

N°

50376
1973
221

50376
1973
221

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE I

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

par

André DELACOURTE

**ALKYLATION DES RÉSIDUS D'HISTIDINE
DE LA MYOGLOBINE DE CHEVAL**



Membres du Jury : **MM. J. MONTREUIL** Président
J. HAN Rapporteur
C. LOUCHEUX Examineur
G. BISERTE »
M. DAUTREVAUX »

Soutenue le Mars 1973

AVANT-PROPOS

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

A cette occasion, nous sommes heureux de pouvoir exprimer notre profonde gratitude et notre respectueux attachement à Monsieur le Professeur BOULANGER qui a bien voulu nous accueillir dans son laboratoire auquel nous sommes fier d'appartenir.

Nous remercions vivement Monsieur le Professeur BISERTE dont nous apprécions les inépuisables connaissances scientifiques et les hautes qualités humaines, qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre profonde gratitude pour le grand honneur qu'il nous fait en acceptant de participer au jury de notre thèse. Nous n'oublierons jamais qu'il s'est employé activement pour notre reconversion vers la Chimie Biologique et nous ait ainsi donné la possibilité de travailler dans un laboratoire efficace sous la direction de maîtres compétents.

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

Nous adressons nos vifs remerciements et notre profonde gratitude à Monsieur le Professeur LOUCHEUX pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant de participer au jury de notre thèse. Nous vous sommes très reconnaissant de nous avoir permis de travailler dans votre laboratoire sur les effets "cotton" de la myoglobine et de nous avoir donné vos précieux conseils.

Nous remercions très chaleureusement Monsieur le Professeur DAUTREVAUX qui est l'instigateur de ce travail. Vous avez pu nous faire bénéficier de vos vastes connaissances scientifiques. Bien souvent, malgré l'ampleur et la diversité de vos travaux vous avez accepté avec beaucoup de gentillesse et d'indulgence de discuter des problèmes qui se trouvaient posés. Nous vous en sommes infiniment reconnaissant et nous vous prions de croire en notre entier dévouement.

Nous sommes heureux, à l'occasion de cette thèse, de pouvoir exprimer nos plus grands remerciements à Monsieur HAN, Maître de Recherches au CNRS, notre Directeur de travail. Dès notre arrivée, vous nous avez appris notre métier sans vous ménager et nous sommes fier d'avoir été votre élève, car vous nous avez fait bénéficier de la valeur et de la sûreté de vos immenses connaissances scientifiques ainsi que de votre dextérité dans le maniement des méthodes chimiques de détermination des séquences de protéines.

Nous remercions très vivement tous nos amis du laboratoire, en particulier ceux du Labo D-E qui, grâce à leur aide, leur gentillesse et leur franche amitié, nous ont permis de travailler dans la sérénité et la bonne humeur.

Nous remercions également ceux qui nous ont grandement aidé par leurs conseils et leur aide directe, Madame DEMOUEAU, Madame MILLOT et Madame MORANDI,

Mademoiselle DAVRIL, Mademoiselle HENNACHE

Monsieur Pierre BOULANGER

Monsieur PICQUE, Monsieur STRECKER et Monsieur VANDECASSERIE.

ABBREVIATIONS UTILISEES DANS LE TEXTE

Hb : Hémoglobine

Mb : Myoglobine

CM Mb : Carboxyméthyl Myoglobine

Gb : Globine

Reconst. (P. 33) Myoglobine reconstituée (Globine + Hème)

BuOH : Butanol

AcOH : Acide acétique

CPM : coups par minute

D.O. : densité optique

nm : nanomètre

EmM : (p.25) Coefficient d'extinction pour une solution millimolaire.

TABLE DES MATIERES

	<u>pages</u>
I - <u>INTRODUCTION</u>	1
II - <u>PRESENTATION GENERALE DE LA MOLECULE</u>	6
A) Structure primaire de la myoglobine	
1) Composition	
2) Séquence en acides aminés	
3) Groupe prosthétique ou hème	
B) Structures secondaire et tertiaire de la molécule	12
1) Aspect de la molécule	
2) Disposition de l'hème	
3) Union hème-globine	
C) Accessibilité des résidus d'histidine	20
D) Microhétérogénéité	
E) Structure des dérivés d'addition de la myoglobine	22
1) Caractéristiques de quatre types de liaison dans les complexes globine-hème-ligand	
2) Spectres d'absorption des ferromyoglobines	23
3) Propriétés des spectres de la ferrimyoglobine	24
4) Systèmes réducteurs de la ferrimyoglobine	24
5) Fixation d'oxygène	28
a) Forme de la courbe de dissociation de l'oxymyoglobine	
b) Constante d'équilibre K	
c) Variation de la courbe de dissociation de l'oxymyoglobine en fonction de différents facteurs	
III - <u>RESULTATS EXPERIMENTAUX</u>	34
A) Alkylation de la myoglobine par l'iodoacétate	35
a) Techniques d'étude	
1) Préparation de la myoglobine	35
2) Technique d'alkylation de la myoglobine	
3) Préparation de la myoglobine dénaturée	36
4) Hydrolyse trypsique	37
5) Hydrolyse chymotrypsique	

6) Technique de fractionnement peptidique	37
α) Préparation de la colonne	
β) Chromatographie	
γ) Régénération de la résine	
δ) Lecture de la courbe d'élution	
ε) Technique d'évaluation de la radioactivité	
ζ) Electrochromatographie sur papier	
η) Technique des autoradiogrammes	
θ) Etude des peptides	
b) Résultats et discussion	41
1) Alkylation	41
2) Hydrolyse trypsique	42
3) Hydrolyse chymotrypsique	47
α) Etude de l'hydrolysate par fractionnement sur colonne de résine échangeuse de cations	47
β) Etude comparative des finger-prints de la globine de Mb et de CM Mb	49
- par révélations spécifiques	
- après marquage au ¹⁴ C	
γ) Etude de l'hydrolysate chymotrypsique par fractionnement sur colonne de résine échangeuse de cations et autoradiogramme des peptides radioactifs	50
B) Isolement de la CM Mb ¹⁴ C	55
1) Essais de séparation sur carboxyméthylcellulose	
2) Séparation par électrofocalisation	
3) Contrôle de pureté par électrophorèse en gel de polyacrylamide	
C) Etude des propriétés optiques de la CM Mb et de sa capacité de fixation d'oxygène	59
1) Comparaison des spectres d'absorption après électrofocalisation	59
2) Réduction de la CM Met Mb par différents systèmes réducteurs	61
3) Capacité de fixation d'oxygène	64
a) Réduction de la CM Met Mb et étude de la capacité de fixation d'oxygène par tonométrie	
b) Détermination de la pression partielle en oxygène dans le tonomètre	
c) Détermination du pourcentage d'oxyMb formée	

- d) Courbe de dissociation de l'oxy CM Mb en fonction de la pression partielle en oxygène
- e) Comparaison avec l'oxyMb native

IV - CONCLUSION

70

BIBLIOGRAPHIE

76

I - INTRODUCTION

L'hémoglobine et la myoglobine sont parmi toutes les protéines celles qui ont été et sont encore les plus étudiées.

L'intérêt qui leur est porté est dû à leur rôle physiologique très important comme transporteur d'oxygène. Mais avant tout, elles représentent de tous les points de vue, le modèle idéal pour l'investigation des protéines en général.

Notre connaissance sur la structure et la fonction de l'hémoglobine et de la myoglobine est bien supérieure à celle de toute autre protéine.

En dépit de cela un grand nombre de problèmes est encore à résoudre et, parmi eux, le fonctionnement exact des mécanismes moléculaires responsables de la fonction biochimique de la protéine.

La séquence en amino-acides de la myoglobine de 13 espèces animales a été déterminée et des séquences importantes de plusieurs autres ont été décrites.

En dehors de l'intérêt phylogénétique qui peut découler des comparaisons entre les structures primaires, ces travaux prennent toute leur signification en raison de la facilité de la préparation et de la simplicité des substrats qui font de celles-ci un matériel de choix pour les études physico-chimiques se rapportant à la conformation des protéines.

Les séquences en amino-acides de la myoglobine de Cheval, de Boeuf, de Mouton, de Blaireau, de Chien et de Porc ont été déterminées dans notre laboratoire. La connaissance de leur structure nous permet d'envisager l'étude d'autres aspects biochimiques, notamment dans le domaine des modifications chimiques au niveau de la protéine et du centre actif.

Depuis quelques années, de nombreux travaux ont été effectués en vue de modifier des enzymes ou des protéines de transport par une réaction chimique spécifique. Il a été possible par ce procédé de déterminer la contribution de certains acides aminés à l'activité catalytique, aux phénomènes d'allostérie ainsi qu'au maintien de la structure tridimensionnelle.

Pour tenter de localiser les séquences responsables de la liaison de l'hème à la globine de myoglobine de Cheval et d'étudier le

comportement de la myoglobine après modification chimique. DAUTREVAUX et HAN (1) ont utilisé des réactions de blocage des résidus d'histidine par carboxyméthylation.

La myoglobine de Cheval est une chaîne unipeptidique et elle est constituée par 153 résidus d'acides-amino dont 11 résidus d'histidine. Deux résidus d'histidine sont liés avec l'hème. DAUTREVAUX, HAN, BOULANGER et BISERTE ont classé ces 11 résidus d'histidine en deux catégories : histidines réactives et histidines accessibles. Ces auteurs ont effectué leurs travaux d'après les idées directrices dérivées des travaux de GUNLACH et STEIN(2) et d'après les travaux de BANASZAK et GURD (3) d'autre part.

En effet, MOORE et STEIN ont effectué des études très intéressantes sur la modification chimique de la ribonucléase. Ils ont remarqué que l'acide iodoacétique peut inactiver la ribonucléase à pH 5,5, en alkylant l'un des quatre résidus d'histidine. Cette alkylation n'a pas lieu en présence d'un inhibiteur du type compétitif ni en milieu urée 8 M.

En poursuivant leurs travaux, ces auteurs ont démontré que deux dérivés étaient formés : l'un par alkylation de l'azote 1 du noyau imidazole de His 119 et l'autre par alkylation de l'azote 3 du noyau imidazole d'His 12. Ces deux dérivés 1 CM HIS 119 et 3 CM HIS 12 conservent au maximum 1 p. 100 de l'activité enzymatique. Le rapport des quantités des deux dérivés isolés est 8 : 1 (CM HIS 119 : CM 12). La réaction s'interrompt dès que l'un ou l'autre des résidus d'histidine est alkylé ; on n'obtient aucun dérivé dicarboxyméthylé (DI CM HIS). L'agent actif est l'halogénoalkyl ICH_2COO^- . Ces auteurs ont expliqué cette alkylation spécifique par l'attraction électrostatique émanant d'une zone électropositive du centre actif orientant probablement les molécules en présence et facilitant ainsi la réaction d'alkylation.

La sensibilité particulière de cette réaction vis-à-vis du pH avait conduit MOORE et STEIN (4) à postuler que deux résidus d'histidine pourraient faire partie du centre actif. Cette hypothèse a été largement confirmée par l'étude de la structure tridimensionnelle de la ribonucléase

par HARKER et al. (5). Il est intéressant de noter que l'alkylation de HIS 119 se produit à pH 5,5 et non pas à pH 8,5. Dans la molécule de ribonucléase, le groupe le plus susceptible de perdre une charge positive à pH 8 serait le groupe imidazole d'un second résidu d'histidine.

Par contre, BANASZAK et GURD (6) ont alkylé, à l'aide d'un large excès d'acide bromoacétique à pH 7, 7 résidus d'histidine de myoglobine de Cachalot (sur 10 résidus). De la même façon, en utilisant en milieu Urée 8 M, tous les résidus d'histidine ont été alkylés. DAUTREVAUX, HAN et BOULANGER et BISERTE en ont déduit l'existence de deux sortes de résidus d'histidine dans la myoglobine de Cheval : les uns réactifs et les autres accessibles.. Ces auteurs ont notamment obtenu des résultats intéressants après carboxyméthylation à pH 5,5 avec l'acide iodoacétique : ils ont ainsi pu mettre en évidence la disparition d'un résidu d'histidine après alkylation de la myoglobine native, de 2 résidus pour la myoglobine dénaturée, de 3 résidus pour la globine dénaturée et de 4 résidus pour la globine native.

Ces résultats sont d'autant plus intéressants que l'on sait depuis les travaux de WYMAN (7) que certains résidus d'histidine sont directement impliqués dans une liaison de l'hème à la globine. Dans cette thèse, nous nous sommes attaché à déterminer le résidu d'histidine de la myoglobine native réagissant préférentiellement avec l'iodoacétate dans les conditions douces d'alkylation décrites par GUNLACH, STEIN et MOORE.

Nous avons également étudié les propriétés physico-chimiques de la myoglobine modifiée : propriétés électrophorétiques en électrophorèse et sur gel de polyacrylamide, propriétés optiques de la myoglobine, étude de la réduction de la carboxyméthylmetmyoglobine et affinité de la carboxyméthyl myoglobine pour l'oxygène. La propriété physiologique la plus importante des hémoprotéines respiratoires est en effet leur combinaison réversible avec l'oxygène moléculaire : cette propriété fondamentale semble liée directement au type de liaison unissant l'hème à la globine : l'hème seul ne peut pas fixer cet oxygène et il s'oxyde immédiatement en sa présence ; par contre si l'hème est associé à la protéine, il peut alors fixer la molécule de gaz sans oxydation de son atome de fer.

Après modification de la globine, l'étude de la courbe de dissociation de l'oxymyoglobine modifiée nous indiquera après comparaison avec la courbe de dissociation de l'oxymyoglobine native s'il y a perte d'activité physiologique. Nous pourrions ainsi établir un parallèle entre la modification du ou des acides aminés et la modification de l'activité physiologique et en déduire le rôle joué par ces acides aminés dans la fonction de la protéine et dans ses propriétés physicochimiques.

II - PRESENTATION GENERALE DE LA
MOLECULE

A - STRUCTURE PRIMAIRE DE LA MYOGLOBINE

La myoglobine est un chromoprotéide à groupement prosthétique ferro-porphyrinique. Ce groupement prosthétique ou hème est le même que celui de l'hémoglobine, la ferro-protoporphyrine IX (groupe de l'étioporphyrine de type III). La protéine ou globine est constituée d'une seule chaîne peptidique de 153 amino-acides, ce qui correspond à un poids moléculaire de l'ordre de 17.000.

I - COMPOSITION

La composition de la myoglobine de Cheval est caractérisée par des teneurs très élevées en acide glutamique, leucine, et des teneurs basses en arginine, tyrosine, méthionine, tryptophane ; les taux d'acide aspartique, glycolle, alanine et histidine sont également importants. Il n'y a pas en général de cystéine ni de cystine dans la protéine, sauf dans la myoglobine de quelques primates (Homme, Gibbon, Chimpanzé) (Référence des séquences p. 83).

La composition en amino-acides de la myoglobine de Cheval est conforme à cette représentation générale : Asp : 7 ; Thr : 7 ; Ser : 5 ; Glu : 13 ; Pro : 4 ; Gly : 15 ; Ala : 15 ; Val : 7 ; Met : 2 ; Trp : 2 ; Amide : 9 (3 Asn et 6 Gln).

2) SEQUENCE EN AMINO-ACIDES

La structure covalente de la myoglobine de Cheval a été déterminée par DAUTREVAUX, HAN, BOULANGER et BISERTE (7). Elle a été établie par regroupement des séquences de peptides obtenus par hydrolyse enzymatique de la globine et des fragments obtenus par coupure au bromure de cyanogène (Figure 1).

La séquence de la myoglobine de Cheval possède quelques particularités dont on doit tenir compte pour une étude biochimique de cette protéine.

La trypsine coupe les groupements carboxyliques des résidus arginine et lysine. La liaison lysyle au niveau de la lysine 45 est coupée avec un rendement de 50 p. 100 du fait de la proximité d'un résidu d'acide aspartique inhibant l'action de l'enzyme. L'hydrolyse tryptique entraîne la formation de peptides insolubles contenant

NUMERO 1 5 10 15
 SEQUENCE Gly-Leu-Ser-Asp-Gly-Glu-Trp-Gln-Gln-Val-Leu-Asn-Val-Trp-Gly-
 HYD. TRYP ←----- TN 1-----→ ←----- TN 2-----
 HYD. CHYM ←-----Trp 1-----→ ←--Trp 2--→ ←--
 EXT

 INT N-TER- 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 - 10 - 11 - 12 - 13 -
 (A)

NUMERO 20 25 30
 SEQUENCE Lys-Val-Glu-Ala-Asp-Ile-Ala-Gly-His-Gly-Gln-Glu-Val-Leu-Ile-
 HYD. TRYP --→ ←----- TN 3 -----
 HYD. CHYM -----His 1 -----→ ←--
 EXT

 INT 14 - 15 - 16-AB - 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 - 10 - 11 -
 (B)

NUMERO 35 40 45
 SEQUENCE Arg-Leu-Phe-Thr-Gly-His-Pro-Glu-Thr-Leu-Glu-Lys-Phe-Asp-Lys-
 HYD. TRYP --→ ←-----TN 4 -----→ ←--TN 5 --→
 HYD. CHYM ---Arg 1--→ ←-----Phe 2 -----→ ←--Phe3
 EXT

 INT 12 - 13 - 14 - 15 - 16 - 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 1 - 2 - 3 -
 (B) (C) (C.D)

NUMERO 50 55 60
 SEQUENCE Phe-Lys-His-Leu-Lys-Thr-Glu-Ala-Glu-Met-Lys-Ala-Ser-Glu-Asp-
 HYD. TRYP ←-TN6-→ ←--TN 7 --→ ←-----TN 8 -----→ ←-----TM1-----
 HYD. CHYM --→ ←----- Met 1 -----→ ←-----
 EXT

 INT 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 1 - 2 - 3 -
 (C.D) (D) (E)

AA ---- AA : Acides aminés dont la position en extrémité N ou C
 ----- terminale dans le peptide est due à la spécificité de
 coupure de l'enzyme.

