylalanine à l'extrémité COOH-terminale du peptide Ch-6.

Dans le peptide Ch-6, le résidu de lysine ne peut provenir que du peptide trypsique T-12 : Gly - Val - Leu - Lys ; tandis que la séquence Val - Phe correspond à la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide trypsique T-13. Le peptide Ch-6 fournit ainsi l'enchaînement : T-12 - T-13.

Peptide Ch-7 (résidus 62 à 72) : Leu - Glu - Asn (Val , lle , Arg , Asp , Ala , Val , Thr) Tyr

Ce peptide est localisé dans la fraction 3 avec le peptide Ch-6 dont il est séparé en chromatographie préparative sur papier.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Leu.

Dégradation de Edman :

Deux cycles de dégradation de Edman en couplage avec la méthode de dansylation ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale : Leu - Glx - Asx.

Hydrazinolyse :

L'action de l'hydrazine sur le peptide Ch-7 permet d'identifier la tyrosine en position COOH-terminale.

La séquence Leu - Glx - Asx du peptide Ch-7 correspond à la séquence Leu - Glu - Asn qui constitue la partie médiane du peptide trypsique T-13.

La composition en amino-acides du peptide Ch-7 permet de conclure que ce peptide recouvre la partie COOH-terminale du peptide trypsique T-13 et la partie NH<sub>2</sub>-terminale du peptide trypsique T-14. L'enchaînement T-13 - T-14 est ainsi obtenu.

# Peptide Ch-8 (résidus 73 à 88) :

Thr-Glu-His-Ala-(Lys, Arg, Lys, Thr, Val, Thr, Ala, Met, Asp, Val, Val) Tyr

Ce peptide est obtenu pur dans la fraction 4.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS-Thr.

Dégradation de Edman :

Trois cycles de dégradation de Edman utilisée en couplage avec la méthode de dansylation ont déterminé la séquence NH<sub>2</sub>-terminale Thr - Glu - His - Ala.

La position COOH-terminale de la tyrosine découle de la spécificité de la chymotrypsine.

La séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide Ch-8 correspond à la séquence Thr - Glu - His - Ala située dans la partie COOH-terminale du peptide trypsique T-14.

La composition en amino-acides du peptide Ch-8 caractérisée par la présence de méthionine et de tyrosine, permet de conclure que le peptide Ch-8 recouvre la partie NH<sub>2</sub>-terminale du peptide trypsique T-16 et du peptide CN-2 obtenu par action du bromure de cyanogène sur la GRK-histone. Peptide Ch-11 (résidus 99 à 102) : Gly - Phe - Gly - Gly

Ce peptide est obtenu pur dans la fraction 2.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Gly.

Dégradation de Edman :

Un cycle de dégradation de Edman suivi de la dansylation du peptide résiduel a suffi pour établir la séquence du peptide Ch-11.

L'obtention du peptide Ch-11 fait ressortir la résistance inhabituelle de la liaison Phe – Gly à l'hydrolyse par la chymotrypsine (60) (86).

La proximité de la charge négative portée par le résidu COOH-terminal de la GRK-histone est probablement la cause de cette résistance (87).

Les 4 résidus de tyrosine, les 2 résidus de phénylalanine et les 8 résidus de leucine présents dans la GRK-histone constituent 14 sites majeurs potentiels pour l'action de la chymotrypsine. Théoriquement, l'hydrolyse de la protéine par la chymotrypsine devrait produire 15 peptides. En fait, la résistance à l'hydrolyse de 3 liaisons leucyle:

Leu – Gly , Leu – Glu , Leu – Tyr 10 11 62 63 97 98 et d'une liaison phénylalanyle: Phe – Gly 100 101

ramène ce nombre à 11.

Cependant, le fractionnement de l'hydrolysat chymotrypsique par chromatographie d'échange d'ions sur une résine cationique entraîne la fixation irréversible de certains peptides chymotrypsiques très basiques, qui se traduit par un déficit de 54 résidus d'amino-acides (Tableau XIII, p. 63) portant essentiellement sur la glycine, la lysine et l'arginine. Les peptides Ch-1 (résidus 1 à 22), Ch-3 (résidus 38 à 49) et Ch-10 (résidus 91 à 98) ont ainsi échappé à nos investigations (Tableau XV, p. 69).

## G) SEQUENCE EN AMINO-ACIDES DE LA GRK-HISTONE

La première histone dont la structure primaire a été déterminée est la GRK-histone de thymus de Veau.

La séquence complète en amino-acides de cette histone a été établie indépendamment en 1969 par De LANGE <u>et al</u> (54) et OGAWA <u>et al</u> (85). Au cours de la même année, De LANGE <u>et al</u> (88) ont déterminé la séquence en amino-acides de la GRK-histone de l'embryon de Pois et montré une remarquable constance dans la structure primaire de cette protéine, puisque seulement deux différences de type conservatif existent entre ces histones de sources pourtant fort éloignées.

Les travaux que nous avons réalisés pour la détermination de la structure primaire de la GRK-histone de <u>thymus de Veau</u> (60) (62) (80) nous ont permis la mise au point d'un protocole où l'étude des peptides trypsiques constitue la base des études comparatives réalisées sur des histones homologues isolées de différents tissus.

Pour la détermination de la structure primaire de la GRK-histone de <u>thymus de Porc</u>, l'étude des peptides trypsiques a été complétée par la détermination de la séquence de l'octadécapeptide COOH-terminal obtenu par coupure de la protéine avec le bromure de cyanogène au niveau du résidu de méthionine en position 84 et par de larges recoupements déduits de l'étude des peptides de l'hydrolysat chymotrypsique.

La séquence complète des 102 amino-acides de la GRK-histone de thymus de Porc est présentée dans le tableau XV (61).

Comme il s'agissait moins d'établir une nouvelle séquence que de comparer des structures, nous n'avons pas recherché une méthode plus satisfaisante pour le fractionnement des peptides chymotrypsiques. L'étude de ces peptides ne constituait en effet, qu'une confirmation de l'identité de la structure primaire de la GRK-histone de thymus de Porc avec celle de la GRK-histone de thymus de Veau, identité déjà amplement démontrée par l'étude complète des peptides trypsiques et de l'octadécapeptide COOH-terminal CN-2.

La structure primaire de la GRK-histone isolée de la tumeur de chloroleucémie de Rat a été déduite de l'étude de l'octadécapeptide COOH-terminal

## TABLEAU XV

# SEQUENCE COMPLETE EN AMINO-ACIDES DE LA GRK-HÍSTONE DE THYMUS DE PORC

K T-1 T-1 T-2 K T-2 T-3 T-3 T-4 N-acétyl - Ser - Gly - Arg - Gly - Lys - Gly - Gly - Lys - Gly - Lys - Gly - Leu -Lys - Pro - Ala - Ile - Arg - Arg - Leu - Ala - Arg - Arg - 40 Gly - Gly - Val - Lys - Arg - Ile - Ser - Gly - Leu - Ile -70 80 --- Ch-8 ---- T-16 Val - Thr - Ala - Met - Asp - Val - Val - Tyr - Ala - Leu -Lys - Arg - Gln - Gly - Arg - Thr - Leu - Tyr - Gly - Phe -Ch-11 - - - - -Gly - Gly(OH)

obtenu par coupure de la protéine avec le bromure de cyanogène (89) et de l'étude des peptides trypsiques.

Chaque peptide trypsique a été comparé avec le peptide homologue de la GRK-histone de thymus de Veau et de la GRK-histone de thymus de Porc. La position dans le diagramme d'élution, la localisation sur la carte peptidique, la composition en amino-acides, les amino-acides NH<sub>2</sub> et COOH-terminaux, ont constitué les différents points de cette étude comparative qui démontre l'identité de la structure primaire de la GRK-histone de chloroleucémie du Rat avec celle de la GRK-histone de thymus de Veau.

On peut dire en effet que 2 peptides ont une structure identique, lorsque ces peptides ont le même temps de rétention sur la colonne de résine à pouvoir d'échange ionique, le même comportement en chromatographie ou en électrophorèse sur papier, la même composition en amino-acides, le même amino-acide en position NH<sub>2</sub>-terminale et le même amino-acide à l'extrémité COOH-terminale.

La séquence en amino-acides de la GRK-histone est caractérisée par :

- Le blocage de l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale par un groupe acétyle.

- Le blocage de la fonction  $\varepsilon$ -aminée de la lysine en position 16 par un groupe acétyle et de la lysine en position 20 par un ou deux groupes méthyle.

- La présence de cinq centres basiques constitués par des chaînons de 2 ou plusieurs résidus d'amino-acides basiques (Tableau XVI).

- La prédominance des résidus basiques dans la région NH<sub>2</sub>-terminale (45 résidus) qui renferme 13 charges positives nettes, alors que la région COOHterminale (57 résidus) ne renferme que 3 charges positives nettes (54).

 Le caractère hydrophobe marqué de la partie COOH-terminale
(résidus 46 à 102) où sont localisés 22 des 33 résidus d'amino-acides à chaîne latérale hydrophobe (\*) présents dans la molécule de GRK-histone.

(★) Alanine, Valine, Méthionine, Isoleucine, Leucine, et Phénylalanine.

# TABLEAU XVI

# CENTRES BASIQUES PRESENTS

# DANS LA SEQUENCE EN AMINO-ACIDES DE LA GRK-HISTONE

- La localisation des 6 résidus d'amino-acides aromatiques dans la partie COOH-terminale où l'on retrouve également 5 des 6 résidus de thréonine présents dans la GRK-histone.

- La présence de 8 résidus de glycine dans les 14 premiers résidus de la chaîne peptidique, tandis que 3 résidus de glycine participent à la séquence COOH-terminale : Gly - Phe - Gly - Gly.

- Les analogies de structure qui apparaissent dans quelques séquences peptidiques (Tableau XVII), ce qui implique selon De LAN GE <u>et al</u> (54) que certains segments du gène responsable de la synthèse de la GRK-histone sont formés par la répétition de certaines séquences nucléotidiques.

Les caractéristiques de la structure primaire de la GRK-histone sont résumées dans le tableau XVIII. TABLEAU XVII

ANALOGIES DE SEQUENCE DANS LA GRK-HISTONE

# LEGENDE DU TABLEAU XVIII

Les amino-acides sont représentés par une lettre suivant le code utilisé par DAYHOFF (DAYHOFF M.O., Atlas of Protein sequence and structure, 1969, vol. 4, National Biomedical Research Foundation, Georgetown University Medical Center, Washington, D.C. 20007).

- D = Acide aspartique
- Q = Glutamine
- G = Glycine
- K = Lysine
- R = Arginine

- 74 -	-histone .	hobe sur 33 présents dans la GRK- ts dans la GRK-histone. its dans la GRK-histone.	positives nettes. à chaîne latérale hydroph aromatiques sur 6 présen de thréonine sur 6 présen	3 charges   22 résidus 6 résidus 5 résidus	(AUS)
100	61	75 79	67	55	.0
	KR QG		R D	R G	
		ıs 46 à 102)	COOH-terminale (résidu:	Séquence	
			s positives nettes.	13 charges	
			Ac Me	- 8 Gly -	
	40 45	<i>11///////////////////////////////////</i>	1 14 16 17 20	4 7 1	
		1 à 45)	NH <sub>2</sub> -terminale (résidus	Séquence	
	-HISTONE (*)	DE LA SEQUENCE DE LA GRK	CARACTERISTIQUES D		

TABLEAU XVIII

.

•

siques sont representes par

# CHAPITRE V

## STRUCTURE PRIMAIRE DE L'ALK-HISTONE

- A) COMPOSITION EN AMINO-ACIDES.
- B) DETERMINATION DE L'EXTREMITE NH2-TERMINALE.
- C) DETERMINATION DE L'EXTREMITE COOH-TERMINALE.

## D) HYDROLYSES ENZYMATIQUES

- 1) Peptides trypsiques de l'ALK-histone native.
- 2) Peptides trypsiques de l'ALK-histone maléylée.
- 3) Peptides chymotrypsiques de l'ALK-histone native.
- 4) Peptides chymotrypsiques de l'ALK-histone maléylée.
- 5) Peptides obtenus par hydrolyse de l'ALK-histone native avec la thermolysine.
- E) SEQUENCE EN AMINO-ACIDES.

## A) COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DE L'ALK-HISTONE

La composition en amino-acides de l'ALK-histone, établie sur des hydrolysats de 24 heures et de 72 heures, est présentée dans le tableau XIX.

Cette composition est caractérisée par un taux élevé d'arginine et de lysine, d'acide glutamique, de glycine, d'alanine et de leucine. L'absence de cystéine, de méthionine et de dérivés  $\varepsilon$ -N-méthylés de la lysine dans l'ALK-histone présente un intérêt particulier. Elle constitue en effet la base d'un critère de pureté chimique de la protéine dont les contaminants possibles qui sont l'ARE-histone et la GRK-histone renferment de la cystéine, de la méthionine et des dérivés  $\varepsilon$ -N-méthylés de la lysine (ARE-histone), de la méthionine et des dérivés  $\varepsilon$ -N-méthylés de la lysine (GRK-histone).

L'ALK-histone se place, par son taux élevé de lysine, dans une position intermédiaire entre les histones riches en arginine et les histones riches en lysine. Son taux d'arginine, quoique légèrement inférieur à celui de la lysine, est suffisamment élevé en soi pour nous permettre de classer définitivement cette histone dans le groupe des histones riches en arginine où, avec la GRK-histone et l'ARE-histone, elle partage le caractère de solubilité en milieu éthanolique (29).

L'absence de méthionine dans l'ALK-histone peut apparaître comme un handicap pour l'étude de la structure primaire de cette protéine où seules sont applicables des méthodes enzymatiques de coupure de la chaîne peptidique.

# B) DETERMINATION DE L'EXTREMITE NH2-TERMINALE DE L'ALK-HISTONE

Dans les travaux antérieurs réalisés sur les fractions  $F_{2a1}$  et  $F_{2a2'}$  correspondant respectivement à la GRK-histone et à l'ALK-histone, PHILLIPS (78) avait montré le blocage de la fonction  $\alpha$ -aminée à l'extrémité  $NH_2$ -terminale et avait identifié le peptide trypsique N-acétyl-Ser-Gly-Arg en position  $NH_2$ -terminale dans ces deux histones.

# TABLEAU XIX

# COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DE L'ALK-HISTONE DU THYMUS DE VEAU

Amino-acides	Valeurs moyennes obte- nues à partir des hydro- lysats de 24 et 72 heures	Nombre o	le résidus
	exprim <b>ées en moles</b> pour 100 moles d'amino-acides	calculés ( <del>x</del> )	assumés
Acide aspartique	6,62	8,50	8
Thréonine (**)	3,90	5,00	5
Sérine (**)	3,17	4,07	4
Acide glutamique	9,49	12,18	12
Proline	4,15	5 <b>,3</b> 2	5
Glycine	10,92	14,02	14
Alanine	12,68	16,27	17 ( <del>***</del> *)
1/2 Cystine	0	-	-
Valine ( <del>****</del> )	6,22	7,99	8
Méthionine	0	-	-
lsoleucine (****)	4,40	5,65	6
Leucine	12,27	15,75	16
Tyrosine	2,29	2,95	3
Phénylalanine	0,90	1,16	1
Lysine	10,59	13,59	14
Histidine	3,04	3,91	4
Arginine	9,34	11,98	12
Total	99,98		129
Rapport Lysine/Argir Rapport Amino-acide	nine = 1,16 es basiques/Amino-acides aci	des = 1,50	in en
Poids moléculaire cal Amino-acide NH <sub>2</sub> -te Amino-acide COOH-	culé = 14.005 rminal bloqué : N-acétyl-Sé terminal : Lysine	rine	

(\*) Le nombre de résidus d'amino-acides a été calculé sur la base d'un résidu de phénylalanine.

(\*\*) Valeurs obtenues par extrapolation linéaire au temps zéro de l'hydrolyse.
(\*\*\*) Valeur retenue à partir de la séquence.

(\*\*\*\*) Valeur obtenue à partir des hydrolysats de 72 heures.



Nous avons retrouvé les résultats de PHILLIPS en identifiant le peptide N-acétyl-Ser-Gly-Arg dans l'hydrolysat trypsique de l'ALK-histone, après avoir contrôlé par la méthode de dinitrophénylation décrite par PHILLIPS (19) et la méthode au cyanate de STARK et SMYTH (79) l'absence d'une fonction  $\alpha$ -aminée libre à l'extrémité de cette protéine. Des résultats identiques ont été obtenus par STARBUCK et al (39), HAYASHI et IWAI (48) et OLSON et al (90).

# C) DETERMINATION DE L'EXTREMITE COOH-TERMINALE DE L'ALK-HISTONE

L'hydrolyse de l'ALK-histone par la carboxypeptidase B a permis d'identifier la lysine à l'extrémité COOH-terminale de la protéine (PHILLIPS et SIMSON) (91) (SENSHU et IWAI) (44) (SAUTIERE <u>et al</u>) (41) (SUGANO <u>et al</u>) (92).

Toutefois, la comparaison des résultats obtenus par ces auteurs sur la séquence COOH-terminale de l'ALK-histone fait apparaître des divergences profondes.

PHILLIPS et SIMSON (91), s'appyyant sur les résultats des hydrolyses de la fraction F<sub>2a2</sub> par les carboxypeptidases A et B et par la chymotrypsine, ont trouvé la séquence : Val - Gly - Ala - Arg - His - Lys.

Si cette séquence était correcte, le peptide His - Lys aurait dû être présent dans l'hydrolysat trypsique de la protéine. En fait, nous n'avons jamais obtenu ce peptide et HAYASHI et IWAI (48) ne l'ont pas davantage retrouvé.

Les résultats obtenus de l'hydrolyse de l'ALK-histone par la carboxypeptidase B pendant une heure, suivie d'une hydrolyse par la carboxypeptidase A pendant une heure (tableau XX, résultats personnels, lère colonne) nous avaient amené à conclure à la séquence COOH-terminale : His - Lys. Cette séquence était seulement compatible avec le peptide Lys - Thr - Glu - Ser - His-His - Lys présent dans l'hydrolysat trypsique de l'ALK-histone native (41). HAYASHI et IWAI (48) avaient tiré une conclusion identique.

# TABLEAU XX

# ETUDES CINETIQUES DE L'HYDROLYSE DE L'ALK-HISTONE PAR LES CARBOXYPEPTIDASES A ET B

	Résultats (*)		Résultats pe	rsonnels (**)	
Amino-acides libérés	SUGANO <u>et al</u> (92) (après 8 heures d'hydrolyse)	Carboxypeptidase B 1 heure +Carboxypeptidase A 1 heure	Carboxypeptidase B 10 minutes	Carboxypeptidase B 10 minutes + Hydrazinolyse	Carboxypeptidase B 30 minutes
Lysine	43,5 (3,0)	126,7 (0,7)	50,2 (0,8)	50,2 (0,8)	62,0 (1,0)
Histidine	27,7 (1,9)	73,1 (0,4)	0	0	4,1
Sérine	6,4 (0,5)	-	-	-	-
Glycine	11,9 (0,8)	35,2 (0,2)	1,6	33,7 (0,5)	4,4
Alanine	13,7 (0,9)	72,5 (0,4)	4,3	11,2 (0,2)	9,6
Arginine	4,5 (0,3)	-	-	-	-
Valine	3,6 (0,4)	-	-	-	12,0
Leucine	2,8 (0,2)	-	-	-	-

(\*) Les résultats sont exprimés en nanomoles d'amino-acides libérés ; les chiffres entre parenthèses indiquent les rapports molaires des amino-acides calculés sur la base de 3 résidus de lysine.

1

79

1

(\*\*) Les résultats sont exprimés en nanomoles d'amino-acides libérés ; les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de moles d'amino-acides libérés par mole de protéine.



Cependant, ces conclusions se sont trouvées contestées par les résultats de SUGANO <u>et al</u> (92) qui montrent d'une façon irréfutable que la séquence COOH-terminale de l'ALK-histone doit être : Lys – Thr – Glu – Ser – His – His – Lys – Ala – Lys – Gly – Lys. Leurs résultats sont fondés sur l'étude cinétique de l'hydrolyse de la protéine effectuée pendant 8 heures avec les carboxypepti– dases A et B (tableau XX).

Nous avons pu confirmer les résultats de SUGANO <u>et al</u> (92) de la façon suivante : l'ALK-histone est hydrolysée à 40°C et pH 7,9 avec la carboxypeptidase B ; après 10 minutes d'hydrolyse, deux aliquotes sont prélevées, l'une pour l'analyse directe des amino-acides, l'autre pour l'hydrazinolyse suivie de l'analyse des amino-acides.

En 10 minutes, la carboxypeptidase B libère 0,8 mole de lysine par mole de protéine. Après 10 minutes d'hydrolyse par la carboxypeptidase B, l'action de l'hydrazine libère 0,5 mole de glycine par mole de protéine (tableau XX).

A partir de ces résultats, la séquence COOH-terminale de l'ALKhistone doit être : Gly – Lys.

Ces résultats qui confirment ceux obtenus par SUGANO <u>et al</u> (92) sont supportés par l'obtention du peptide chymotrypsique Ch-14 : Lys – Ala – Lys – Gly – Lys résultant de la coupure de la liaison His – Lys , par la chymo– trypsine (tableau XXXV page 164).

# D) HYDROLYSES ENZYMATIQUES

# 1) Peptides trypsiques solubles de l'ALK-histone native

L'addition de TPCK-trypsine, à la solution d'histone en milieu tamponné de pH 8,0, entraîne immédiatement l'apparition d'un trouble qui persiste durant l'hydrolyse. Ce trouble reflète l'existence d'un "core" insoluble dont l'analyse des amino-acides souligne le caractère hydrophobe par la présence de nombreux résidus d'alanine, de valine et de leucine.

L'acidification de l'hydrolysat jusqu'à pH 3,5, pour l'arrêt de l'hydro-

lyse, entraîne généralement une disparition du trouble.

Après lyophilisation, l'hydrolysat est repris dans un faible volume (3 ml) d'acide formique à 30 p.100, pour la chromatographie d'échange d'ions. A ce stade, apparaît une fraction insoluble qu'il est nécessaire d'éliminer par centrifugation. Cette fraction insoluble rend compte du déficit observé dans la composition en amino-acides des peptides solubles de l'hydrolysat trypsique par rapport à la composition en amino-acides de la protéine (Tableau XXI).

Le diagramme d'élution des peptides solubles de l'hydrolysat trypsique de l'ALK-histone fractionnés sur colonne de Chromobeads P, est présenté dans la figure 9 et montre la séparation des peptides en 16 fractions. Les fractions indiquées par des traits pleins sont numérotées suivant leur ordre d'élution de la colonne. Les peptides trypsiques, désignés par T, sont numérotés suivant leur position dans la séquence de la protéine (Tableau XXXV page 164).

La composition et la séquence en amino-acides de chaque peptide sont respectivement présentées dans les tableaux XXI et XXII.

Peptide T-1 (résidus 1 à 3):

N=acétyl - Ser - Gly - Arg

Le peptide T-1 est obtenu pur dans la fraction 2.

Le blocage du groupe & -aminé terminal par un radical acétyle, confère à ce peptide un caractère acide marqué qui se manifeste par une élution précoce de la colonne d'échangeur d'ions et par une migration anodique en électrophorèse sur papier à pH 3,6.

Le peptide T-1 ne réagit pas avec la ninhydrine, mais peut être localisé par la réaction spécifique du résidu d'arginine avec le réactif de Sakaguchi ou le réactif à la phénanthrène-quinone.

La séquence du peptide T-1 a été établie après une hydrolyse par la carboxypeptidase B à 40°C pendant 2 heures, suivie d'une hydrazinolyse : les amino-acides ainsi libérés ont été identifiés par électrochromatographie sur papier. L'acéthydrazide obtenue par action de l'hydrazine sur le groupe acétyle



# TABLEAU XXI

# COMPOSITIONS EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES DE LA FRACTION SOLUBLE

# DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE DE L'ALK-HISTONE NATIVE

(exprimées en rapports molaires par rapport à la lysine et à l'arginine)(€)

Amino-acides	T-1	T-2 ⊺-23	T-3	T-4	T-5 T-6 T-22	T-7 T-15	T-8	T-9	T-10	<b>T</b> ⊶11
Acide aspartique										
Thréonine						0,9(1)				
Sérine	1,0(1)						1,9(2)			
Acide glutamique			0,9(1)					0,9(1)		
Proline								1,0(1)		
Glycine	1,3(1)	1,2 (1)	1,7 (2)					2,2 (2)		
Alanine				0,9(1)	1,0(1)			0,9(1)		
Valine								0,9(1)	0,9(1)	
lsoleucine										
Leucine								1,0(1)		2,2(2)
Tyrosine										
Phénylalanine								0,9(1)		
Lysine		1,0(1)	1,0(1)		1,0(1)					
Histidine .			· .			-			0,9(1)	
Arginine	1,0(1)			1,0(1)		1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)
Nombre de résidus	3	2	4	2	2	2	3	9	3	3

(\*) Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de résidus assumés.

- 83

î

 $\cdot f_{\mu}$ 

## TABLEAU XXI (suite)

# COMPOSITIONS EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES DE LA FRACTION SOLUBLE

# DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE DE L'ALK-HISTONE NATIVE

(exprimées en rapports molaires par rapport à la lysine et à l'arginine) (\*)

Amino-acides	T-12	T-14	T-16	<b>1</b> - 17	T-18	T≖19	T-21	Nb total de résidus	ALK – histone
Acide aspartique	0,8(1)	2,1(2)			3,0(3)			6	8
Thréonine							1,2 (1)	3	5
Sérine							1,0(1)	4	4
Acide glutamique	1,0(1)			1,4(1)	1,8(2)		1,1(1)	7	12
Proline			1,1(1)					2	5
Glycine	1,2(1)			· ·		1,0(1)		9	14
Alanine	0,8(1)			1,1(1)				7	17
Valine 🕐								2	8
Isoleucine			1,7 (2)	1,1(1)				3	6
Leucine				1,9(2)	1,0(1)	2,1(2)		8	16
Tyrosine	0,7 (1)							1	3
Phénylalanine								I	1
Lysine	1,1(1)	1,0(1)			1,0(1)	1,0(1)	2,0(2)	12( <del>**</del> )	14
Histidine				1,0(1)			2,0(2)	4	4
Arginine	1,0(1)		1,0(1)	1,0(1)				11	12
Nombre de résidus	7	3	4	7	7	4	7	80	129



(\*) Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de résidus assumés.

(\*\*) La lysine libre n'est pas incluse dans ce total.

T-1 (résidus 1 à 3)	N-acétyl – Ser – <u>Gly</u> – Arg
T-2 (résidus 4 et 5) ; T-23 (résidus 128 et 129)	Gly - Lys
T-3 (résidus 6 à 9) (柴来)	Glp - Gly - Gly - Lys
T-4 (résidus 10 et 11)	Ala - Arg
T-5 (rés.12 e† 13);T-6 (rés.14 e† 15);T-22 (rés.126 e† 127)	Ala - Lys
T-7 (résidus 16 et 17) ; T-15 (résidus 76 et 77)	Thr - Arg
T-8 (résidus 18 à 20)	Ser - Ser - Arg
T-9 (résidus 21 à 29)	Ala - Gly F Leu & Gln - Phe - Pro 7 Val - Gly - A
T-10 (résidus 30 à 32)	Val - His - Arg
T-11 (résidus 33 à 35)	Leu - Leu - Arg
T-12 (résidus 36 à 42)	Lys - Gly - Asn - Tyr - Ala - Glu - Arg
T-14 (résidus 72 à 74)	Asp - Asn - Lys
T-15 (résid⊍s 78 à 81)	ile - Ile - Pro - Arg
T-17 (résidus 82 à 88)	His – Leu – Gln – Leu – Ala – Ile – Arg
T-18 (résidus 89 à 95)	Asn'- Asp - Glu - Glu - Leu - Asn - Lys
T-19 (résidus 96 à 99)	Leu - Leu - Gly - Lys
T-21 (résidue 119 à 125)	Lvs - Thr - Glu - Ser - His - His - Lvs

IABLEAU XXII

fixé sur la fonction &-aminée terminale a été identifiée selon la méthode d'ANDREAE (67).