EXT, INT : Acides aminés se trouvant à l'extérieur ou à l'intérieur
 de la molécule protéique.



NUMERO	65	70	75
SEQUENCE	Leu-Lys-Lys-His-Gly-Thr-Val-Val-Leu-Thr-Ala-Leu-Gly-Gly-Ile-		
HYD. TRYP	----->	<-----TM 2 ----->	<-----TM 3 ----->
HYD. CHYM	-->	<-----His 4 ----->	<----->
EXT	4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 - 10 - 11 - 12 - 13 - 14 - 15 - 16 - 17 - 18 -		
INT	(E)		

NUMERO	80	85	90
SEQUENCE	Leu-Lys-lys-Lys-Gly-His-His-Glu-Ala-Glu-Leu-Lys-Pro-Leu-Ala-		
HYD. TRYP	----->	<-TM4->	<-----TM 5 ----->
HYD. CHYM	-->	<-----His 5-His 6----->	<-----His 7----->
EXT	19- 20- 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 1 - 2 - 3 - 4 - 5 -		
INT	(E)	(E.F)	(F)

NUMERO	95	100	105
SEQUENCE	Gln-Ser-His-Ala-Thr-Lys-His-Lys-Ile-Pro-Ile-Lys-Tyr-Leu-Glu-		
HYD. TRYP	----->	<TM 6->	<-----TM 7 ----->
HYD. CHYM	----->	<-----His 8-->	<-----Tyr 1----->
EXT	6 - 7 - 8 - 9 - 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 -		
INT	(F)	(F.G)	(G)

NUMERO	110	115	120
SEQUENCE	Phe-Ile-Ser-Asp-Ala-Ile-Ile-His-Val-Leu-His-Ser-Lys-His-Pro-		
HYD. TRYP	-----TM 8 ----->	<----->	<--TM 9 -->
HYD. CHYM	-->	<-----His 9 ----->	<-----Met 2----->
EXT	7 - 8 - 9 - 10 - 11 - 12 - 13 - 14 - 15 - 16 - 17 - 18 - 19 - 1 - 2 -		
INT	(G)		(G.H)

AA ---- AA : Acides aminés dont la position en extrémité N ou C terminale dans le peptide est due à la spécificité de coupure de l'enzyme.

EXT, INT : Acides aminés se trouvant à l'extérieur ou à l'intérieur de la molécule protéique.



NUMERO	125	130	135
SEQUENCE	Gly-Asn-Phe-Gly-Ala-Asp-Ala-Gln-Gly-Ala-Met-Thr-Lys-Ala-Leu-		
HYD. TRYP	-----TM 10 -----> <TC 1-> <-----		
HYD. CHYM	-----Met 2 -----> <-----		
EXT			
---	3 - 4 - 5 - 1 - 2 - 3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 - 10 - 11 - 12 -		
INT	(G.H) (H)		

NUMERO	140	145	150
SEQUENCE	Glu-Leu-Phe-Arg-Asn-Asp-Ile-Ala-Ala-Lys-Tyr-Lys-Glu-Leu-Gly-		
HYD. TRYP	--TC 2 -----> <-----TC 3 -----> <TC4-> <----TC 5 --		
HYD. CHYM	--Phe 6----> <-----Arg 2 -----> <-----Phe 7 ---		
EXT			
---	13_ 14_ - 15_ 16_ - 17_ 18_ - 19_ 20_ - 21_ 22_ 23_ - 24_ 25_ - 1 - 2 -		
INT	(H)		

NUMERO	153
SEQUENCE	Phe-Gln-Gly;
HYD. TRYP	----->
HYD. CHYM	----->
EXT	
---	3 - 4 - 5 ;
INT	

FIGURE 1

AA-----AA : Acides aminés dont la position en extrémité N ou C
 <-----> terminale dans le peptide est due à la spécificité
 de coupure de l'enzyme.

EXT, INT : Acides aminés se trouvant à l'extérieur ou à
 l'intérieur de la molécule proteique.



un grand nombre de résidus d'acides aminés hydrophobes. Ces peptides insolubles appartiennent au noyau tryptique insoluble (Core) et sont localisés dans la région limitée par les acides aminés 1 --- 16, 64 --- 67 et 103 --- 118.

Cependant, il existe dans la myoglobine de Cheval 4 liaisons Val-Leu dont 3 sont hydrolysées par la trypsine avec un rendement de moins de 30 p. 100. La coupure au niveau de Val-Leu-Asn divise le

10 11 12

peptide 1 --- 16 faisant partie du noyau tryptique insoluble en deux peptides solubles ; la coupure se fait également au niveau de Val-Leu-Thr (deuxième noyau tryptique insoluble scindé), et au niveau

68 69 70
Val-Leu-His. La liaison leucyle 29-30 au niveau de la séquence
113 114 115

Val-Leu-Ile-Arg n'est pas hydrolysée en raison du voisinage immédiat
28 29 30 31

d'une liaison arginyle sensible à l'action de la trypsine.

Au milieu de la protéine se trouvent deux centres basiques représentés par la séquence 62-64 (Lys-Lys-His) qui assurent une des liaisons de l'hème à la globine et par la séquence 77-82 (Lys-Lys-Lys-Gly-His-His).

La présence de deux résidus de méthionine permet de scinder la globine en trois segments par clivage des liaisons méthionyl par le bromure de cyanogène.

3) GROUPE PROSTHETIQUE OU HEME

Le groupement prosthétique de la myoglobine est un complexe fer⁺⁺-protoporphyrine IX (groupe de l'étioporphyrine de type III) FISCHER(8). Les porphyrines sont très répandues dans la nature et jouent un rôle fondamental dans les processus biologiques tels que la photosynthèse, le transport d'électrons et la fixation réversible d'oxygène, processus qui sont apparemment très différents.

La molécule de porphyrine est constituée de quatre noyaux pyrrol reliés entre eux par des groupements méthényle par l'intermédiaire des carbones en α de l'azote.

- La porphyrine naturelle contient 3 types de substituants :
- Quatre groupes méthyle en position 1.3.5.8.
 - Deux groupes vinyle en position 2.4 et deux groupes propanoïque en position 6.7 (Figure 2).

L'anneau tétrapyrrolique est une structure plane qui a la forme d'un disque.

La principale propriété chimique des porphyrines est leur aptitude à se combiner par leurs azotes pyrroliques aux métaux, en particulier aux métaux de la famille du fer (Fe, Cr, Mn, Ni, Co) au zinc et au cuivre, pour donner naissance à des complexes non ionisables.

Les métalloporphyrines ont reçu le nom d'hème quand elles renferment du fer à l'état ferreux (Fe II) et celui d'hématine quand elles renferment du fer à l'état ferrique (Fe III). Il existe autant d'hèmes et d'hématines que de porphyrines et on les désigne d'un nom rappelant celui de leur constituant organique : à la protoporphyrine correspondent le protohème et la protohématine.

B - STRUCTURE SECONDAIRE ET TERTIAIRE DE LA MYOGLOBINE

La méthode de diffraction des rayons X appliquée à la myoglobine de Cachalot par KENDREW et al. (9) a permis la détermination des structures secondaire et tertiaire de la molécule.

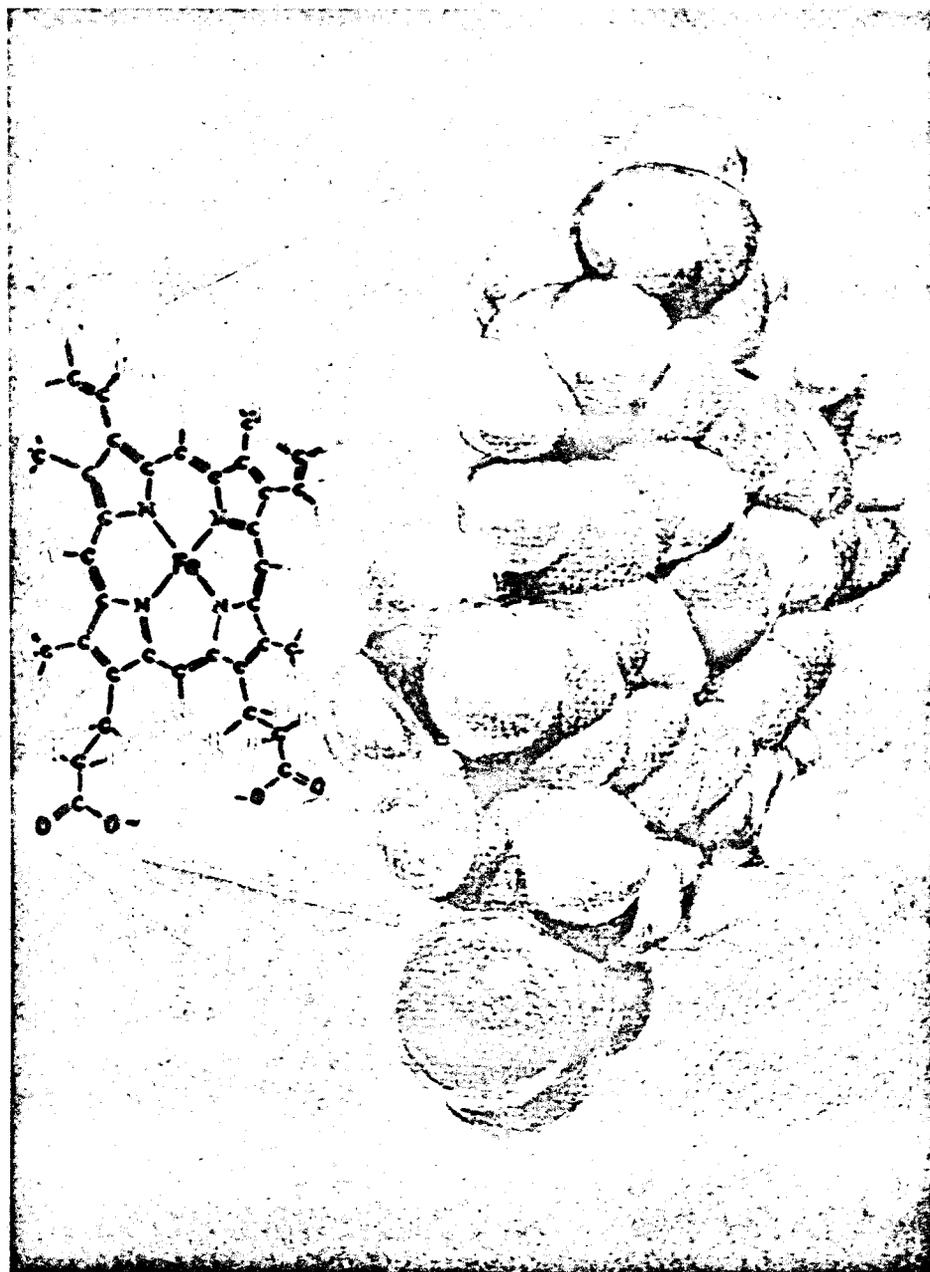
En 1958, KENDREW et al. (9) montrèrent avec un pouvoir de résolution de 6 Å la configuration générale de la chaîne polypeptidique.

Les progrès réalisés dans le domaine des ordinateurs électroniques portèrent en 1960 le pouvoir de résolution à 2 Å. KENDREW et al. (10) purent ainsi identifier l'hélice α de PAULING et les segments en pelote statistique.

En 1963, avec un pouvoir de résolution de 1,4 Å, NOBBS (11) montra les atomes constitutifs de la myoglobine.

1) Aspect de la molécule

La molécule de myoglobine de Cachalot est formée de huit



Groupe prosthétique de la myoglobine
(d'après PAULING) (12)



FIGURE 2

14

segments d'hélice α dextrogyre numérotés de A à H à partir de l'acide aminé N-terminal comportant de 8 à 24 résidus chacun, soit 118 résidus sur les 153 que compte la molécule (77 p. 100 d'hélicité).

Deux coins aigus et cinq régions non hélicoïdales, de 1 à 8 résidus chacune, assurent la jonction des segments hélicoïdaux. Les segments terminaux, de 2 à 5 résidus d'acides aminés chacun, ne sont pas hélicoïdaux. Le plissement de la molécule détermine une crevasse dans laquelle se situe l'hème. L'ensemble est plié de façon complexe et asymétrique pour former un prisme triangulaire aplati dont les arêtes mesurent respectivement 45, 35 et 25 Å. L'aspect de la molécule est très compact (Figure 3).

2) Disposition de l'hème

L'hème est enfoncé dans une crevasse limitée par les segments C, E, F, CD, EF et FG ; les groupes propyloxy de l'hème affleurent la surface de la molécule alors que les groupes vinyle sont profondément enfoncés dans la crevasse.

La surface intérieure de cette crevasse est tapissée principalement des chaînes latérales de résidus d'acides aminés non polaires aliphatiques ou aromatiques ; les chaînes latérales d'acides aminés polaires sont au contraire orientées vers la surface extérieure de la molécule, qui présente de ce fait un caractère hydrophile marqué.

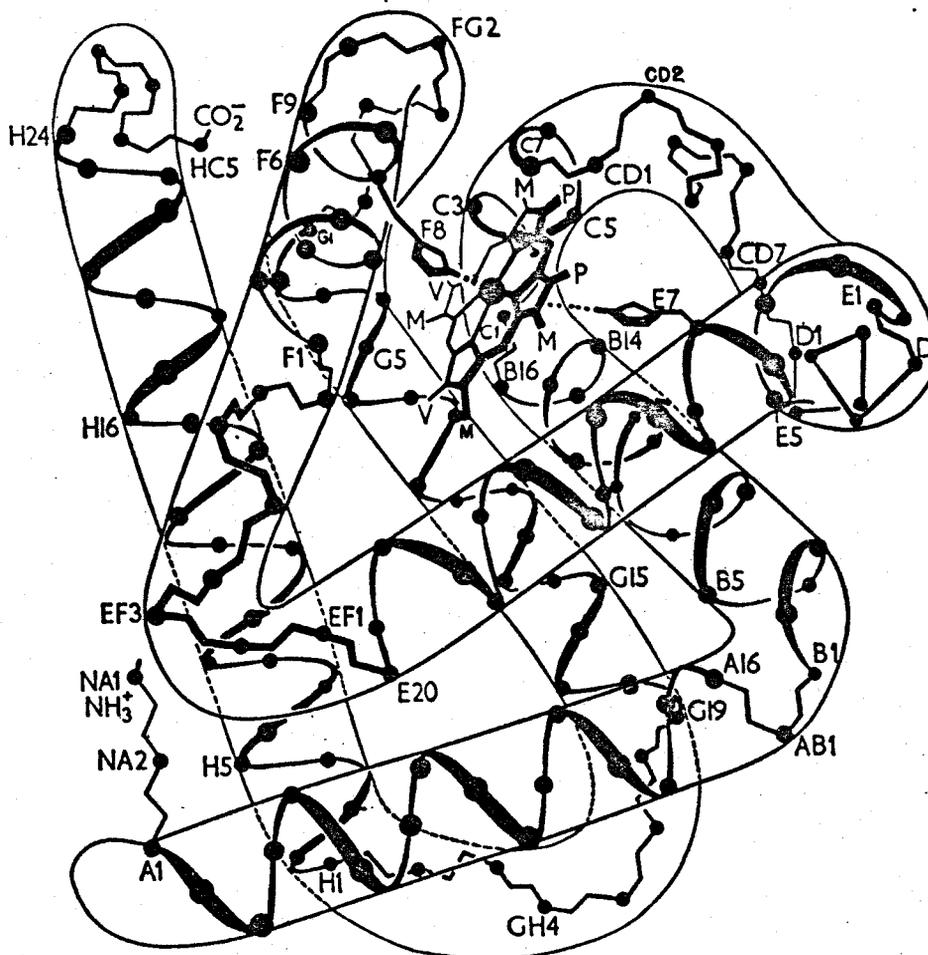
3) Union hème-globine

Selon les schémas proposés par PAULING et CORYELL (13), THEORELL (14) et PAULING (15), le fer peut acquérir une structure de gaz rare en formant un complexe d^2sp^3 octaédrique (Figure 4).

Le fer a une coordination de 6. Il est capable de loger six doublets électroniques dans les cases vides ou vidées par les électrons célibataires qui se sont appariés.

Le fer (Fe^{++}) qui a 4 électrons célibataires, a une susceptibilité paramagnétique élevée puisque celle-ci varie en fonction du nombre d'électrons célibataires.