Le peptide isolé de l'hydrolysat trypsique d'ALK-histone est identique au peptide T-1 identifié dans l'hydrolysat trypsique de la GRK-histone.

Peptide T-2 (résidus 4 et 5) et Peptide T-23 (résidus 128 et 129) :

Gly - Lys

Le peptide Gly - Lys est obtenu pur dans la fraction 7.

Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal : DNS - Gly.

Peptide T-3 (résidus 6 à 9) :

Glp - Gly - Gly - Lys

Ce peptide est obtenu pur dans la fraction 1 et donne une réaction faiblement positive avec la ninhydrine.

Ce peptide dérive du peptide Gln - Gly - Gly - Lys par cyclisation de la glutamine en acide pyroglutamique.

Une élution précoce de la colonne d'échangeur d'ions et une migration anodique en électrophorèse à pH 3,6, soulignent le caractère acide du peptide Glp – Gly – Gly – Lys ainsi obtenu.

La séquence du peptide T-3 a été établie après hydrolyse par les carboxypeptidases A et B, suivie d'une hydrazinolyse.

L'hydrolyse du peptide T-3 par la carboxypeptidase B à 40°C pendant 2 heures, puis par la carboxypeptidase A à 40°C pendant 6 heures, libère une µmole de lysine et une µmole de glycine par µmole de peptide.

L'hydrazinolyse du peptide résiduel libère un résidu de glycine.

Peptide T-4 (résidus 10 et 11) :

Ala - Arg

Le peptide T-4 est obtenu pur dans la fraction 13.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Ala.

Peptide T-5 (résidus 12 et 13), Peptide T-6 (résidus 14 et 15) et Peptide T-22 (résidus 126 et 127) :

### Ala - Lys

Le peptide Ala - Lys est localisé dans la fraction 9 avec le peptide T-9 dont il est séparé en chromatographie préparative sur papier.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Ala.

Peptide T-7 (résidus 16 et 17) et Peptide T-15 (résidus 76 et 77) :

### Thr - Arg

Le peptide Thr – Arg est localisé dans la fraction 12 avec le peptide T-16 dont il est séparé en chromatographie préparative sur papier.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Thr.

### Peptide T-8 (résidus 18 à 20) :

Ser - Ser - Arg

Le peptide T-8 est localisé dans la fraction 10 avec le peptide T-19 dont il est séparé en chromatographie préparative sur papier.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Ser.

Dégradation de Edman :

Un cycle de dégradation de Edman suivi<sub>,</sub> de la dansylation du peptide résiduel nous a permis d'établir la séquence du peptide T-8.

Peptide T-9 (résidus 21 à 29) :

Ala - Gly - Leu - Gln - Phe - Pro - Val - Gly - Arg -

Le peptide T-9 est localisé dans la fraction 9 avec le peptide Ala - Lys, dont il est séparé en chromatographie préparative sur papier.

La présence d'un résidu de glutamine a été établie après hydrolyse totale du peptide T-9 par l'aminopeptidase M à 40°C pendant 48 heures. La séquence du peptide T-9 a été déduite des données fournies par la dégradation de Edman et de l'étude des peptides résultant de l'hydrolyse du peptide par la chymotrypsine et la thermolysine.

# Dégradation de Edman :

Deux cycles de dégradation de Edman en couplage avec la méthode de dansylation ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale Ala - Gly - Leu du peptide T-9.

La dégradation récurrente n'a pu être poursuivie au-delà du 3ème cycle, par suite du blocage de la réaction dont nous avons attribué la cause à la présence du résidu de glutamine, immédiatement après la leucine. On observe classiquement un tel blocage dans la méthode manuelle de Edman par cyclisation de la glutamine en acide pyroglutamique.

# Hydrolyse chymotrypsique du peptide T-9 :

L'hydrolyse chymotrypsique du peptide T-9 pendant 6 heures à 37°C donne deux peptides séparés en électrophorèse sur papier à pH 3,6.

Ala - Gly - Leu Gln - Phe - Pro - Val - Gly - Arg

T-9-Ch-1 : Ala - Gly - Leu

Peptide neutre.

Composition : Gly , Ala , Leu 1,1 0,9 1,0

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Ala.

La spécificité de la chymotrypsine pour la liaison leucyle permet de placer le résidu de leucine en position COOH-terminale et d'obtenir ainsi la séquence Ala - Gly - Leu qui correspond à la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide T-9 déterminée par la dégradation de Edman. <u>T-9-Ch-2</u> : Glp – Phe – Pro – Val – Gly – Arg

Peptide acide.

Composition : Glu , Pro , Gly , Val , Phe , Arg 0,9 1,0 1,1 0,9 0,9 1,0

Ce peptide ne peut être localisé sur le papier que par la réaction à la phénanthrène-quinone, spécifique de l'arginine. Le caractère acide de ce peptide et l'absence de réaction à la ninhydrine impliquent la présence d'un résidu d'acide pyroglutamique obtenu par cyclisation de la glutamine en position NH2-terminale.

L'absence de coupure au niveau de la liaîson phénylalanyle suggère l'existence d'une liaison Phe – Pro que nous avons pu mettre en évidence après hydrolyse du peptide T-9 par la thermolysine.

Hydrolyse du peptide T-9 par la thermolysine :

L'hydrolyse du peptide T-9 par la thermolysine a été réalisée à 40°C pendant 6 heures.

Les peptides de l'hydrolysat sont séparés en électrophorèse et chromatographie préparative sur papier : l'électrophorèse à pH 3,6 permet de séparer un peptide de caractère basique correspondant au peptide Val – Gly – Arg ; les peptides T-9-Th-1 et T-9-Th-2 de caractère neutre migrent ensemble en électrophorèse et sont séparés en chromatographie.

Th Th A | a - G | y + Leu - G | n - Phe - Pro + Val - G | y - Arg $<math>\leftarrow T-9-Th-1 \rightarrow T-9-Th-2 \rightarrow T-9-Th-3 \rightarrow T-7-Th-3 \rightarrow T-7$ 

<u>T-9-Th-1</u> : Ala - Gly

Composition : Gly , Ala 1,0 1,0

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Ala.

Le peptide T-9-Th-1 se place nécessairement en position NH<sub>2</sub>-terminale dans le peptide T-9. T-9-Th-2: Leu - Gln - Phe - Pro

Composition : Glu , Pro , Leu , Phe 1,1 1,0 1,0 0,9

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Leu

Hydrazinolyse :

L'action de l'hydrazine sur le peptide T-9-Th-2 conduit à l'identification de la proline à l'extrémité COOH-terminale de ce peptide.

Ces résultats, joints aux éléments de structure déjà connus pour le peptide T-9, permettent d'établir la séquence : Leu – Gln – Phe – Pro.

La position du résidu de proline par rapport au résidu de phénylalanine explique l'absence de coupure de la liaison Gln – Phe lors de l'hydrolyse du peptide T-9 par la thermolysine.

Cette résistance à l'hydrolyse par la thermolysine procède du changement conformationnel de la chaîne peptidique induit par la proline et son analogie est évidente avec la résistance des liaisons X – Pro et Y – Pro à l'action hydrolytique respective de la trypsine et de la chymotrypsine.

<u>T-9-Th-3</u> : Val - Gly - Arg

Composition : Gly , Val , Arg 1,0 0,9 1,0

Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal : DNS - Val.

Ce peptide occupe la partie COOH-terminale du peptide T-9 où la position COOH-terminale de l'arginine découle de la spécificité de la trypsine.

Peptide T-10 (résidus 30 à 32) :

Val - His - Arg

Le peptide T-10 est obtenu pur dans la fraction 17.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Val.
ont déterminé la séquence de ce peptide. ۲ys Ω Peptide Peptide résiduel nous a permis d'établir la séquence Leu résiduel nous a permis d'établir la séquence du peptide T-10, été établie après hydrolyse totale du peptide T-12 par l'aminopeptidase M. Peptide Gly ì Gly -Leu I T-12 (résidus Cinq cycles de dégradation Dégradation de Edman Dansylamino-acide NH2-terminal : di DNS La présence d'un résidu d'asparagine et d'un résidu d'acide glutamique Б С T-11 (résidus ē Un cycle Dégradation de Edman : Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Leu. Un cycle de Asn ~ Dégradation de Edman 8 peptide I-12 est obtenu pur dans la fraction 15. Asn – Arg peptide T-11 T-12a (résidus 37 Tyŗ Tyr de dégradation de Edman suivi 8 36 à Ala ယ ယ dégradation Ala Q٢ est obtenu pur dans la fraction 14. R. 42) : 35 ດ ເ à 42) : Glu - Arg •• •• - Arg de Edman suivi de la dansylation du peptide de Edman utilisée du peptide T-11. de la dansylation du peptide - Lys. en méthode soustractive

- 91

1

	Asp,	Glu ,	Gly ,	Ala ,	Tyr ,	Lys,	Arg
Composition :	0,8	1,0	1,2	0,8	0,7	1,1	1,0
ler cycle	0,8	1,0	1,2	0,8	0,7	0,2	1,0
2ème cycle	0,8	1,0	0,3	0,8	0,7	-	1,0
3ème cycle	0,2	1,0	-	1,0	1,0	-	1,0
4ème cycle	-	1,0	-	1,0	0,2	-	1,0
5ème cycle	-	1,0	-	0,2	-	-	1,0

Hydrolyse par la carboxypeptidase B :

L'action de la carboxypeptidase B, pendant 2 heures à 40°C, libère uniquement de l'arginine.

Le peptide T-12a est obtenu pur dans la fraction 11.

Composition : Asp , Glu , Gly , Ala , Tyr , Arg 1,0 0,9 1,2 1,0 1,1 1,0

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Gly.

Dégradation de Edman :

Quatre cycles de dégradation de Edman utilisée en méthode soustractive, ont permis d'établir la séquence du peptide T-12a.

	Asp ,	Glu ,	Gly ,	Ala ,	Tyr ,	Arg
Composition :	1,0	0,9	1,2	1,0	1,1	1,0
ler cycle	1,0	0,9	0,3	1,0	1,1	1,0
2ème cycle	0,2	0,9	-	1,0	1,1	1,0
3ème cycle	-	0,9	-	1,0	0,1	1,0
4ème cycle	-	0,9	-	0,2	-	1,0

La résistance partielle de la liaison Lys - Gly à l'hydrolyse trypsique 36 37 s'explique par la présence d'une liaison adjacente Arg - Lys comme l'ont démontré les études ultérieures réalisées sur les peptides trypsiques de l'ALK-histone maléylée et sur les peptides chymotrypsiques de l'histone native ou maléylée. Peptide T-14 (résidus 72 à 74) :

Asp - Asn - Lys

Le peptide T-14 est obtenu pur dans la fraction 5.

La présence d'un résidu d'acide aspartique et d'un résidu d'asparagine a été établie après hydrolyse totale du peptide T-14 par l'aminopeptidase M.

Dégradation de Edman :

Deux cycles de dégradation de Edman avec identification directe du PTH-amino-acide libéré après chaque cycle (71) ont permis d'établir la séquence du peptide T-14.

Peptide T-16 (résidus 78 à 81) :

Ile - Ile - Pro - Arg

Le peptide T-16 est localisé dans la fraction 12 avec le peptide Thr-Arg (peptides T-7 et T-15) dont il est séparé en chromatographie préparative sur papier.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Ile.

Dégradation de Edman :

Deux cycles de dégradation de Edman en couplage avec la méthode de dansylation ont permis d'établir la séquence du peptide T=16. La DNS – lle a été identifiée en chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de gel de silice avec les solvants 1 et 2 décrits par GROS et LABOUESSE (66).

Peptide T-17 (résidus 82 à 88) :

His - Leu - Gln - Leu - Ala - Ile - Arg

Le peptide T-17 est obtenu pur dans la fraction 16.

La présence d'un résidu de glutamine a été établie par hydrolyse totale du peptide T-17 par l'aminopeptidase M.

# Dégradation de Edman :

La dégradation de Edman, utilisée en méthode soustractive, n'a pu être poursuivie au-delà du second cycle et a déterminé la séquence NH<sub>2</sub>terminale His – Leu.

	Glu ,	Ala ,	lle ,	Leu ,	His,	Arg
Composition :	1,4	1,1	1,1	1,9	1,0	1,0
ler cycle	1,4	1,1	1,0	1,9	0,1	1,0
2ème cycle	1,3	1,0	0,9	1,1	-	1,0

Le blocage de la dégradation récurrente suggère que le résidu de glutamine est placé immédiatement après la leucine.

# Hydrolyse chymotrypsique du peptide T-17 :

L'hydrolyse chymotrypsique du peptide T-17, pendant 3 heures, à 37°C et à pH 8,0, libère 2 peptides T-17-Ch-1 et T-17-Ch-2 séparés en chromatographie préparative sur papier.

<u>T-17-Ch-1</u>: His - Leu - Gln - Leu <u>Composition</u>: Glu , Leu , His 1,1 2,0 0,7

Ce peptide occupe la partie NH<sub>2</sub>-terminale du peptide T-17. La position COOH-terminale de la leucine, qui découle de la spécificité de la chymotrypsine, a été confirmée par l'hydrazinolyse.

```
<u>T-17-Ch-2</u>:
Ala - Ile - Arg
<u>Composition</u>: Ala , Ile , Arg
1,1 0,9 1,0
<u>Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal</u>: DNS - Ala.
```

Ce peptide occupe la partie COOH-terminale du peptide T-17 où la position COOH-terminale de l'arginine découle de la spécificité de la trypsine.

L'ensemble des résultats fournis par la dégradation de Edman et l'hydrolyse chymotrypsique permet d'établir la séquence du peptide T-17.

Peptide T-18 (résidus 89 à 95) :

Asn - Asp - Glu - Glu - Leu - Asn - Lys

Le peptide T-18 est obtenu pur dans la fraction 4.

La présence d'un résidu d'acide aspartique, de deux résidus d'asparagine et de deux résidus d'acide glutamique a été établie par hydrolyse totale du peptide T-18 par l'aminopeptidase M.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Asp.

Dégradation de Edman :

Deux cycles de dégradation de Edman utilisée en méthode soustractive, ont permis de déterminer la séquence NH<sub>2</sub>-terminale : Asx - Asx.

	Asp	, Glu	, Leu	, Lys
Composition :	3,0	1,8	1,0	1,0
ler cycle	2,0	2,0	1,0	1,0
2ème cycle	1,4	2,0	0,9	1,0

Deux cycles de dégradation de Edman, avec identification directe du PTH-amino-acide libéré après chaque cycle (71), ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale : Asn - Asp du peptide T-18.

Hydrolyse par la thermolysine :

L'hydrolyse du peptide T-18 par la thermolysine pendant 6 heures à 40°C avec 0,05 mg d'enzyme par µmole de peptide, libère deux peptides : T-18-Th-1 et T-18-Th-2 séparés en électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6.

T-18-Th-1 :

Asn - Asp - Glu - Glu

Composition : Asp , Glu 2,0 2,0

Ce peptide recouvre la séquence NH<sub>2</sub>-terminale Asn – Asp du peptide T-18 établie par la dégradation de Edman. Sa structure est évidente.

T-18-Th-2 :

Leu - Asn - Lys

Composition: Asp, Leu, Lys 0,9 0,9 1,0

Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal : DNS - Leu

La position NH<sub>2</sub>-terminale de la leucine correspond à la spécificité de la thermolysine, tandis que la position COOH-terminale de la lysine découle de la spécificité de la trypsine.

L'hydrolyse du peptide T-18-Th-2 par l'aminopeptidase M confirme la présence d'un résidu d'asparagine que la migration du peptide en électrophorèse et les résultats déjà acquis sur le peptide T-18 avaient montrée.

L'ensemble des résultats fournis par la dégradation de Edman et l'hydrolyse du peptide T-18 par la thermolysine ont permis d'établir la séquence du peptide T-18.

Nous avons pu constater au cours de l'étude de la structure du peptide T-18 la résistance de la liaison leucyleà l'action de la chymotrypsine pendant 3 heures à 37°C. Cette résistance s'explique par la proximité de la charge négative portée par le résidu d'acide glutamique adjacent au résidu de leucine, et de la charge négative portée par le résidu de lysine en position COOH-terminale (87).

### Peptide T-19 (résidus 96 à 99) :

Leu - Leu - Gly - Lys

Ce peptide est localisé dans la fraction 10 avec le peptide T-8 dont il est séparé en chromatographie préparative sur papier.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Leu.

Dégradation de Edman :

Un cycle de dégradation de Edman suivi de la dansylation du peptide résiduel a suffi pour déterminer la séquence du peptide T-19.

Peptide T-21 (résidus 119 à 125) :

Lys - Thr - Glu - Ser - His - His - Lys

Le peptide T-21 est obtenu pur dans la fraction 18.

La séparation des amino-acides basiques dans les conditions requises pour séparer la lysine de ses dérivés E-N-méthylés nous a permis de conclure à l'absence de dérivés E-N-méthylés de la lysine dans le peptide T-21.

La présence d'un résidu d'acide glutamique a été établie après hydrolyse totale du peptide T-21 par l'aminopeptidase M.

Dansylamino-acide NH2-terminal : di DNS - Lys.

Dégradation de Edman :

Quatre cycles de dégradation de Edman utilisée en méthode soustractive ont permis de déterminer la séquence NH<sub>2</sub>-terminale : Lys - Thr - Glu - Ser.

	Thr ,	Ser ,	Glu ,	His ,	Lys
Composition :	1,2	1,0	1,1	2,0	2,0
ler cycle	1,0	0,9	1,0	2,0	1,1
2ème cycle	0,1	0,9	1,0	2,0	1,0
3ème cycle	<b>CBC</b>	0,9	0,2	2,0	1,0
4ème cycle	-	0,1		2,0	1,0

# Hydrolyse par les carboxypeptidases A et B :

L'hydrolyse du peptide T-21 par le mélange carboxypeptidase A et carboxypeptidase B libère en 3 heures 1 µmole de lysine et 1,8 µmoles d'histidine par µmole de peptide.

Ces résultats donnent pour le peptide T-21 la séquence COOHterminale : His - His - Lys.

L'ensemble des résultats fournis par la dégradation de Edman et par l'hydrolyse du peptide avec les carboxypeptidases A et B conduit à la séquence : Lys – Thr – Glu – Ser – His – His – Lys.

La résistance de la liaison Lys – Thr à l'hydrolyse trypsique s'explique 119 120 par la proximité d'une charge négative portée par le résidu 121 d'acide glutamique adjacent au résidu de thréonine (93).

# Lysine libre :

La lysine libre est obtenue pure dans la fraction 6 (figure 9). Elle résulte de l'hydrolyse partielle de la liaison Lys - Gly dans le peptide T-12 et de l'hydrolyse totale de la liaison Lys - Lys mise en évidence par le peptide 74 75 Tm-10 (Tableau XXIV page 102).

# Discussion :

La composition en amino-acides de l'ALK-histone indique 26 sites potentiels (14 lysine et 12 arginine) susceptibles à l'action de la trypsine : 26 peptides trypsiques devraient donc théoriquement être obtenus puisque un résidu de lysine est à l'extrémité COOH-terminale de la protéine. En fait, la fraction soluble de l'hydrolysat trypsique de l'ALK-histone contient 17 peptides et de la lysine libre : la plupart de ces peptides sont des di-, tri- ou tétrapeptides (Tableaux XXI et XXII).

Sur la base d'un rendement de 100 p.100 pour le peptide NH<sub>2</sub>-terminal N-acétyl – Ser – Gly – Arg, l'obtention des peptides Gly – Lys, Ala – Lys et Thr – Arg avec des rendements de 155 p.100, 234 p.100 et 175 p.100 respectivement, suggère que ces peptides doivent être respectivement présents deux fois, trois fois et deux fois dans la molécule d'ALK-histone. HAYASHI et IWAI (48) ont obtenu ces peptides avec des rendements comparables.

L<sup>a</sup>obtention des peptides trypsiques Tm-2, Tm-3 et Tm-10 (Tableau XXIV page 102) et du peptide chymotrypsique Ch-14 (Tableau XXVI page 112) où apparaissent ces répétitions de séquences, rend compte de ces rendements élevés.

# 2) Peptides trypsiques solubles de l'ALK-histone maléylée

En milieu tamponné de pH 8,0, l'addition de TPCK-trypsine à la solution d'ALK-histone maléylée ne se traduit pas par l'apparition immédiate d'un précipité à l'inverse de ce que nous avons constaté lors de l'hydrolyse trypsique de l'ALK-histone native.

Le milieu réactionnel reste limpide pendant toute la durée de l'hydrolyse. L'arrêt de l'hydrolyse est obtenu par abaissement du pH à 3,5. L'acidification de l'hydrolysat entraîne la démaléylation des groupes & -aminés de la lysine et l'apparition d'une fraction insoluble qui est éliminée par centrifugation.

Cette fraction insoluble rend compte du déficit observé dans la composition en amino-acides des peptides solubles de l'hydrolysat trypsique de l'ALKhistone maléylée, par rapport à la composition en amino-acides de la protéine (Tableau XXIII).

Le diagramme d'élution des peptides trypsiques de l'ALK-histone maléylée, fractionnés sur colonne de Chromobeads P, est présenté dans la figure 10 et montre la séparation des peptides en 13 fractions qui correspondent chacune à un seul peptide. Les fractions indiquées par des traits pleins sont numérotées suivant l'ordre d'élution de la colonne. Les peptides trypsiques de l'ALK-histone maléylée sont désignés par Tm et numérotés suivant leur position dans la séquence de la protéine (Tableau XXXV page 164).

La composition et la séquence en amino-acides de chaque peptide sont respectivement présentées dans les tableaux XXIII et XXIV.



TABLEAU XXIII

# COMPOSITIONS EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES DE LA FRACTION SOLUBLE

# DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE DE L'ALK-HISTONE MALEYLEE

(exprimées en rapports molaires par rapport à l'arginine)(★)

ALK – hîstone	∞	2	4	12	5	14	17	8	9	16	ო	-	14	4	12	129
Nb total de résidus	7	4	4	6	4		6	2	5	11	-	-	14	4	1	100
Tm-13	3,8(4)	2,0(2)	1, 1(1)	5,2(5)	2,2(2)	4,3(4)	3, 4(3)	2,8(3)	2,0(2)	5,8(6)			6,9	2,0	-	41
Tm-12				1, 1(1)			1, 1(1)		0,9(1)	2,0(2)				0,9(1)	1,0(1)	7
Tm - 11 (★★)	Ţ				1,1(1)				1,7(2)						1,0(1)	4
Tm-10	2, 1(2)	1,0(1)				_							1,7(2)		1,0(1)	Ŷ
Tm-8	1,1(1)			1,1(1)		1,1(1)	1,0(1)				1,0(1)		1,1(1)		1,0(1)	7
Tm −7										2,0(2)					1,0(1)	
Tm-Ó								1,0(1)						0,9(1)	1,0(1)	e
Tm -5				1,0(1)	1,0(1)	1,8(2)	0,9(1)	0,8(1)		0,9(1)		0, 8(1)			1,0(1)	6
Tm-4			1,6(2)				-								1,0(1)	e
Tm-3		0,9(1)					1,9(2)						2,0(2)		1,0(1)	6
Tm-2				0,9(1)		2,6(3)	1,0(1)						2,0(2)		1,0(1)	ω
Tm = 1		<u>kak or n</u> akona	1,0(1)	<u> </u>		1,0(1)					<u>1 -                                   </u>				1,0(1)	e
Amino-acides	Acide aspartique	Thréonine	Sérine	Acide glutamique	Proline	Glycine	Alanine	Valine	lsoleucine	Leucine	Tyrosine	Phénylalanine	Lysine	Histidine	Arginine	Nombre de résidus

(★★) La valeur de l'isoleucine est obtenue à partir d'un hydrolysat de 72 h du peptide Tm-11 。 (\*) Les chiffres en parenthèses correspondent au nombre de résidus assumés.

BUS LILLE

- 101 -

Tm∽l (résidus là 3)	N-acétyl - Ser - Gly - Arg
Tm-2 (résidus 4 à 11)	Gly - Lys - Gln - Gly - Gly - Lys - Ala - Arg
Tm-3 (résidus 12 à 17)	Ala - Lys - Ala - Lys - Thr - Arg
Tm-4 (résidus 18 à 20)	Ser – Ser – Arg
Tm=5 (résidus 21 à 29)	Ala – Gly – Leu – Gln – Phe – Pro – Val – Gly – Arg
Tm-6 (résidus 30 à 32)	Val – His – Arg
Tm-7 (résidus 33 à 35)	Leu – Leu – Arg
Tm-8 (résidus 36 à 42)	Lys - Gly - Asn - Tyr - Ala - Glu - Arg
Tm-10 (résidus 72 à 77)	Asp - Asn = Lys - Lys - Thr - Arg
Tm-11 (résidus 78 à 81)	lle - lle - Arg
Tm-12 (résidus 82 à 88)	His – Leu – Gln – Leu – Ala – Ile – Arg
Tm-13 (résidus 89 à 129)	Asn - Asp - Glu - Glu - Leu - Asn - Lys - Leu - Leu - Gly -
	Lys -(Val , Thr , Ile , Ala , Gln , Gly , Gly , Val , Leu ,
	Pro , Asn , Ile , Gln , Ala , Val , Leu , Leu , Pro , Lys)(Lys -
	Thr - Glu - Ser - His - His - Lys), (Ala - Lys) - Gly - Lys(OH)

TABLEAU XXIV

÷

BUS

.

- 102 -

La maléylation de la fonction & -aminée de la lysine limite la spécificité de la trypsine à la liaison arginyl - X (X = tous les amino-acides sauf la proline). Dans les peptides trypsiques de la protéine maléylée, le résidu d'arginine se trouve donc en position COOH-terminale.

Peptide Tm-1 (résidus 1 à 3) :

N-acétyl - Ser - Gly - Arg

Ce peptide est obtenu pur dans la fraction 1.

Le peptide Tm-1 correspond au peptide T-1 en position NH<sub>2</sub>-terminale dans l'ALK-histone.

Peptide Tm-2 (résidus 4 à 11) :

Gly - Lys - Gln - Gly - Gly - Lys - Ala - Arg

Ce peptide est obtenu pur dans la fraction 13.

La présence d'un résidu de glutamine a été établie après hydrolyse totale du peptide Tm-2 par l'aminopeptidase M

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Gly.

Dégradation de Edman :

Un cycle de dégradation de Edman suivi de la dansylation du peptide résiduel nous a permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale Gly - Lys.

La composition en amino-acides du peptide Tm-2 et les données de la dégradation de Edman font ressortir le recouvrement des peptides T-2, T-3 et T-4 par le peptide Tm-2 et permettent de placer ces peptides suivant la séquence T-2 - T-3 - T-4 d'une façon non é**q**uivoque.

← T-2 → T-3 → T-4 → Gly - Lys - Gln - Gly - Gly - Lys - Ala - Arg ← Tm-2 → Peptide Tm-3 (résidus 12 à 17) :

Ala - Lys - Ala - Lys - Thr - Arg

Le peptide Tm-3 est obtenu pur dans la fraction 14.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Ala.

Dégradation de Edman :

Quatre cycles de dégradation de Edman, en couplage avec la méthode de dansylation, ont permis d'établir la séquence du peptide Tm-3.

Le peptide Tm-3 recouvre les peptides T-5, T-6 et T-7. Il est caractérisé par la répétition de la séquence Ala – Lys.

← T-5 → T-6 → T-7 → Ala - Lys - Ala - Lys - Thr - Arg ← Tm-3 →

Peptide Tm-4 (résidus 18 à 20) :

Ser – Ser – Arg

Le peptide Tm-4 est obtenu pur dans la fraction 5.

Le peptide Tm-4 correspond au peptide T-8.

Peptide Tm-5 (résidus 21 à 29) :

Ala – Gly – Leu – Gln – Phe – Pro – Val – Gly – Arg

Ce peptide est obtenu pur dans la fraction 4.