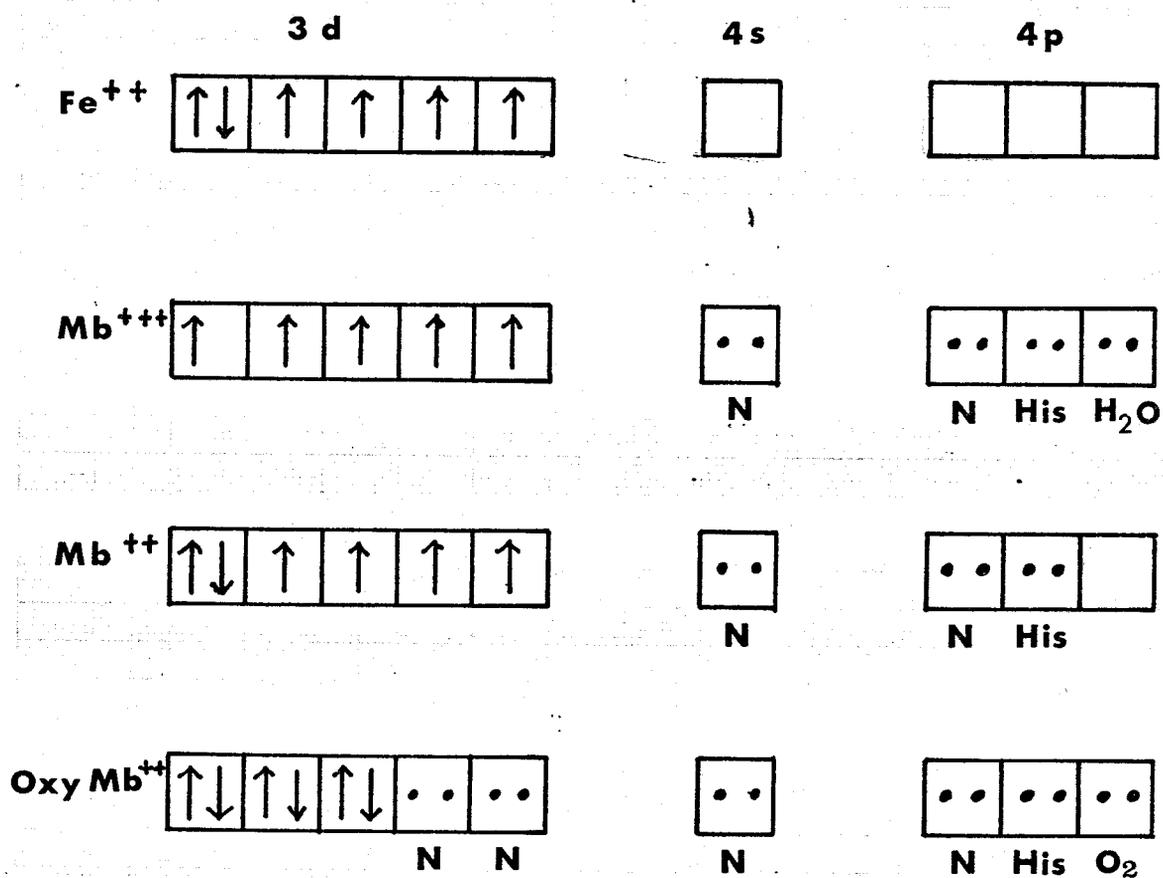
Le complexe oxymyoglobine n'a plus d'électrons célibataires :



Régions hélicoïdales et non hélicoïdales de la myoglobine
(PERUTZ) (16)

FIGURE 3





Représentation électronique de la liaison
globine-hème-ligand

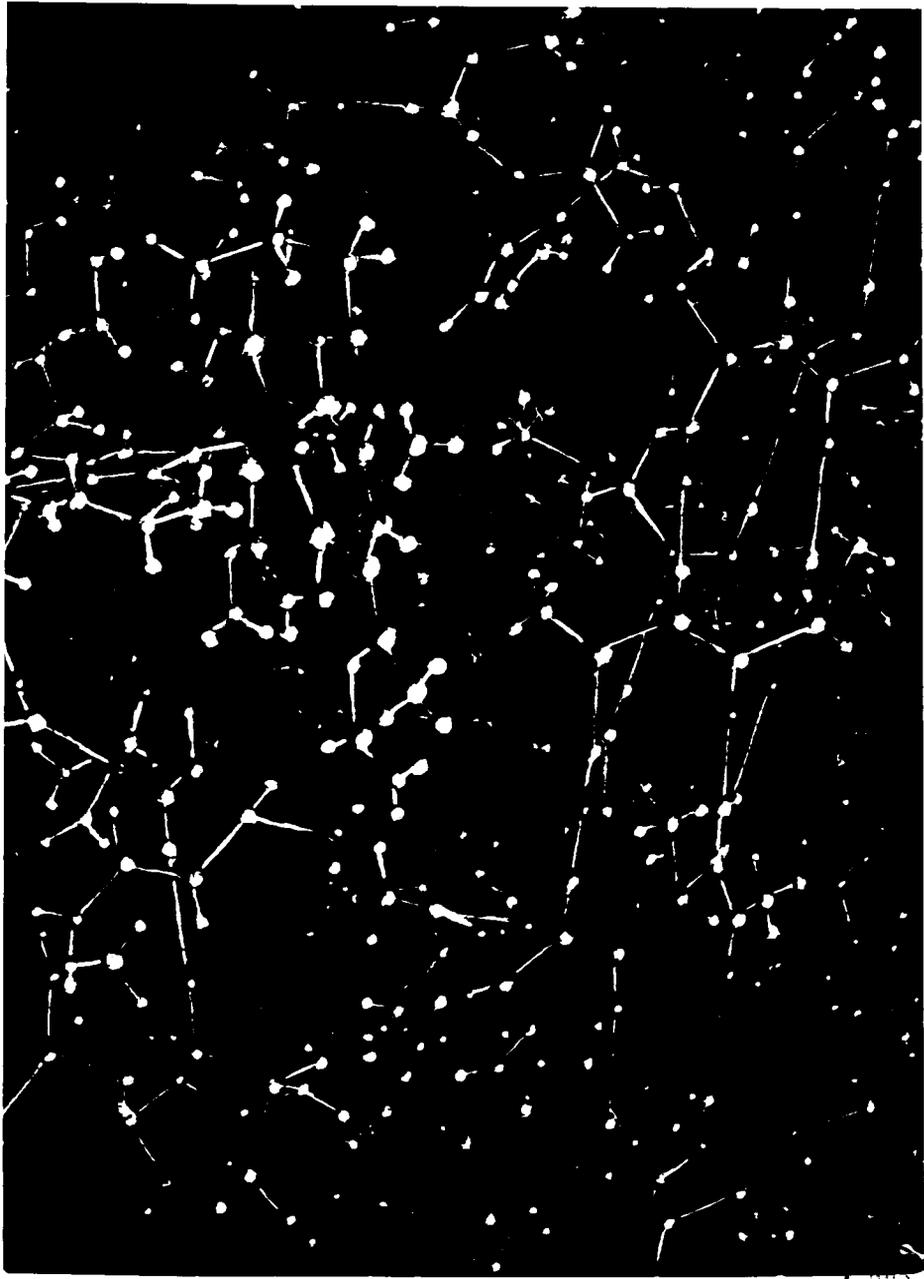
FIGURE 4



il est diamagnétique. En effet, lorsque les électrons sont appariés, ils neutralisent les effets créés par leur rotation autour d'eux-mêmes. KENDREW a montré que pour l'oxymyoglobine, les quatre premières coordinances sont occupées par quatre azotes des noyaux pyrroliques, la cinquième par l'azote N₃ de l'histidine en position F8 (His 93) et la sixième coordinance par une molécule d'oxygène. Le noyau imidazole du résidu histidine 93 est situé dans un plan perpendiculaire au plan du noyau porphyrinique (Fig. 5). De l'autre côté du plan de l'hème, une région électroniquement dense marque la place de l'atome d'oxygène. A courte distance de cette molécule d'oxygène se trouve le noyau imidazole du résidu d'histidine (E7) (résidu 64 pour la myoglobine de Cachalot) situé dans un plan perpendiculaire à celui du résidu 93. Contrairement aux autres dérivés de myoglobine la déoxymyoglobine n'a que 5 sites de coordinance occupés et le fer se trouve en dehors du plan de l'hème, à proximité de l'hélice F.

PERUTZ (18) a montré que le début du mécanisme d'allostérie de l'Hb s'explique par le fait qu'après la fixation d'une molécule d'O₂ sur la déoxyHb, l'atome de fer se place dans le plan de l'hème (6 sites de coordinance occupés). Ceci va provoquer un déplacement de l'histidine proximale et une réaction en chaîne s'établira avec le déplacement d'autres acides aminés et la rupture de certaines liaisons salines entre les chaînes α₁ et α₂. D'autres types de liaisons confèrent sa stabilité au complexe hème-globine : KENDREW a montré que les groupes carboxyliques de la porphyrine, disposés vers l'extérieur de la crevasse, peuvent former des liaisons salines avec les groupes basiques : c'est le cas de la liaison d'un des groupes carboxyliques de la protoporphyrine avec le groupe guanidyl d'un résidu d'arginine (résidu CD3 ou 45) ; dans la myoglobine de Cheval, la substitution de ce résidu par la lysine laisse subsister cette possibilité.

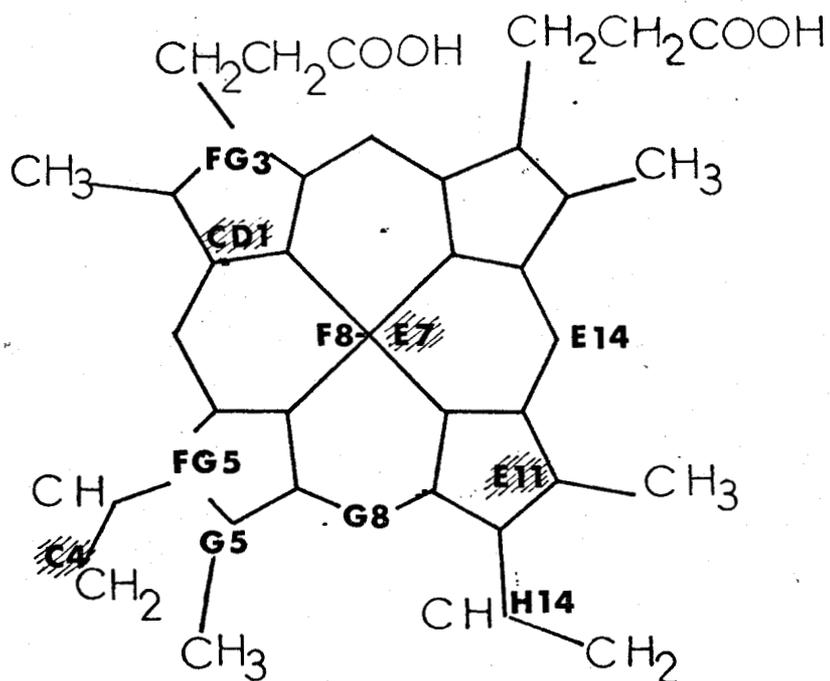
Il est certain d'autre part, l'orientation vers l'intérieur des chaînes hydrophobes le prouve, qu'il existe entre l'hème et la globine des liaisons de Van der Waals. Les expériences de CANN (19) ont mis en évidence la possibilité de telles liaisons, entre les groupes vinyle de la porphyrine et des résidus aromatiques tels que la tyrosine et les phénylalanines (Schéma I).



1953
11122

Liaison Hème-Histidine (d'après PAULING) (17)

FIGURE 5



Environnement de l'hème de la myoglobine
de Cachalot.

Les parties blanches et hachurées indiquent les acides aminés
respectivement en-dessous et au-dessus du plan du groupement
hémique, en regardant le côté où se combine l'oxygène (PERUTZ) (20)

SCHEMA I



C - ETUDE DE L'ACCESSIBILITE DES RESIDUS D'HISTIDINE DE LA MYOGLOBINE

BANASZAK et GURD ont étudié l'accessibilité des résidus d'histidine après une alkylation par le bromoacétate 0,2 M, pH 6,8 pendant 10 jours. Cette alkylation poussée conduit à la modification de nombreux résidus d'histidine accessibles à l'agent réactif.

Le Tableau suivant montre l'évolution des recherches dans la détermination des résidus alkylés. Ces études se sont portées sur des myoglobines d'origine différente, sur une myoglobine cristallisée et une myoglobine en solution et comparativement sur une ferri et une ferro-myoglobine. L'alkylation se porte en fait sur les résidus d'histidine qui sont orientés vers l'extérieur de la molécule et qui sont donc accessibles à l'agent réactif (voir Figure 1). On note des différences entre l'Homme, le Cachalot et la Baleine. Trois résidus d'histidine (12 - 113 - 119) se trouvant dans la myoglobine de Baleine sont remplacés par d'autres acides aminés chez l'Homme. Le résidu d'histidine 81 semble le résidu le plus facilement alkylé.

D - MICROHETEROGENEITE

Les méthodes utilisées pour purifier la myoglobine permettent bien souvent de mettre en évidence une microhétérogénéité de la myoglobine, c'est-à-dire la présence dans les préparations, même hautement purifiées, de constituants mineurs qui ne peuvent être différenciés de la fraction majeure que par des techniques très sélectives, comme la chromatographie ou l'électrophorèse en gel. Cette microhétérogénéité peut interférer avec les méthodes de fractionnement, surtout lorsqu'il s'agit de séparations fines, comme celle d'une myoglobine normale et d'une myoglobine modifiée.

1) Chromatographie sur carboxyméthylcellulose

La chromatographie sur carboxyméthylcellulose a été utilisée par ATASSI et SAPLIN (21) pour la purification de la myoglobine de Baleine. La myoglobine est transformée en cyanmetmyoglobine pour éviter les causes d'hétérogénéité qui pourraient provenir de l'hème. L'élution est réalisée au moyen d'un gradient de pH 6,2 à 7,7 obtenue avec des tampons phosphate de sodium: la courbe d'élution du chromatogramme révèle la présence de neuf pics bien délimités. Tous ces pics sont



HIS	CACHALOT	CACHALOT	CACHALOT	HOMME	CACHALOT Mb cristallisée	CACHALOT Mb en solution
12			Réactif	Absent	Di CM His	Di CM His
24		Même accessibi-	Réactif	non réactif	non réactif	non réactif
36		bilité pour la	non réactif	3 CM His	3 CM His	
48		FERRO et la	Di CM His	3 CM His		
64		FERRI Mb	Réactif	non réactif		CM His
81	Di CM His	(Détermination par	Di CM His	Un des 2 résidus est réactif mais	Di CM His	
82	non réactif	titration)	non réactif	pas les deux en même temps		
93			non réactif	non réactif		
97			non réactif	non réactif		
113			réactif	absent	Di CM His	Di CM His
116					Di CM His-3CM His	Di CM His
119			réactif	absent	non réactif 1 CM His	Di CM His 1 CM His
	BANASZAK et GURD 1964 (22)	RAY et GURD 1967 (23)	HARRIS et HILL 1969 (24)		TONY 1970 (25)	FRANK et GURD 1970(26)

constitués par de la myoglobine dont ils présentent la composition en amino-acides.

La myoglobine de Cheval a également été fractionnée en trois constituants par chromatographie sur colonne de carboxyméthylcellulose avec élution au moyen de tampon phosphate de sodium 0,02 M de pH 6,9. Les dosages d'acides aminés et des groupements amides n'ont pas permis de révéler de différences significatives entre ces trois fractions (THEORELL et AKESON) (27).

2) Electrofocalisation

Les travaux de OORD van den (28) sur la myoglobine de Cheval montrent qu'elle présente une microhétérogénéité de charge électrique. Par électrophorèse de focalisation en gradient de pH 6 à 8, VAN DEN OORD sépare ainsi la myoglobine de Cheval en trois fractions MbI, MbII et MbIII. Il montre par ailleurs que MbII et MbIII sont elles-mêmes hétérogènes. Les pourcentages des fractions, enregistrés à partir de la myoglobine de Cheval native sont de 80 p. 100 de MbI, 15 p. 100 de MbII et 5 p. 100 de MbIII.

Aucune différence dans la composition en acides aminés, dans les spectres d'absorption et la fixation d'oxygène n'a pu être mise en évidence.

E - STRUCTURE DES DERIVES D'ADDITION DE LA MYOGLOBINE

1) Caractéristiques des quatre types de liaisons dans les complexes

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

L'étude des propriétés magnétiques et optiques de la myoglobine et de ses dérivés d'addition montre d'importantes différences dans la nature de la liaison hème-globine (WANG) (29).

La forme réduite est paramagnétique, tout comme l'hémoglobine ce qui implique une liaison à caractère surtout ionique entre fer ferreux et globine (THEORELL) (30). L'oxyhémoglobine et l'oxymyoglobine sont au contraire diamagnétiques, de même que les dérivés carbonylés correspondants, et la liaison hème-globine est alors covalentielle.

L'oxygène ou l'oxyde de carbone occupe dans ce cas la sixième coordinance du fer. THEORELL (31) confirme ces résultats par l'étude des spectres visibles des chromoprotéides porphyriniques ; quatre types de spectres d'adsorption dans le visible des composés ferri- et ferroporphyriniques peuvent être distingués et leurs caractéristiques sont indiquées dans le tableau II.

Il est à noter que les bandes d'absorption de la myoglobine et de l'oxymyoglobine dans le visible sont légèrement décalées vers les grandes longueurs d'onde par rapport à celles de l'hémoglobine et de l'oxyhémoglobine : pour la myoglobine humaine (HAUROWITZ) (32), les maxima d'absorption sont obtenus à 543 et 583 nm, alors que pour l'hémoglobine humaine (THEORELL) (33), ils se situent à 541,5 et 577 nm. Outre ces bandes d'absorption, on note pour la myoglobine, comme pour l'hémoglobine, une forte bande d'absorption à la limite de l'ultra-violet (400 à 420 nm) : c'est la bande de Soret.

2) Spectres d'absorption des ferromyoglobines

Les ferromyoglobines comprennent les dérivés avec ou sans ligands, tels que l'oxygène ou l'oxyde de carbone, le fer étant sous la forme Fe^{++} ; seuls les dérivés oxygénés ont été étudiés.

Les dérivés déoxygénés

Lorsqu'il n'y a pas de ligands attachés au fer de l'hème, la myoglobine est appelée deoxymyoglobine ou myoglobine réduite ou simplement ferromyoglobine. La préparation de la deoxymyoglobine s'effectue à partir de l'oxymyoglobine en éliminant l'oxygène ou en équilibrant l'oxymyoglobine avec un gaz inerte comme l'azote ou l'argon. La deoxymyoglobine peut être préparée à partir d'une ferrimyoglobine (Fe^{+++}) en utilisant un système réducteur en absence d'oxygène. La deoxymyoglobine a un spectre d'absorption avec 3 bandes d'absorption ayant des maxima à 560, 435 (bande de Soret) et 280 nm (protéine) (Figure 6).

Les dérivés oxygénés

L'oxymyoglobine est une ferromyoglobine qui a une molécule d'oxygène comme ligand. L'oxygène se lie mole pour mole avec le fer ferreux de l'hème. Cette réaction qui est réversible est la base de la

TABLEAU II

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

	Coloration	Bandes d'absorption	Electrons célibataires	Exemples
Composés ferriques liaisons ioniques	brune ou verte	une bande vers 630 nm	5	Catalase Peroxydase Metmyoglobine acide Méthémoglobine acide
Composés ferriques liaisons covalentes	rouge	une à deux bandes dans le vert	1	Cyan-catalase Cyan-péroxydase
Composés ferreux	rouge pourpre	une bande à 560 nm	4	Myoglobine réduite Hémoglobine réduite
Composés ferreux liaisons covalentes	rouge brillant	deux bandes vers 545 nm et 580 nm	0	Oxymyoglobine Oxymyoglobine Carbonylmyoglobine

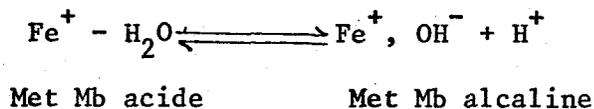


fonction physiologique de l'hémoglobine et de la myoglobine comme transporteur d'oxygène.

L'oxymyoglobine est préparée par exposition de la ferromyoglobine à l'oxygène moléculaire ou par la réduction de la ferrimyoglobine en présence d'oxygène. L'oxymyoglobine a un spectre d'absorption avec 4 bandes d'absorption ayant des maxima à 580, 542, 418 (bande de Soret), et 280 nm (protéine) (Figure 6).

3) Propriétés des spectres de la ferrimyoglobine

Le produit d'oxydation du fer ferreux en fer ferrique de la myoglobine est appelé metmyoglobine. Le spectre d'absorption de la metmyoglobine varie en fonction du pH et on distingue deux sortes de metmyoglobine : le MetMb acide et la MetMb alcaline. La modification du spectre a été expliquée par l'étude des spectres de diffraction des rayons X de cristaux de metmyoglobine de Cachalot (KENDREW) (34) qui ont montré que le fer ferrique a sa sixième coordinance occupée par une molécule d'eau ou par un ion hydroxyle. Cette molécule d'eau peut se dissocier (STRYER et al.) (35) suivant le schéma

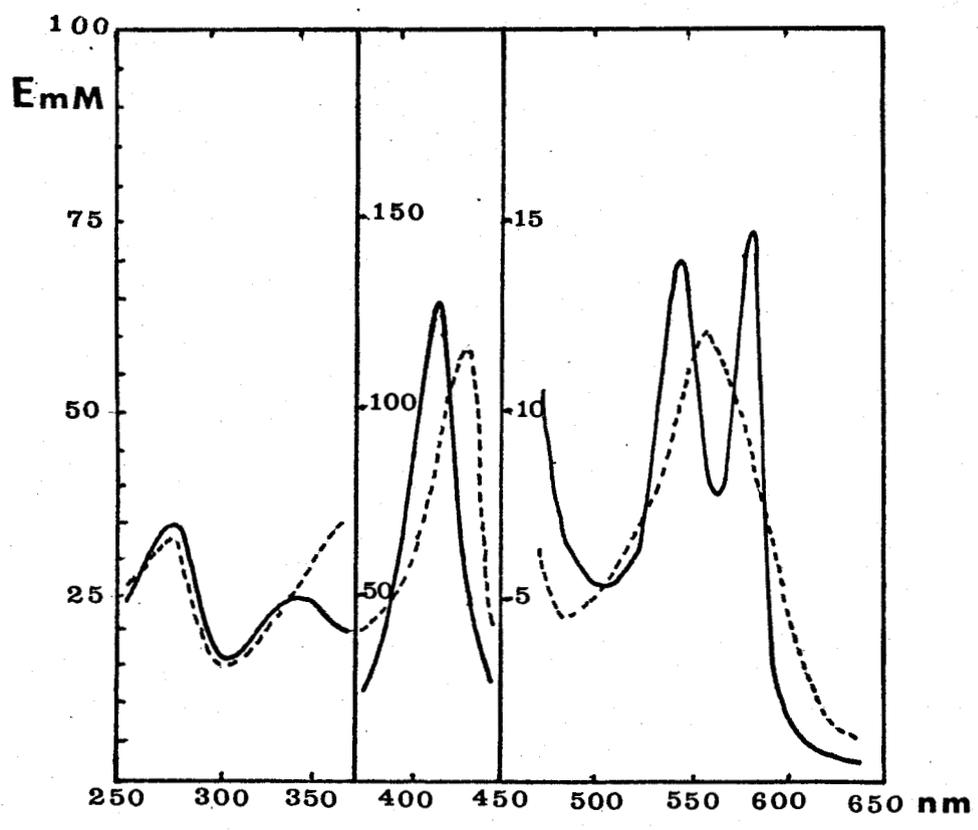


Le groupement OH^- serait toujours lié au fer et la liaison se ferait par la libération d'un proton provenant du noyau imidazole distal (Fig 7). Le spectre d'absorption de la ferrimyoglobine varie donc suivant le pH ; la constante d'ionisation de la forme de transition MetMb acide \rightleftharpoons Met Mb alcaline est de 8,93 pour la myoglobine de Cheval à 20°C avec une force ionique 0,1 M

4) Systèmes réducteurs de la metmyoglobine

a) Généralités

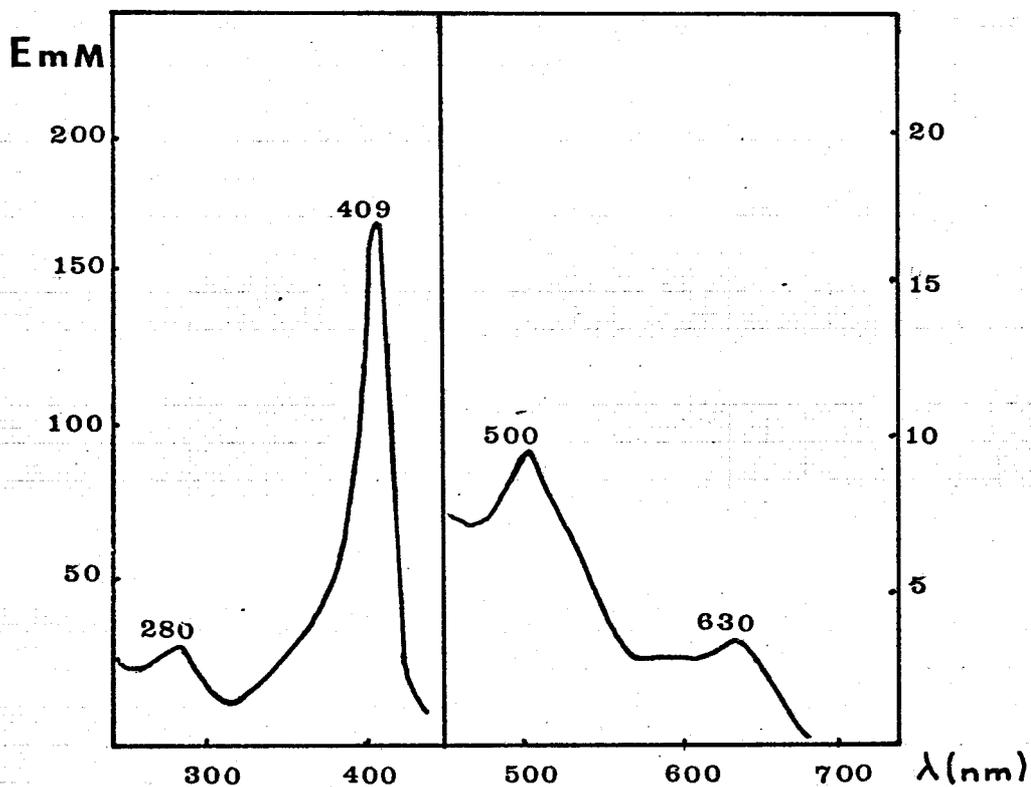
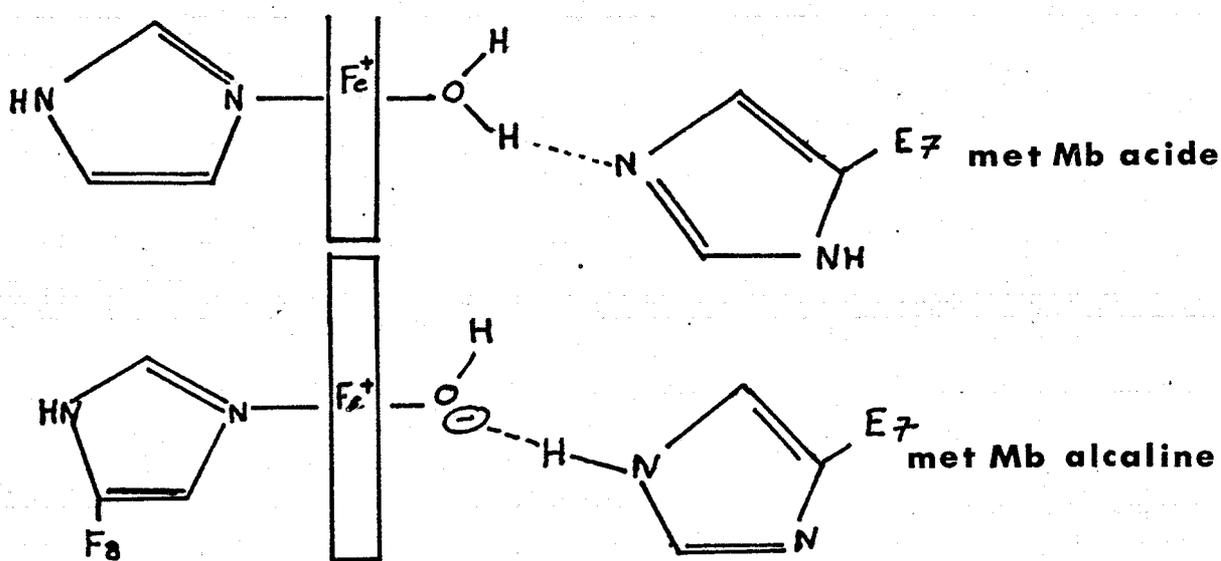
L'hème est facilement oxydé par l'oxygène ou par d'autres agents d'oxydation courants : cette oxydation donne naissance à des composés ferriques. L'oxymyoglobine peut aussi s'autoxyder au cours de sa préparation pour donner une ferrimyoglobine.



SPECTRES D'ABSORPTION DE L'OXYMYOGLOBINE (—)
et de la DEOXYMYOGLOBINE (- - -)

FIGURE 6





Spectre d'absorption de la ferrimyoglobine alcaline

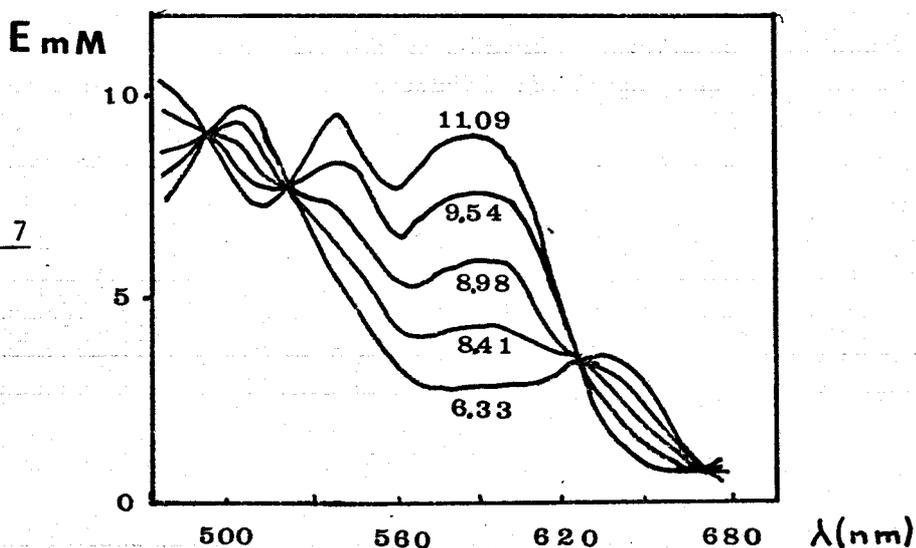


FIGURE 7

Spectre d'absorption de la Mb à différents pH
($T^\circ 20^\circ C$ - force ionique 0,1 M)



Les courbes de saturation par l'oxygène se font uniquement avec la ferromyoglobine, car la metmyoglobine ne peut fixer l'oxygène ; elle interfère d'autre part avec l'oxymyoglobine au niveau de la région du spectre utilisée pour l'étude de la fixation d'oxygène ; il est donc nécessaire d'éliminer la metmyoglobine ou mieux de la réduire afin de la récupérer sous forme de Myoglobine active.

β) Méthodes de réduction

Plusieurs méthodes de réduction de la Met Mb ou de la Met Hb en oxy Mb ou Hb ont été proposées :

a) Système oxydo-réducteur Cytochrome c NADH réductase - NADH/NAD

Ce système proposé par ROSSI-FANELLI. (35) est susceptible de réduire la Met Mb en présence de bleu de méthylène. En cours d'expérimentation, on observe généralement la formation d'un précipité qui gêne les mesures spectrophotométriques.

b) Réduction par le dithionite de sodium (Azakura)(36)

Ce réducteur puissant transforme immédiatement la ferri en ferromyoglobine. Son utilisation a été critiquée car le dithionite produit des effets secondaires sur la protéine, qui sont dus à la formation des peroxydes (DALZIEL et O'BRIEN). (37)

c) Réduction par le borohydrure de sodium (Azakura)(38)

Le BH_4Na réduit la Met Mb en ferromyoglobine et en même temps déoxygène la solution par la formation d'un courant d'hydrogène gazeux dû à sa décomposition spontanée.

d) Réduction par le phénazine métosulfate (PMS) - NADH, H^+

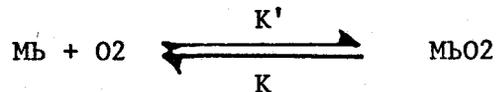
Ce procédé a été mis au point par KATITA (39) pour la réduction de la Methémoglobine. La solution d'hémoglobine réduite par ce procédé peut être conservée quelques semaines sans formation de Methémoglobine. Ce système réducteur n'a pas été utilisé pour les mesures de saturation en oxygène de la myoglobine.

5) Fixation d'oxygène

Comme pour l'hémoglobine, la plus importante des réactions d'addition de la myoglobine est la fixation réversible d'oxygène.

a) Forme de la courbe de dissociation de l'oxymyoglobine

L'étude de la réaction de la myoglobine avec l'oxygène montre que celle-ci est plus simple que celle de l'hémoglobine.