Le peptide Tm-5 correspond au peptide T-9.

Un peptide Tm-5a, de caractère moins basique que Tm-5 et de composition identique, est présent dans la fraction 3. L'existence de ce peptide s'explique par la désamidation partielle du résidu de glutamine dans le peptide Tm-5.

Peptide Tm-6 (résidus 30 à 32) :

Val – His – Arg

Le peptide Tm-6, localisé dans la fraction 12, est purifié par chromatographie préparative sur papier.

Le peptide Tm-6 correspond au peptide T-10.

Peptide Tm-7 (résidus 33 à 35) :

Leu - Leu - Arg

Ce peptide est obtenu pur dans la fraction 7. Le peptide Tm-7 correspond au peptide T-11.

Peptide Tm-8 (résidus 36 à 42) :

Lys - Gly - Asn - Tyr - Ala - Glu - Arg

Ce peptide est obtenu pur dans la fraction 9. Le peptide Tm-8 correspond au peptide T-12.

Peptide Tm-10 (résidus 72 à 77) :

Asp - Asn - Lys - Lys - Thr - Arg

Ce peptide est obtenu pur dans la fraction 8.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Asp.

Dégradation de Edman :

Un cycle de dégradation de Edman suivi de la dansylation du peptide résiduel détermine la séquence NH<sub>2</sub>-terminale : Asx - Asx.

La composition du peptide Tm-10 et les données de la dégradation de Edman nous permettent de conclure que le peptide Tm-10 recouvre les peptides T-14 et T-15.

L'obtention du peptide Tm-10 met en évidence une liaison Lys - Lys, qui est coupée au cours de l'hydrolyse trypsique de l'ALK-histone native.

 $\begin{array}{c|c} & \hline & T-14 \\ \hline & F \\ Asp - Asn - Lys - Lys - Thr - Arg \\ \hline & \hline & Tm-10 \\ \hline \end{array}$ 

# Peptide Tm-11 (résidus 78 à 81) :

Ile - Ile - Pro - Arg Ce peptide est obtenu pur dans la fraction 6. Le peptide Tm-11 correspond au peptide T-16.

Peptide Tm-12 (résidus 82 à 88) :

His - Leu - Gln - Leu - Ala - Ile - Arg

Ce peptide est obtenu pur dans la fraction 10. Le peptide Tm-12 correspond au peptide T-17.

Peptide Tm-13 (résidus 89 à 129) :

Asn - Asp - Glu - Glu - Leu - Asn - Lys - Leu - Leu - Gly - Lys - (Val, Thr, Ile., Ala, Gln, Gly, Gly, Val, Leu, Pro, Asn, Ile, Gln, Ala, Val, Leu, Leu, Pro, Lys) (Lys - Thr - Glu - Ser - His - His - Lys), (Ala - Lys) -Gly - Lys(OH).

Le peptide Tm-13 est obtenu pur dans la fraction 11.

Parmi tous les peptides trypsiques solubles de l'ALK-histone maléylée élués de la colonne de Chromobeads P, le peptide Tm-13 est le seul à ne pas donner de réaction positive avec le réactif de Sakaguchi, spécifique de l'arginine. L'analyse des amino-acides du peptide Tm-13 confirme l'absence d'arginine.

La maléylation limite la spécificité de la trypsine à la liaison arginyle: le peptide Tm-13, qui est le seul peptide trypsique de l'ALK-histone maléylée à ne pas contenir d'arginine, doit donc se trouver en position COOHterminale dans la protéine.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Asp.

La composition en amino-acides du peptide Tm-13 est caractérisée par un taux élevé de résidus hydrophobes (14 résidus), de résidus acides (9 résidus) et de résidus basiques (9 résidus).

Le peptide Tm-13 recouvre nécessairement les peptides T-18, T-19,

T-21, T-22 et T-23 isolés de la fraction soluble de l'hydrolysat trypsique de l'ALK-histone native.

La structure complète du peptide Tm-13 a été déduite de l'étude des peptides trypsiques mentionnés plus haut et des peptides obtenus par hydrolyse de l'ALK-histone avec la thermolysine.

L'obtention du peptide Tm-13 implique la coupure de la liaison Arg – Asn par la trypsine. Cette liaison a été trouvée résistante à la trypsine par 88 SUGANO <u>et al</u> (92) qui ont effectué l'hydrolyse trypsique de l'ALK-histone pendant 3 heures à 37°C et pH 8,0.

# Discussion

La maléylation du groupe *e*-aminé des 14 résidus de lysine présents dans l'ALK-histone limite l'hydrolyse trypsique aux 12 liaisons arginyle: 13 peptides devraient donc théoriquement être obtenus. En fait, la fraction soluble de l'hydrolysat trypsique de l'ALK-histone contient 12 peptides (Tableaux XXIII et XXIV). Parmi ceux-ci, 8 peptides : Tm-1, Tm-4, Tm-5, Tm-6, Tm-7, Tm-8, Tm-11 et Tm-12 ont leur équivalent dans la fraction soluble de l'hydrolysat trypsique de la protéine native.

Les autres peptides : Tm-2, Tm-3, Tm-10 et Tm-13 présentent un grand intérêt, par les recouvrements qu'ils procurent pour les peptides trypsiques solubles de l'ALK-histone native.

L'obtention de ces 4 peptides constitue l'avantage essentiel de la maléylation de l'ALK-histone. Un autre avantage de la maléylation réside dans l'obtention des peptides trypsiques avec un bon rendement.

L'étude de la fraction soluble de l'hydrolysat trypsique de l'ALKhistone maléylée fait ressortir un déficit de 29 résidus d'amino-acides – dont un résidu d'arginine – par rapport au nombre total de résidus. Ces 29 résidus, de caractère hydrophobe pour la plupart, correspondent au peptide Tm-9 et lui confèrent son insolubilité.

Ce peptide insoluble apparaît également durant l'hydrolyse trypsique de l'ALK-histone native (peptide T-13). Il correspond vraisemblablement au "core" isolé par BUTLER, JOHNS et PHILLIPS (94) d'un hydrolysat trypsique de la fraction F<sub>2a2</sub> et caractérisé par un poids moléculaire d'environ 3.000, un taux élevé d'amino-acides hydrophobes et la présence d'un résidu de valine à l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale. L'addition de chymotrypsine à la solution d'ALK-histone en milieu tamponné de pH 8,0 se traduit par l'apparition immédiate d'un précipité abondant, qui persiste pendant toute la durée de l'hydrolyse (2 heures à 37°C). L'acidification de l'hydrolysat jusqu'à pH 3,5 pour l'arrêt de l'hydrolyse, entraîne la dissolution du précipité.

Après lyophilisation, l'hydrolysat est repris dans un faible volume d'acide formique à 30 p.100, pour la chromatographie d'échange d'ions. A ce stade apparaît une fraction insoluble qui est éliminée par centrifugation. Cette fraction insoluble rend compte du déficit en amino-acides qui ressort de la comparaison de la composition en amino-acides de la protéine avec celle des peptides solubles de l'hydrolysat chymotrypsique (tableau XXV).

Le diagramme d'élution des peptides chymotrypsiques solubles de l'ALK-histone native, fractionnés sur colonne de Chromobeads P, est présenté dans la figure 11, et montre la séparation des peptides en cinq fractions. Les fractions indiquées par des traits pleins sont numérotées suivant leur ordre d'élution de la colonne. Les peptides chymotrypsiques sont désignés par Ch-, et numérotés suivant leur position dans la séquence de la protéine (tableau XXXV page 164).

La composition et la séquence en amino-acides de chaque peptide sont respectivement présentées dans les tableaux XXV et XXVI.

Peptide Ch-2 (résidus 18 à 23) :

Ser – Ser – Arg – Ala – Gly – Leu

Ce peptide est obtenu pur dans la fraction 4.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Ser.

Dégradation de Edman :

La dégradation de Edman, utilisée en méthode soustractive a permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale : Ser - Ser - Arg - Ala.



# TABLEAU XXV

# COMPOSITIONS EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES SOLUBLES DE L'ALK-HISTONE NATIVE

Amino-acides	Ch-2	Ch-3	Ch-4	Ch-5	Ch-11	Ch-14	Nb total de résidus	ALK- histone
Acide aspartique				0,8(1)	2,5 ( <b>3</b> )		4	8
Thréonine								5
Sérine	1,9(2)						2	4
Acide glutamique		1,2(1)			2,0(2)		3	12
Proline		1,0(1)					1	5
Glycine	1,0(1)	1,1(1)		1,0(1)		1,0(1)	4	14
Alanine	1,1(1)				1,1(1)	1,0(1)	3	17
Valine		1,8(2)					2	8
lsoleucine					0,9(1)		1	6
Leucine	1,0(1)		1,0(1)		2,0(2)		4	16
Tyrosine				0,8(1)			1	3
Phénylalanine		1,0(1)					1	1
Lysine				1,0(1)	1,0(1)	2,8( <b>3</b> )	5	14
Histidine		0,9(1)					1	4
Arginine	1,0(1)	1,0(1)	1,0(1)	0,9(1)	1,1(1)		5	12
Nombre de résidus	6	8	2	5	11	5	37	129

(exprimées en rapports molaires) (\*)



(★) Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de résidus assumés.

TABLEAU XXVI DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES SOLUBLES DE L'ALK-HISTONE NATIVE (*)	Ser - Ser - Arg - Ala - Gly - Leu	Glp - Phe - Pro - Val - Gly - Arg - Val - His	Arg - Leu	Arg – Lys – Gly – Asn – Tyr	Ala - Ile - Arg - Asn - Asp - Glu - Glu - Leu - Asn - Lys - Leu	Lys - Ala - Lys - Gly - Lys(OH)	olacés au-dessus ou en-dessous des résidus d'amino-acides est présentée dans	e. de 3 GIn – Phe – Pro – Val – Gly – Arg – Val – His par cyclisation de la tamique.
EN AMINO-ACIDES [	(résidus 18 à 23)	★★) (résidus 24 à 31)	(résidus 32 à 33)	(résidus 35 à 39)	(résidus 86 à 96)	(résidus 125 à 129)	a signification des signes : tableau IX page 41.	lp : acide pyroglutamique e peptide dérive du pepti lutamine en acide pyroglu
SEQUENCES	Ch-2	Ch-3 (;	Ch-4	Ch-5	Ch-11	Ch-14	(★) Lc le	

		Ser ,	Gly ,	Ala ,	Leu ,	Arg
Composition	0 0	1,9	1,0	1,1	1,0	1,0
ler cycle		1,3	1,0	1,1	1,0	1,0
2ème cycle		0,7	1,0	1,1	1,0	1,0
3ème cycle		0,7	1,0	1,0	1,0	0,6
4ème cycle		0,6	1,0	0,6	1,0	0,5

Hydrolyse par la carboxypeptidase A :

L'action de la carboxypeptidase A, pendant 2 heures à 37°C, libère uniquement de la leucine.

L'ensemble de ces résultats détermine la séquence du peptide Ch-2. Le peptide Ch-2 recouvre le peptide Tm-4 et la partie NH<sub>2</sub>-terminale du peptide Tm-5 et permet ainsi d'établir la séquence partielle présentée ci-dessous.

La présence du peptide trypsique Tm-4 en position NH<sub>2</sub>-terminale dans le peptide Ch-2 implique la coupure d'une liaison Arg - Ser au cours de l'hydrolyse chymotrypsique de l'ALK-histone. Cette coupure unique, de type trypsique, doit être attribuée à la susceptibilité particulière de la liaison Arg - Ser, à l'action de la chymotrypsine, ainsi qu'à l'environnement de cette liaison.

L'hypothèse de l'existence d'une "activité trypsique" dans le lot de chymotrypsine utilisé pour l'hydrolyse est à écarter en raison de l'utilisation d'une chymotrypsine traitée par le TLCK (\*), de l'obtention du peptide Ch-2 avec un bon rendement et de l'unicité de la coupure.

<u>Peptide Ch-3 (résidus 24 à 31)</u> : Glp – Phe – Pro – Val – Gly – Arg – Val – His

(★) TLCK : N-Tosyl-L-Lysine-Chlorométhyl-Kétone.

Le peptide Ch-3 est obtenu pur dans la fraction 2.

Ce peptide n'est pas décelable par la réaction à la ninhydrine et présente une faible réaction avec le réactif de Sakaguchi. Il est toutefois aisément localisé dans l'éluat de la colonne par la réaction de Pauly.

La cyclisation de la glutamine en acide pyroglutamique explique à la fois l'absence d'un groupe «-aminé libre et le caractère neutre du peptide souligné par son comportement sur l'échangeur d'ions et en électrophorèse sur papier à pH 3,6.

Hydrazinolyse :

L'action de l'hydrazine sur le peptide Ch-3 permet d'identifier l'histidine en position COOH-terminale.

# Hydrolyse trypsique :

L'hydrolyse du peptide Ch-3 par la TPCK-trypsine pendant 4 heures à 37°C et pH 8,0 libère deux peptides : Ch-3-T-1 et Ch-3-T-2, séparés en électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6.

<u>Ch-3-T-1 (résidus 24 à 29)</u> Glp - Phe - Pro - Val - Gly - Arg <u>Composition</u> : Glu , Pro , Gly , Val , Phe , Arg 1,1 1,0 1,1 1,0 0,9 1,0

Ce peptide ne donne pas de réaction avec la ninhydrine. Il est localisé sur l'électrophorégramme par la réaction à la phénanthrène-quinone spécifique de l'arginine.

<u>Ch-3-T-2 (résidus 30 et 31)</u> Val - His <u>Composition</u> : Val , His 1,0 0,7 <u>Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal</u> : DNS - Val. Les données de l'hydrolyse et la spécificité de la trypsine déterminent Le peptide Ch-3 qui renferme le seul résidu de phénylalanine présent dans l'ALK-histone, correspond nécessairement au peptide T-9 dont il recouvre la partie COOH-terminale. Le peptide Ch-3 recouvre également la partie NH<sub>2</sub>-terminale du peptide T-10 et détermine la séquence partielle présentée ci-dessous :

L'obtention du peptide Ch-3 implique la coupure de la liaison histidyle par la chymotrypsine dont l'action à ce niveau reste cependant peu fréquente.

Il faut noter enfin, que le résidu de phénylalanine est engagé dans une liaison Phe – Pro qui n'est pas hydrolysée par la chymotrypsine.

Peptide Ch-4 (résidus 32 et 33) :

Arg - Leu

Le peptide Ch-4 est obtenu pur dans la fraction 5.

Dansylamino-acide NH2-terminal ; DNS - Arg.

Peptide Ch-5 (résidus 35 à 39) :

Arg - Lys - Gly - Asn - Tyr

Le peptide Ch-5 est localisé dans la fraction 6 avec le peptide Ch-14 dont il est séparé par électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Arg.

Dégradation de Edman :

Trois cycles de dégradation de Edman, en couplage avec la méthode de dansylation, ont permis d'établir la séquence du peptide Ch-5.

Le peptide Ch-5 recouvre la partie NH<sub>2</sub>-terminale du peptide T-12 en déterminant la séquence partielle présentée ci-dessous.

La présence de la liaison Arg – Lys, mise en relief par le peptide Ch-5, explique l'obtention dans l'hydrolysat trypsique de l'AL-histone native du peptide T-12a Gly – Asn – Tyr – Ala – Glu – Arg, à côté du peptide T-12 Lys – Gly – Asn – Tyr – Ala – Glu – Arg.

Peptide Ch-11 (résidus 86 à 96) :

Ala - Ile - Arg - Asn - Asp - Glu - Glu - Leu - Asn - Lys - Leu

Le peptide Ch-11 est obtenu pur dans la fraction 3.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Ala.

Dégradation de Edman :

Trois cycles de dégradation de Edman utilisée en méthode soustractive ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale : Ala - Ile - Arg.

	Asp ,	, Glu ,	, Ala	, lle ,	Leu	, Lys ,	Arg
Composition :	2,5	2,0	1,1	0,9	2,0	1,0	1,0
ler cycle	2,5	2,0	0,1	0,9	2,0	N.D.*	1,0
2ème cycle	2,5	2,0	-	0	2,0	N.D.	1,0
3ème cycle	2,5	2,0	-	-	2,0	N.D.	0

Hydrazinolyse :

L'action de l'hydrazine sur le peptide Ch-11 conduit à l'identification de la leucine à l'extrémité COOH-terminale de ce peptide.

Le reste de la séquence du peptide Ch-11 a été déduit de l'étude du peptide T-18. Par les trois résidus d'acide aspartique et les deux résidus d'acide (\*) N.D. = non déterminée. glutamique qui caractérisent sa composition en amino-acides, le peptide Ch-11 correspond nécessairement au peptide trypsique T-18.

La séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide Ch-11 : Ala - Ile - Arg correspond à la séquence COOH-terminale du peptide trypsique T-17, tandis que la partie COOH-terminale du peptide Ch-11 recouvre totalement le peptide T-18.

L'ensemble de ces résultats détermine la séquence partielle présentée dans le tableau XXVII.

Peptide Ch-14 (résidus 125 à 129) :

Lys - Ala - Lys - Gly - Lys

Ce peptide très basique est localisé dans la fraction 6 avec le peptide Ch-5 dont il est séparé en électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6.

Dansylamino-acide NH2-terminal : di-DNS - Lys.

Dégradation de Edman 🕴

Trois cycles de dégradation de Edman couplés avec la méthode de dansylation ont permis d'établir la séquence du peptide Ch-14.

Hydrazinolyse 3

L'action de l'hydrazine sur le peptide Ch-14 conduit à l'identification de la lysine en position COOH-terminale.

Le peptide Ch-14 recouvre les peptides trypsiques T-22 (Ala - Lys) et T-23 (Gly - Lys).

Comme l'utilisation de chymotrypsine traitée par le TLCK et l'obtention du peptide Ch-14 avec un haut rendement excluent la présence d'une "activité trypsique" dans la chymotrypsine, et par conséquent excluent une coupure trypsique au niveau du résidu de lysine-129, le peptide Ch-14 doit être le peptide chymotrypsique COOH-terminal de l'ALK-histone.

Ce résultat confirme la séquence COOH-terminale de l'ALK-histone : - Gly – Lys (OH) déterminée par une hydrolyse de la protéine avec la carboxypeptidase B suivie d'une hydrazinolyse. TABLEAU XXVII

SEQUENCE PARTIELLE DE 15 RESIDUS D'AMINO-ACIDES

DETERMINEE PAR L'OBTENTION DU PEPTIDE Ch-11



- 118 -

BUS

# 4) Peptides chymotrypsiques de l'ALK-histone maléylée

L'ALK-histone maléylée a été hydrolysée par la chymotrypsine à 40°C et pH 8,0, pendant 90 minutes. Aucune précipitation traduisant l'existence d'un "core", n'apparaît au cours de l'hydrolyse, contrairement à ce que nous avions observé au cours de l'hydrolyse chymotrypsique de l'histone native.

Toutefois, au cours de la démaléylation de l'hydrolysat apparaît une fraction insoluble qui est éliminée par centrifugation. Cette fraction insoluble rend compte du déficit en amino-acides qui ressort de la comparaison de la composition en amino-acides de la protéine avec celle des peptides solubles de l'hydrolysat chymotrypsique (tableau XXVIII).

Le diagramme d'élution des peptides chymotrypsiques solubles de l'ALK-histone maléylée, fractionnés sur colonne de "Chromobeads P" est présenté dans la figure 12, et montre la séparation des peptides en douze fractions.

La présence de nombreux peptides de caractère neutre, différencie ce diagramme de celui de l'hydrolysat chymotrypsique de l'ALK-histone native, fractionné dans les mêmes conditions.

Les fractions indiquées par des traits pleins sont numérotées suivant leur ordre d'élution de la colonne. Les peptides chymotrypsiques de l'ALKhistone maléylée indiqués par Chm- sont numérotés suivant leur position dans la séquence de la protéine (tableau XXXV page 164). La composition et la séquence en amino-acides de chaque peptide sont respectivement présentées dans les tableaux XXVIII et XXIX.

# Peptide Chm-3 (résidus 24 à 31) :

Glp - Phe - Pro - Val - Gly - Arg - Val - His -

Le peptide Chm-3 est obtenu pur dans la fraction 6. Il est identique au peptide Ch-3.



BUS LILLE

# TABLEAU XXVIII

# COMPOSITIONS EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES SOLUBLES

# DE L'ALK-HISTONE MALEYLEE

(exprimées en rapports molaires)(\*)

Amino-acides	Chm-3	Chm-4	Chm-5	Chm-6	Chm-7	Chm-8	Chm-9	Chm - 11	Nb tot <b>al</b> de résidus	ALK- histone
Acide aspartique			0,8(1)				2,8 (3)	2,8 (3)	7	8
Thréonine						1,0(1)	1,0(1)		2	5
Sérine										4
Acide glutamique	1,2(1)			1,1(1)	1,0(1)	1,2(1)	0,9(1)	2,0(2)	7	12
Proline	1,0(1)			1,0(1)					2	5
Glycine	1,1(1)		1,0(1)	1,8(2)			1,2(1)		5	14
Alanine				2,9 (3)	2,0(2)	1,1(1)	3,0(3)	1,1(1)	10	17
Valine	1,8 (2)			1,7 (2)	1,0(1)				5	8
Isoleucine						1,0(1)		0,8(1)	2	6
Leucine		2,0(2)		1,0(1)	1,0(1)	2,0(2)	1,0(1)	2,0(2)	9	16
Tyrosine			0,8(1)	0,8(1)	1,0(1)				3	3
Phénylalanine	1,0(1)								1	1
Lysine			1,0(1)		1		1,9 (2)	1,0(1)	4	14
Histidine	0,9(1)								1	4
Arginine	1,0(1)	1,0(1)	0,9(1)	1,0(1)			1,0(1)	0,9(1)	6	12
Nombre de résidus	8	3	5	12	6	6	13	11	64	129

- 121 -

(\*) Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de résidus assumés.

## TABLEAU XXIX

# SEQUENCES EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES SOLUBLES DE L'ALK-HISTONE MALEYLEE (\*)

n <b>m-3(★★)</b> (résidus 24 à	31) Glp -	Phe - Pro - Val - Gly - Arg - Val - His
nm-4 (résidus 32 à	34) Ārg -	Leu - Leu
nm-5 (résidus 35 à	39) Arg -	Lys - Gly - Asn - Tyr
nm-6 (résidus 40 à	51) Ala -	Glu - Arg - Val - Gly - Ala - Gly - Ala - Pro - Val - Tyr - Leu
nm-6 <b>o</b> ( <del>***</del> )(rêsidus 40	à 50)	$\overrightarrow{Glu} - \operatorname{Arg} \stackrel{In}{\underline{+}} \overrightarrow{Val} - \overrightarrow{Gly} - \operatorname{Ala} \stackrel{In}{\underline{+}} \overrightarrow{Gly} - \operatorname{Ala} - \operatorname{Pro} \stackrel{In}{\underline{+}} \operatorname{Val} - \underbrace{\operatorname{Tyr}}_{\underline{+}}$
nm-7 (rêsidus 52 à	57) Āla -	Ala - Val - Leu - Glu - <u>Tyr</u>
nm-7a (résidus 52 à	55) Ala -	Ala - Val - Leu
nm-7b (résidus 51 à	55) <u>Lev</u> -	Ala - Ala - Val - Leu
nm-8 (résidus 58 à	63)	Thr - Ala - Glu - Ile - Leu
nm-9( <del>****</del> )(résidus 64	à 76)	Leu - Ala - Gly - Asn -(Ala - Ala - Arg)- Asp - Asn - Lys - Lys - Thr
am-9 <b>a</b> (résidus 64 à	68) Glu -	Leu - Ala - Gly - Asn
nm-11 (résidus 86 à	96) Ala -	lle - Arg - Asn - Asp - Glu - Glu - Leu - Asn - Lys - Leu
nm-7 (résidus 52 à nm-7a (résidus 52 à nm-7b (résidus 51 à nm-8 (résidus 58 à nm-9( <del>****</del> )(résidus 64 nm-9a (résidus 64 à nm-11 (résidus 86 à	57)       Ala -         55)       Ala -         55)       Leu -         63)       Leu -         à 76)       Glu -         68)       Glu -         96)       Ala -	Ala - Val - Leu - Glu - Tyr Ala - Val - Leu Ala - Ala - Val - Leu Thr - Ala - Glu - Ile - Leu Leu - Ala - Gly - Asn -(Ala - Ala - Arg)- Asp - Asn - Lys - Ly Leu - Ala - Gly - Asn Ile - Arg - Asn - Asp - Glu - Glu - Leu - Asn - Lys - Leu

- La signification des signes placés au-dessus ou en-dessous des résidus d'amino-acides est présentée dans le tableau IX page 41.
- (\*\*) Les peptides Chm-3, Chm-5, Chm-11 correspondent respectivement aux peptides Ch-3, Ch-5 et Ch-11 de l'hydrolysat chymotrypsique de l'ALK-histone native.
- (\*\*\*) L'hydrolyse du peptide Chm-6a par la thermolysine a permis d'en établir la structure.
- (\*\*\*\*) La séquence complète du peptide Chm-9 a été établie à partir des données fournies par l'étude du peptide trypsique Tm-10 et du peptide "thermolysine" Th-13.

# Peptide Chm-4 (résidus 32 à 34) :

Arg - Leu - Leu

Le peptide Chm-4 est obtenu pur dans la fraction 11.

Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal : DNS - Arg.

La structure de ce peptide est évidente. La séquence Leu – Leu est ici préservée, alors qu'elle n'apparaît pas dans l'hydrolysat chymotrypsique de la protéine native où l'on trouve le peptide Arg – Leu (peptide Ch-4 : résidus 32 et 33).

Peptide Chm-5 (résidus 35 à 39) :

Arg - Lys - Gly - Asn - Tyr

Le peptide Chm-5 est obtenu pur dans la fraction 12. Il est identique au peptide Ch-5.

Peptide Chm-6 (résidus 40 à 51) :

Ala - Glu - Arg - Val - Gly - Ala - Gly - Ala - Pro - Val - Tyr - Leu

Le peptide Chm-6 est obtenu pur dans la fraction 8.

Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal : DNS - Ala.

Hydrazinolyse 3

L'action de l'hydrazine sur le peptide Chm-6 permet d'identifier la leucine en position COOH-terminale.

La structure complète du peptide Chm-6 a été déduite de l'étude du peptide Chm-6a qui résulte de l'hydrolyse par la chymotrypsine de la liaison Tyr – Leu. 50 51

Peptide Chm-6a (résidus 40 à 50) : Ala - Glu - Arg - Val - Gly - Ala - Gly - Ala - Pro - Val - Tyr Le peptide Chm-6a est obtenu pur dans la fraction 7.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Ala.

Dégradation de Edman :

Un cycle de dégradation de Edman suivi de la dansylation du peptide résiduel permet d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale : Ala - Glu.

Hydrolyse par la carboxypeptidase A :

L'action de l'enzyme pendant 6 heures à 37°C libère uniquement de la tyrosine.

Hydrolyse par la thermolysine :

L'hydrolyse du peptide Chm-6a par la thermolysine pendant 4 heures à 40°C et pH 8,0 libère 4 peptides : Chm-6a-Th-1 , Chm-6a-Th-2 , Chm-6a-Th-3 et Chm-6a-Th-4. L'électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6 permet d'obtenir à l'état pur les peptides Th-1 (basique) et Th-4 (légèrement acide). Les peptides Th-2 et Th-3 non séparés en électrophorèse sont séparés en chromatographie préparative sur papier.

Peptide Chm-6a-Th-1 : Ala - Glu - Arg <u>Composition</u> : Glu , Ala , Arg 1,2 1,0 1,0 <u>Peptide Chm-6a-Th-2</u> : Val - Gly - Ala <u>Composition</u> : Gly , Ala , Val 0,8 1,0 1,2 <u>Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal</u> : DNS - Val. Dégradation de Edman :

Un cycle de dégradation de Edman en couplage avec la méthode de dansylation nous a permis d'établir la séquence du peptide Chm-6a-Th-2.