L'application de la loi d'action de masse à cette réaction équilibrée permet d'écrire

$$\frac{[\text{MbO}_2]}{[\text{Mb}][\text{O}_2]} = K = \frac{k'}{k} \quad \text{ou} \quad \frac{[\text{MbO}_2]}{[\text{Mb}]} = K [\text{O}_2]$$

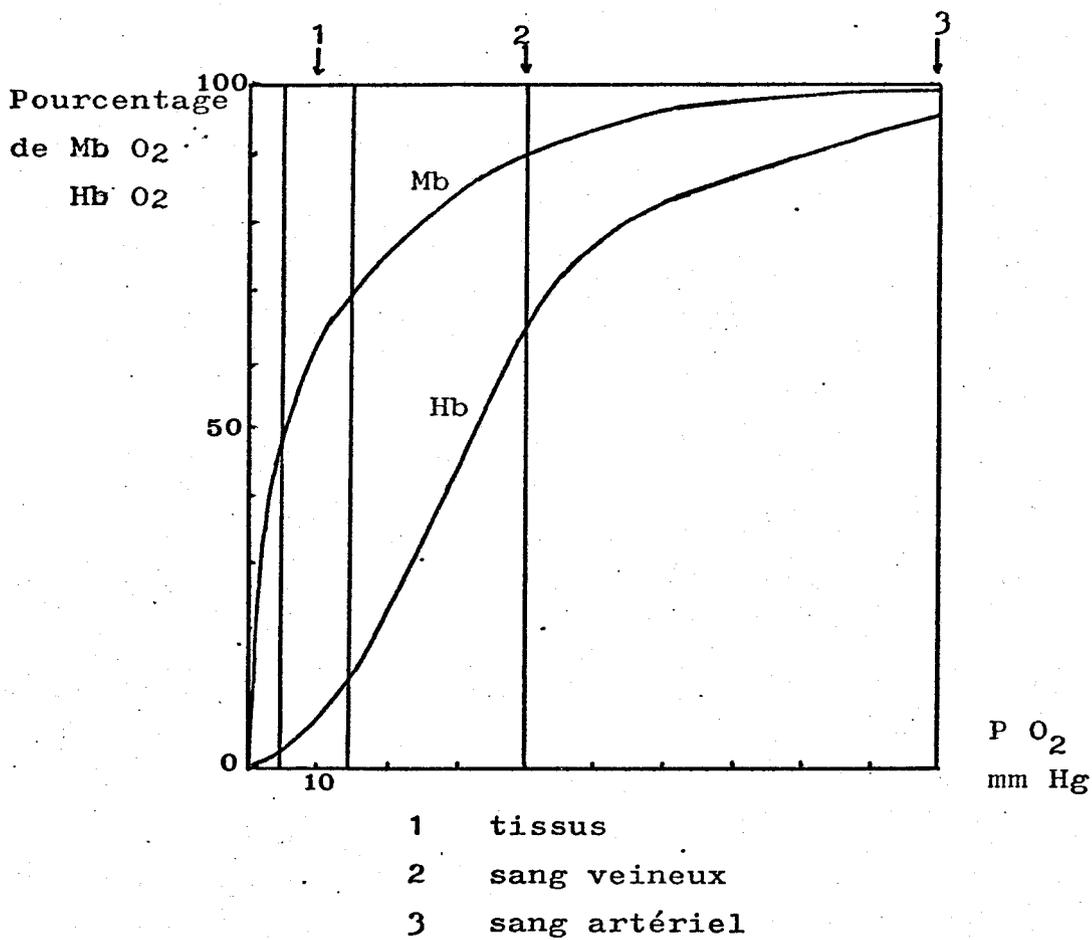
La concentration en oxygène étant proportionnelle à la pression partielle de ce gaz (loi de Henry), on peut écrire :

$$\frac{[\text{MbO}_2]}{[\text{Mb}]} = k p_{\text{O}_2}$$

D'après cette équation, la représentation graphique du pourcentage de saturation (pourcentage d'oxymyoglobine par rapport à la totalité de la myoglobine) en fonction de la pression partielle en oxygène (p_{O_2}) est une hyperbole équilatère.

Le pourcentage de MbO₂ est calculé par dosage au spectrophotomètre. L'aspect hyperbolique de la courbe contraste avec l'allure sigmoïde des courbes de dissociation de l'oxyhémoglobine.

La Figure 8 montre qu'aux pressions d'oxygène physiologiques, le pourcentage de saturation en oxygène est toujours plus élevé dans le cas de la myoglobine que dans celui de l'hémoglobine. La fixation d'oxyde de carbone conduit à des courbes de saturation analogues à celles de l'oxygène.



COURBE DE DISSOCIATION DE L'OXYMYOGLOBINE ET DE L'OXYHEMOGLOBINE
(d'après Rossi Fanelli) (40)

FIGURE 8

b) Constante d'équilibre K

$$\frac{\{Mb X\}}{\{Mb\}} = K \{X\}$$

$$\text{et } \log \frac{\{Mb X\}}{\{Mb\}} = \log K + \log \{X\}$$

Si y représente le pourcentage d'oxymyoglobine, 1 - y le pourcentage de la myoglobine et que X dans le cas d'une liaison avec une molécule de gaz, est exprimé en P, c'est-à-dire en mm de Hg de pression partielle de gaz dans la phase gazeuse; on peut écrire :

$$\frac{y}{1-y} = K (P_x)$$

$$\log \frac{y}{1-y} = \log K + \log (P_x)$$

L'affinité du gaz pour la protéine est souvent écrite en terme de P 1/2, c'est-à-dire à la pression partielle du gaz correspondant à la moitié de la saturation.

$$\log P_{1/2} = - \log K$$

c) Variation de la courbe de dissociation de l'oxymyoglobine en fonction de différents facteurs

- Effet de la température

L'effet de la variation de la température conformément à la loi d'action de masse, résulte des principes de la thermodynamique.

$$\text{On démontre la relation } H = - \frac{Rd \ln K}{d(1/T)}$$

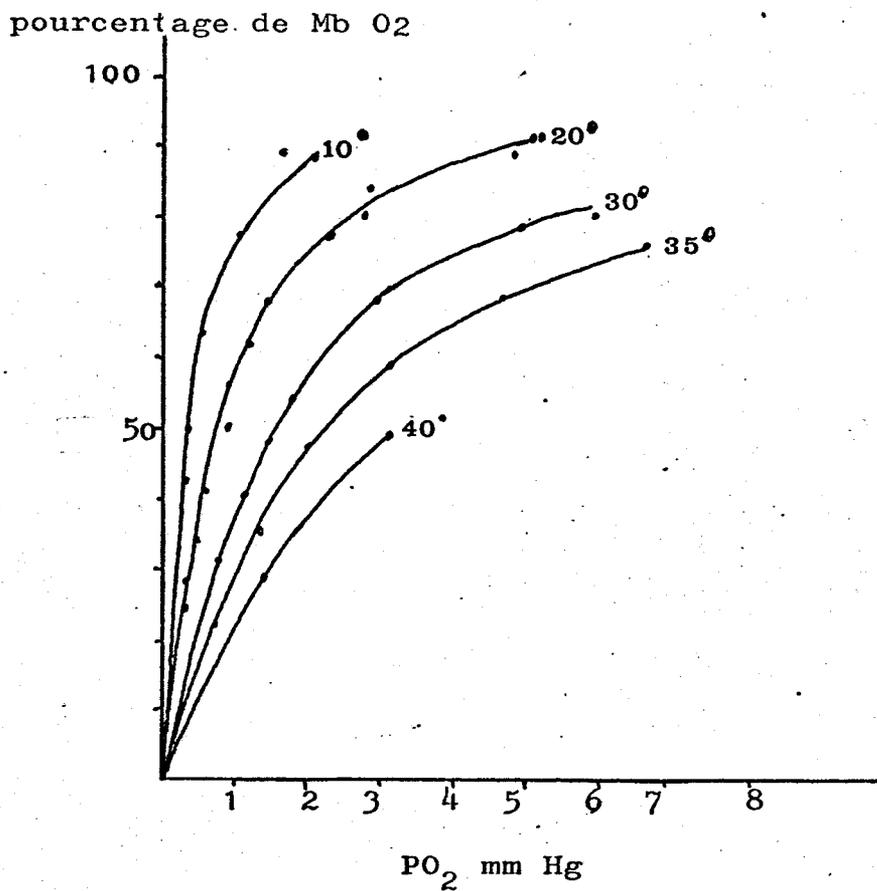
H : variation d'enthalpie

R : Constante d'équilibre des gaz parfaits

T : Température absolue

K : Constante d'équilibre

La figure 9 montre l'effet des variations de la température sur la courbe de dissociation de l'oxymyoglobine.



Courbe de dissociation de l'oxymyoglobine humaine
à différentes températures (Rossi Fanelli et Antonini, 1958) (41)

FIGURE 9



- Effet du pH

La fixation réversible d'oxygène de la myoglobine varie très peu en fonction d'un changement de pH. Contrairement à l'hémoglobine l'effet Bohr est très faible.

De même, et contrairement à l'hémoglobine, la courbe de dissociation d'oxygène n'est pas affectée par les variations de force ionique du milieu, ni par la concentration de la myoglobine, ni par les solutions concentrées d'urée.

Le Tableau III montre que toutes les valeurs données aux équilibres de fixation d'oxygène et d'oxyde de carbone des différentes myoglobines sont très voisines.

TABLEAU III

VALEURS DES EQUILIBRES DE FIXATION DE L'O₂ et du CO DES MYOGLOBINES (*)

AUTEURS	ESPECE	ETAT DE PURIFICATION	TEMPERATURE °C	pH	p1/2 mm Hg	k (10 ⁻⁶ M ⁻¹)	ref.
ORELL	BOEUF	EXT.musc.	20	9	0,6	0,91	42
ORELL	CHIEN	Ext.musc.	20	9	0,6	0,91	»
ORELL	MOUTON	Ext.musc.	20	9	0,46	1,19	»
ORELL	OIE	Ext.Musc.	20	9	0,65	0,85	»
SI-FANELLI	CHEVAL	Crist.	20	7	0,65	0,85	43
SI-FANELLI	HOMME	Crist.	20	7,45	0,72	0,77	44
"		MB I	20	8,0	0,65	0,83	»
"		MB II	20	8,0	0,65	0,85	»
"	RECONST.	PROTO MB	20	7,4	0,72	0,77	»
OTHER	BOEUF	CRIST.	20	7,45	0,55	1,0	45
SI-FANELLI	THON	CRIST.	20	7,45	0,90	0,61	46
OTHER	RAT	Ext.card.	25	7,5	1,04	0,53	47
		Ext.musc.	20	7,8	1,3	0,40	48
DNINI	CHEVAL	Crist.	20	7,0	0,70	0,78	49

(*) La conversion des valeurs de p1/2 pour l'O₂ et le CO en constante d'équilibre K (M⁻¹) fait intervenir les coefficients de solubilité des deux gaz. A 20°C une pression partielle de 1 mm de Hg correspond à 1,82 x 10⁻⁶ moles/litre pour l'oxygène et 1,36 x 10⁻⁶ moles/litre pour l'oxyde de carbone.



III - RESULTATS EXPERIMENTAUX

A - ALKYLATION DE LA MYOGLOBINE PAR L' IODOACETATE - RECHERCHE
DES RESIDUS D'HISTIDINE MODIFIES.

Pour étudier la réactivité de la myoglobine, nous avons soumis cette protéine aux conditions d'alkylation décrites par GUNLACH, STEIN et MOORE (50). Comme pour l'étude de la ribonucléase, nous avons voulu déterminer le nombre et identifier les résidus d'histidine, qui par leur fonction, ont une réactivité particulière (protonisation) leur permettant de réagir avec l'halogéno-alkyl ICH_2COO^- dans des conditions habituellement défavorables (pH 5,5).

a) Techniques d'études

1) Préparation de la Mb

La myoglobine a été préparée à partir du coeur de Cheval par relargage au sulfate d'ammonium. En vue d'obtenir la myoglobine dans un état conformationnel aussi proche que possible de celui de la myoglobine native, la méthode de préparation a été simplifiée et accélérée par rapport à la technique habituelle (51).

Le muscle cardiaque est d'abord haché puis broyé finement en présence de 2 à 3 volumes d'eau maintenue à + 4°C. Après centrifugation, le surnageant est filtré et amené à 85 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium à pH 7. Après un contact d'une nuit, sous agitation à + 4°C, le précipité est éliminé par filtration et le surnageant est amené à 96 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium. Le précipité obtenu est recueilli après 6 à 8 heures d'agitation à + 4°C, dissous dans le minimum de NH_4OH N/100 ; la solution obtenue est répartie dans plusieurs boudins de cellophane et dialysée de façon à faire cristalliser la myoglobine. La préparation est stable sous cette forme pendant une quinzaine de jours (préparation à 95 p. 100 d'oxymyoglobine) puis elle s'oxyde progressivement en metmyoglobine. Avant utilisation, les boudins contenant la myoglobine sont dialysés contre de l'eau distillée pendant une nuit.

2) Technique d'alkylation de la myoglobine

L'alkylation de la myoglobine non dénaturée a été réalisée à l'aide d'acide mono-iodoacétique à pH 5,5, selon la méthode de

GUNLACH, STEIN et MOORE (52). Dans certains cas, il a été utilisé de l'acide monoiodoacétique marqué au ^{14}C sur le carbone du carboxyle (35 microcuries/micromole). 85 mg de protéine (5 micromoles de globine ou de myoglobine) sont dissous dans 10 ml de tampon Tris-HCl 0,05 M de pH 7. 85 mg d'acide iodoacétique sont d'autre part dissous dans 10 ml de Tampon Tris. La solution est ajustée à pH 4,5 avec NaOH 0,1 N. Pour une alkylation avec de l'iodoacétate marqué, on dissout ce produit dans les 10 ml de tampon Tris contenant l'iodoacétate non marqué. La réaction est effectuée à 38°C pendant 8 heures sous agitation, à l'abri de la lumière. La solution finale est dialysée soigneusement contre de l'eau distillée et ensuite lyophilisée.

3) Préparation de la myoglobine dénaturée

Afin de faciliter l'action enzymatique, la globine est dénaturée avant l'hydrolyse enzymatique. Nous avons utilisé une technique de dénaturation douce par l'éthanol et le chlorhydrate de guanidine (BISERTE et HOLLEMAN) (53).

§ Technique de dénaturation

A une solution aqueuse de myoglobine à 10 mg par ml, on ajoute du chlorhydrate de guanidine jusqu'à une concentration de 19,1 mg pour 1 ml (0,2 M) puis goutte à goutte 2 ml d'éthanol absolu pour 10 ml de solution. On laisse en contact toute une nuit sous agitation à température ambiante. Le lendemain on ajuste lentement la proportion d'éthanol à 3 volumes par volume de solution aqueuse de myoglobine et on continue l'agitation pendant 3 heures. L'addition de 6 volumes d'acétone précipite totalement la myoglobine partiellement dénaturée que l'on recueille par centrifugation (à 5000 t/min pendant 5 à 10 minutes) et que l'on redissout dans la quantité minimum d'acide chlorhydrique 0,05 N (20 ml par gramme de globine). On ajoute sous forte agitation 8 volumes d'acétone contenant 2 p. 100 d'acide chlorhydrique concentré pour détacher l'hème. On centrifuge et répète cette opération deux fois. Enfin, on lave le précipité de globine à l'acétone. Après séchage sous le vide partiel d'une trompe à eau, on obtient une poudre grise soluble dans l'eau.

4) Hydrolyse trypsique

La trypsine traitée par le chlorure de diphénylcarbamyl provient de SERAVAC. L'enzyme traitée est dépourvue d'activité chymotrypsique. L'hydrolyse trypsique est conduite de la manière suivante : 200 mg de substrat sont dissous dans 20 ml d'une solution de sesquicarbonat d'ammonium à 1 p. 100 à pH 8,75. La trypsine est ajoutée en une seule fois, de façon à obtenir un rapport Enzyme/substrat (Poids/Poids) de 4 p. 100. L'hydrolyse trypsique est poursuivie pendant 2 heures et demie à 38°C sous agitation. L'arrêt de l'hydrolyse est effectuée par congélation. L'hydrolysats est directement lyophilisé.

5) Hydrolyse chymotrypsique

Traitement de la chymotrypsine par le TLCK

La chymotrypsine a été traitée avant son utilisation par la 1-chloro-3-tosylamido-7-amino-2-heptanone (TLCK) selon la technique de SHAW, MARES-GUIA et COHEN : 200 mg de chymotrypsine (Worthington Biochemical Corporation, lot CD 537-40) sont dissous dans 200 ml de tampon Tris 0,01 M de pH 6,0, 0,05 M en CaCl₂ : après filtration (filtre Millipore 0,45 μ), on ajoute au filtrat 20 mg de TLCK (Mann Research Laboratories) préalablement dissous dans 2 ml de méthanol ; on laisse réagir pendant 2 h 30 à température ordinaire sous agitation magnétique ; puis on filtre sur Millipore (0,45 μ) et après une dialyse d'une nuit à 4°C contre une solution d'HCl 0,01 N (élimination des ions métalliques bivalents), la solution est finalement lyophilisée. L'enzyme est alors conservée à - 15°C.

Hydrolyse chymotrypsique

La chymotrypsine est ajoutée en une seule fois. Le rapport E/S est de 2 p. 100 (P/P). La concentration de substrat dans le tampon (pH 8,75 sesquicarbonat d'ammonium 1/100) est de 10 mg/ml. L'hydrolyse chymotrypsique est poursuivie pendant 6 heures à 38°C sous agitation. L'hydrolysats est aussitôt lyophilisé.