Peptide Chm-6a-Th-3 : Gly - Ala - Pro

Composition : Pro , Gly , Ala 0,9 1,0 1,0 Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal : DNS - Gly.

Dégradation de Edman :

Un cycle de dégradation de Edman en couplage avec la méthode de dansylation nous a permis d'établir la séquence du peptide Chm-6a-Th-3.

Considérant la spécificité de la thermolysine, la position NH<sub>2</sub>terminale du résidu de glycine dans ce peptide est tout à fait inattendue. Cette "erreur" de l'enzyme est imputable à la structure du peptide Chm-6a et à la présence d'un résidu de proline qui rend la liaison Gly – Ala résistante à l'hydrolyse par la thermolysine. Ce point sera présenté dans la discussion des résultats des peptides obtenus par hydrolyse de l'ALK-histone avec la thermolysine.

<u>Peptide Chm-6a-Th-4</u> : Val – Tyr

Composition : Val , Tyr 1,0 0,8

La position NH<sub>2</sub>-terminale du résidu de valine découle de la spécificité de la thermolysine.

Séquence du peptide Chm-6a :

L'ensemble des résultats acquis présentés plus haut nous a permis de placer les peptides obtenus par hydrolyse de Chm-6a avec la thermolysine, dans l'ordre : Th-1 – Th-2 – Th-3 – Th-4 et de déterminer ainsi la séquence du peptide Chm-6a. Le peptide Th-1 est en position NH<sub>2</sub>-terminale dans le peptide Chm-6a dont il recouvre la séquence NH<sub>2</sub>-terminale Ala – Glu déterminée par la dégradation de Edman.

Le peptide Th-4 constitue la séquence COOH-terminale du peptide Chm-6a puisqu'il contient le résidu de tyrosine, identifié à l'extrémité COOHterminale du peptide Chm-6a après hydrolyse de ce peptide par la carboxypeptidase A.

La position respective des peptides Th-2 et Th-3 a été déduite des résultats fournis par l'hydrolyse du peptide Chm-6a avec la carboxypeptidase A.

En effet, l'action de la carboxypeptidase A sur ce peptide libère uniquement de la tyrosine, au cours d'une hydrolyse de 6 heures : ceci suggère le blocage de l'action récurrente de l'enzyme, par le résidu de proline placé immédiatement avant la valine dans la séquence COOH-terminale : Pro - Val - Tyr. L'ordre des peptides Th-, dans le peptide Chm-6a doit donc être : Th-1 - Th-2 - Th-3 - Th-4, plutôt que : Th-1 - Th-3 - Th-2 -Th-4.

La séquence du peptide Chm-6a a été confirmée par l'étude du peptide Th-8 obtenu dans l'hydrolysat thermolysine de l'ALK-histone.

Peptide Chm-7 (résidus 52 à 57) :

Ala - Ala - Val - Leu - Glu - Tyr

Le peptide Chm-7 est obtenu pur dans la fraction 5.

La présence d'un résidu d'acide glutamique a été établie après hydrolyse totale du peptide Chm-7 par l'aminopeptidase M.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Ala.
Hydrazinolyse :

L'action de l'hydrazine sur le peptide Chm-7 permet d'identifier la tyrosine en position COOH-terminale.

La structure complète du peptide Chm-7 a été déduite de l'étude des peptides Chm-7a et Chm-7b, également présents dans l'hydrolysat chymotrypsique de l'ALK-histone maléylée.

Peptide Chm-7a (résidus 52 à 55) : Ala - Ala - Val - Leu

Le peptide Chm-7a est obtenu pur dans la fraction 3.

Composition: Ala , Val , Leu 2,0 1,0 1,0

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Ala.

Dégradation de Edman :

Un cycle de dégradation de Edman, en couplage avec la méthode de dansylation, détermine la séquence NH2-terminale : Ala - Ala.

La position COOH-terminale de la leucine découle de la spécificité de la chymotrypsine et nous permet ainsi d'établir la séquence du peptide Chm-7a.

Peptide Chm-7b (résidus 51 à 55) : Leu - Ala - Ala - Val - Leu

Le peptide Chm-7b est obtenu pur dans la fraction 4.

Composition : Ala , Val , Leu 2,2 1,1 2,0

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Leu.

Le second résidu de leucine occupe la position COOH-terminale en raison de la spécificité de la chymotrypsine et par analogie avec le peptide Chm-7a.

Les éléments de structure fournis par l'étude des peptides Chm-7a et

Chm-7b permettent de déterminer la séquence en amino-acides du peptide Chm-7.

La séquence Ala - Ala - Val - Leu qui correspond au peptide Chm-7a constitue la partie commune aux peptides Chm-7 et Chm-7b.

Tyr - Leu - Ala - Ala - Val - Leu - Glu - Tyr 50 Chm-7a - 57 Chm-7a - 57

Peptide Chm-8 (résidus 58 à 63) :

Leu - Thr - Ala - Glu - Ile - Leu

Le peptide Chm-8 est obtenu pur dans la fraction 2.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Leu.

Dégradation de Edman :

Quatre cycles de dégradation de Edman en couplage avec la méthode de dansylation ont permis d'établir la séquence du peptide Chm-8.

La présence d'un résidu d'acide glutamique a été établie après hydrolyse totale du peptide Chm-8 par l'aminopeptidase M.

Hydrolyse par la carboxypeptidase A :

L'action de l'enzyme pendant 6 heures à 37°C libère essentiellement de la leucine.

Peptide Chm-9 (résidus 64 à 76) :

Glu - Leu - Ala - Gly - Asn - Ala - Ala - Arg - Asp - Asn - Lys - Thr

Le peptide Chm-9 est localisé dans la fraction 10. Il est purifié par chromatographie sur papier.

 $Dansylamino-acide NH_2$ -terminal : DNS - Glu.

# Hydrolyse par la carboxypeptidase A :

L'action de l'enzyme pendant 6 heures à 37°C libère uniquement de la thréonine.

Peptide Chm-9a (résidus 64 à 68) :

Glu - Leu - Ala - Gly - Asn

Le peptide Chm-9a est obtenu pur dans la fraction 1.

Composition : Asp , Glu , Gly , Ala , Leu 1,0 1,2 0,8 1,0 1,0

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Glu.

Dégradation de Edman :

Trois cycles de dégradation de Edman en couplage avec la méthode de dansylation ont permis d'établir la séquence du peptide Chm-9a.

La présence d'un résidu d'asparagine et d'un résidu d'acide glutamique a été établie après hydrolyse totale du peptide Chm-9a par l'aminopeptidase M.

Le peptide Chm-9a correspond à la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide Chm-9, puisqu'il contient le résidu d'acide glutamique identifié à l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale du peptide Chm-9.

La séquence complète du peptide Chm-9 a été déduite des données fournies par le peptide trypsique Tm-10 et par le peptide thermolysine Th-13.

Peptide Chm-11 (résidus 86 à 96) :

Ala - Ile - Arg - Asn - Asp - Glu - Glu - Leu - Asn - Lys - Leu

Ce peptide est obtenu pur dans la fraction 9.

Il est identique au peptide Ch-11 présent dans l'hydrolysat chymotrypsique de l'ALK-histone native.

### Discussion

Trois liaisons tyrosyle, une liaison phénylalanyle et seize liaisons leucyle constituent dans l'ALK-histone, vingt sites potentiels majeurs de coupure par la chymotrypsine.

Cependant, l'hydrolyse de l'histone native par la chymotrypsine conduit à l'obtention de 6 peptides : Ch-2, Ch-3, Ch-4, Ch-5, Ch-11 et Ch-14, qui correspondent à 37 des 129 résidus d'amino-acides présents dans la protéine (tableau XXV); le recouvrement d'une seule tyrosine sur les trois tyrosine présentes dans l'ALK-histone est particulièrement surprenant.

Un tel déficit s'explique à la fois par la précipitation d'un abondant matériel insoluble au cours de l'hydrolyse de la protéine native par la chymotrypsine et par l'adsorption irréversible de peptides très basiques (peptide Ch-1, résidus 1 à 17, par exemple), sur la résine cationique utilisée pour le fractionnement chromatographique de l'hydrolysat.

Aucune fraction insoluble n'apparaît au cours de l'hydrolyse chymotrypsique de l'ALK-histone maléylée, mais un précipité se forme durant la démaléylation.

Les 8 peptides chymotrypsiques obtenus 3 Chm-3, Chm-4, Chm-5, Chm-6, Chm-7, Chm-8, Chm-9 et Chm-11 correspondent à 64 des 129 résidus d'amino-acides présents dans la protéine (tableau XXVIII).

L'intérêt de la maléylation de l'ALK-histone avant l'hydrolyse chymotrypsique apparaît dans l'obtention de peptides qui couvrent entièrement la partie médiane de la séquence en amino-acides de la protéine, et correspondent au peptide trypsique insoluble T-13 ou Tm-9 (résidus 43 à 71).

La maléylation modifie la charge électrique de la protéine et induit un changement dans la conformation de la macromolécule, changement qui permet à la chymotrypsine d'atteindre les sites de coupure tels que Tyr-50 et Tyr-57. Ceci nous amène à suggérer que les résidus de tyrosine en positions 50 et 57 sont vraisemblablement "camouflés" dans la structure tertiaire de l'ALKhistone.

> Les liaisons Arg - Ser et His - Lys qui, dans l'ALK-histone native, 17 18 124 125

sont coupées au cours d'une hydrolyse de 2 heures par la chymotrypsine, en donnant respectivement les peptides Ch-2 et Ch-14, ne sont pas hydrolysées quand l'ALK-histone est maléylée.

Cette résistance à l'hydrolyse chymotrypsique peut être attribuée à la présence au niveau ou dans l'environnement de ces liaisons, de charges négatives induites par la maléylation (87) ; elle semble toutefois partielle, puisque la liaison Arg – Ser dans l'histone maléylée, est hydrolysée en 4 heures par la 17 18

Une interférence analogue des groupes acides situés au niveau ou près d'une liaison susceptible à la trypsine, a été observée par BRATTIN et SMITH au cours de l'hydrolyse trypsique de la glutamate-déshydrogénase bovine (93).

L'obtention des peptides Chm-3 et Ch-14 implique la coupure d'une liaison histidyle : His – Arg (peptide Chm-3) et His – Lys (peptide Ch-14), 31 32 124 125 tandis que l'obtention du peptide Chm-9 implique la coupure d'une liaison thréonyle : Thr – Arg ; de telles liaisons sont plutôt des sites mineurs pour l'hydrolyse chymotrypsique.

Le recoupement des peptides trypsiques avec les peptides chymotrypsiques permet d'établir une séquence de 60 résidus d'amino-acides, de Ser 18 à Arg 77, qui contient les 4 résidus aromatiques présents dans l'ALK-histone et correspond à la région hydrophobe médiane de la protéine (tableau XXX).

La séquence NH<sub>2</sub>-terminale de l'ALK-histone (17 résidus) et la séquence COOH-terminale (52 résidus) caractérisée par la présence de nombreux résidus hydrophobes ont pu être déterminées par l'étude des peptides obtenus par hydrolyse de la protéine avec la thermolysine. TABLEAU XXX



- 132 -

# 5) <u>Peptides obtenus par hydrolyse de l'ALK-histone avec la</u> thermolysine

Le choix de la thermolysine pour l'hydrolyse de l'ALK-histone s'imposait après l'étude des peptides trypsiques et chymotrypsiques, dont le bilan faisait apparaître un déficit portant sur les acides aminés de caractère hydrophobe (alanine et leucine essentiellement).

Ce choix découle de la spécificité de la thermolysine pour les liaisons peptidiques où le groupe «-aminé des amino-acides à chaîne latérale hydrophobe se trouve engagé.

L'ALK-histone est hydrolysée par la thermolysine pendant 4 heures à 40°C et pH 8,0. Contrairement à ce que nous avions observé au cours de l'hydrolyse trypsique ou chymotrypsique de l'ALK-histone native, aucune fraction insoluble n'apparaît au cours de l'hydrolyse de la protéine par la thermolysine.

Après lyophilisation, l'hydrolysat est dissous dans 3 ml d'acide formique à 30 p.100, pour être fractionné par chromatographie d'échange d'ions dans des conditions identiques à celles utilisées pour le fractionnement des hydrolysats trypsiques et chymotrypsiques.

Le diagramme d'élution des peptides "thermolysine" de l'ALK-histone fractionnés sur colonne de Chromobeads P est présenté dans la figure 13, et montre la séparation des peptides en 25 fractions. Les fractions indiquées par des traits pleins sont numérotées suivant leur ordre d'élution de la colonne. Les peptides "thermolysine", désignés par Th, sont numérotés suivant leur position dans la séquence de la protéine (Tableau XXXV page 164).

La composition et la séquence en amino-acides de chaque peptide sont respectivement présentées dans les tableaux XXXI et XXXII.



TABLEAU XXXI

COMPOSITIONS EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES "THERMOLYSINE" DE L'ALK-HISTONE

(exprimées en rapports molaires par rapport à un amino-acide hydrophobe)(≋)

, 0(1)
~~~~
11,0(1)1 11,0(1)1

🚓 (ج) Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de résidus assumés.

## TABLEAU XXXI (suite)

### COMPOSITIONS EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES "THERMOLYSINE" DE L'ALK-HISTONE

Amino-acides	Th-14	Th-15 ( <del>≉≉≉</del> )	Th-16	Th-17	Th-18	Th-19	Th-20	Th-21	Th-22	Th-23	Nb total de résidu	ALK- s histone
Acide aspartique				2,8 (3)			1,0(1)				8	8
Thréonine	1,0(1)		na sun e manufa e presi		Chair - Press - Bolance	1,3 (1)			1,0(1)		5	5
Sérine									1,0(1)		4	4
Acide glut <b>amiq</b> ue			1,0(1)	1,9 (2)			1,0(1)	1,1(1)	1,1(1)		12	12
Proline		1,1(1)					0,9(1)		1,0(1)		5	5
Glycine	ar operation				1,1 (1)		2,2 (2)			1,0(1)	14	14
Alanine	Yes show a way to be a second of the second		ninge de verse annu				1,0(1)	1,1(1)		1,0(1)	16( <del>**</del> )	17
Valine						1,0(1)	0,9(1)	1,0(1)	1,0(1)		8	8
Isoleucine	an - Yang ang ang ang ang ang ang ang ang ang	1,7 (2)		0,8(1)			0,9(1)	1,0(1)			6	6
Leucine			1,0(1)	2,0(2)	1,0(1)		0,9(1)		2,0(2)		15(**)	16
Tyrosine	in a la facta and de la facta a					W TOY TO BE AND					3	3
Phénylalanine											1	1
Lysine				1,3 (1)	1,0(1)				3,1 (3)	2,0(2)	14	14
Histidine		0,9(1)							1,8(2)		4	4
Arginine	1,0(1)	1,0(1)		1,2(1)							12	12
Nombre total de résidus	2	5	2	10	3	2	9	4	12	4	127	129

(exprimées en rapports molaires par rapport à un amino-acide hydrophobe)(\*)

(\*) Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de résidus assumés.

(\*\*) L'alanine libre et la leucine libre ne sont pas incluses dans ce total.

(\*\*\*) La composition en amino-acides du peptide Th-15 a été déterminée après une hydrolyse de 72 heures.

	SEQUENCES EN AA	MINO-ACIDES DES PEPTIDES "THERMOLYSINE" DE L'ALK-HISTONE (*)
Th-1 ( <sub>樂★</sub>	) (résidus Ì à 11)	T N-acétyl – Ser – Gly – Arg <sup>±</sup> Gly – Lys <sup>±</sup> Gln – Gly – Gly – Lys <sup>±</sup> Ala – Arg
Th-2	(résidus 12 à 18)	Ala - Lys - Ala - Lys - Thr - Arg - Ser
Th-3	(résidus 19 à 22)	Ser - Arg - Gly
Th-4	(résidus 23 à 26)	Leu - Gln - Phe - Pro
Th-5	(résidus 27 à 29)	Val - Gly - Arg
Th-6	(résidus 30 à 33)	Val – His – Arg – Leu
Th-7	(résidus 34 à 39)	Leu - Arg - Lys - Gly - Asn - Tyr
Th-8	(résidus 40 à 48)	Ala - Glu - Årg - Val - Gly - Ala - Gly - Ala - Pro
Th-9	(résidus 49 et 50)	Val – Tyr
Th-10	(résidus 51 à 53)	Leu – Ala – Ala
Th-11	(résidus 54 à 57)	Val – Leu – Glu – Tyr
Th-12	(résidus 58 à 64)	Leu - Thr - Ala - Glu - Ile - Leu - Glu
(★) La si	anification des signes plo	المعالمين والمعدد من معاملة معاملة مالمستمد مالمستقد عمامة معامد معالم مالم and active a

TABLEAU XXXII

tes signes places aurdessus ou en-dessous des résidus d'amino-acides est présentée dans le tableau IX p.41, المعنى المعن معنى المعنى معنى المعنى المعن المعن معنى المعنى ال

	SEQUENCES EN AN	11NO-ACIDES DES PEPTIDES "THERMOLYSINE" DE L'ALK-HISTONF (*)
Th-13	(résidus 65 à 75)	Leu – Ala – Gly – Asn – Ala – Ala – Arg – Asp – Asn – Lys – Lys
Th-14	(résidus 76 et 77)	Thr - Arg
Th-15	(résidus 78 à 82)	lle – Ile – Pro – Arg – <u>His</u>
Th-16	(résidus 83 et 84)	Leu - Gln
Th-17	(résidus 87 à 96)	
Th-18	(résidus 97 à 99)	Leu - Gly - Lys
Th-19	(résidus 100 et 101)	Val – Thr Th Th
Th-20	(résidus 102 à 110)	lle - Ala - Gln - Gly - Gly - Val - Leu - Pro - Asn
(***) Th-21	(résidus 111 à 114)	lle - Gln - Ala - Val
Th-22	(résidus 114 à 125)	💙 🛁 🚽 Leu - Leu - Pro - Lys - Thr - Glu - Ser - His - His - Lys
Th-23	(résidus 126 à 129)	Ala - Lys - Gly - Lys(OH)
( <b>*</b> )	a signification des signes p age 41 ,	lacés au-dessus ou en-dessous des résidus d'amino-acides est présentée dans le tableau

 $<sup>\</sup>succeq$ 

(★★★) Le peptide Th-20 a été hydrolysé par la thermolysine.

BUS

Peptide Th-1 (résidus 1 à 11) : N-acétyl - Ser - Gly - Arg - Gly - Lys - Gln - Gly - Gly - Lys - Ala - Arg <u>Peptide Th-1a (résidus 1 à 9)</u> : N-acétyl - Ser - Gly - Arg - Gly - Lys - Gln - Gly - Gly - Lys <u>Peptide Th-1b (résidus 10 et 11)</u> ;

Le <u>peptide Th-1</u> est localisé dans la fraction 23 avec le peptide Th-6a dont il est séparé en chromatographie préparative sur papier.

Dansylamino-acide NH2-terminal :

Le peptide Th-1 ne réagit pas avec le chlorure de dansyle, ce qui traduit l'absence d'un groupe &-aminé terminal libre.

Hydrolyse trypsique s

Ala - Arg

L'hydrolyse trypsique du peptide Th-1 pendant 4 heures à 37°C libère 4 peptides qui sont séparés en électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6.

Th-1-T-1	0	Ser , Gly , Arg 1,0 1,0 1,0	
Th-1-T-2	2	Gly , Lys 1,0 1,0	
Th-1-T-3	3	Glu, Gly, Lys 1,1 2,0 1,0	I
Th-1-T-4	1 0	Ala , Arg 1,0 1,0	

La migration anionique du peptide Th-1-T-1 localisé sur la carte peptidique par le réactif à la phénanthrène-quinone, l'absence de réaction avec le réactif à la ninhydrine - cadmium et la composition en amino-acides sont caractéristiques du peptide Tm-1 : N-acétyl - Ser - Gly - Arg, en position NH<sub>2</sub>terminale dans l'ALK-histone. Les peptides Th-1-T-2 , Th-1-T-3 et Th-1-T-4 constituent les différents éléments de la structure du peptide Tm-2.

 Im-1
 Tm-2

 Im-1
 T-2 

 Im-1
 Im-2

 'absence d'un groupe «-aminé libre dans le peptide Th-1 et l'identification du peptide N-acétyl - Ser - Gly - Arg dans l'hydrolysat trypsique du peptide Th-1 déterminent sans ambiguité sa position à l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale de l'ALK-histone.

Le peptide Th-la est obtenu pur dans la fraction 17.

Composition : Ser , Glu , Gly , Lys , Arg 1,0 1,0 4,0 1,9 1,0

Hydrazinolyse :

L'action de l'hydrazine sur le peptide Th-la conduit à l'identification de la lysine en position COOH-terminale.

Le peptide Th-1b est obtenu pur dans la fraction 16.

Composition : Ala , Arg 1,0 1,0

Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal : DNS - Ala.

L'obtention du peptide Th-1 avec les peptides Th-1a et Th-1b montre une action incomplète de la thermolysine au niveau de la liaison Lys - Ala. 9 10 <u>Peptide Th-2 (résidus 12 à 18)</u> :
Ala - Lys - Ala - Lys - Thr - Arg - Ser
<u>Peptide Th-2a (résidus 12 et 13)</u> :
Ala - Lys
<u>Peptide Th-2b (résidus 14 à 18)</u> :
Ala - Lys - Thr - Arg - Ser
<u>Peptide Th-2c (résidus 14 à 22)</u> ;
Ala - Lys - Thr - Arg - Ser - Arg - Ala - Gly

Le <u>peptide Th-2</u> est localisé dans la fraction 24 avec le peptide Th-6 dont il est séparé en chromatographie préparative sur papier.

> Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal : DNS - Ala. Dégradation de Edman :

Quatre cycles de dégradation de Edman en couplage avec la méthode de dansylation ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale : Ala - Lys - Ala - Lys - Thr du peptide Th-2.

Hydrazinolyse :

L'action de l'hydrazine sur le peptide Th-2 conduit à l'identification de la sérine en position COOH-terminale.

L'ensemble de ces résultats détermine la séquence du peptide Th-2.

Le <u>peptide Th-2a</u> est localisé dans la fraction 10 avec le peptide Th-8a dont il est séparé en électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Ala.

Le peptide Th-2b est localisé dans la fraction 20 avec le peptide Th-12a dont il est séparé en chromatographie sur papier.

Composition : Thr , Ser , Ala , Lys , Arg 1,0 1,0 1,0 1,1 1,0 Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Ala.

Le peptide Th-2c est présent dans l'hydrolysat obtenu par action de la thermolysine sur l'ALK-histone pendant 45 minutes. Il est obtenu pur dans la dernière fraction éluée de la colonne de Chromobeads P. Son volume d'élution est supérieur à celui des peptides Th- présents dans la fraction 25.

Composition : Thr , Ser , Gly , Ala , Lys , Arg 1,0 1,7(2) 1,1 2,0 1,2(1) 1,8(2) Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Ala.

L'obtention du peptide Th-2 avec les peptides Th-2a et Th-2b montre une action incomplète de la thermolysine sur la liaison Lys - Ala. 14

13

Le peptide Th-2 recouvre le peptide Tm-3.

Le résidu de sérine à l'extrémité COOH-terminale du peptide Th-2 est placé immédiatement après un résidu d'arginine : il doit donc appartenir nécessairement au peptide Tm-4 qui, le peptide Tm-1 étant exclus, est le seul à posséder un résidu de sérine en position NH2-terminale.

En recouvrant les peptides Tm-3, Tm-4 et Tm-5, ainsi que le peptide Ch-2, le peptide Th-2c détermine une séquence partielle de 18 résidus (tableau XXXIII).

Peptide Th-3 (résidus 19 à 22) :

Ser - Arg - Ala - Gly

Le peptide Th-3 est localisé dans la fraction 14 avec le peptide Th-5 dont il est séparé en chromatographie préparative sur papier.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Ser.

TABLEAU XXXIII

# SEQUENCE PARTIELLE DE 18 RESIDUS D'AMINO-ACIDES

DETERMINEE PAR LE PEPTIDE Th-2c



- 143 -

### Dégradation de Edman :

Deux cycles de dégradation de Edman en couplage avec la méthode de dansylation ont permis d'établir la séquence du peptide Th-3.

Le peptide Th-3 recouvre les peptides Tm-4 et Tm-5.

L'obtention du peptide Th-3 implique l'hydrolyse d'une liaison sérine par la thermolysine. Nous reviendrons sur ce point dans la discussion.

### Peptide Th-4 (résidus 23 à 26) :

Leu - Gln - Phe - Pro

Le peptide Th-4 est obtenu après purification de la fraction 6 en chromatographie préparative sur papier.

Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal : DNS - Leu.

La structure du peptide Th-4 qui contient le seul résidu de phénylalanine présent dans l'ALK-histone se déduit des résultats acquis sur le peptide trypsique T-9.

Peptide Th-5 (résidus 27 à 29) :

Val - Gly - Arg

Le peptide Th-5 est localisé dans la fraction 14 avec le peptide Th-3 dont il est séparé en chromatographie préparative sur papier.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Val.

Dégradation de Edman :

Un cycle de dégradation de Edman suivi de la dansylation du peptide résiduel suffit pour déterminer la séquence du peptide Th-5.

Le peptide Th-5 correspond à la séquence COOH-terminale du peptide trypsique T-9.

Peptide Th-6 (résidus 30 à 33) :

Val - His - Arg - Leu

Peptide Th-6a (résidus 30 à 32) : Val – His – Arg

Le <u>peptide Th-6</u> est localisé dans la fraction 24 avec le peptide Th-2 dont il est séparé en chromatographie préparative sur papier.

Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal : DNS - Val.

Le <u>peptide</u> Th-6a est localisé dans la fraction 23 avec le peptide Th-1 dont îl est séparé en chromatographie préparative sur papier.

Composition : Val , His , Arg 1,0 0,9 1,0

Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal : DNS - Val.

Le peptide Th-6a est identique au peptide Tm-6.

La relation entre les peptides Th-6 et Th-6a est évidente. L'identification du résidu de valine en position NH<sub>2</sub>-terminale dans le peptide Th-6 permet de placer la leucine à l'extrémité COOH-terminale de ce peptide.

L'action incomplète de la thermolysine au niveau de la liaison Arg - Leu, qui aboutit à l'obtention du peptide Th-6, détermine la séquence 32 33 Tm-6 - Tm-7.

Peptide Th-7 (résidus 34 à 39) :

Leu - Arg - Lys - Gly - Asn - Tyr

Le peptide Th-7 est localisé dans la fraction 25 avec le peptide Th-21 dont il est séparé en chromatographie préparative sur papier.

 $Dansylamino-acide NH_2$ -terminal : DNS - Leu.

Dégradation de Edman

Deux cycles de dégradation de Edman en couplage avec la méthode de donsylation, ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale : Leu - Arg - Lys du peptine Ch-7.

déduire la structure du peptide Th-7.

Leu Arg - Lys - Gly - Asn - Tyr

Le peptide Th-7 recouvre les peptides Tm-7 et Im-8.

Peptide In-8 (résidus 40 à 48) :

Ala - Glu - Arg - Val - Gly - Ala - Gly - Ala - Pro

Peptide Ih-8a (résidus 40 à 42) : Ala - Glu - Arg

Le peptide Th-8 est localisé dans la fraction 8. Il est séparé du peptide Th-9 et de la valine libre en chromatographie préparative sur papier.

Dansylamino-acide NH2-terminal DNS - Ala.

Degradation de Edman

Six cycles de dégradation de Edman en couplage avec la méthode de dansylation déterminent la séquence x Ala - Glu - Arg - Val - Gly - Ala - Gly.

Hydrazinolyse :

L'action de l'hydrazine sur le peptide Th-8 conduit à l'identification de la proline en position COOH-terminale.

L'ensemble de ces résultats détermine la séquence du peptide Th-à

Le <u>peptide Th-8a</u> est localisé dans la fraction 10 avec le peptide Th-2a dont il est séparé en électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6.

Composition : Glu , Ala , Arg 1,0 1,0 1,0

Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal : DNS - Ala.

Dégradation de Edman :

Un cycle de dégradation de Edman, suivi de la dansylation du peptide résiduel a suffi pour établir la séquence de ce peptide.

La coupure de la liaison Arg - Val du peptide Th-8 par la thermoly-42 43sine aboutit à l'obtention du peptide Th-8a.

La structure du peptide Th-8 confirme celle du peptide Chm-6. Comme le peptide Chm-6, le peptide Th-8 qui recouvre la séquence COOH-terminale du peptide Tm-8 et la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide Tm-9 (non isolé), constitue le maillon entre la partie NH<sub>2</sub>-terminale et la région hydrophobe médiane de l'ALK-histone.

Peptide Th-9 (résidus 49 et 50) :

Val - Tyr

Le peptide Th-9 est localisé dans la fraction 8 avec le peptide Th-8 et la valine libre dont il est séparé en chromatographie préparative sur papier.

Dansylamino-acide NH2-terminal ; DNS - Val.

Le peptide Th-9 correspond à la séquence COOH-terminale du peptide Chm-6a.

Peptide Th-10 (résidus 51 à 53) :

Leu - Ala - Ala

Le peptide Th-10 est localisé dans la fraction 4 avec le peptide Th-16 dont il est séparé en chromatographie préparative sur papier. Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal : DNS - Val.

Le peptide Th-10 correspond à la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide Chm-7b ; il recouvre les peptides Chm-6 et Chm-7.

Peptide Th-11 (résidus 54 à 57) :

Val - Leu - Glu - Tyr

Le peptide Th-11 est obtenu pur dans la fraction 7.

La présence d'un résidu d'acide glutamique a été établie après hydrolyse totale du peptide Th-11 par l'aminopeptidase M pendant 24 heures.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Val.

Dégradation de Edman :

Deux cycles de dégradation de Edman en couplage avec la méthode de dansylation ont permis d'établir la séquence du peptide Th-11.

Le peptide Th-11 correspond à la séquence COOH-terminale du peptide Chm-7.

<u>Peptide Th-12 (résidus 58 à 64)</u> ; Leu – Thr – Ala – Glu – Ile – Leu – Glu

Peptide Th-12a (résidus 58 à 61) : Leu - Thr - Ala - Glu

Peptide Th-12b (résidus 62 à 64) : 11e - Leu - Glu

Le <u>peptide Th-12</u> est localisé dans la fraction 2 avec les peptides Th-12a, Th-13a et Th-20a dont il est séparé par chromatographie préparative sur papier, suivie d'une électrophorèse préparative sur papier à pH 3,0.

La présence de 2 résidus d'acide glutamique a été établie après hydrolyse du peptide par l'aminopeptidase M pendant 48 heures. Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Leu.

Dégradation de Edman :

Cinq cycles de dégradation de Edman en couplage avec la méthode de dansylation ont permis d'établir la séguence du peptide Th-12.

Le peptide Th-12a est localisé dans la fraction 2.

Composition : Thr , Glu , Ala , Leu 1,0 1,1 1,1 0,9

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Leu.

Dégradation de Edman :

Trois cycles de dégradation de Edman, utilisée en méthode soustractive, ont suffi pour déterminer la séquence du peptide Th-12a.

	Thr ,	Glu ,	Ala ,	Leu
Composition :	1,0	1,1	1,1	0,9
ler cycle	1,0	1,0	1,1	0,1
2ème cycle	0,2	1,0	1,1	-
3ème cycle	-	1,0	0,2	-

Le peptide Th-12b est localisé dans la fraction 6 avec le peptide Leu - Ala dont il est séparé en électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6.

Composition : Glu , lle , Leu 1,1 0,9 1,0

### Dégradation de Edman :

Deux cycles de dégradation de Edman utilisée en méthode soustractive, ont permis d'établir la séquence du peptide Th-12b.

• ·

	Glu ,	lle ,	Leu
Composition :	1,1	0,9	1,0
ler cycle	1,1	0	1,0
2ème cycle	1,1	-	0

Les peptides Th-12a et Th-12b résultent de la coupure de la liaison Glu - Ile du peptide Th-12 par la thermolysine.

61 62

Le peptide Th-12 recouvre les peptides Chm-8 et Chm-9.

Peptide Th-13 (résidus 65 à 75) :

Leu - Ala - Gly - Asn - Ala - Ala - Arg - Asp - Asn - Lys - Lys

Peptide Th-13a (résidus 65 à 68) : Leu – Ala – Gly – Asn

Peptide Th-13b (résidus 69 à 75) Ala - Ala - Arg - Asp - Asn - Lys - Lys

<u>Peptide Th-13c (résidus 70 à 75)</u> : Ala – Arg – Asp – Asn – Lys – Lys

Le peptide Th-13 est obtenu pur dans la fraction 18.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Leu.

Dégradation de Edman :

Deux cycles de dégradation de Edman en couplage avec la méthode de dansylation ont permis de déterminer la séquence NH<sub>2</sub>-terminale Leu - Ala - Gly du peptide Th-13.

Hydrolyse par la carboxypeptidase B :

L'action de l'enzyme pendant 6 heures à 40°C libère uniquement de la lysine.

Le <u>peptide Th-13a</u> est localisé dans la fraction 2 avec les peptides Th-12, Th-12a et Th-20a dont il est séparé par chromatographie préparative sur papier suivie d'une électrophorèse préparative sur papier à pH 3,0.

<u>Composition</u> : Asp , Gly , Ala , Leu 1,0 1,0 1,0 1,0 1,0 La présence d'un résidu d'asparagine a été établie après hydrolyse du peptide Th-13a par l'aminopeptidase M à 40°C pendant 24 heures.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Leu.

Le peptide Th-13b est obtenu pur dans la fraction 20.

Composition : Asp , Ala , Lys , Arg 1,7(2) 1,8(2) 2,0 1,0

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Ala.

Dégradation de Edman :

Un cycle de dégradation de Edman suivi de la dansylation du peptide résiduel nous a permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale : Ala – Ala. Le reste de la séquence a été déterminé avec trois cycles de dégradation de Edman utilisée en méthode soustractive.

	Asp	,	Alα	,	Lys	,	Arg
Composition (après 2 cycles)	1,7		0		2,0		1,0
3ème cycle	٦,7		346		N . D	.(*	) <u>0, 1</u>
4ème cycle	1,1				N.D	o	-
5ème cycle	0,5		-		N.D	0	-

Le peptide Th-13c est obtenu pur dans la fraction 22.

Composition: Asp, Ala, Lys, Arg 2,0 1,0 2,2 1,0

Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal : DNS - Ala.

L'ensemble des données fournies par l'étude du peptide Th-13 et de ses dérivés Th-13a, Th-13b et Th-13c nous a permis d'établir la séquence du peptide Th-13.

(\*) N.D. : non déterminée.



Le peptide Th-13 correspond au peptide Chm-9. La séquence complète du peptide Chm-9 a été déduite de l'étude du peptide Th-13 et du peptide Tm-10.

Peptide Th-14 (résidus 76 et 77) :

Thr - Arg

Ce peptide est obtenu pur dans la fraction 15.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Thr.

Le peptide Th-14 est identique au peptide T-15.

Peptide Th-15 (résidus 78 à 82) :

lle - lle - Pro - Arg - His

Le peptide Th-15 est obtenu après purification de la fraction 21 par chromatographie sur papier.

Composition	0 0	Pro	,	lle	,	His	,	Arg
Hydrolyse de 24 h		1,0		1,0		0,9		1,0
Hydrolyse de 72 h		1,1		1,7		0,9		1,0

L'augmentation du taux d'isoleucine après une hydrolyse totale acide de 72 heures fait ressortir l'existence d'une liaison Ile – Ile dans le peptide Th-15.