6) Technique de fractionnement peptidique

α) Préparation de la colonne

La résine Chromobeads P (Technicon) est mise dans un tampon

Pyridine 2,0 N - acide acétique de pH 5,0 (*) et versée à l'aide d'une ampoule dans la colonne (**) maintenue à 50°C. On la laisse décanter une nuit par gravité, puis on se débarrasse de l'excédent de résine par aspiration à la trompe à eau, on enlève l'ampoule et on tasse la résine sous pression (***) (environ 20 kg par cm²) avec un débit de 0,6 ml par minute pendant 2 heures. On équilibre ensuite la résine au pH désiré par pompage pendant 2 à 3 heures du tampon initial utilisé pour la chromatographie (tampon pyridine 0,1 N de pH 2,90 ou 4,25 (****)). Pendant cette opération, la pression diminue jusqu'à 14 kg par cm² environ.

B) Chromatographie

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

(*) Formule du tampon : Pyridine 644 ml
Acide acétique 400 ml + qsp pH 5,0
Eau distillée qsp 4 litres

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

(***) Pression obtenue à l'aide d'une pompe Milton Roy.

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

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

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

Pyridine 40 ml
Acide formique pur 10 ml
Eau distillée 3,5 litres
Acide formique dilué au 1/10 qsp pH 4,25
Eau distillée qsp 5 litres

L'élution de la colonne est assurée par un gradient de pH et de concentration en ion pyridinium assurée par le système suivant :

1) Élution par le tampon pyridine-formique à pH 2,90 pendant 16 heures.

2) Premier gradient obtenu par utilisation d'un Varigrad à 9 cellules contenant 200 ml de tampon chacune.

- Cellules n° 1 à 4 : pyridine-formique à pH 4,25
- Cellules n° 5 à 7 : pyridine-formique à pH 5,0 (0,5 M)
- Cellules n° 8 à 9 : pyridine-formique à pH 5,0 (1 M)

Durée totale : environ : 50 heures

Elution par le tampon pyridine-formique à pH 5,0 (1 M - 4 h)

3) Deuxième gradient obtenu par l'utilisation d'un Varigrad à 4 cellules contenant 200 ml de tampon chacune.

- Cellule n° 1 : pyridine-formique) pH 5,0 (M)
- Cellule n° 2 : pyridine-acétique à pH 5,0 (1,5 M)
- Cellules n° 3 et 4 : pyridine-acétique à pH 5,0 (2 M)

Durée totale : environ : 22 heures.

4) Elution par le tampon pyridine-acétique de pH 5,0 (2 M) pendant 8 heures.

Le débit est de 36 ml à l'heure et on collecte une fraction de 6 ml toutes les 10 minutes.

γ) Régénération de la résine

La pression en fin de chromatographie atteint normalement 21 à 25 kg par cm². La variation de volume de la résine au cours de la chromatographie est très faible. On peut donc régénérer la résine dans la colonne par simple pompage du tampon initial de la nouvelle chromatographie. Pendant la régénération, la pression baisse jusqu'à environ 14 kg par cm². Au bout de 5 ou 6 chromatographies, il est nécessaire de détasser la résine car la pression finale atteint ou dépasse 30 kg par cm² et la régénération ne permet pas de retrouver une pression de 14 kg par cm².

δ) Lecture de la courbe d'élution

La courbe d'élution de la colonne est établie par dosage automatique à l'autoanalyseur Technicon à l'aide d'une réaction colorimétrique à la ninhydrine réalisée sur une partie aliquote (0,32 ml)

de chaque tube. Les tubes correspondent à un même pic de la courbe d'élu-tion, ils sont rassemblés et lyophilisés. L'homogénéité de chaque fraction peptidique ainsi obtenue est vérifiée par couplage électrochromatographique sur papier.

e) Technique d'évaluation de la radioactivité

L'évaluation de la radioactivité des peptides est faite par comptage en scintillation. Une fraction aliquote de chaque peptide (100 μ l) est dosée sur un appareil de comptage en scintillation (Packard) selon la technique de BRAY (54).

f) Electrochromatographie sur papier

La méthode que nous avons utilisée utilise le couplage électrochromatographique bidimensionnel préconisé par BISERTE, PLAQUET-SCHOONAERT, BOULANGER et PAYSANT (55) ; 2 à 3 mg de l'hydrolysats trypsique sont déposés sur une feuille de papier Whatman 3 MM (57 x 47 cm). L'électrophorèse est réalisée dans un appareil en toit de Durrum, à pH 3,9 avec un tampon pyridine-acide acétique-eau (30 : 100 : 4870) sous 300 volts pendant 7 heures.

La chromatographie descendante est réalisée dans le solvant Butanol-acide acétique-eau (4 : 1 : 5) pendant 18 heures. Nous avons aussi utilisé pour la chromatographie descendante le système butanol - pyridine - acide acétique - eau (15 : 10 : 3 : 12) de WALEY et WATSON (56).

La révélation des peptides se fait avec un réactif à la ninhydrine à 1 p. 100 ou à 0,2 p. 100 dans l'acétone ; le réactif à 1 p. 100 permet de révéler par une coloration franche tous les peptides ; cette coloration est fixée par une solution de Kawereau (*). Le réactif à 0,2 p. 100 (BAGLIONI) (57), moins sensible, permet une décoloration ultérieure du chromatogramme par un mélange d'acétone et d'HCl N (4 : 1) ; ceci permet, après avoir entouré d'un trait de crayon les peptides colorés en bleu violet par la ninhydrine, de réaliser sur le même chromatogramme plusieurs réactions spécifiques successives.

* Réactif de Kawereau : 10 ml d'une solution saturée en nitrate de cuivre
+ 2 ml HNO₃ 10 %
qsp 1 litre d'éthanol

4

Nous avons ainsi mis en évidence successivement sur un même électrochromatogramme, préalablement révélé par la ninhydrine et décoloré, les peptides à histidine par le réactif de PAULY selon la technique de BALDRIDGE et LEWIS (58) ; on pulvérise sur le chromatogramme le mélange extemporané à volumes égaux :

- d'une solution d'acide sulfanilique à 0,69 %. Auparavant, on pulvérise une solution aqueuse de CO_3Na_2 à 10 p. 100 et on laisse sécher.

Les peptides à histidine apparaissent sous forme de spots rose rouge.

h) Technique des autoradiogrammes

Les films radiographiques utilisés sont émulsionnés sur une seule face (KODAK-KODIREX). Ces films 45 x 45 cm sont mis en contact 15 jours avec l'électrochromatogramme et sont ensuite développés.

g) Etude des peptides

§ Composition en acides aminés

La composition en acides aminés de la globine et des peptides a été réalisée sur un analyseur automatique (JEOL 5 AH) après hydrolyse totale par HCl 5,6 N pendant 24 heures à 105°C en tube scellé sous vide.

§ Détermination de l'acide aminé N-terminal

L'acide aminé N-terminal a été déterminé par dansylation selon la méthode de GRAY et HARTLEY (59). Nous avons utilisé la chromatographie des dansyl aminoacides sur couche mince de gel de silice (GROS et LABOUESSE) (60) et sur feuille de polyamide (HARTLEY) (61).

b) Résultats et discussion

1) Alkylation

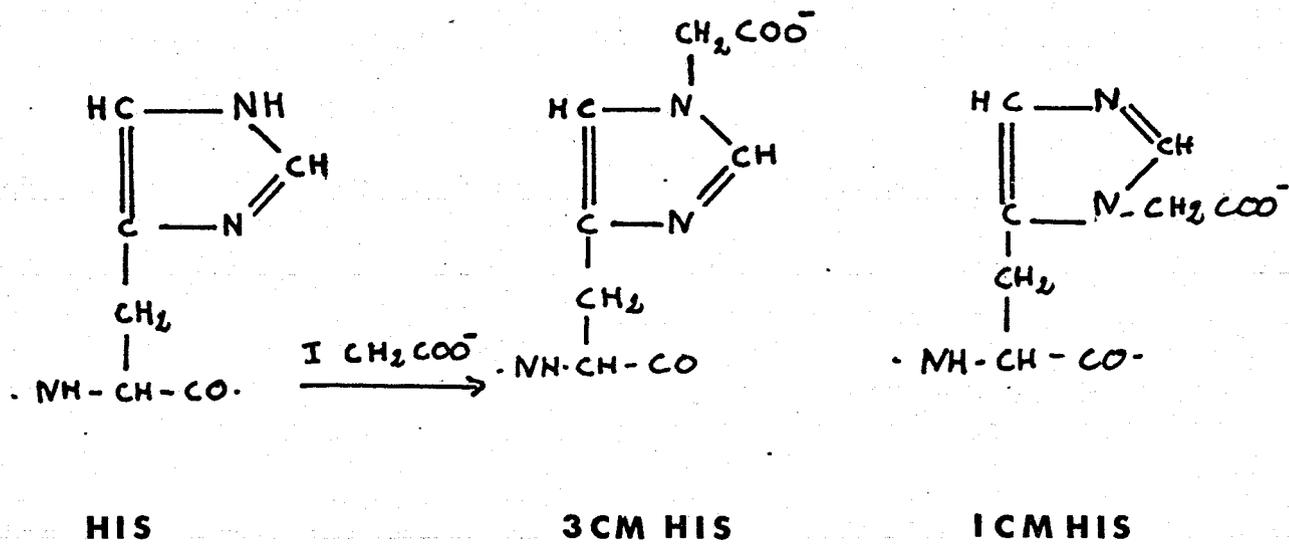
Après modification des résidus d'histidine par l'iodoacétate trois dérivés peuvent être formés : la 1-carboxyméthylhistidine, la 3-carboxyméthylhistidine et la dicarboxyméthylhistidine (Schéma II). Ces dérivés ont été préalablement synthétisés par la méthode de CRESTFIELD et STEIN (62) et leur comportement sur des colonnes de résine utilisées

pour les dosages d'acides aminés a été déterminé comparativement à une solution d'acides aminés témoins. La di CM histidine est éluée avant l'acide aspartique, la 1 CM histidine est éluée entre la proline et le glycolle et la 3 CM histidine entre l'alanine et la valine (Figure 10). Nous avons analysé les hydrolysats acides de la myoglobine carboxyméthylée dans les conditions de GUNDLACH, STEIN et MOORE, en nous intéressant à la fois au nombre de résidus d'histidine qui disparaissent et à la formation des carboxyméthylhistidine.

Conformément aux résultats obtenus antérieurement par DAUTREVAUX et al. (63) nous observons la disparition d'un résidu d'histidine (10 au lieu de 11) après carboxyméthylation ; simultanément nous notons l'apparition de deux types de carboxyméthylhistidine. La 1 CM histidine correspond à 0,6 résidus et la 3 CM histidine à 0,4 résidu ; la somme de ces deux dérivés représente approximativement la disparition du résidu d'histidine. La formation de deux sortes de résidus montre qu'il y a vraisemblablement plusieurs résidus d'histidine modifiés.

2) Hydrolyse trypsique

L'identification des résidus d'histidine intéressés dans la réaction a été réalisée après alkylation par l'iodoacétate marqué au ^{14}C au niveau du carboxyle ; la CM myoglobine obtenue a alors été soumise à une hydrolyse enzymatique par la trypsine ou la chymotrypsine ; après fractionnement de l'hydrolysate par chromatographie sur colonne de résine à échange de cations, les peptides radioactifs isolés ont été étudiés de façon à identifier les séquences peptidiques contenant les résidus de CM histidine. Après hydrolyse trypsique de la myoglobine alkylée, l'hydrolysate est chromatographié sur colonne de résine polystyrène sulfonée et la courbe d'éluion a été établie au moyen de la réaction à la ninhydrine (Figure 11) ; la radioactivité des fractions obtenues a été mesurée et a montré l'existence de dérivés carboxyméthylés au niveau des pics 11 et 16 (respectivement 76 et 78 cpm - bruit de fond 4,6 cpm). Après purification par couplage bidimensionnel d'une



SCHEMA II

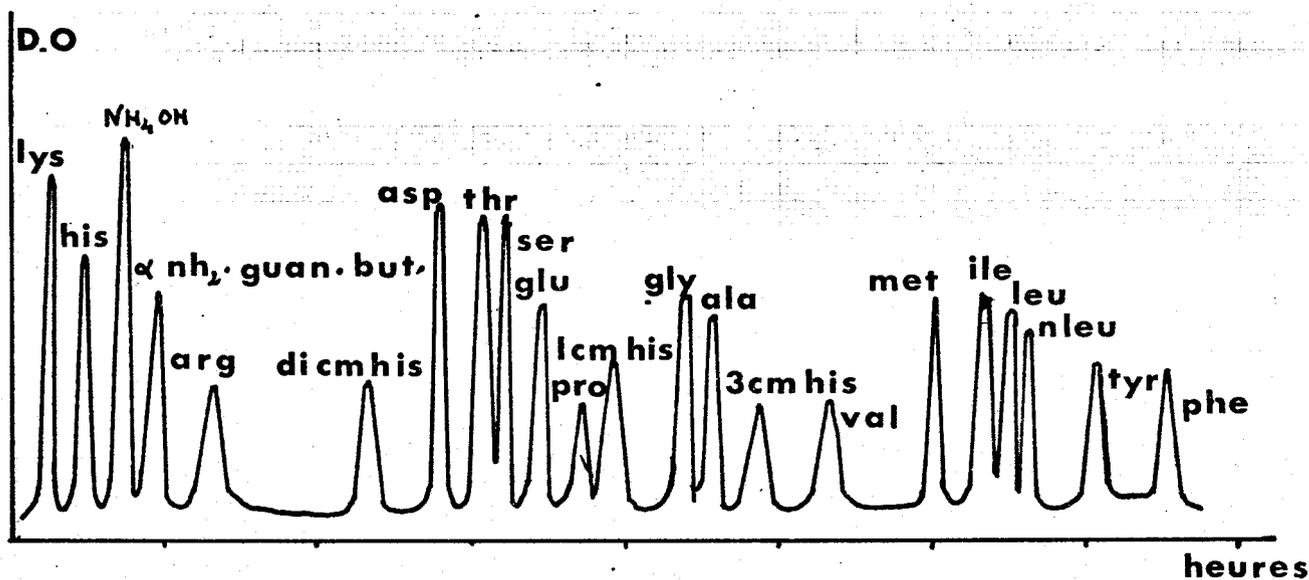


Diagramme d'élution des acides aminés témoins et des dérivés carboxyméthylhistidine.

Chromatogramme réalisé à l'aide de l'autoanalyseur TECHNICON

FIGURE 10



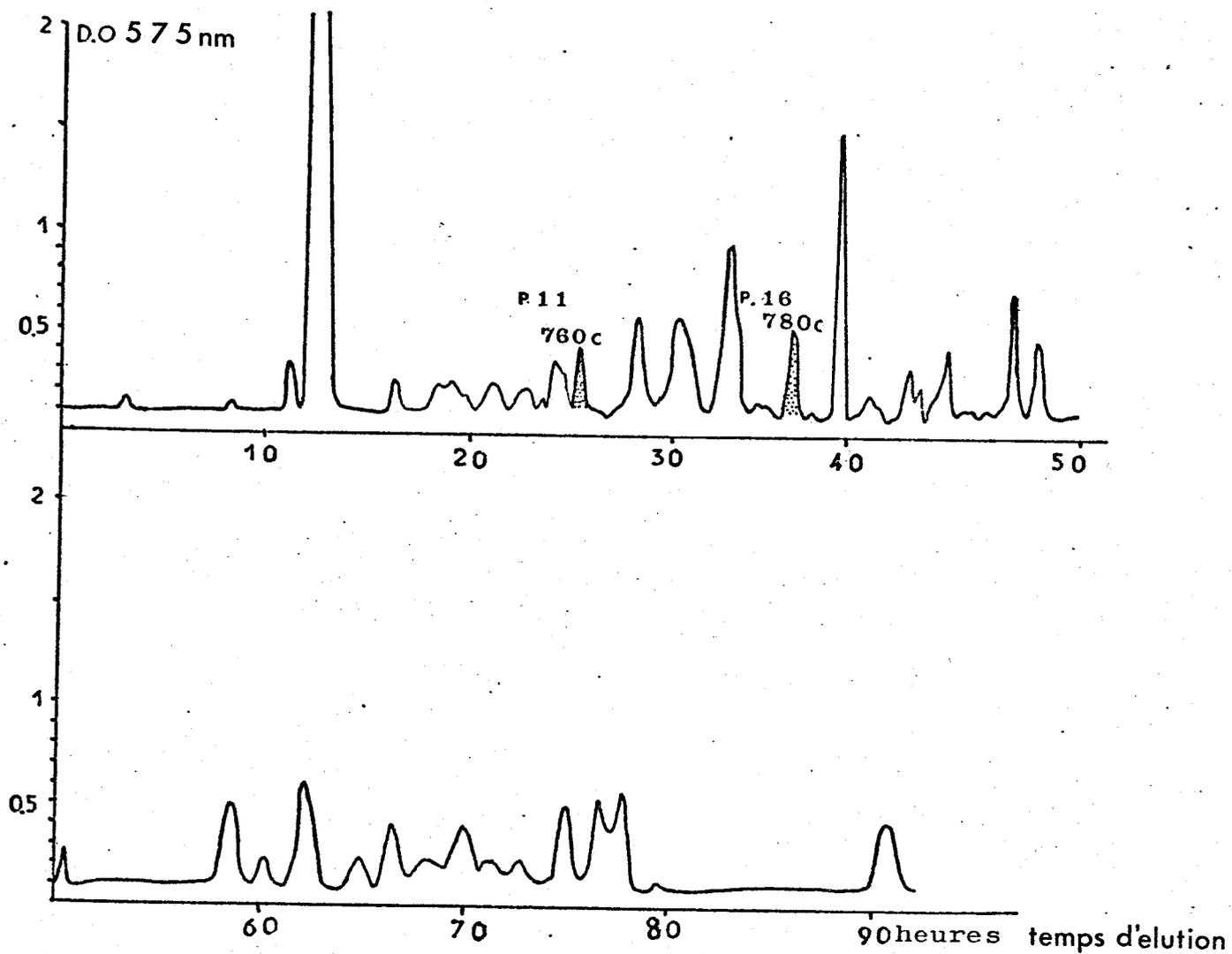


FIGURE 11

COURBE D'ELUTION DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE DE LA
 GLOBINE DE CARBOXYMETHYL MYOGLOBINE ^{14}C

Réaction à la ninhydrine

(Pour les conditions, se référer aux pages 38-39-40)



électrophorèse et d'une chromatographie, les peptides 11 et 16 ont été hydrolysés et leur composition en acides aminés a été déterminée.

Peptide 11 : Thr : 0,81 ; Glu : 2,02 ; Ala : 1,03 ; Met : 0,48 ;
HCy (*) 0,43 ; Hse (*) 0,18 ; Lys : 1,03.

Peptide 16 : Asp : 2,33 ; Thr : 0,99 ; Glu : 1,30 ; Pro : 0,74 ;
Gly : 3,16 ; Ala : 3,05 ; Met : 0,55 ; Phe : 0,90 ;
Lys : 0,98 ; His : 0,98 ; HCy et Hse (+).

Ces deux peptides correspondent en fait par leur composition en aminoacides aux deux peptides à méthionine des hydrolysats tryptiques de myoglobine de Cheval :

Séquence 51 - 56 (Peptide 11)

Thr - Glu - Ala - Glu - Met - Lys

Séquence 119 - 133 (Peptide 16)

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

Dans aucun de ces peptides nous ne retrouvons de carboxyméthylhistidine : l'iodoacétate a en fait réagi avec la méthionine pour donner le SCM Méthionine-sulfonium qui se décompose au cours de l'hydrolyse acide en homosérine, homocystéine, méthionine sulfone et méthionine sulfoxyde (Figure 12). Nous n'avons en fait trouvé aucun peptide majeur contenant de la CM Histidine dans l'hydrolysats, peut être parce que ces peptides existent en quantité faible par rapport à ceux qui contiennent la SCM Méthionine ; ceci peut également s'expliquer par le fait que le ou les résidus d'histidine alkylés se situent dans le noyau qui devient insoluble après hydrolyse tryptique et qui contient un grand nombre de résidus d'acides aminés hydrophobes, tels que la leucine et l'isoleucine.

(*) HCy : homocystéine ; Hse : homosérine

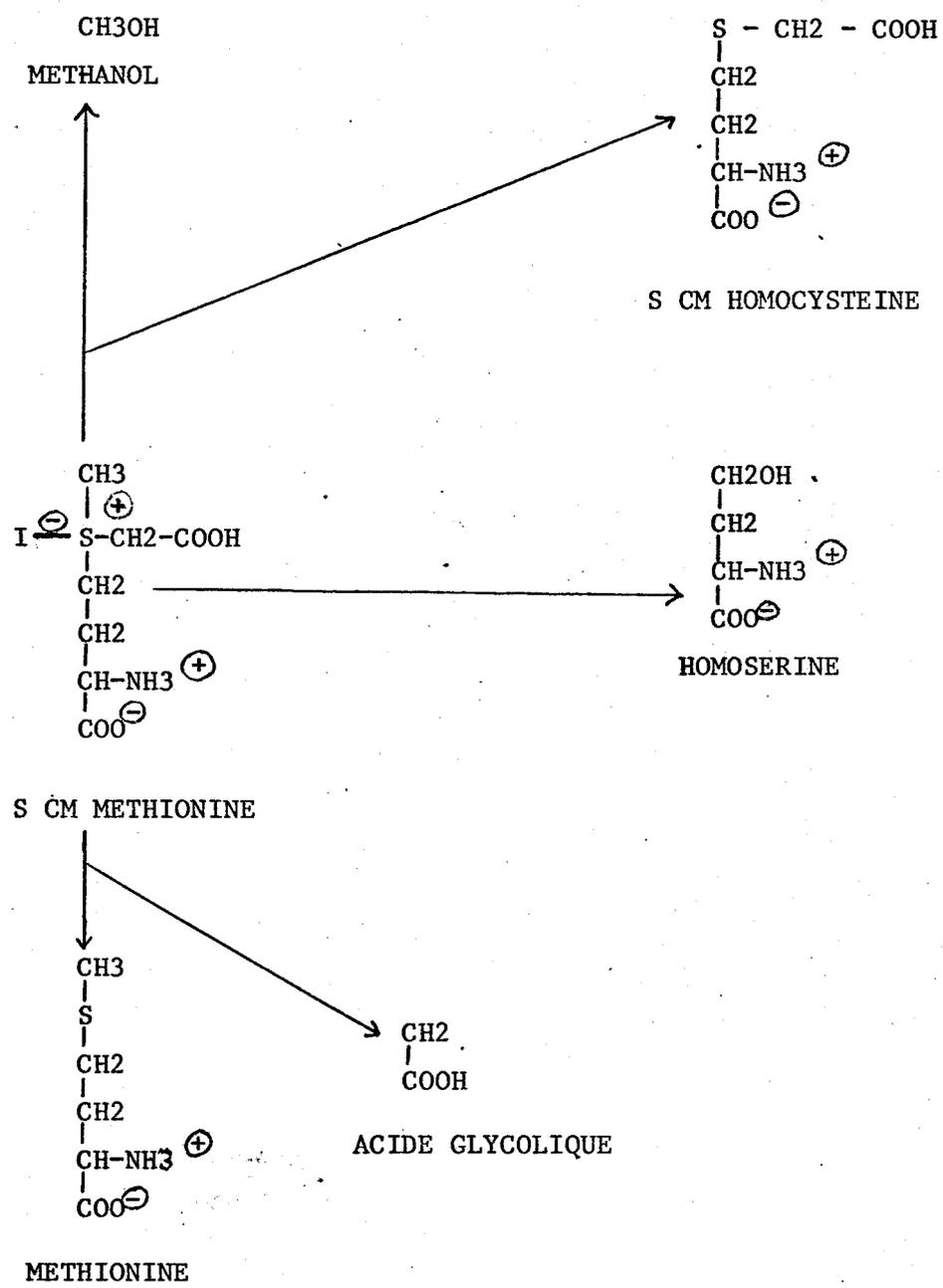


FIGURE 12

DEGRADATION DE LA S CM METHIONINE SULFONIUM
APRES HYDROLYSE TOTALE



3) Hydrolyse chymotrypsique

α) Etude de l'hydrolysate par fractionnement sur colonne de résines échangeuses de cations

Une autre enzyme susceptible de couper les liaisons impliquant ces résidus hydrophobes se révélait nécessaire pour résoudre ce problème : nous avons choisi la chymotrypsine, bien qu'elle soit moins spécifique que la trypsine. En raison de cette spécificité plus large le nombre de peptides libérés sera plus élevé, mais tous les peptides obtenus sont solubles.

Après hydrolyse chymotrypsique, nous isolons cinq peptides radioactifs par chromatographie d'échange d'ions (Figure 13). Chaque peptide radioactif est purifié par chromatographie sur papier et élué. Après hydrolyse totale chlorhydrique, leur composition en acides aminés a été déterminée et est indiquée dans le tableau IV. Seul le peptide 3 contient un dérivé carboxyméthylé. Il s'agit de la 1 CM His. La composition en acide aminé correspond approximativement à la séquence 107-115.

Ile Ser Asp Ala Ile Ile His Val Leu

La totalité du peptide ayant été utilisée pour la détermination de sa composition en acides aminés, nous ne pouvons confirmer la séquence. Les compositions en acides aminés des peptides 4, 16, 20 et 23 ne permettent pas d'établir une correspondance avec les séquences de peptides chymotrypsiques.

Pic 3 (462 cpm) : Asp : 1,91 ; Ser : 2,45 ; Glu : 0,93 ; I CM His : 0,89 ;
Gly : 1,35 ; Ala : 1,96 ; Val : 0,43 ; Ile : 2,59 ;
Leu : 2,00.

Pic 4 (330 cpm) : Asp : 1,30 ; Ser : 2,15 ; Glu : 2,05 ; Gly : 2,27 ;
Ala : 1,23 ; Val : 0,50 ; Ile : 0,30 ; Leu : 1,55 ;
Phe : 0,27.

Pic 16 (100 cpm) : Lys : 1,04 ; Glu : 1,16 ; Gly : 0,40 ; Ala : 0,20 ;
Phe : 0,43

→ Pic 20a Lys : 2,13 ; Thr : 3,27 ; Glu : 3,11 ; Pro : 1,05 ;

Pic 20 → Electrophorèse Gly : 1,68 ; Leu : 1,97 ; Phe : 1,75.
(110 cpm)

↘ Pic 20b Lys : 2,10 ; Glu : 1,31 ; Gly : 0,56 ; Ala : 1,42 ;
Leu : 3,10 ; Phe : 0,64.

Pic 23 (103 cpm) : Lys : 1,15 ; Asp : 0,55 ; Thr : 0,52 ; Ser : 0,85 ;
Glu : 0,80 ; Gly : 0,50 ; Ala : 1,00 ; Leu : 0,47.

TABLEAU IV

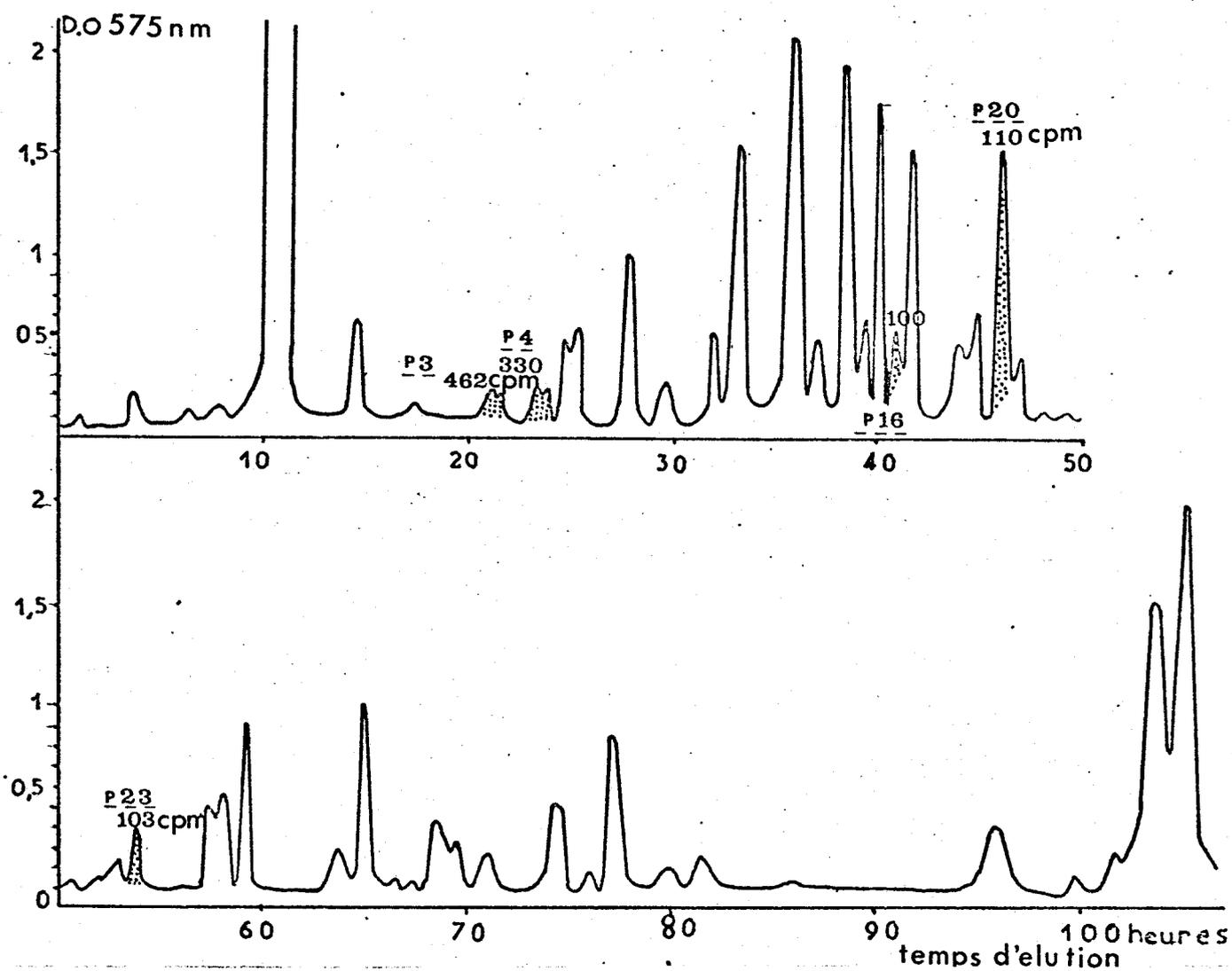


FIGURE 13

COURBE D'ELUTION DE L'HYDROLYSAT CHYMOTRYPSIQUE DE LA
 GLOBINE DE LA CARBOXYMETHYLMYOGLOBINE ¹⁴C



Réaction à la ninhydrine
 (Pour les conditions, se référer aux pages 38-39-40)

Les peptides radioactifs 4, 16, 20 et 23 ne contiennent pas de dérivés carboxyméthylés identifiables chimiquement ; ces résultats sont expliqués par le fait que ces peptides sont probablement constitués d'un mélange de peptides non modifiés et d'un peu de peptides carboxyméthylés. Au cours de leur purification par chromatographie sur papier, nous n'avons isolé que le peptide majeur après repérage par une coloration à la ninhydrine. Les peptides mineurs vis-à-vis de la révélation à la ninhydrine peuvent être en fait des peptides à carboxyméthyl-histidine, mais ils ont été négligés en raison de leur faible concentration. Ces résultats nous ont amené à modifier la stratégie d'étude de l'hydrolysate chymotrypsique après son fractionnement sur colonne échangeuse d'ions ; nous avons alors étudié systématiquement tous les peptides même ceux qui réagissent très faiblement à la coloration ninhydrine. Ensuite, nous avons suivi les peptides radioactifs par autoradiogramme au cours de leur purification afin de distinguer les peptides ordinaires des peptides carboxyméthylés.

β) Etude comparative des finger-prints de la globine de myoglobine et de carboxyméthyl myoglobine



Parallèlement à l'étude des peptides chymotrypsiques obtenus par fractionnement sur colonne de résine, nous avons fait une étude comparative des cartes électrochromatographiques sur papier des globines de myoglobine native et modifiée, afin de repérer tout changement dans la position d'un peptide qui correspondrait alors au peptide à histidine modifiée

§ Par révélations spécifiques

La globine de la myoglobine native est alkylée et soumise à l'hydrolyse chymotrypsique. Après couplage d'une électrophorèse à pH 3,9 et d'une chromatographie dans le système Butanol/pyridine/acide acétique/eau (150 : 100 : 30 : 120) suivi d'une révélation à la ninhydrine 2/1000, nous n'observons pas de modifications nettes dans la répartition des peptides. Pour mieux suivre les peptides à histidine nous avons employé la coloration de PAULY après avoir décoloré l'électrochromatographie par de l'acétone chlorhydrique. Les deux cartes de la

myoglobine et de la carboxyméthyl myoglobine sont également comparables. (Figure 14)

§ Après marquage au ^{14}C

Après alkylation avec l'iodoacétate marqué et hydrolyse chymotrypsique, on réalise l'autoradiographie de l'électrochromatogramme afin de repérer la position des peptides radioactifs : l'autoradiogramme montre ainsi la présence de 4 peptides radioactifs principaux (Figure 15). Chaque partie du chromatogramme correspondant à un peptide radioactif est découpée puis éluée avec HCl N/100. Après hydrolyse totale chlorhydrique, leur composition en amino-acides a été déterminée et est indiquée dans le tableau suivant : pour les deux taches radioactives principales.

Peptide 1 : Lys : 2,20 ; His : 1,07 ; Glu : 1,53 ; Gly : 1,04 ;
Ala : 0,86 ; Leu : 0,72.