```
Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Ile.
```

Dégradation de Edman :

Un cycle de dégradation de Edman suivi de la dansylation du peptide résiduel détermine la séquence NH<sub>2</sub>-terminale IIe - IIe.

Hydrazinolyse :

L'action de l'hydrazine sur le peptide Th-15 conduit à l'identification de l'histidine en position COOH-terminale.

La relation entre les peptides Th-15 et Tm-11 : 11e - 11e - Pro - Arg est évidente et permet de déduire la structure du peptide Th-15.

Le résidu d'histidine à l'extrémité COOH-terminale du peptide Th-15 est placé immédiatement après un résidu d'arginine : il doit donc appartenir nécessairement au peptide Tm-12 qui est le seul à posséder un résidu d'histidine en position NH<sub>2</sub>-terminale.

Le peptide Th-15 détermine ainsi la séquence Tm-11 - Tm-12.

Peptide Th-16 (résidus 83 et 84) :

Leu - Gln

Le peptide Th-16 est localisé dans la fraction 4 avec le peptide Th-10 dont il est séparé en chromatographie préparative sur papier.

La présence de glutamine a été établie après hydrolyse du peptide par l'aminopeptidase M pendant 24 heures.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Leu.

Peptide Th-17 (résidus 87 à 96) : Ile - Arg - Asn - Asp - Glu - Glu - Leu - Asn - Lys - Leu <u>Peptide Th-17a (résidus 87 à 92)</u> : Ile - Arg - Asn - Asp - Glu - Glu <u>Peptide Th-17b (résidus 93 à 96)</u> : Leu - Asn - Lys - Leu Le <u>peptide Th-17</u> est obtenu pur dans la fraction 12.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Ile.

Le peptide Th-17a est obtenu pur dans la fraction 9.

Composition : Asp , Glu , Ile , Arg 2,1 2,2 1,0 1,1

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Ile.

Dégradation de Edman :

Quatre cycles de dégradation de Edman utilisée en méthode soustractive ont permis d'établir la séquence du peptide Th-17a.

Asp,	Glu,	lle ,	Arg
2,1	2,2	1,0	1,1
2,1	2,2	0	1,1
2,0	2,0	-	0,1
1,4	2,0	-	-
0,6	2,0	-	-
	Asp , 2,1 2,1 2,0 <u>1,4</u> 0,6	Asp , Glu , 2,1 2,2 2,1 2,2 2,0 2,0 <u>1,4</u> 2,0 <u>0,6</u> 2,0	Asp , Glu , Ile , 2,1 2,2 1,0 2,1 2,2 <u>0</u> 2,0 2,0 - <u>1,4</u> 2,0 - <u>0,6</u> 2,0 -

Le peptide Th-17b est obtenu pur dans la fraction 13.

Composition: Asp, Leu, Lys 1,1 2,0 1,1

La présence d'un résidu d'asparagine a été établie après hydrolyse du peptide par l'aminopeptidase M pendant 24 heures.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Leu.

Dégradation de Edman :

Un cycle de dégradation de Edman suivi de la dansylation du peptide résiduel a permis de déterminer la séquence du peptide Th-17b.

Hydrazinolyse :

L'action de l'hydrazine sur le peptide Th-17b conduit à l'identification de la leucine en position COOH-terminale.

Les peptides Th-17a et Th-17b résultent de la coupure de la liaison Glu – Leu du peptide Th-17 par la thermolysine. 92 93 Peptide Th-18 (résidus 97 à 99) :

Leu - Gly - Lys

Le peptide Th-18 est obtenu pur dans la fraction 11.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Leu.

Dégradation de Edman 🖇

Un cycle de dégradation de Edman suivi de la dansylation du peptide résiduel permet d'établir la séquence de ce peptide.

```
Peptide Th-19 (résidus 100 et 101) :
```

Val – Thr

<u>Peptide Th-19a (résidus 97 à 101)</u> : Leu – Gly – Lys – Val – Thr

Le <u>peptide Th-19</u> est localisé dans la fraction 3 avec le peptide Th-21 et l'alanine libre dont il est séparé en chromatographie préparative sur papier.

Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal : DNS - Val.

<u>Peptide Th-19a</u>: L'hydrolyse de l'ALK-histone par la thermolysine pendant 45 minutes libère le peptide Th-19a.

Séparé par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Chromobeads P, son volume d'élution est intermédiaire entre celui du peptide Th-9 et celui du peptide Th-17.

Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal : DNS - Leu.

Dégradation de Edman :

Trois cycles de dégradation de Edman en couplage avec la méthode de dansylation ont permis d'établir la séquence du peptide Th-19a.

Peptide Th-20 (résidus 102 à 110) :

lle - Ala - Gln - Gly - Gly - Val - Leu - Pro - Asn

Peptide Th-20a (résidus 102 à 106) : 11e - Ala - Gln - Gly - Gly

Le <u>peptide Th-20</u>, localisé dans la fraction 1, est purifié par chromatographie préparative sur papier.

La présence d'un résidu d'asparagine et d'un résidu de glutamine a été établie après hydrolyse du peptide par l'aminopeptidase M à 40°C pendant 48 heures.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Ile.

Dégradation de Edman :

Trois cycles de dégradation de Edman utilisée en méthode soustractive ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale : Ile - Ala - Gln.

	Asp ,	Glu ,	Pro ,	Gly ,	Ala ,	Val ,	lle ,	Leu
Composition :	1,1	1,1	1,0	2,3	1,0	1,0	1,0	1,0
ler cycle	1,1	1,1	۱,0	2,3	1,0	١,٥	0	1,0
2ème cycle	1,0	1,1	1,0	2,2	0,1	1,0	-	1,0
3ème cycle	1,2	0,5	1,0	2,1	-	1,0	-	1,0

La dégradation récurrente n'a pu être poursuivie au-delà du 3ème cycle, à cause de la cyclisation partielle de la glutamine en acide pyroglutamique.

Hydrolyse par la thermolysine :

L'hydrolyse du peptide Th-20 par la thermolysine, à 40°C et pH 8,0,

pendant 6 heures, libère 2 peptides : Th-20-Th-1 et Th-20-Th-2 séparés en chromatographie préparative sur papier.

Peptide Th-20-Th-1 (résidus 102 à 106) : Ile - Ala - Gln - Gly - Gly

Composition : Glu , Gly , Ala , Ile 1,1 2,1 1,0 0,9

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Ile.

Hydrazinolyse 3

L'action de l'hydrazine sur le peptide Th-20-Th-1 conduit à l'identification de la glycine en position COOH-terminale.

Par sa composition et son amino-acide NH<sub>2</sub>-terminal, le peptide Th-20-Th-1 correspond nécessairement à la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide Th-20.

Sa structure a été déduite des résultats fournis par la dégradation de Edman du peptide Th-20.

Peptide Th-20-Th-2 (résidus 107 à 110) :

Val - Leu - Pro - Asn

Composition : Asp , Pro , Val , Leu 1,0 1,3(1) 1,0 1,0

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Val.

Dégradation de Edman :

Deux cycles de dégradation de Edman en couplage avec la méthode de dansylation ont permis d'établir la séquence de ce peptide.

Le <u>peptide Th-20a</u> est localisé dans la fraction 2 avec les peptides Th-12, Th-12a et Th-13a dont il est séparé par chromatographie préparative sur papier, suivie d'une électrophorèse préparative sur papier à pH 3,0.

Composition : Glu , Gly , Ala , lle 1,0 2,0 1,0 1,0

Le peptide Th-20a est identique au peptide Th-20-Th-1 obtenu par hydrolyse prolongée du peptide Th-20 avec la thermolysine.

L'obtention du peptide Th-20a avec le peptide Th-20 montre une action incomplète de la thermolysine sur la liaison Gly - Val. 106 107

Peptide Th-21 (résidus 111 à 114) :

lle – Gln – Ala – Val

Le peptide Th-21 est localisé dans la fraction 3 avec le peptide Th-19 et l'alanine libre dont il est séparé en chromatographie préparative sur papier.

La présence d'un résidu de glutamine a été établie après hydrolyse du peptide par l'aminopeptidase M à 40°C pendant 24 heures.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Ile.

Dégradation de Edman :

Trois cycles de dégradation de Edman utilisée en méthode soustractive, ont permis d'établir la séquence de ce peptide.

	Glu	,	Ala	,	Val ,	lle
Composition 3	1,1		1,1		1,0	1,0
ler cycle	1,1		1,1		1,0 '	0,1
2ème cycle	0,3		1,1		1,0	0
3ème cycle	-		0,4		1,0	0

Les valeurs de 0,3 et 0,4 trouvées respectivement pour l'acide glutamique et l'alanine font ressortir une dégradation incomplète du peptide qui traduit un blocage partiel de la réaction par cyclisation de la glutamine en acide pyroglutamique. Peptide Th-22 (résidus 114 à 125) :

Val - Leu - Leu - Pro - Lys - Lys - Thr - Glu - Ser - His - His - Lys

Le peptide Th-22 est localisé dans la fraction 25 avec le peptide Th-7 dont il est séparé en chromatographie sur papier.

Dansylamino-acide NH2-terminal : DNS - Val.

Dégradation de Edman :

Six cycles de dégradation de Edman utilisée en méthode soustractive ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide Th-22 : Val - Leu - Leu - Pro - Lys - Lys.

	Thr ,	Ser ,	Glu ,	Pro,	Val ,	Leu ,	Lys ,	His
Composition :	1,0	1,0	1,1	1,0	1,0	2,0	3,1	1,8
ler cycle	1,0	1,0	1,1	1,0	0	2,0	3,1	1,8
2ème cycle	1,0	1,0	1,1	1,0	-	1,1	3,1	1,8
3ème cycle	1,0	1,0	1,1	1,0	-	0,1	3,1	1,8
4ème cycle	1,0	1,0	1,1	0	-	-	3,1	1,8
5ème cycle	1,0	1,0	1,1	-	-	-	2,0	1,8
6ème cycle	1,0	1,0	1,1		-	-	1,0	1,8

La séquence COOH-terminale du peptide Th-22 a été déduite de la séquence du peptide trypsique T-21.

Val – Leu – Leu – Pro – Lys – Lys – Thr – Glu – Ser – His – His – Lys

La liaison Lys - Lys mise en évidence par le peptide Th-22 est hydrolysée par la trypsine préférentiellement à la liaison Lys - Thr, où l'action de 119 120 la trypsine est perturbée par la charge négative du résidu d'acide glutamique Glu-121 adjacent à la thréonine (93).

Peptide Th-23 (résidus 126 à 129) :

Ala - Lys - Gly - Lys

Le peptide Th-23 est obtenu pur dans la fraction 19.

 $Dansylamino-acide NH_2$ -terminal : DNS - Ala.

Dégradation de Edman :

Deux cycles de dégradation de Edman en couplage avec la méthode de dansylation ont permis d'établir la séquence du peptide Th-23.

# Hydrazinolyse 3

L'action de l'hydrazine sur le peptide Th-23 conduit à l'identification de la lysine en position COOH-terminale.

Le peptide Th-23 correspond à la séquence COOH-terminale de l'ALK-histone. Il recouvre le peptide Ch-14 : Lys - Ala - Lys - Gly - Lys.

### Discussion

La composition en amino-acides de l'ALK-histone indique 48 sites potentiels majeurs (17 alanine, 8 valine, 6 isoleucine, 16 leucine et 1 phénylalanine) susceptibles à l'action de la thermolysine : 49 peptides devraient donc théoriquement être obtenus.

En fait, 35 peptides seulement sont présents dans un hydrolysat "thermolysine" de 4 heures. Des amino-acides libres – alanine, valine et leucine – sont également présents dans l'hydrolysat.

L'obtention des peptides Th-3 et Th-14 implique respectivement la coupure d'une liaison sérine et la coupure d'une liaison thréonine. Toutefois, la liaison Lys – Thr hydrolysée dans la séquence Lys – Thr – Arg , n'est pas 75 77 77 77 hydrolysée dans la séquence Lys – Thr – Arg. 15 17

Bien que la sérine et la thréonine ne puissent être considérées comme des amino-acides à chaîne latérale hydrophobe, l'analogie de structure qui les apparente à l'alanine, suscite l'action de la thermolysine.

Huit peptides : Th-1, Th-2, Th-6, Th-8, Th-12, Th-13, Th-17 et Th-20 sont accompagnés d'un ou plusieurs dérivés (indiqués : Th-1a, Th-2a, Th-2b, etc...). Ceci rend l'hydrolysat "thermolysine" plus complexe, mais peut constituer un avantage pour l'étude de la structure des peptides. L'intérêt d'une hydrolyse courte (45 minutes au lieu de 4 heures) apparaît dans l'obtention des peptides Th-2c et Th-19a.

Le peptide Th-2c recouvre les peptides trypsiques Tm-3, Tm-4 et Tm-5 et détermine ainsi une séquence partielle de 18 résidus.

Le peptide Th-19a permet de placer le peptide Th-19 sans ambiguïté en donnant la séquence Th-18-Th-19. Le peptide Th-19a constitue le maillon entre le peptide trypsique T-19 et la région COOH-terminale hydrophobe de l'ALK-histone.

L'étude des peptides "thermolysine" de l'ALK-histone montre que l'action de l'enzyme est limitée par la présence de proline dans l'environnement du site d'hydrolyse.

Ainsi, curieusement, les 5 résidus de proline présents dans l'ALKhistone sont engagés dans une liaison imide avec des résidus d'amino-acides hydrophobes : il en résulte une résistance à l'hydrolyse par la thermolysine des liaisons susceptibles, situées juste avant la proline, telles que Gln - Phe Gly - Ala lle – lle Val – Leu et Leu - Leu 24 25 78 79 107 46 47 108 115 116 (tableau XXXIV).

Cette résistance, constamment observée dans l'étude des peptides obtenus par action de la thermolysine sur la protéine ou sur les peptides trypsiques et chymotrypsiques, est dûe à la plicature de la chaîne peptidique introduite par le résidu de proline. Elle présente une analogie évidente avec la résistance des liaisons telles que Lys - Pro et Phe - Pro, à l'hydrolyse par la trypsine et la chymotrypsine, respectivement.

# TABLEAU XXXIV

# SEQUENCES PARTIELLES DE L'ALK-HISTONE

# AVEC LES RESIDUS DE PROLINE

Gln	-	Phe	-	Pro	-	Val
24						27

Gly – Ala – Pro – Val 46 49

lle – lle – Pro – Arg 78 81

Val - Leu - Pro - Asn 107 110

Leu - Leu - Pro - Lys 115 118

•


### E) <u>SEQUENCE COMPLETE EN AMINO-ACIDES DE</u> L'ALK-HISTONE

La séquence complète des 129 résidus d'amino-acides de l'ALK-histone de thymus de Veau a été déduite de l'étude des peptides trypsiques et chymotrypsiques de la protéine native ou maléylée et de l'étude des peptides obtenus par hydrolyse de la protéine native avec la thermolysine (Tableau XXXV).

La position NH<sub>2</sub>-terminale du peptide Th-1 est déterminée par la présence du résidu de N-acétyl-sérine identifié dans le peptide trypsique N-acétyl-Ser-Gly-Arg.

Nous n'avons pas d'argument direct pour la position du peptide Th-2 dans la séquence de la protéine. La trypsine et la thermolysine coupent la liaison Arg - Ala en donnant respectivement les peptides Tm-3 et Th-2; en outre, le peptide chymotrypsique Ch-1 (résidus 1 à 17) qui correspond à la séquence NH<sub>2</sub>-terminale de la protéine et qui aurait pu établir l'ordre Th-1 -Th-2, n'a pas été isolé à cause de son adsorption irréversible sur la résine Chromobeads P, liée au caractère très basique du peptide. Cependant, d'après la spécificité de la trypsine limitée aux liaisons arginyle dans une protéine maléylée, la position du peptide Tm-3 immédiatement après un résidu d'arginine, détermine celle du peptide Th-2 qui possède la même séquence NH<sub>2</sub>-terminale ; ceci implique nécessairement la séquence de l'ALK-histone.

Le peptide Th-2c qui détermine l'ordre Tm-3 - Tm-4 - Tm-5 nous permet d'étendre la séquence NH<sub>2</sub>-terminale de l'ALK-histone jusqu'au résidu d'arginine-29.

L'étude des peptides trypsiques et chymotrypsiques de la protéine maléylée nous a permis d'établir une séquence de 60 résidus comprise entre sérine-18 et arginine-77 (Tableau XXX page 132).

La séquence de la région hydrophobe médiane de la protéine (résidus 43 à 71), déterminée d'abord par l'étude des peptides Chm-6, Chm-7, Chm-8 et Chm-9 a été confirmée par l'étude des peptides "thermolysine" : Th-8, Th-9, Th-10, Th-11, Th-12 et Th-13 qui recoupent ces peptides chymotrypsiques.



.

164 -

Le peptide Th-15 recouvre les peptides trypsiques Tm-11 et Tm-12 et établit l'ordre Tm-11 - Tm-12. La liaison Arg - Ile est hydrolysée par la 77 78 trypsine et la thermolysine en donnant respectivement les peptides Tm-11 et Th-15. En outre, le peptide Chm-10 : Arg - Ile - Ile - Pro - Arg - His - Leu -Gln - Leu, qui aurait pu donner l'ordre : Tm-10 - Tm-11, n'a pas été isolé, le caractère très basique de ce peptide entraînant son adsorption irréversible sur la résine Chromobeads P. Toutefois, d'après la spécificité de la trypsine limitée aux liaisons arginyle dans une protéine maléylée, la position du peptide Tm-11 immédiatement après un résidu d'arginine, détermine celle du peptide Th-15 qui possède la même séquence NH<sub>2</sub>-terminale. Ce résidu d'arginine doit être nécessairement Arg-77, ce qui établit la séquence Th-14 - Th-15.

Le peptide Th-17, identique au peptide Chm-11, recouvre les peptides Tm-12 et les peptides T-18 et T-19 qui, dans l'ordre T-18 - T-19, constituent la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide Tm-13.

Isolé de l'hydrolysat trypsique de l'ALK-histone maléylée, le peptide Tm-13 qui ne contient pas d'arginine, fut assigné à la position COOHterminale dans la protéine. La composition en amino-acides de ce peptide nous a été précieuse pour localiser les peptides trypsiques T-18 et T-21, bien caractérisés, et pour déterminer la composition en amino-acides de la région hydrophobe présente dans la partie COOH-terminale de la protéine.

Seule, l'hydrolyse de la protéine par la thermolysine nous a permis d'élucider la structure de cette région hydrophobe.

Le peptide Th-19a, obtenu par une hydrolyse de l'ALK-histone avec la thermolysine pendant 45 minutes, détermine sans ambiguité la séquence Th-18 - Th-19.

Les peptides Th-21 et Th-22 ont en commun le résidu de valine-114 : l'hypothèse de l'existence d'une liaison Val - Val dont l'hydrolyse par la thermolysine aurait pu libérer ces peptides, ne peut être retenue car le nombre de valine recouvré dans les peptides thermolysine", correspond exactement au nombre de valine déterminé par l'analyse des amino-acides de la protéine.

La séquence COOH-terminale du peptide Th-22 correspond au peptide Th-21. Le peptide Ch-14 détermine la séquence Th-22 - Th-23. La position Nos travaux qui ont abouti à la détermination de la séquence complète en amino-acides de l'ALK-histone isolée du thymus de Veau confirment certaines séquences partielles établies par PHILLIPS (95), OLSON <u>et al</u> (90), SUGANO <u>et al</u> (92) et les résultats de HAYASHI et IWAI (48) acquis sur les peptides trypsiques de cette protéine.

La séquence NH<sub>2</sub>-terminale (résidus 1 à 99) de l'ALK-histone établie par SAUTIERE <u>et al</u> (41) au début de 1972 a été récemment confirmée par YEOMAN, OLSON, SUGANO, JORDAN, TAYLOR, STARBUCK et BUSCH (96) dont les travaux ont également abouti à la présentation de la séquence complète de l'ALK-histone.

Nous avons identifié dans l'hydrolysat trypsique de l'ALK-histone le peptide Asn – Lys. Ce peptide est obtenu pur dans la fraction 8. <u>Composition</u> : Asp , Lys 0,9 1,0

L'hydrolyse du peptide par l'aminopeptidase M à 40°C, pendant 24 heures, confirme la présence d'un résidu d'asparagine que la migration du peptide en électrophorèse sur papier à pH 3,6 avait déjà montrée.

Dansylamino-acide NH2-terminal ; DNS - Asp.

Etant donné le rendement élevé avec lequel il est obtenu - rendement légèrement supérieur à celui du peptide Asp - Asn - Lys -, le peptide Asn - Lys ne semble pas provenir d'une coupure de la liaison Leu - Asn résul-93 94 tant d'une activité "chymotrypsine-like" de la trypsine traitée par le TPCK. Nous avons d'ailleurs observé dans le peptide T-18 isolé, la résistance de cette liaison à l'action de la chymotrypsine.

Comme HAYASHI et IWAI (48), on peut alors postuler l'existence de "<u>deux types</u>" d'ALK-histone : l'un correspondant au peptide trypsique Asn - Lys serait caractérisé par la séquence : Asp - Asn - Lys - Asn - Lys -Thr - Arg, l'autre serait caractérisé par la séquence : Asp - Asn - Lys - Lys -Thr - Arg. Le nombre de résidus - 8,5 - d'acide aspartique calculé pour l'ALK-histone serait alors le reflet de l'existence de ces deux variants.

Pour établir la séquence complète en amino-acides de l'ALK-histone, la maléylation de la protéine avant l'hydrolyse chymotrypsique et l'utilisation de la thermolysine pour une hydrolyse extensive de la protéine présentaient un grand intérêt, car elles constituaient les seules méthodes donnant accès aux deux régions hydrophobes de la protéine.

Le première région <u>hydrophobe</u> est localisée dans la partie médiane de l'ALK-histone entre les résidus Arg-42 et Arg-71. Elle montre une séquence de 28 résidus dépourvue de lysine ou d'arginine et qui contient 2 des 3 résidus de tyrosine, 5 des 16 résidus de leucine et 8 des 17 résidus d'alanine présents dans la protéine.

Ces résidus d'alanine sont impliqués dans 6 séquences telles que :

- Gly - Ala - , - Ala - Ala - , - Thr - Ala - , - Gly - Ala -, 44 45 46 47 52 53 59 60 - Ala - Gly - et - Ala - Ala - . 69 66 67 70

La seconde région hydrophobe est localisée dans la partie COOHterminale de l'ALK-histone entre les résidus Lys-99 et Lys-118. Elle montre une séquence de 18 résidus dépourvue de lysine ou d'arginine où apparaissent les séquences telles que - Ile - Ala - Gln -- 11e - Gln - Ala -104 111 113 102 et - Val - Leu - Leu - Pro -. - Val - Leu - Pro -107 109 114 117

La présence de séquences répétitives ou analogues constitue en fait une des caractéristiques de la structure primaire de l'ALK-histone : la séquence Gly – Lys apparaît 4 fois, la séquence Ala – Lys, 3 fois, les séquences Gly – Arg, Ala – Arg et Thr – Arg, 2 fois et la séquence Ser – Arg, une fois.

Quatre centres basiques apparaissent dans l'ALK-histone, ainsi qu'une séquence de trois résidus acides (Tableau XXXVI).

### TABLEAU XXXVI

### CENTRE ACIDE ET CENTRES BASIQUES DE L'ALK-HISTONE

CENTRE ACIDE :

Asp - Glu - Glu 90 92

CENTRES BASIQUES :

Lys - Ala - Arg - Ala - Lys - Ala - Lys - Thr - Arg 9 Val - His - Arg - Leu - Leu - Arg - Lys 29 36 Lys - Lys - Thr - Arg 74 77 His - His - Lys - Ala - Lys - Gly - Lys 123 129



### DISCUSSION GENERALE

L'association de méthodes d'extraction sélective et de techniques chromatographiques ou électrophorétiques a permis d'isoler les histones de tissus variés et d'en déterminer la structure primaire.

La GRK-histone et l'ALK-histone de thymus de Veau présentent entre elles et avec l'ARE-histone isolée du même tissu (55) de remarquables analogies de séquence (Tableau XXXVII), dont la plus importante apparaît au niveau de la séquence NH<sub>2</sub>-terminale qui contient probablement les sites primaires de liaison de ces histones riches en arginine avec le DNA.

SUNG et DIXON (58) ont montré à l'aide de modèles moléculaires que la séquence NH<sub>2</sub>-terminale de la GRK-histone, en conformation d'hélice α, s'insérait parfaitement dans la cavité majeure de la double hélice du DNA en configuration B. Ainsi les quatre groupes *e*-aminés des résidus de lysine en positions 5, 8, 12 et 16 et le résidu d'arginine en position 17, sont en contact étroit avec cinq groupes phosphate consécutifs sur un brin du DNA, tandis que le résidu d'arginine en position 3 est lié à un groupe phosphate de l'autre brin du DNA.

La présence de quatre résidus de glycine en positions 2, 6, 9 et 13, sur un côté de l'hélice «, et celle de quatre résidus de glycine et d'un résidu d'alanine en positions 4, 7, 11, 14 et 15 sur l'autre côté, permet l'insertion

-	
>	
~	
~	
×	
$\sim$	
へ	
$\sim$	
$\sim$	
~	
_	
~	
~	
ш	
<b>m</b>	
1	
4	
<b>—</b>	1

ANALOGIES DE SEQUENCE DES HISTONES RICHES EN ARGININE

$$ALK = \frac{N-acétyl - Ser}{l} - \frac{Gly}{l} - \frac{Arg}{Arg} - Gly - \frac{Lys}{Lys} - \frac{Gln}{l} - \frac{Gly}{Gly} - \frac{Lys}{9}$$

$$SRK = \frac{N-acétyl - Ser}{l} - \frac{Gly}{l} - \frac{Arg}{Arg} - Gly - \frac{Lys}{Lys} - \frac{Gly}{Gly} - \frac{Gly}{8}$$

ARE 
$$\frac{Ala}{1} - \frac{Arg}{2} - Thr - \frac{Lys}{2} - Gln - Thr - \frac{Ala}{8} - \frac{Arg}{8}$$

$$ALK \qquad GIu - Leu - AIa - GIy - Asn \qquad AIa - AIa - Arg - \frac{Arg}{71}$$

$$\begin{array}{rcl} GRK & GIn - Gly - Ile - \overline{Ihr} - \underline{Lys} - Pro - \underline{Ala} - Ile - \underline{Arg} - \underline{Arg} - \underline{Leu} - \underline{Ala} - Arg - & Arg - & Gly - \underline{Gly} - \underline{Gly} - \underline{Gly} - \underline{Sly} -$$



Substitution conservative

| | |

ldenti té

complète de cette région en hélice « de la GRK-histone dans la cavité majeure du DNA.

Le résidu de leucine en position 10 prend place au fond de la cavité où il peut établir des liaisons hydrophobes avec deux paires de base du DNA.

ADLER <u>et al</u> (97) se sont inspirés des travaux de SUNG et DIXON (58) pour proposer récemment un modèle de liaison du <u>lac</u>-répresseur au DNA. Ils ont ainsi déterminé dans la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du <u>lac</u>-répresseur, une région qui peut se lier aux groupes phosphate du DNA aussi bien qu'aux groupes polaires dans la cavité majeure du DNA en configuration B.

Cette région s'étend du résidu de tyrosine-17, au résidu de lysine-33. L'arginine-22, l'histidine-29 et la lysine-33 peuvent former des liaisons ioniques avec les groupes phosphate du DNA. La tyrosine-17, la glutamine-18, la sérine-21, l'acide aspartique-25 et la glutamine-26 peuvent former des liaisons hydrogène avec les groupes polaires situés dans la cavité majeure du DNA.

En examinant la séquence en amino-acides de l'ALK-histone, de la GRK-histone et de l'ARE-histone, au voisinage des résidus de tyrosine, nous avons trouvé pour chacune de ces histones, une région privilégiée susceptible de se lier à la fois aux groupes phosphate du DNA et aux groupes polaires dans la cavité majeure du DNA (Tableau XXXVIII).

La GRK-histone montre une remarquable conservation de séquence à travers l'évolution des Eucaryotes (54)(61)(88). Cette conservation qui se manifeste même dans les GRK-histones isolées de tissus cancéreux (40)(98)(99) est un fait unique dans les études de structure primaire des protéines qui ont été réalisées jusqu'à présent.

Par comparaison avec d'autres protéines ou peptides dont l'étude a été faite pour de nombreuses espèces (cytochromes, hémoglobines, fibrinopeptides), la GRK-histone apparaît comme une protéine peu évolutive.

La conservation rigide de la séquence de la GRK-histone implique une fonction hautement spécifique liée à la conformation exacte de la molécule entière et non à des régions spécifiques de la protéine et que seuls quelques changements mineurs peuvent être tolérés.

- 171 -

#### TABLEAU XXXVIII

# REGIONS PRIVILEGIEES DE LA SEQUENCE DU LAC-REPRESSEUR ET DES HISTONES RICHES EN ARGININE, SUSCEPTIBLES DE SE LIER AUX GROUPES PHOSPHATE DU DNA ET AUX GROUPES POLAIRES DANS LA CAVITE MAJEURE DU DNA EN CONFIGURATION B

lac-répresseur	Tyr – Gln – Thr – Val – Ser – Arg – Val – Val – Asp – Gln – Ala – Ser – His – Val – Ser – Ala – 17	Lys <b>33</b>
ALK-histone	Tyr - Leu - Thr <b>- Ala</b> - Glu - Ile - Leu - Glu - Leu - Ala - Gly - Asn - Ala - Ala - Arg - Asp - 57	Asn 73
GRK-histone	Tyr - Glu - Glu - Thr - Arg - Gly - Val - Leu - Lys - Val - Phe - Leu - Glu - Asn - Val - Ile - 51	Arg 67
ARE-histone	Tyr - Gln - Lys - Ser - Thr - Glu - Leu - Leu - Ile - Arg - Lys - Leu - Pro - Phe - Gln - Arg - 54	Leu 70

Les régions privilégiées dans la séquence des histones riches en arginine ont été choisies non pas en fonction de certaines analogies purement fortuites avec la séquence du lac-répresseur, mais en fonction du nombre et de la distribution des résidus basiques et des résidus susceptibles de former des liaisons hydrogène avec les bases du DNA.

- 172

1



Avec cette fonction de structure, les histones peuvent contrôler les mécanismes du cycle cellulaire qui sont étroitement liés à la conformation des macromolécules.

### BIBLIO GRAPHIE

1.	STEDMAN E. et STEDMAN E. Nature, 1943, <u>152</u> , 556.	1
2.	GEORGIEV G.P. Ann. Rev. Genetics, 1969, 3, 155.	1
3.	HUANG R.C. et BONNER J. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1962, <u>48</u> , 1216.	1
4.	BUTLER J.A.V., DAVISON P.F., JAMES D.W.F. et SHOOTER K.V. <u>Biochim. Biophys. Acta</u> , 1954, <u>13</u> , 224.	1
5.	LUCK J.M., RASMUSSEN P.S., SATAKE K. et TSVETIKOV A.N. J. Biol. Chem., 1958, 233, 1407.	1
6.	CRAMPTON C.F., MOORE S. et STEIN W.H. J. Biol. Chem., 1955, 215, 787.	1
7.	DAVISON P.F., JAMES D.W.F., SHOOTER K.V. et BUTLER J.A.V. <u>Biochim. Biophys. Acta,</u> 1954, <u>15</u> , 415.	1
8.	DALY M.M. et MIRSKY A.E. J. Gen. Physiol., 1955, <u>38</u> , 405.	1
9.	UI N. Biochim. Biophys. Acta, 1957, <u>25</u> , 49 <b>3</b> .	1
10	.BIJVOET P. Biochim. Biophys. Acta, 1957, 25, 502.	1
11	.CRAMPTON C.F., STEIN W.H. et MOORE S. J. Biol. Chem., 1957, 225, 363.	1
12	.CRUFT H.J., MAURITZEN C.M. et STEDMAN E. Proc. Roy. Soc. B., 1958, 149, 21.	1

1/5	-	1	7	5	-
-----	---	---	---	---	---

13.	CRUFT H.J., MAURITZEN C.M. et STEDMAN E. Proc. Roy. Soc. B., 1958, 149, 36.	1
14.	CRUFT H.J., MAURITZEN C.M. et STEDMAN E. Nature, 1954, 174, 580.	1
15.	LUCK J.M., COOK H.A., ELDREDGE N.T., HALEY M.I. KUPKE D.W. et RASMUSSEN P.S. Arch. Biochem. Biophys., 1956, 65, 449.	1, 2
16.	CRUFT H.J., MAURITZEN C.M. et STEDMAN E. Phil. Trans. Roy. Soc. London. B., 1957, 241, 93.	1, 2
17.	CRUFT H.J., HINDLEY J., MAURITZEN C.M. et STEDMAN E. Nature, 1957, 180, 1107.	1, 2
18.	UI N. Biochim. Biophys. Acta, 1956, <u>22</u> , 205.	2
19.	PHILLIPS D.M.P. Biochem, J., 1958, 68, 35.	2, <b>33</b> , 78
20.	BISERTE G. et SAUTIERE P. C. R. Acad. Sci. Paris, 1958, 246, 1764.	2
21.	NEELIN J.M. et CONNELL G.E. Biochim. Biophys. Acta, 1959, 31, 539.	2
22.	SAUTIERE P. <u>Thèse Doctorat Etat Pharmacie</u> , Lille, 1959.	2
23.	REISFELD R.A., LEWIS J. et WILLIAMS D.E. Nature, 1962, 195, 281.	2, 16, 30
24.	RASMUSSEN P.S., MURRAY K. et LUCK J.M. Biochemistry, 1962, 1, 79	2, 5, 7
25.	PHILLIPS D.M.P. et JOHNS E.W. Biochem. J., 1959, 71, 17	2
26.	JOHNS E.W., PHILLIPS D.M.P., SIMSON P. et BUTLER J.A.V. Biochem. J., 1960, 77, 631.	2,18
27.	DENOOIJ E.H. et WESTENBRINK H.G.K. Biochim Biophys. Acta, 1962, 62, 608.	2, 18
28.	JOHNS E.W. et BUTLER J.A.V. Biochem. J., 1962, 82, 15.	2, 18

		Pages du texte
29.	JOHNS E.W. Biochem. J., 1964, 92, 55.	2, 5, 7, 9, 10, 11, 76
30.	JOHNS E.W. Biochem. J., 1967, 105, 611.	2, 5, 7, 9, 10, 11
31。	OHLENBUSCH H.H., OLIVERA B.M., TUAN D. et DAVIDSON N. J. Mol. Biol., 1967, 25, 299.	2, 18
32.	WILHELM X. et CHAMPAGNE M. Eur. J. Biochem., 1969, 10, 102.	2
33.	HNILICA L.S. Experientia, 1964, 20, 13.	2
34.	VIDALI G. et NEELIN J.M. Eur. J. Biochem., 1968, 5, 330.	2
35.	JOHNS E.W. Biochem. J., 1967, 104, 78.	2
36.	SAUTIERE P., DAUTREVAUX M. et BISERTE G. Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, 821.	3
37.	BISERTE G., BONTE M., SAUTIERE P., MARTINAGE A. MOSCHETTO Y et BOULANGER P. J. Chromatog., 1968, 35, 168.	3
38.	LECLERC J., MARTINAGE A., MOSCHETTO Y. et BISERTE G. Eur. J. Biochem., 1969, <u>11</u> , 261.	3
39.	STARBUCK W.C., MAURITZEN C.M., TAYLOR C.W., SAROJA I.S. et BUSCH H. J. Biol. Chem., 1968, 243, 2038.	3, 5, 78
40.	SAUTIERE P., TYROU D., MOSCHETTO Y. et BISERTE G. <u>Biochimie</u> , 1971, <u>53</u> , 479.	3, 6, 7, 23, 35, 52, 171.
41.	SAUTIERE P., TYROU D., LAINE B., MIZON J., LAMBELIN-BREYNAERT M.D., RUFFIN P. et BISERTE G. C. R. Acad. Sci. Paris, 1972, 274, 1422.	<b>3</b> , 6, 7, 78, 165
42.	SKANDRANI E., MIZON J., SAUTIERE P. et BISERTE G. Biochimie (accepté pour la publication).	3

43.	KINKADE J.M., Jr. et COLE R.D. J. Biol. Chem., 1966, 241, 5790.	3
44。	SENSHU T. et IWAI K. J. Biochem. Japan, 1970, 67, 473	3, 78
45。	HNILICA L.S., KAPPLER H.A. et JORDAN J.J. Experientia, 1970, 26, 353	3, 17
46.	FAMBROUGH D.M. et BONNER J. J. Biol. Chem., 1968, 243, 4434.	3
47。	SAUTIERE P., DAUTREVAUX M. et BISERTE G. Bull. Soc. Chim. Biol., 1966, 48, 353	3,16
48.	HAYASHI H. et IWAI K. J. Biochem. Japan, 1971, 70, 543.	6, 7, 78, 99, 165
49.	PANYIM S., JENSEN R.H. et CHALKLEY R. Biochim. Biophys. Acta, 1968, 160, 252.	8
50.	JOHNS E.W., PHILLIPS D.M.P., SIMSON P. et BUTLER J.A.V. Biochem. J., 1960, 77, 631.	9
51.	KINKADE J.M., Jr. et COLE R.D. J. Biol. Chem., 1966, 241, 5798.	17
52。	IWAI K., ISHIKAWA K. et HAYASHI H. Nature, 1970, 226, 1056.	17
5 <b>3</b> 。	SAUTIERE P., TYROU D., LAINE B., MIZON J. RUFFIN P. et BISERTE G. Eur. J. Biochem., 1973 (soumis pour la publication).	17
54.	DELANGE R.J., FAMBROUGH D.M., SMITH E.L. et BONNER J. J. Biol. Chem., 1969, 244, 319.	17, 26, 35, 52, 53, 68, 70, 72, 171.
55.	DE LANGE R.J., HOOPER J.A. et SMITH E.L. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1972, 69, 882.	17, 169
56.	PANYIM S. et CHALKLEY R. Arch. Biochem. Biophys., 1969, 130, 337.	16
57。	PANYIM S. et CHALKLEY R. Biochemistry, 1969, 8, 3972.	16
58.	SUNG M. et DIXON G.H. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 1970, 67, 1616.	16, 169, 171

		Pages du texte
59.	BUTLER P.J.G., HARRIS J.I., HARTLEY B.S. et LEBERMAN R. Biochem. J., 1969, <u>112</u> , 679.	21
60.	SAUTIERE P., STARBUCK W.C., ROTH C. et BUSCH H. J. Biol. Chem., 1968, 243, 5899.	23, 30, 35, 67, 68
61.	SAUTIERE P., LAMBELIN-BREYNAERT M.D., MOSCHETTO Y. et BISERTE G. Biochimie, 1971, 53, 711.	23, 35, 60, 68, 171.
62.	QUAGLIAROTTI G., OGAWA Y., TAYLOR C.W., SAUTIERE P., JORDAN J., STARBUCK W.C. et BUSCH H. J. Biol. Chem., 1969, 244, 1796.	25, 60, 68
63.	YAMADA S. et ITANO H.A. Biochim. Biophys. Acta, 1966, <u>130</u> , 538.	25
64.	GRAY W.R. et HARTLEY B.S. Biochem. J., 1963, 89, 59P.	27
65。	STEHELIN D. et DURANTON H. J. Chromatog., 1969, 43, 93.	27
66.	GROS C. et LABOUESSE B. Eur. J. Biochem., 1969, 7, 463.	27, 93
67.	ANDREAE W.A. Can. J. Biochem. Physiol., 1958, 36, 71.	27, 49, 86
68.	EDMAN P. Acta Chem. Scand., 1956, 10, 761.	28
69.	HIRS C.H.W., MOORE S. et STEIN W.H. J. Biol. Chem., 1960, 235, 633	28
70.	GRAY W.R. et HARTLEY B.S. Biochem. J., 1963, 89, 379.	29
71.	JEPPSSON J.O. et SJÖQUIST J. Anal. Biochem., 1967, <u>18</u> , 264.	29, 54, 9 <b>3</b> , 95
72.	GROSS E. et WITKOP B. J. Biol. Chem., 1962, 237, 1856.	30
73.	MATSUBARA H. et SMITH E.L. J. Biol. Chem., 1963, 238, 2732.	31
74。	LEVY A.L. Nature, 1954, 174, 126.	31

- 178 -

		Pages du texte
59.	BUTLER P.J.G., HARRIS J.I., HARTLEY B.S. et LEBERMAN R. Biochem. J., 1969, 112, 679.	21
60.	SAUTIERE P., STARBUCK W.C., ROTH C. et BUSCH H. J. Biol. Chem., 1968, 243, 5899.	23, 30, 35, 67, 68
61.	SAUTIERE P., LAMBELIN-BREYNAERT M.D., MOSCHETTO Y. et BISERTE G. Biochimie, 1971, 53, 711.	23, 35, 60, 68, 171.
62。	QUAGLIAROTTI G., OGAWA Y., TAYLOR C.W., SAUTIERE P., JORDAN J., STARBUCK W.C. et BUSCH H. J. Biol. Chem., 1969, 244, 1796.	25, 60, 68
63 .	YAMADA S. et ITANO H.A. Biochim. Biophys. Acta, 1966, <u>130</u> , 538.	25
64.	GRAY W.R. et HARTLEY B.S. Biochem. J., 1963, 89, 59P.	27
65.	STEHELIN D. et DURANTON H. J. Chromatog., 1969, 43, 93	27
66.	GROS C. et LABOUESSE B. Eur. J. Biochem., 1969, 7, 463.	27, 93
67.	ANDREAE W.A. Can. J. Biochem. Physiol., 1958, 36, 71.	27, 49, 86
68.	EDMAN P. Acta Chem. Scand., 1956, 10, 761.	28
69.	HIRS C.H.W., MOORE S. et STEIN W.H. J. Biol. Chem., 1960, 235, 633.	28
70.	GRAY W.R. et HARTLEY B.S. Biochem. J., 1963, 89, 379.	29
71.	JEPPSSON J.O. et SJÖQUIST J. Anal. Biochem., 1967, 18, 264.	29, 54, 93, 95
72.	GROSS E. et WITKOP B. J. Biol. Chem., 1962, 237, 1856.	30
73.	MATSUBARA H. et SMITH E.L. J. Biol. Chem., 1963, 238, 2732.	31
74.	LEVY A.L. Nature, 1954, 174, 126.	31

- 178 -

75.	BISERTE G. et OSTEUX R. Bull. Soc. Chim. Biol., 1952, 33, 50.	31
76.	PHILLIPS D.M.P. Biochem. J., 1961, 80, 40 P.	33
77。	PHILLIPS D.M.P. Biochem. J., 1963, 87, 258.	33
78.	PHILLIPS D.M.P. Biochem. J., 1968, 107, 135.	33, 76
79.	STARK G.R. et SMYTH D.G. J. Biol. Chem., 1963, 238, 214.	33, 78
80.	SAUTIERE P., MOSCHETTO Y., DAUTREVAUX M. et BISERTE G. Eur. J. Biochem., 1970, 12, 222.	35, 49, 68
81.	COZZONE P. et MARCHIS-MOUREN G. FEBS Letters, 1970, 9, 341.	49
82.	GERSHEY E.L., VIDALI G. et ALLFREY V.G. J. Biol. Chem., 1968, 243, 5018.	52
83.	MURRAY K. Biochemistry, 1964, 3, 10.	53
84.	PAIK W.K. et KIM S. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1967, 27, 479.	53
85。	OGAWA Y., QUAGLIAROTTI G., JORDAN J., TAYLOR C.W., STARBUCK W.C. et BUSCH H. J. Biol. Chem., 1969, 244, 4387.	53, 68
86.	DE LANGE R.J., FAMBROUGH D.M., SMITH E.L. et BONNER J. J. Biol. Chem., 1968, 243, 5906.	67
87.	SCHROEDER W.A. The primary structure of proteins, p.106. Harper and Row, Publishers, New-York, 1968.	67, 96, 131
88 .	DE LANGE R.J., FAMBROUGH D.M., SMITH E.L. et BONNER J. J. Biol. Chem., 1969, 244, 5669.	68, 171.
89。	SAUTIERE P., TYROU D., LECLERCQ M. et BISERTE G. C. R. Acad. Sci. Paris 1970 271 1131	70

		- 180	-
		Pag	ges du texte
90.	OLSON M.O.J., SUGANO N., YEOMAN L.C., JOHNSON B. et STARBUCK W.C. Fed. Proc., 1971, 30, 1295.		78, 165.
91.	PHILLIPS D.M.P. et SIMSON P. Biochem. Biophys. Acta, 1969, 181, 154.		78
92 .	SUGANO N., OLSON M.O.J., YEOMAN L.C., JOHNSON B.R., TAYLOR C.W., STARBUCK W.C. & BUSCH H. J. Biol. Chem., 1972, 247, 3589.	et.	78, 79, 80, 107, 165.
93.	BRATTIN W.J., Jr. et SMITH E.L. J. Biol. Chem., 1971, 246, 2400.		98, 131, 158.
94。	BUTLER J.A.V., JOHNS E.W. et PHILLIPS D.M.P. Progress in Biophysics and Molecular Biology, p. 232, J.A.V. BUTLER and D. NOBLE Ed. Pergamon Press, Oxford and New-York, 1968.		108
95。	PHILLIPS D.M.P. Histones and nucleohistones, p. 47, D.M.P. PHILLIPS E Plenum Press, Londres - New-York, 1971.	d.,	165
96.	YEOMAN L.C., OLSON M.O.J., SUGANO N., JORDAN J.J., TAYLOR C.W., STARBUCK W.C. et BUSCH H. J. Biol. Chem., 1972, 247, 6018.		165
97.	ADLER K., BEYREUTHER K., FANNING E., GEISLER N., GRONENBORN B., KLEMM A., MÜLLER-HILL B., PFAHL M. et SCHMITZ A. Nature, 1972, 237, 322		171
98.	DESAI L.S. et FOLEY G.E. Biochem. J., 1970, 119, 165		171
99.	WILSON R.K., STARBUCK W.C., TAYLOR C.W., JORDAN J. et BUSCH H. Cancer Res., 1970, 30, 2942		171
100	RICHARDS B.M., PARDON J.F. et HIRST E. Biochem. J., 1970, 117, 59 P.		173
101.	RICHARDS B.M. et PARDON J.F. Exp. Cell. Res., 1970, 62, 184.		173

# APPENDICE TECHNIQUE

### TABLE DES MATIERES

### DE L'APPENDICE TECHNIQUE

### Pages

I - PREPARATION DE LA GRK-HISTONE ET DE L'ALK-	
HISTONE	T-1
A) Prélèvement des tissus	T-1
B) Préparation des histones	T-1
1) Préparation de la désoxyribonucléoprotéine	T-1
a) A partir du thymus b) A partir des noyaux isolés	T-1 T-2
2) Extraction sélective des fractions F <sub>2al</sub> et F <sub>2a2</sub>	T-3
3) Purification des histones	T-4
a) Obtention de la GRK-histone à partir de la fraction <sup>F</sup> 2a1	T-4
<ul> <li>b) Obtention de l'ALK-histone à partir de la fraction</li> <li>F2a2</li> <li>c) Préparation des colonnes</li> </ul>	T-4 T-5
<ul> <li>-1 - Préparation de la colonne de Sephadex G-100</li> <li>-2 - Préparation de la colonne de Biorex-70</li> </ul>	T-5 T-6
II - CONTROLE DE PURETE DES PREPARATIONS D'HISTONES:	
ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE	
à pH 4,5	T-7
A) Préparation des solutions	T-7
B) Préparation des gels	T8

<ol> <li>Gel à petits pores</li> <li>Gel à larges pores</li> <li>Préparation et dépôt des échantillons d'histones</li> </ol>	T-8 T-8 T-9
C) Electrophorèse	T-9
D) Coloration – Décoloration des gels	T-9
III - HYDROLYSE DES HISTONES PAR LES CARBOXYPEP-	
TIDASES A ET B	T-10
A) Hydrolyse de la GRK-histone par la carboxypeptidase A	T-10
<ol> <li>Préparation de la solution de carboxypeptidase A</li> <li>Hydrolyse</li> </ol>	T-10 T-10
B) Hydrolyse de l'ALK-histone par la carboxypeptidase B	T-11
IV - COUPURE DE LA LIAISON METHIONYLE PAR LE	
BROMURE DE CYANOGENE ET SEPARATION DES	
PRODUITS DE CLIVAGE	T-12
A) Coupure de la GRK-histone par le bromure de cyanogène	T-12
B) Séparation des produits de clivage	T-12
V - HYDROLYSE DES HISTONES PAR LES ENDOPEPTI-	
DASES	T-13
A) GRK-histone	T-13
<ol> <li>Hydrolyse trypsique</li> <li>Hydrolyse chymotrypsique</li> </ol>	T-13
B) ALK-histone	T-13
1) Hydrolyse de l'ALK-histone native par la trypsine ou	T_13
2) Hydrolyco do L'Al K-bistono maléviéo nas la trypsino	1-15
ou la chymotrypsine	T-14
a) Maléylation	T-14
р) пyaroiyse c) Démaléylation	T-14
3) Hydrolyse de l'ALK-histone native par la thermolysine	T-15

VI - FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS ENZYMATI-	
QUES PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS	T-16
A) Séparation des peptides	T-16
B) Repérage des peptides dans l'éluat	T-18
1) Réaction à la ninhydrine	T-18
a) Réactif à la ninhydrine b) Réactif concentré à la ninhydrine c) Mode opératoire	T-18 T-19 T-19
2) Réaction de Sakaguchi	T-19
a) Réactifs b) Mode opératoire	T-19 T-20
3) Réaction de Pauly	T-20
a) Réactifs b) Mode opératoire	T-20 T-20
4) Schémas des manifolds	T-21
C) Evaporation des fractions peptidiques	T-23
VII - ANALYSE ET PURIFICATION DES FRACTIONS PEP-	
TIDIQUES	T-24
A) Solvants de chromatographie	T-24
1) Solvant Butanol – Pyridine 2) Solvant Butanol – Acide acétique	T-24 T-24
B) Tampons d'électrophorèse	T-24
1) Tampon pH 3,6 2) Tampon pH 3,0	T-25 T-25
C) Colorations des cartes peptidiques	T-25
1) Coloration à la ninhydrine	T-25
a) Réactif à la ninhydrine – cadmium	T-25 T-25
2) Coloration à la phénanthrène – quinone	T-25
a) Réactif	T-26
	1-20

# VIII - TECHNIQUES D'ETUDE DE LA SEQUENCE EN

AMINO-ACIDES DES PEPTIDES	T-27
<ul> <li>A) Détermination de l'amino-acide en position NH<sub>2</sub>-termi- nale par la méthode de dansylation</li> </ul>	T-27
1) Dansylation du peptide	T-27
2) Chromatographie des Dansylamino-acides	T-28
B) Dégradation de Edman	T-29
1) Réactifs	T-29
2) Mode opératoire	T-29
C) Détermination de l'amino-acide en position COOH- terminale	T-30
1) Hydrolyse par les carboxypeptidases A et B	T-30
<ul> <li>a) Préparation de la solution de carboxypeptidase A</li> <li>b) Hydrolyse et identification des amino-acides libérés</li> </ul>	T-30 T-30
2) Hydrazinolyse	T-30
a) Réactifs b) Mode opératoire	T-31 T-31
D) Hydrolyse par l'aminopeptidase M	T-31
BIBLIO GRAPHIE	T-33

### - PREPARATION DE LA GRK-HISTONE ET DE L'ALK-HISTONE

#### A) PRELEVEMENT DES TISSUS

1

Le thymus (Veau, Porc) ou la tumeur de chloroleucémie (Rat) sont prélevés dès la mort de l'animal et congelés rapidement dans la neige carbonique. Les tissus congelés sont conservés à - 20°C jusqu'à leur utilisation.

### B) PREPARATION DES HISTONES

La préparation des histones comporte trois étapes :

- Préparation de la désoxyribonucléoprotéine ;

- Extraction sélective des fractions  $F_{2a1}$  et  $F_{2a2}$  de JOHNS (1) ;

- Purification des histones par chromatographie de gel-filtration ou d'échange ionique.

Les deux premières étapes de cette préparation sont effectuées à + 4°C. La dernière étape est effectuée à la température du laboratoire.

#### 1) Préparation de la désoxyribonucléoprotéine

La désoxyribonucléoprotéine est préparée soit directement à partir du tissu (thymus), soit à partir des noyaux préalablement isolés (tumeur de chloroleucémie) (2) (3).

### a) A partir du thymus

Le thymus émincé (150 g) est homogénéisé à l'aide d'un homogénéiseur Ultra-Turrax pendant 2 minutes dans 1 litre de solution NaCl 0,14<u>M</u> – citrate trisodique 0,01<u>M</u> – DFP (\*) 0,1 <u>mM</u>, pH 7,1. L'homogénat est filtré sur 4 épais-

(\*) DFP : diisopropylfluorophosphate.
 On fait une solution de DFP à 1 p.100 dans l'éthanol absolu et on ajoute 2 ml de cette solution à 1 litre de solution NaCl 0,14M - citrate trisodique 0,01M, pH 7,1.

seurs de gaze hydrophile et centrifugé à 1.100 g pendant 30 minutes (centrifugeuse IRC type PR-2). Le surnageant est écarté. Le sédiment est homogénéisé pendant 1 minute dans 1 litre de solution NaCl 0,14 <u>M</u> - citrate de Na 0,01 <u>M</u> -DFP 0,1 <u>mM</u>, pH 7,1. L'homogénat est centrifugé à 1.100 g pendant 15 minutes. Le sédiment est traité trois fois encore de la même manière. Le sédiment obtenu après le dernier lavage constitue la désoxyribonucléoprotéine purifiée.

### b) A partir des noyaux isolés

L'isolement des noyaux à partir de la tumeur de chloroleucémie est réalisé suivant une technique dérivée de la méthode de MURAMATSU <u>et al</u> (4). Les tumeurs (200 g) sont émincées et homogénéisées à l'aide d'un homogénéiseur de type Packard pendant 2 minutes dans 2 litres d'une solution de saccharose 0,25 <u>M</u> - CaCl<sub>2</sub> 0,003 <u>M</u>.

L'homogénat est filtré sur 4 épaisseurs de gaze hydrophile et centrifugé à 1.100 g pendant 30 minutes. Le surnageant est écarté. Le sédiment est lavé deux fois avec 1 litre de solution de saccharose  $0,25 \text{ M} - \text{CaCl}_2 0,003 \text{ M}$ , par homogénéisation suivie d'une centrifugation à 1.100 g pendant 30 minutes. Les noyaux ainsi obtenus sont purifiés selon la méthode de CHAUVEAU (5) par homogénéisation dans 250 ml d'une solution de saccharose 2,2 <u>M</u>, suivie d'une centrifugation à 36.000 g pendant 90 minutes (centrifugeuse IRC type B 20 A). Le surnageant est écarté. Le sédiment constitué par les noyaux purs est traité selon la technique décrite par STEELE <u>et al</u> (6). Il est lavé trois fois avec 500 ml de NaCl 0,14 <u>M</u> - citrate trisodique 0,01 <u>M</u>, pH 7,1 et une fois avec 500 ml de tampon Tris 0,1 <u>M</u>, pH 7,6. (\*) Toutes ces opérations de lavage s'effectuent par homogénéisation à 1.100 g pendant 15 minutes. Le sédiment obtenu après le dernier lavage constitue la désoxyribonucléoprotéine purifiée.

(\*) Tris : Tris (hydroxyméthyl)-aminométhane.

T-2

### 2) Extraction sélective des fractions F2a1 et F2a2

Les fractions  $F_{2a1}$  et  $F_{2a2}$  correspondant respectivement à la GRKhistone et à l'ALK-histone sont extraites sélectivement, selon la méthode de JOHNS (1), à partir de la désoxyribonucléoprotéine purifiée. Le sédiment de désoxyribonucléoprotéine purifiée est lavé deux fois avec 500 ml d'un mélange éthanol – eau (4 : 1 ; v/v) par homogénéisation suivie d'une centrifugation à 1.100 g pendant 10 minutes.

Le sédiment est dispersé dans 750 ml ( $\ddagger$ ) d'un mélange éthanol – solution aqueuse de chlorhydrate de guanidine à 40 p.100 et à pH 7,0 (3 : 1 ; v/v). La suspension est transférée dans un flacon de polyéthylène et soumise à une agitation douce pendant 18 heures sur un agitateur-secoueur Prolabo. La suspension est ensuite centrifugée à 1.100 g pendant 30 minutes. Le sédiment de désoxyribonucléoprotéine est extrait deux fois encore pendant deux heures chaque fois avec 300 ml ( $\ddagger$ ) de la solution éthanol – chlorhydrate de guanidine et recueilli par centrifugation à 1.100 g pendant 30 minutes.

Les surnageants sont rassemblés et filtrés sur un filtre de verre fritté n°4. A l'extrait clarifié, on ajoute un volume égal d'acétone. Le mélange est laissé 18 heures à -20°C. Le précipité qui constitue la fraction  $F_{2a2}$  est recueilli par centrifugation à 1.100 g pendant 30 minutes. Au surnageant, on ajoute un volume égal d'acétone. Le mélange est laissé 18 heures à - 20°C. Le précipité qui constitue la fraction  $F_{2a1}$  est recueilli par centrifugation à 1.100 g pendant 30 minutes. Les fractions  $F_{2a1}$  est recueilli par centrifugation à 1.100 g pendant 100 ml de HCI 0,01 N, dialysées pendant 24 heures contre de l'eau distillée (3 fois 5 litres) et lyophilisées.

A partir de 150 g de thymus, le rendement est de 902 mg pour la fraction  $F_{2a1}$  et de 995 mg pour la fraction  $F_{2a2}$ .

A partir de 200 g de tumeur de chloroleucémie, le rendement est de 75 mg pour la fraction  $F_{2a1}$  et de 125 mg pour la fraction  $F_{2a2}$ .

<sup>(\*)</sup> Les quantités de mélange éthanol – chlorhydrate de guanidine (750 ml et 300 ml) sont données pour la préparation des fractions F<sub>2a1</sub> et F<sub>2a2</sub> à partir de 150 g de thymus. Pour la préparation des fractions homologues à partir de 200 g de tumeur, ces quantités sont de 500 ml pour la première extraction et de 200 ml pour les deux extractions suivantes.

#### 3) Purification des histones

a) Obtention de la GRK-histone à partir de la fraction F<sub>2a 1</sub>

L'isolement de la GRK-histone pure à partir de la fraction F<sub>2a1</sub> est réalisé par chromatographie de gel-filtration selon une technique adaptée de SAUTIERE et al (7) et de MAURITZEN et al (8).

120 mg de fraction  $F_{2a1}$  sont dissous dans 2 ml de HCl 0,01 <u>M</u> - urée 8 <u>M</u> et maintenus à + 4°C pendant 48 heures. La solution d'histone est diluée au demi avec HCl 0,01 <u>M</u>, centrifugée et déposée sur une colonne de Sephadex G-100 (dimensions de la colonne : 200 x 2,5 cm) équilibrée et éluée avec HCl 0,01 <u>M</u> (\*) en présence de thiomersal (10 mg/l) comme antiseptique. Un débit constant de 18 ml/heure est obtenu à l'aide d'une pompe Perpex monocanal LKB (\*\*).

Les fractions de l'éluat correspondant à la GRK-histone sont rassemblées, dialysées (tube Nojax 23) pendant 24 heures contre de l'eau distillée (3 fois 5 litres) et lyophilisées.

# b) Obtention de l'ALK-histone à partir de la fraction F<sub>2a2</sub>

L'isolement de l'ALK-histone à partir de la fraction F<sub>2a2</sub> de JOHNS (1) est réalisé par chromatographie d'échange d'ions, selon une méthode adaptée de LUCK <u>et al</u> (9).

250 mg de fraction F<sub>2a2</sub> sont dissous dans 3 ml de HCl 0,01 <u>M</u> - urée 8 <u>M</u> et maintenus à + 4°C pendant 48 heures. La solution d'histone est diluée au demi avec un tampon phosphate Na 0,1 <u>M</u>, pH 6,8, contenant 8 p.100 de chlorhydrate de guanidine (\*\*\*), centrifugée et déposée sur une colonne de Biorex 70 (dimensions de la colonne : 56 x 2,5 cm), équilibrée en tampon phosphate 0,1 <u>M</u>, pH 6,8, contenant 8 p.100 de chlorhydrate de guanidine. La colonne est d'abord lavée avec 100 ml de tampon, puis éluée avec un gradient linéaire de concentration en chlorhydrate de guanidine, obtenu en introduisant dans une chambre de mélange 300 ml de tampon phosphate Na 0,1 <u>M</u>, pH 6,8,

### (\*) La solution d'HCI 0,01 M est dégazée par une ébullition de 30 minutes.

(\*\*) La densité optique de l'éluat recueilli par fractions de 4,5 ml est mesurée à 230 nm.

(\*\*\*) Chlorhydrate de guanidine purissimum Fluka.

contenant 8 p.100 de chlorhydrate de guanidine et dans un réservoir connecté à la chambre de mélange, 300 ml de tampon phosphate Na 0,1 <u>M</u>, pH 6,8, contenant 15 p.100 de chlorhydrate de guanidine. Un débit constant de 15,6 ml/heure est obtenu à l'aide d'une pompe Perpex monocanal LKB. La densité optique de l'éluat recueilli par fractions de 5,2 ml est mesurée à 277 nm. Une mesure de la turbidité est également réalisée sur chaque fraction de l'éluat. A une aliquote (0,1 ml) de chaque fraction, on ajoute successivement, 1,9 ml d'eau désionisée et 1 ml d'acide trichloracétique 3 <u>M</u>; après 15 minutes, la turbidité du mélange est mesurée à 400 nm. La concentration en chlorhydrate de guanidine dans l'éluat est déduite des mesures de réfractométrie effectuées de 10 en 10 fractions.

Les fractions de l'éluat correspondant à l'ALK-histone sont rassemblées, dialysées (tube Nojax 23) sous agitation, 48 heures contre de l'eau distillée (6 fois 5 litres) et lyophilisées.

Après le passage du gradient, la colonne de Biorex-70 est lavée pendant 24 heures avec un tampon phosphate Na 0,1 <u>M</u>, pH 6,8, contenant 40 p.100 de chlorhydrate de guanidine, puis elle est de nouveau équilibrée en tampon phosphate 0,1 M, pH 6,8, contenant 8 p.100 de chlorhydrate de guanidine.

L'ALK-histone ainsi obtenue contient encore un contaminant mineur de taille moléculaire plus élevée. Il est donc nécessaire de la purifier par chromatographie de gel-filtration sur colonne de Sephadex G-100 suivant un protocole identique à celui décrit pour l'obtention de GRK-histone pure.

### c) Préparation des colonnes

- 1 - Préparation de la colonne de Sephadex G-100

120 g de Sephadex G-100 (40 - 120 microns) sont versés par petites portions et sous agitation constante dans 4 litres d'eau désionisée, contenus dans un bécher. Le gel de Sephadex est laissé 24 heures à la température du laboratoire. Il est ensuite débarrassé des particules les plus fines à l'aide du processus suivant effectué 5 fois : suspension du gel dans 3 litres d'eau désionisée, décantation de 15 minutes, élimination du surnageant par aspiration à la trompe à eau. Après la dernière opération de lavage, le gel est suspendu dans 2 litres d'HCl 0,01 <u>M</u>, contenant du thiomersal (10 mg/litre), et la suspension est dégazée sous vide, pendant une heure.

Avant d'y introduire le Sephadex, la colonne est stérilisée, par remplissage avec une solution aqueuse de phénol à 1 p.100, préalablement dégazée par ébullition de 30 minutes à 100°C et refroidie. Au bout de 24 heures, la colonne ainsi stérilisée est vidée à moitié et remplie de Sephadex. Elle est ensuite équilibrée pendant 72 heures avec HCI 0,01 <u>M</u> contenant du thiomersal (10 mg/litre).

# - 2 - Préparation de la colonne de Biorex-70

120 g de résine Biorex-70 sont mis en suspension sous forte agitation dans 2 litres d'eau distillée. L'agitation est maintenue pendant 30 minutes. L'eau de lavage est ensuite éliminée. La résine est mise alors en suspension sous forte agitation dans 2 litres d'HCl 2 <u>N</u>. L'agitation est maintenue pendant 30 minutes. La résine, maintenant sous forme acide, est lavée à l'eau distillée sur un filtre de verre fritté n° 4 jusqu'à ce que les eaux de lavage soient à pH 6. La résine ainsi traitée est mise en suspension dans le tampon phosphate Na 0,1 <u>M</u>, pH 6,8, contenant 8 p.100 de chlorhydrate de guanidine et introduite dans la colonne.

### II - CONTROLE DE PURETE DES PREPARATIONS D'HISTONES

### ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE à pH 4,5

L'électrophorèse des histones en gel de polyacrylamide est réalisée à pH 4,5 selon la technique de REISFELD et al (10).

A) Préparation des solutions

Solution A :	KOH <u>N</u>	48	ml
	Acide acétique glacial	17,2	ml
	Temed ( <del>x</del> )	4	ml
	Eau distillée q.s.p.	100	ml
Solution B .	KOH N	48	ml
	Acide acétique alacial	2 8	7 m l
	Tomod	0 1	۰ ۱ ۲۰۰۸ ما
		0,4	0 111
	Lau distillée q.s.p.	100	ml
Solution C :	Acrylamide	60	g.
	Méthylène bis acrylamide	0,4	g
	Eau distillée q.s.p.	100	ml
Solution D :	Acrylamide	10	g
	Méthylène bis acrylamide	2,5	g
r.	Eau distillée q.s.p.	100	ml
Solution E :	Riboflavine	4	mg
	Eau distillée q.s.p.	100	ml

(\*) Temed : Tétraméthyléthylènediamine.

Solution F :	préparée extemporanément		
	Persulfate d'ammonium	0,028	g
	Urée	4,8	g
	Eau désionisée q.s.p.	10	ml

Toutes ces solutions sont conservées en flacons bruns à + 4°C.

#### B) Préparation des gels

Les gels sont préparés dans des tubes de verre (longueur : 75 mm ; diamètre intérieur : 5 mm) soigneusement dégraissés par un lavage au détergent (Teepol) suivi d'un lavage à l'acide sulfurique chaud.

#### 1) Gel à petits pores (15 p.100 d'acrylamide)

Le mélange suivant est préparé à 0°C et à l'abri de la lumière :

Solution A	l volume	1,5 ml ( <del>x</del> )
Solution C	2 volumes	3 m.l
Eau distillée	l volume	1,5 ml
Solution F	4 volumes	6 m l

0,9 ml de ce mélange sont introduits dans chaque tube en évitant la formation de bulles d'air. Une goutte d'eau distillée est déposée dans chaque tube à la surface du mélange. La polymérisation du mélange s'effectue en 45 minutes à la température ambiante. La pellicule d'eau est alors éliminée de la surface du gel à l'aide d'un papier filtre.

2) Gel à larges pores "spacer gel" (2,5 p.100 d'acrylamide)

Le mélange suivant est préparé à 0°C et à l'abri de la lumière :

Solution B	l volume	0,4 ml ( <del>x</del>
Solution D	2 volumes	0,8 ml
Solution E	l volume	0,4 ml
Solution d'urée 8 <u>M</u>	4 volumes	1,6 ml

(\*) Les quantités sont indiquées pour 12 gels.

0,15 ml de ce mélange sont introduits dans chaque tube. Une goutte d'eau distillée est déposée dans chaque tube à la surface du mélange. La polymérisation du mélange s'effectue en 20 minutes à la température ambiante, avec une lampe fluorescente. La pellicule d'eau est alors éliminée de la surface du gel à l'aide d'un papier filtre.

### 3) Préparation et dépôt des échantillons d'histones

1 mg d'histone est dissous dans 1 ml d'HCl 0,01 <u>M</u> - urée 8 <u>M</u>. La solution est conservée à + 4°C et utilisée 48 heures après sa préparation.

Des quantités de 5 µl et 20 µl correspondant respectivement à 5 µg et à 20 µg de protéine sont prélevées dans chaque solution d'histone à analyser et sont mélangées à 0,15 ml de solution pour gel à larges pores, avant d'être introduites dans les tubes d'électrophorèse.

Une goutte d'eau distillée est déposée dans chaque tube à la surface de la solution. La polymérisation du mélange s'effectue en 20 minutes à la température ambiante, avec une lampe fluorescente. La pellicule d'eau est alors éliminée de la surface du gel à l'aide d'un papier filtre.

### C) Electrophorèse

La migration électrophorétique est effectuée dans un appareil Buchler dont la cuve est maintenue à 10°C. Un courant constant de 6 mA/tube est fourni par une alimentation Shandon type Vokam. La durée de l'électrophorèse est de 60 minutes.

### D) Coloration - Décoloration des gels

Les gels sont colorés pendant 30 minutes dans une solution d'Amidoschwarz 10 B à 1 p.100 dans le mélange acide acétique – éthanol – eau (1:2:7; v/v) et décolorés par lavages répétés sous agitation douce avec le mélange acide acétique – éthanol – eau (1:2:7; v/v).

### III - HYDROLYSE DES HISTONES PAR LES CARBOXYPEPTIDASES A ET B (\*)

# A) HYDROLYSE DE LA GRK-HISTONE PAR LA CARBOXY-PEPTIDASE A

#### 1) Préparation de la solution de carboxypeptidase A

La solution de carboxypeptidase A est préparée en lavant 0,1 ml de la suspension d'enzyme cristallisé, 4 fois avec 2 ml d'eau distillée glacée. L'enzyme est alors dissous dans 1 ml d'une solution de LiCl à 10 p.100 dans le tampon Tris 0,01 <u>M</u>, pH 7,5 ; la concentration d'enzyme est approximativement 2,5 mg/ml.

### 2) Hydrolyse

11 mg (1 µmole) de GRK-histone sont dissous dans 1,8 ml de tampon Tris 0,01 <u>M</u>, pH 7,5 et hydrolysés à 37°C, sous agitation constante avec 0,2 ml de la solution de carboxypeptidase A (rapport enzyme/substrat : 1/20). Une cinétique de l'hydrolyse est réalisée en prélevant des aliquotes de 0,2 ml aux temps : 10 minutes, 20 minutes, 30 minutes, 1 heure, 2 heures, 3 heures et 24 heures. Un témoin enzyme (1,8 ml de tampon Tris 0,01 <u>M</u> pH 7,5 et 0,2 ml de solution de carboxypeptidase A) est maintenu à 37°C sous agitation constante. Des aliquotes de 0,2 ml sont prélevées 10 minutes, 3 heures et 24 heures après l'addition d'enzyme.

Les prélèvements sont recueillis dans 1 ml de tampon citrate trisodique 0,2 <u>M</u> pH 2,2 et congelés dans un mélange de neige carbonique et d'acétone, pour être ensuite analysés avec l'Analyseur d'amino-acides.

(\*) Carboxypeptidase A (EC 3.4.2.1) (Worthington) traitée par le DFP.
 Carboxypeptidase B (EC 3.4.2.2) (Worthington) traitée par le DFP.

T-10

### B) HYDROLYSE DE L'ALK-HISTONE PAR LA CARBOXYPEPTIDASE B

7 mg (0,5 µmole) d'ALK-histone sont dissous dans 0,9 ml de tampon Tris 0,01 <u>M</u> pH 7,8 et hydrolysés à 37°C, sous agitation constante avec 0,01 ml de solution de carboxypeptidase B (rapport enzyme/substrat : 1/20).

Des aliquotes de 0,3 ml sont prélevées après 10 minutes et 30 minutes d'hydrolyse. Un témoin enzyme (0,9 ml de tampon Tris 0,01 <u>M</u> pH 7,8 et 0,01 ml de solution de carboxypeptidase B) est maintenu à 37°C, sous agitation constante. Des aliquotes de 0,3 ml sont prélevées 10 minutes et 30 minutes après l'addition d'enzyme.

Les prélèvements sont recueillis dans 2,5 ml de tampon citrate trisodique 0,2 <u>M</u> pH 2,2 et congelés dans un mélange de neige carbonique et d'acétone pour être ensuite analysés avec l'Analyseur d'amino-acides.

Un second prélèvement de 0,3 ml effectué après 10 minutes d'hydrolyse est acidifié avec 0,1 ml d'HCI N pour être ensuite soumis à l'hydrazinolyse.

# IV - COUPURE DE LA LIAISON METHIONYLE PAR LE BROMURE DE CYANOGENE ET SEPARATION DES PRODUITS DE CLIVAGE

## A) COUPURE DE LA GRK-HISTONE PAR LE BROMURE DE CYANOGENE

La coupure de la liaison méthionyle par le bromure de cyanogène a été réalisée selon la méthode de GROSS et WITKOP (11). 110 mg (10 µmoles) de GRK-histone sont dissous dans 10 ml d'acide formique à 70 p.100. On ajoute 106 mg de bromure de cyanogène (100 µmoles/µmole de méthionine). Le mélange réactionnel est placé sous azote et maintenu à 34°C pendant 24 heures avec une agitation constante. Il est ensuite dilué à 100 ml avec de l'eau désionisée, et lyophilisé.

#### B) SEPARATION DES PRODUITS DE CLIVAGE (12)

Le résidu sec ainsi obtenu est dissous dans 4 ml d'HCl 0,01 <u>N</u>. Après centrifugation, la solution est déposée sur une colonne (200 x 2,5 cm) de Sephadex G-100 (40-120 µ) équilibrée en milieu HCl 0,01 <u>N</u>. L'élution des produits de clivage est effectuée par HCl 0,01 <u>N</u> avec un débit constant de 18 ml/heure. La densité optique de l'éluat recueilli par fractions de 4,5 ml, est mesurée à 230 et 278 nm.

. . . .

12 7
# V - HYDROLYSE DES HISTONES PAR LES ENDOPEPTIDASES

#### A) GRK-HISTONE

#### 1) Hydrolyse trypsique

110 mg (10 µmoles) de GRK-histone sont dissous dans 15 ml de tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 <u>M</u> pH 8,0 et hydrolysés par la TPCK-trypsine (\*) à 37°C, pendant 4 heures. La TPCK-trypsine, utilisée dans un rapport final enzyme/substrat de 1/50, est ajoutée au temps zéro de l'hydrolyse (1,1 mg) et après 2 heures d'hydrolyse (1,1 mg). L'arrêt de l'hydrolyse est obtenu par ajustement du pH à 3,5 avec de l'acide formique pur.

#### 2) Hydrolyse chymotrypsique

110 mg (10 µmoles) de GRK-histone sont dissous dans 15 ml de tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 <u>M</u> pH 8,0 et hydrolysés par la chymotrypsine à 37°C pendant 2 heures. La chymotrypsine, utilisée dans un rapport final enzyme/substrat de 1/50, est ajoutée au temps zéro de l'hydrolyse (1,1 mg) et après 1 heure d'hydrolyse (1,1 mg). L'arrêt de l'hydrolyse est obtenu par ajustement du pH à 3,5 avec de l'acide formique pur.

#### B) ALK-HISTONE

# Hydrolyse de l'ALK-histone native par la trypsine ou la chymotrypsine

140 mg (10 µmoles) d'ALK-histone sont dissous dans 20 ml de tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 <u>M</u> pH 8,0 et hydrolysés par la TPCK-trypsine ou

 <sup>(\*)</sup> Trypsine (EC 3.4.4.4) (Worthington) traitée par le TPCK, L-(1-tosylamido-2-phényl)éthyl chlorométhyl kétone.
 chymotrypsine (EC 3.4.4.5) (Worthington WCDS).
 Thermolysine (EC 3.4.4.-) (Merck).

la chymotrypsine à 37 °C pendant 4 heures. Chaque enzyme, utilisé dans un rapport final enzyme/substrat de 1/50, est ajouté au temps zéro de l'hydrolyse (1,4 mg) et après 2 heures d'hydrolyse (1,4 mg). L'arrêt de l'hydrolyse est obtenu par ajustement du pH à 3,5 avec de l'acide formique pur.

# 2) Hydrolyse de l'ALK-histone maléylée par la trypsine ou la chymotrypsine

# a) Maléylation

La maléylation de l'ALK-histone a été réalisée selon la technique de BUTLER <u>et al</u> (13). 100 mg (7 µmoles) d'ALK-histone sont dissous dans 20 ml d'eau distillée. La solution maintenue à 0°C à l'aide d'un bain thermostaté LAUDA (type K 2 RD) est ajustée à pH 9,0 avec de la soude normale. 120 mg d'anhydride maléique (10 µmoles d'anhydride maléique/µmole de lysine) sont ajoutés par petites portions, sous agitation constante, en maintenant le pH entre 8,5 et 9,5 à l'aide de soude <u>N</u>. Il faut environ 15 minutes pour ajouter les 120 mg d'anhydride maléique. Le pH se stabilise à 9,0, 15 minutes après la dernière addition d'anhydride maléique. Après une heure de réaction, le mélange est dialysé (tube Nojax 18), sous pression et sous agitation pendant 4 heures à la température du laboratoire contre NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,1 <u>M</u> pH 8,0 (4 fois 1 litre). La solution d'ALK-maléylée est alors transférée dans une fiole conique thermostatée à 37°C.

# b) Hydrolyse

L'ALK-histone maléylée est hydrolysée par la TPCK-trypsine ou la chymotrypsine à 37 °C pendant 4 heures en milieu bicarbonate d'ammonium 0,1 <u>M</u> pH 8,0. Chaque enzyme est ajouté au temps zéro de l'hydrolyse (1 mg) et après 2 heures d'hydrolyse (1 mg). L'arrêt de l'hydrolyse est obtenu par ajustement du pH à 3,5 avec de l'acide formique pur.

## c) Démaléylation

La démaléylation de l'hydrolysat est effectuée selon la méthode de De LANGE <u>et al</u> (14). L'hydrolysat acidifié à pH 3,5 est maintenu, sous agitation constante, à 40°C pendant 40 heures, en présence de toluène (0,1 ml) pour éviter tout développement de microorganismes.

T-15

# 3) Hydrolyse de l'ALK-histone native par la thermolysine

140 mg (10 µmoles) d'ALK-histone sont dissous dans 20 ml de tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 <u>M</u> pH 8,0 et hydrolysés par la thermolysine à 40°C pendant 4 heures. La thermolysine utilisée dans un rapport final enzyme/ substrat de 1/100, est ajoutée au temps zéro de l'hydrolyse (0,7 mg) et après 2 heures d'hydrolyse (0,7 mg). L'arrêt de l'hydrolyse est obtenu par ajustement du pH à 3,5 avec de l'acide formique pur.

# VI - FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS ENZYMATIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS (15)

#### A) SEPARATION DES PEPTIDES

Après lyophilisation, l'hydrolysat est dissous dans 3 ml d'acide formique à 30 p.100. Le matériel insoluble est éliminé par centrifugation. Le surnageant est déposé sur une colonne de Chromobeads P (\*) (130 x 0,635 cm) thermostatée à 59°C et équilibrée dans un tampon pyridine 0,1 <u>M</u> – acide formique pH 2,9. Un débit constant de 33 ml/heure est obtenu à l'aide d'une pompe Milton-Roy et des fractions de 5,5 ml sont collectées automatiquement. L'élution des peptides est réalisée dans un premier temps avec un gradient continu de pH croissant – pH 2,9 à pH 5,0 –, et de molarité croissante en pyridine – 0,1 M à 2 M –.

Ce gradient est obtenu avec un appareil Varigrad à 9 cellules cylindriques contenant chacune 200 ml de tampon (Tableau 1).

Après le passage du gradient, l'élution des peptides de caractère basique est poursuivie pendant 24 heures avec un tampon pyridine 2 <u>M</u> – acide acétique pH 5,0.

En modifiant le gonflement des grains de résine, l'accroissement de la molarité en pyridine (de 0,1 <u>M</u> à 2 <u>M</u>) entraîne une augmentation de la pression du tampon sur la colonne de résine et le tassement de cette colonne. Avant de régénérer la résine par la soude 0,2 <u>N</u>, il est donc nécessaire de la replacer en tampon pyridine 0,1 <u>M</u> pH 2,9, pour éviter les fortes pressions dommageables pour la colonne. Il est même recommandé d'enlever la résine de la colonne et de refaire la colonne après chaque fractionnement.

(\*) La résine Chromobeads P (Technicon) est une résine cationique type Dowex 50 X 2.

TABLEAU I

Numéro de la cellule	Tampon pyridine – (★) acide formique	Tampons pyridine – acide formique pH 5,0		Tampon pyridine –	
de la cellule	0,1 <u>M</u> , pH 2,9	0,5 <u>M</u>	1 <u>M</u>	2 <u>M</u> , pH 5,0	
1	200 m l				
2	150 ml	50 m l			
3	100 m l	100 m l			
4	50 m l	150 ml			
· 5		200 m l			
6		200 m l			
7		100 m l	100 m l		
8		-	200 m l		
9				200 m l	

(\*) La pyridine (RP Prolabo) est purifiée par distillation sur ninhydrine (1 g/litre) et baryte anhydre (10 g/litre).

BUS

T-17

#### B) REPERAGE DES PEPTIDES DANS L'ELUAT

Le repérage des peptides dans l'éluat s'effectue successivement par la réaction à la ninhydrine, la réaction de SAKAGUCHI (arginine) et la réaction de PAULY (histidine et tyrosine)sur des aliquotes de 0,32 ml prélevées automatiquement dans chaque fraction. Une chaîne d'analyse Technicon équipée du manifold approprié à chaque réaction est utilisée pour ce repérage (Figures 1, 2, 3 et 4). Le montage permet l'analyse de 40 échantillons à l'heure. Le temps de prélèvement de chaque échantillon est de 1 minute. Chaque prélèvement d'échantillon est suivi d'un prélèvement d'eau distillée pendant 30 secondes pour le rinçage du circuit d'analyse et pour éviter l'introduction de bulles d'air dans le circuit d'analyse.

#### 1) Réaction à la ninhydrine

# a) Réactif à la ninhydrine

Solution concentrée de ninhydrine	750 ml
Solution diluée de méthylcellosolve	3.000 ml
Le réactif est maintenu sous atmosphère d'azote,	dans un flacon opaque.

#### - 1 - Solution concentrée de ninhydrine

Méthylcellosolve	500 m l
Ninhydrine	15 g
Hydrindantine	1,125 g
Tampon acétate Na 4 <u>M</u> pH 5,51	262,5 ml

Cette solution est préparée et conservée sous atmosphère d'azote dans un flacon opaque.

- 2 - Solution diluée de r	méthylcellosolve
Méthylcellosolve	1.500 m l
Eau distillée	1.500 ml

Cette solution est préparée et conservée sous atmosphère d'azote, en flacon brun. Lorsque le rendement d'une hydrolyse enzymatique se trouve diminué par la présence d'une fraction insoluble importante (hydrolyse trypsique ou chymotrypsique de l'ALK-histone native) ou que la quantité de protéine hydrolysée est faible, un réactif concentré à la ninhydrine est utilisé.

b) Réactif concentré à la ninhydrine

Solution concentrée de ninhydrine 750 ml Solution diluée de méthylcellosolve 1.000 ml Le réactif est maintenu sous atmosphère d'azote, dans un flacon opaque.

# c) Mode opératoire

L'échantillon prélevé est mélangé au réactif à la ninhydrine dans une bobine de délai. Le flux liquidien est fractionné par bulles d'azote. La progression du flux est assurée par une pompe péristaltique. Après passage au bainmarie à 95°C et refroidissement, le mélange réactionnel passe dans un colorimètre où sa densité optique est mesurée à 570 nm.

#### 2) Réaction de SAKAGUCHI

La réaction de SAKAGUCHI adaptée à l'Auto-Analyseur Technicon est utilisée pour le repérage des peptides contenant de l'arginine.

#### a) Réactifs

-	1 -	Solution de	N-bromosuccinimic	le (	(NBS)
N-bromosu	ccir	nimide		3	g
Eau distillé	e q	.s.p.	1.0	00	ml

Cette solution doit être préparée extemporanément et maintenue dans un flacon opaque.

- 2 - Solution de 8-hydrox	y-quinoléine (8	HQ)
Solution de 8-hydroxy-quinoléine à	1 p.100	
dans le méthanol	20 m l	
NaOH 8 N	<b>3</b> 75 ml	
Eau distillée g.s.p.	1.000 ml	

L'échantillon prélevé est dilué au demi avec de l'eau distillée et fractionné par bulles d'air. Il passe dans une bobine de délai, puis il est mélangé avec la solution de 8-hydroxy-quinoléine. Il passe dans une seconde bobine de délai à la sortie de laquelle il est mélangé avec la solution de N-bromosuccinimide. Après passage dans une troisième bobine de délai, le mélange réactionnel passe dans un colorimètre où sa densité optique est mesurée à 505 nm.

#### 3) Réaction de PAULY

La réaction de PAULY adaptée à l'Auto-Analyseur Technicon est utilisée pour le repérage des peptides contenant de l'histidine et de la tyrosine.

# a) Réactifs

- 1 - Solution d'acide sul	fanilique
Acide sulfanilique	5 g
HCI concentré	42 m l
Eau distillée q.s.p.	1.000 ml
- 2 - Solution de nitrite d	le sodium
NaNO <sub>2</sub>	3,5 g
Eau distillée q.s.p.	1.000 ml

Cette solution doit être préparée extemporanément.

- 3 - Solution de carbonate de	sodium 2	M
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> anhydre	212 g	
Eau distillée q.s.p.	1.000 ml	

# b) Mode opératoire

L'échantillon prélevé est mélangé avec la solution de carbonate de sodium. Le mélange fractionné par bulles d'air passe dans une bobine de délai à la sortie de laquelle il est mélangé avec le mélange – acide sulfanilique, nitrite de sodium –. Après passage dans une bobine de délai, le mélange réactionnel passe dans un colorimètre où sa densité optique est mesurée à 505 nm 4) Schémas des manifolds



# MANIFOLD NINHYDRINE CONCENTREE



## MANIFOLD SAKAGUCHI



#### MANIFOLD PAULY



# C) EVAPORATION DES FRACTIONS PEPTIDIQUES

Les fractions correspondant à un pic d'élution sont rassemblées et évaporées à sec à l'aide d'un Rotary Evapomix Buchler équipé d'un piège à neige carbonique. Chaque fraction peptidique est ensuite dissoute dans 2 ml d'acide acétique à 10 p.100 et conservée à - 20°C. L'analyse des fractions peptidiques est effectuée par chromatographie sur papier Whatman 3 MM suivie d'une électrophorèse. Les peptides sont éventuellement purifiés par l'une ou l'autre de ces méthodes ou par les deux méthodes associées, en utilisant un papier Whatman 3 MM lavé pendant 48 heures avec de l'acide acétique à 10 p.100.

#### A) SOLVANTS DE CHROMATOGRAPHIE

 Solvant Butanol - pyridine (chromatographie descendante de 18 heures).

Butanol-1	750 ml
Pyridine	500 m l
Acide acétique	150 ml
Eau désionisée	600 ml

 Solvant Butanol - Acide acétique (chromatographie descendante de 24 heures).

Butanol-1	200 m l
Acide acétique	30 m l
Eau désionisée	75 ml

#### B) TAMPONS D'ELECTROPHORESE

La séparation électrophorétique des peptides ou des amino-acides est effectuée dans un tampon pyridine – acide acétique de pH 3,6 ou 3,0, sous une tension de 2.200 Volts, pendant 90 minutes. L'appareil utilisé est un Electrophorator GILSON (modèle D 5.000 Volts). 1) Tampon pH 3,6

Pyridine	10	ml
Acide acétique	100	ml
Eau désionisée	2.890	mĺ

2) Tampon pH 3,0		
Pyridine	3	m
Acide acétique	120	m
Eau désionisée q.s.p.	4.000	m

#### C) COLORATIONS DES CARTES PEPTIDIQUES

1) Coloration à la ninhydrine

a) Réactif à la ninhydrine - cadmium (16)

Ninhydrine	10 g	
Acétone	1.000 ml	
Acétate de cadmium	lg	
Acide acétique glacial	50 m l	
Eau distillée	100 ml	

## b) Mode opératoire

Après séchage, par simple ventilation sous la hotte, les cartes peptidiques sont placées pendant l heure dans une étuve à 100°C. Elles sont ensuite trempées dans le réactif à la ninhydrine – cadmium et placées dans une étuve dont la température est progressivement élevée jusqu'à 60°C. Ce chauffage progressif permet d'obtenir un fond blanc.

# 2) Coloration à la phénanthrène-quinone

Cette coloration est utilisée pour la révélation spécifique sur papier des peptides contenant de l'arginine (17) (18) et a l'avantage d'être très stable.

# a) Réactif

- <u>Solution</u> A		
Phénanthrène-quinone	0,02 g	
Ethanol	100 m l	
- <u>Solution B</u>	i ne e si	तः संस्थितः संस्थितिः संस्थितिः
NaOH pastilles	10 g	
Ethanol à 60 p.100 q.s.p.	100 ml	
Cette solution doit être préparée	extemporané	ément.

Le réactif à la phénanthrène-quinone est préparé en mélangeant des volumes égaux de solutions A et B.

# b) Mode opératoire

Après séchage par simple ventilation sous la hotte, les cartes peptidiques sont placées pendant 1 heure dans une étuve à 100°C. Elles sont ensuite trempées dans le réactif à la phénanthrène-quinone et séchées sous la hotte. Après 20 minutes, l'examen des cartes peptidiques sous la lumière ultraviolette à 366 nm fait apparaître les peptides contenant de l'arginine sous forme de taches de fluorescence bleutée sur un fond bleu foncé.

## VIII - TECHNIQUES D'ETUDE DE LA SEQUENCE

EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES

# A) DETERMINATION DE L'AMINO-ACIDE EN POSITION NH<sub>2</sub>-TERMINALE PAR LA METHODE DE DANSYLATION (19)(20)

#### 1) Dansylation du peptide

Placer 1 à 5 nmoles de peptide dans un tube (75 x 5 mm). Evaporer à sec sous vide dans un dessicateur, en présence d'acide sulfurique concentré et de soude en pastilles.

Ajouter 10 µl de NaHCO<sub>3</sub> 0,2 M; évaporer à sec sous vide. Cette opération a pour but d'alcaliniser le milieu et d'en éliminer l'ammoniac.

Ajouter 10 µl d'eau désionisée. Vérifier le pH (pH 8,5 papier indicateur Merck). Si le pH est acide, ajouter 10 µl de NaHCO<sub>3</sub> 0,2 <u>M</u>; évaporer à sec et ajouter 10 µl d'eau désionisée.

Ajouter 10 µl d'une solution de DNS-Cl (2,5 mg/ml dans l'acétone anhydre)(\*) préparée chaque mois et conservée à - 20°C et à l'abri de la lumière. Le tube bouché avec un morceau de parafilm et couvert avec une feuille d'aluminium, est laissé l heure à 37°C ou 3 heures à la température du laboratoire. Le mélange réactionnel est évaporé à sec sous vide. Le peptide est hydrolysé avec 0,05 ml d'HCl 5,7 N pendant 18 heures à 105 °C. L'hydrolysat est évaporé à sec sous vide dans un dessicateur en présence de soude en pastilles, et repris par 10 µl d'une solution aqueuse de pyridine à 50 p.100 (v/v). <u>Chromatographie des Dansylamino-acides</u> (ou DNS-amino-acides)
 Les DNS-amino-acides sont séparés et identifiés par chromatographie
 sur couche mince de gel de silice.

28 g de gel de silice (Kieselguhr G Merck) sont mis en suspension dans 60 ml d'un mélange eau distillée – éthanol absolu (55 : 5 ; v/v). La suspension est étalée sur 5 plaques de verre (20 x 20 cm) en une couche uniforme de 0,25 mm d'épaisseur. On laisse les plaques sécher à la température ambiante. Avant le dépôt des DNS-amino-acides, les plaques sont tracées et activées à 100°C pendant 1 heure.

Pour la séparation monodimensionnelle, des couloirs parallèles de 1 cm de largeur sont tracés dans le sens perpendiculaire au sens de l'étalement du gel. Plusieurs échantillons peuvent ainsi être analysés en même temps, sur la même plaque (21). L'échantillon à analyser est déposé à 3 cm du bord inférieur de la plaque. De chaque côté de l'échantillon sont déposés des DNS-amino-acides témoins en solution aqueuse de pyridine à 50 p.100 (v/v).

Après introduction de la plaque dans la cuve de chromatographie et une période de saturation de 30 minutes, les DNS-amino-acides sont séparés par chromatographie ascendante dans le système solvant : benzène – pyridine – acide acétique (16 : 4 : 1 ; v/v) décrit par DEYL et ROSMUS (22) (migration 90 minutes).

Pour les séparations bidimensionnelles, les systèmes solvants préconisés par GROS et LABOUESSE ont été utilisés (23).

Première dimension : migration 90 minutes

Solvant : benzène - pyridine - acide acétique (16 : 4 : 1 ; v/v).

Seconde dimension : migration 120 minutes

Après réactivation à 100°C pendant 10 minutes et saturation de 30 minutes, la plaque est soumise à une seconde migration dans un sens perpendiculaire à celui de la première migration avec le système solvant : toluène monochloroéthanol - ammoniaque concentrée (6 : 10 : 4 ; v/v).

#### B) DEGRADATION DE EDMAN

La dégradation de EDMAN a été utilisée, soit en association avec la méthode de dansylation (20) (24) (25), soit en méthode soustractive.

#### 1) Réactifs

Phénylisothiocyanate (PITC) (Fluka purissimum p.a.)
Pyridine (Prolabo RP) distillée sur ninhydrine (1 g/l) et sur baryte anhydre (10 g/l)

Acide trifluoroacétique (TFA) (Fluka purissimum p.a.) Acétate de n-butyle (Merck p.a.)

#### 2) Mode opératoire

100 à 500 nanomoles de peptide en solution dans l'acide acétique à 10 p.100 sont placées dans un tube Kimax et évaporées à sec à l'aide d'un Rotary EvapoMix Buchler. Le résidu sec est dissous dans 150 µl d'eau distillée. On ajoute 150 µl d'une solution de PITC (\*) à 5 p.100 (p/v) dans la pyridine. La réaction de couplage est effectuée sous atmosphère d'azote à 45°C pendant 90 minutes. Le mélange est évaporé à sec à 60°C pendant 30 minutes, sous vide poussé (1 mm Hg) en présence d'acide sulfurique, de soude en pastilles et d'anhydride phosphorique. Le résidu sec est dissous dans 200 µl de TFA et la cyclisation et la coupure sont réalisées sous atmosphère d'azote à 45°C pendant 30 minutes. Le TFA est ensuite chassé sous un jet d'azote. Le tube est alors placé à 60°C pendant 10 minutes sous vide poussé (1 mm Hg), en présence de soude en pastilles. Le résidu sec est dissous dans 200 µl d'eau distillée. La solution est extraite deux fois avec 1,5 ml d'acétate de butyle saturé d'eau. Le résidu sec est dissous dans 150 µl d'eau distillée. Avant d'effectuer un nouveau cycle de dégradation, une aliquote est prélevée pour être soumise à la dansylation ou à l'analyse des amino-acides.

 (\*) Cette solution est préparée extemporanément en mélangeant 50 µl de PITC et 1 ml de pyridine.

# C) <u>DETERMINATION DE L'AMINO-ACIDE EN POSITION</u> COOH-TERMINALE

#### 1) Hydrolyse par les carboxypeptidases A et B (\*)

# a) Préparation de la solution carboxypeptidase A

La solution de carboxypeptidase A est préparée en lavant 0,1 ml de la suspension d'enzyme cristallisé 4 fois avec 2 ml d'eau distillée glacée. L'enzyme est alors dissous dans 1 ml d'une solution de LiCl à 10 p.100 dans le tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 <u>M</u> pH 8,0 : la concentration d'enzyme est approximativement 2,5 mg/ml.

# b) Hydrolyse et identification des amino-acides libérés

0,25 à 1 µmole de peptide est dissoute dans 0,5 ml de tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 <u>M</u>, pH 8,0 et hydrolysée à 40°C par les carboxypeptidases A ou B ou par le mélange des deux enzymes, pendant des temps généralement compris entre 0 et 6 heures.

L'arrêt de l'hydrolyse est obtenu par acidification de l'hydrolysat avec 0,1 ml d'acide formique. L'hydrolysat est alors lyophilisé. Le ou les amino-acides libérés sont identifiés, soit avec l'Analyseur d'amino-acides, soit en électrochromatographie sur papier. Dans ce cas, l'hydrolysat est dissous dans 0,2 ml d'acide acétique à 10 p.100 et déposé sur une feuille de papier Whatman 3 MM. L'électrophorèse est effectuée en tampon de pH 3,6 ou de pH 3,0, pendant 90 minutes à 2.200 V, en présence d'amino-acides témoins. La séparation chromatographique est effectuée pendant 24 heures avec le système solvant butanol – acide acétique, en présence d'amino-acides témoins. Les amino-acides sont révélés avec le réactif à la ninhydrine – cadmium (voir le paragraphe VII de cet Appendice Technique).

#### 2) Hydrazinolyse

Nous avons utilisé cette méthode soit seule, soit après hydrolyse des peptides ou de la protéine (ALK-histone) par la carboxypeptidase A ou B.

(\*) Rapport Enzyme/Substrat = 0,25 mg/µmole.

#### a) Réactifs

Hydrazine anhydre (97 p.100 Matheson) Benzaldéhyde (p.a. Merck)

# b) Mode opératoire

Une aliquote correspondant à 0,2 - 0,5 µmole de peptide est placée dans un tube Kimax (100 x 10 mm) et lyophilisée. Le résidu sec est redissous dans 0,5 ml d'HCl 0,1 N. La solution est lyophilisée. Ce processus est répété 5 fois. Le résidu sec est alors placé pendant 48 heures dans un dessicateur, sous vide en présence de  $P_2O_5$  et de soude en pastilles. On ajoute alors 0,5 ml d'hydrazine anhydre. Le tube Kimax est introduit dans un tube pyrex (150 x 16 mm) qui est ensuite scellé et placé à l'étuve à 80°C pendant 16 heures. Le mélange réactionnel est évaporé dans un dessicateur sous vide en présence d'acide sulfurique concentré et d'anhydride phosphorique. Il est dissous dans 1 ml d'eau et évaporé de nouveau.

Le résidu sec est dissous dans 1 ml d'eau et la solution est extraite successivement selon la méthode de NIU et FRAENKEL-CONRAT (26) avec du benzaldéhyde (3 fois 1 ml) et de l'éther privé de peroxyde saturé d'eau (2 fois 1 ml). La phase aqueuse est séparée de la phase organique par centrifugation. Après la dernière extraction, la phase aqueuse est évaporée à sec. L'aminoacide libéré est alors identifié, soit en chromatographie bidimensionnelle ou en électrochromatographie sur papier, soit avec l'Analyseur d'amino-acides.

#### D) HYDROLYSE PAR L'AMINOPEPTIDASE M (\*)

Une aliquote correspondant à 0,1 - 0,5 µmole de peptide est lyophilisée. Le résidu sec est dissous dans 0,2 - 1 ml de tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 <u>M</u> pH 8,0. L'hydrolyse du peptide est effectuée avec l'aminopeptidase M (0,5 mg/µmole de peptide) pendant 24 à 48 heures, en présence d'une goutte de toluène.

L'hydrolysat est lyophilisé. L'acide aspartique et l'acide glutamique (\*) Aminopeptidase M (EC 3.4.1.-) (ROHM et HAAS). ainsi que leurs amides respectives sont identifiés par électrochromatographie sur papier Whatman 3 MM (électrophorèse 90 minutes à 2.200 V, en tampon de pH 3,0; chromatographie 24 heures dans le solvant butanol – acide acétique). La séparation bidimensionnelle est réalisée en présence d'amino-acides témoins. Les amino-acides sont révélés par le réactif à la ninhydrine – cadmium.

#### **BIBLIO GRAPHIE**

#### DE L'APPENDICE TECHNIQUE

1. JOHNS E.W. T-1, T-3, T-4 Biochem. J., 1967, 105, 611. 2. LECLERC J., MARTINAGE A., MOSCHETTO Y. et T-1 BISERTE G. Eur. J. Biochem., 1969, 11, 261. 3. SAUTIERE P., TYROU D., MOSCHETTO Y. et T-1 BISERTE G. Biochimie, 1971, 53, 479. 4. MURAMATSU M., SMETANA K. et BUSCH H. T-2 Cancer Research, 1963, 23, 510. 5. CHAUVEAU J., MOULE Y. et ROUILLER Ch. T-2 Exp. Cell Research, 1956, 11, 317. 6. STEELE W.J. et BUSCH H. T-2 Cancer Research, 1963, 23, 1153.

7. SAUTIERE P., DAUTREVAUX M. et BISERTE G. T-4<sup>t</sup>
 Bull. Soc. Chim. Biol., 1966, 48, 353.

Pages dans le texte

- 8. MAURITZEN C.M., STARBUCK W.C., SAROJA I.S., T-4 TAYLOR C.W. et BUSCH H.
  J. Biol. Chem., 1967, 242, 2240.
- 9. LUCK J.M., RASMUSSEN P.S., SATAKE K. et T-4 TSVETIKOV A.N.
   J. Biol. Chem., 1958, 233, 1407.
- 10. REISFELD R.A., LEWIS J. et WILLIAMS D.E. T-7 Nature, 1962, 195, 281.
- 11. GROSS E. et WITKOP B.
   T-12

   J. Biol. Chem., 1962, 237, 1856.
- SAUTIERE P., STARBUCK W.C., ROTH C. et BUSCH H. T-12
   J. Biol. Chem., 1968, 243, 5899.
- 13. BUTLER P.J.G., HARRIS J.I., HARTLEY B.S. et T-14 LIEBERMAN R.
  Biochem. J., 1969, <u>112</u>, 679.
- 14. DE LANGE R.J., FAMBROUGH D.M., SMITH E.L. et T-14 BONNER J. J. Biol. Chem., 1969, 244, 319.
- 15. SAUTIERE P., BREYNAERT M.D., MOSCHETTO Y. et T-16 BISERTE G.
  C. R. Acad. Sci. Paris, 1970, 271, 364.
- LIU T.Y., STEIN W.H., MOORE S. et ELLIOTT S.D. T-25
   J. Biol. Chem., 1965, 240, 1143.
- 17. YAMADA S. et ITANO H.A.
   T-25

   Biochim. Biophys. Acta, 1966, 130, 538.

18.	EASLEY C.W., ZEGERS B.J.M. et DE VIJLDER M.	T-25
	Biochim. Biophys. Acta, 1969, <u>175</u> , 211.	
19.	GRAY W.R. et HARTLEY B.S.	T-27
	<u>Biochem. J.</u> , 1963, <u>89</u> , 59P.	
20.	HARTLEY B.S.	T-27, T-29
	<u>Biochem. J.</u> , 1970, <u>119</u> , 805.	
21.	STEHELIN D. et DURANTON H.	T-28
	<u>J. Chromatog.</u> , 1969, <u>43</u> , 93.	
22.	DEYL Z. et ROSMUS J.	T-28
	<u>J. Chromatog.</u> , 1965, <u>20</u> , 514.	
23.	GROS C. et LABOUESSE B.	T-28
	<u>Eur. J. Biochem.</u> , 1969, <u>7</u> , 463.	
24.	GRAY W.R. et HARTLEY B.S.	T-29
	<u>Biochem. J.</u> , 1963, <u>89</u> , 379.	
25.	GRAY W.R.	T-29
	Methods in Enzymology, Ed. C.H.W. HIRS, Academic Pres New-York, 1967, <u>11</u> , 469.	s,
26.	NIU C.I. et FRAENKEL-CONRAT H.	T-31
3	J. Am. Chem. Soc., 1955, 77, 5882.	