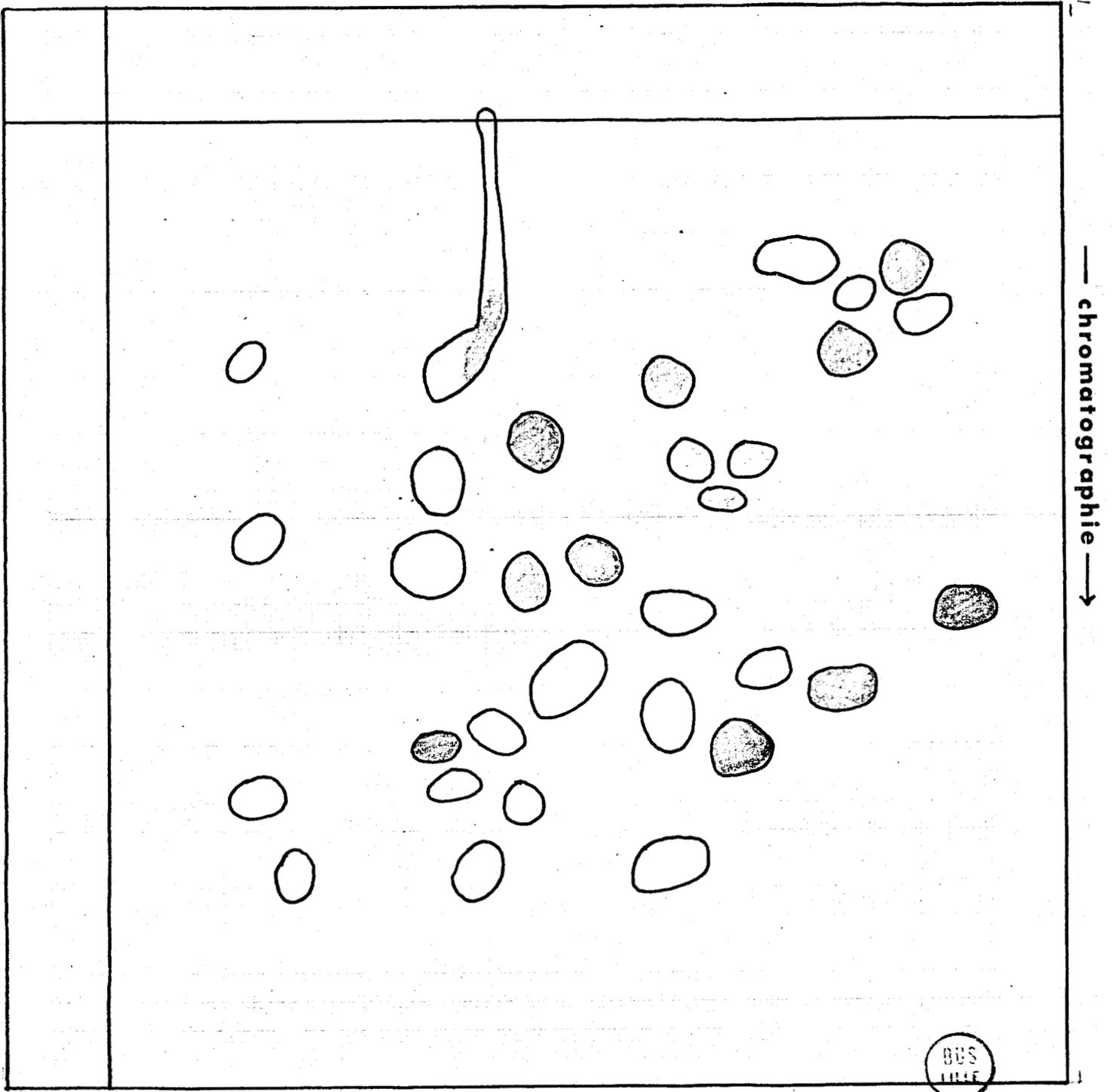
Peptide 2 : His : 1,05 ; Thr : 1,01 ; Ser : 2,18 ; Glu : 1,92 ;
Gly : 0,99 ; Ala : 2,10.

Ces compositions ne permettent pas d'établir une correspondance avec les séquences des peptides chymotrypsiques et montrent que la séparation par une électrochromatographie est insuffisante car les taches isolées sont en fait hétérogènes.

γ) Etude de l'hydrolysat chymotrypsique par fractionnement sur colonne de résine échangeuse de cations et autoradiogramme des peptides radioactifs

Après l'hydrolyse chymotrypsique, nous dosons la radioactivité des peptides séparés par fractionnement sur colonne de résine. Nous nous intéressons particulièrement aux peptides mineurs après coloration à la ninhydrine. Nous repérons ainsi une dizaine de peptides radioactifs (Figure 16), les pics les plus radioactifs réagissent en fait très peu avec la ninhydrine. Les peptides radioactifs sont purifiés par chromatographie dans le système tampon BuOH/pyridine/AcOH/H₂O (150 : 100 : 30 : 120) et sont repérés après autoradiographie (Figure 17) puis sont élués avec HCl N/100.

+ — électrophorèse —> -



Partie foncée : révélation de PAULY positive

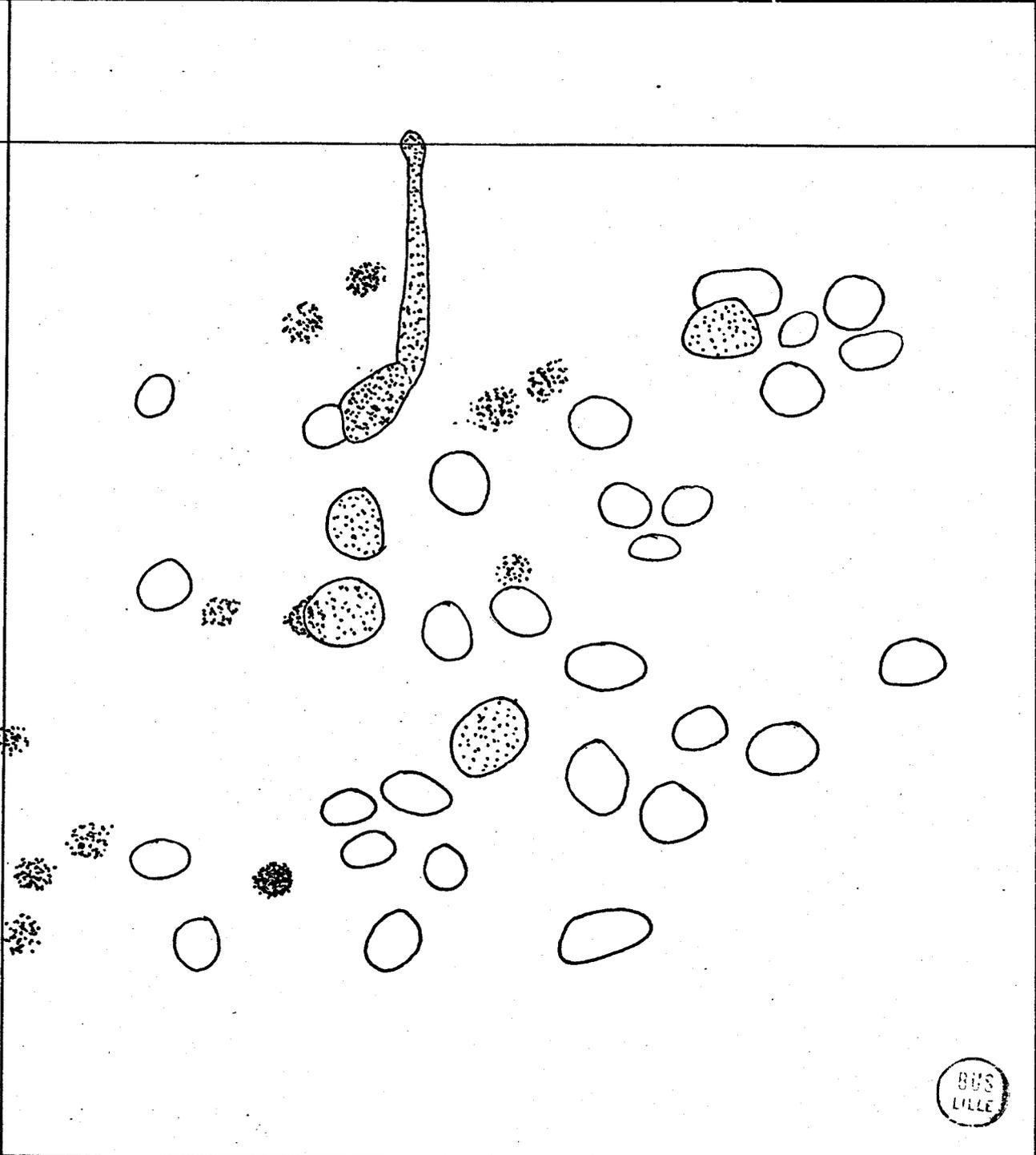
Electrochromatographie de l'hydrolysate chymotrypsique de la CM Mb

à pH 3,9 - solvant : Butanol-Pyridine-acide acétique-eau (150:100:30:120)

FIGURE 14

+ — E —> —

— C —>



 Zone radioactive
Autoradiogramme du finger print de la CM.MB ¹⁴C

Figure 15

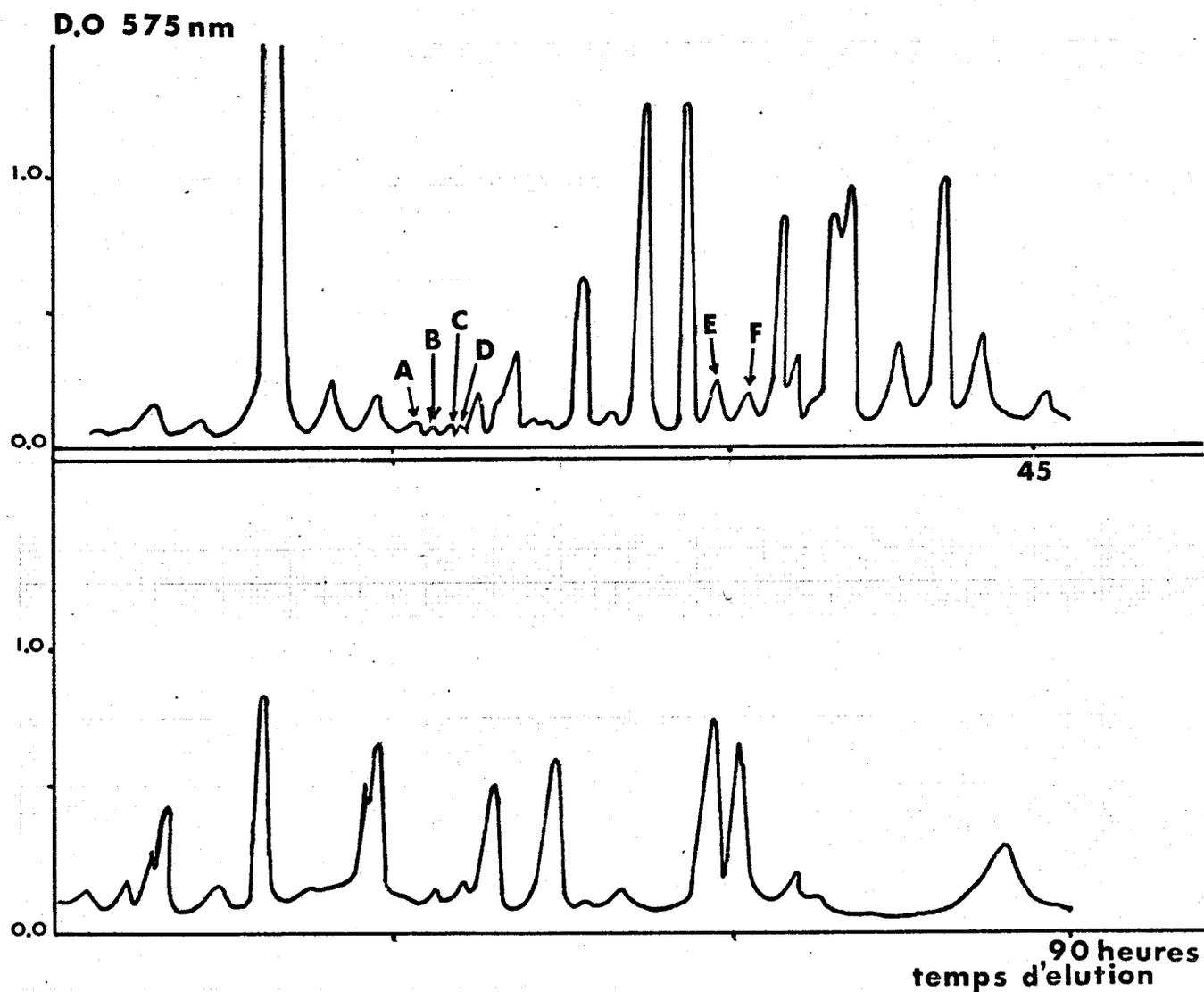


FIGURE 16

COURBE D'ELUTION DE 1'HYDROLYSAT CHYMOTRYPSIQUE DE LA GLOBINE
de CM Mb

Réaction à la ninhydrine
pour les conditions d'élution, se référer aux pages 38-39-40

Peptides radioactifs : pic A : 16 cpm ; pic B : 180 cpm ; pic C : 51 cpm ;
pic D : 11 cpm ; pic E : 11 cpm ; pic F : 15 cpm.

Ligne de base 3,6 cpm.



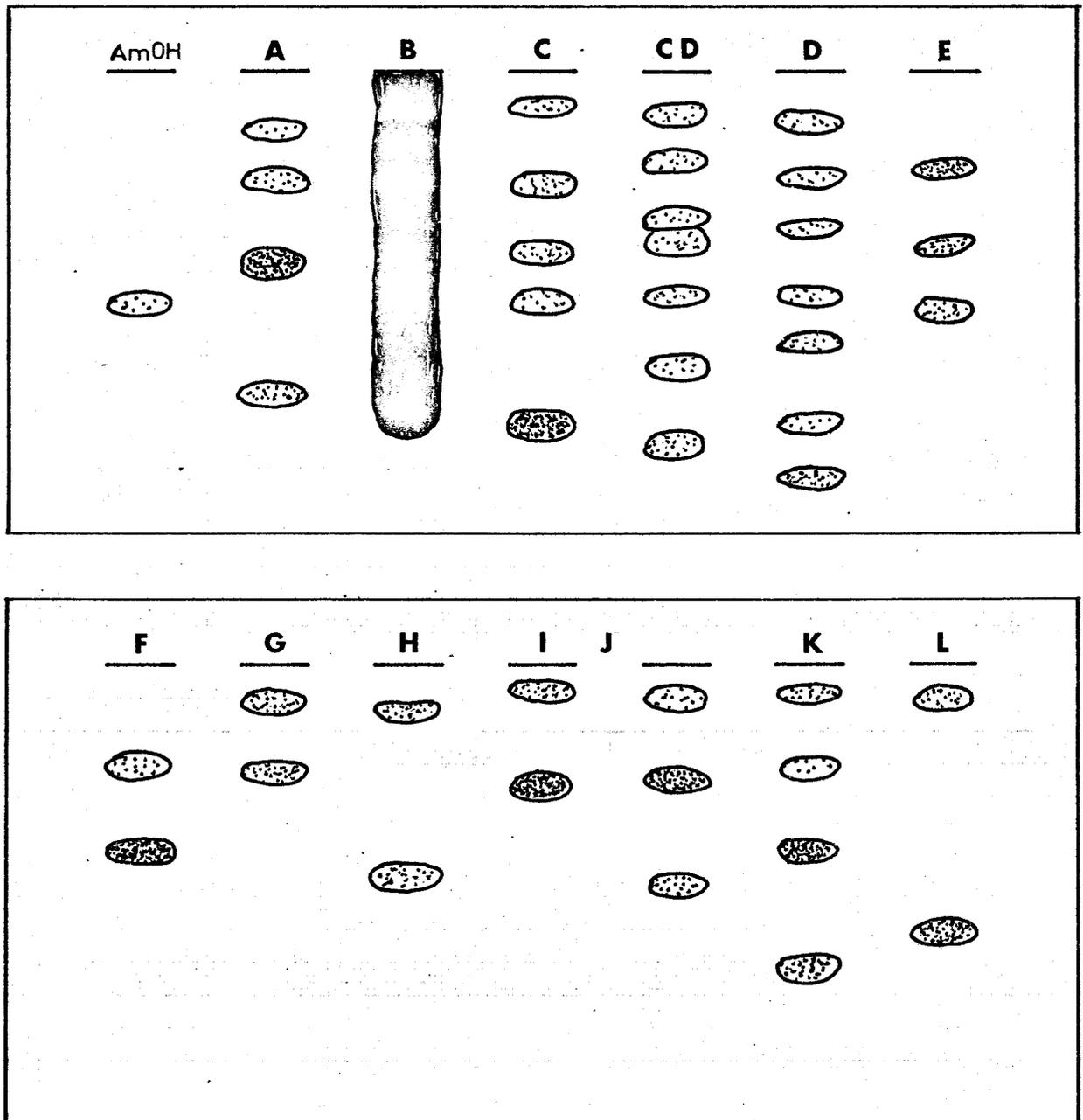


FIGURE 17

Autoradiogramme des chromatogrammes réalisés dans le solvant
 Butanol-Pyridine-Acide acétique-Eau pour la purification des peptides
 radioactifs.



Après hydrolyse totale chlorhydrique, leur composition en amino-acide a été déterminée et est indiquée dans le Tableau **V** . L'acide aminé N-terminal est déterminé par la méthode des dansyls de HARTLEY.

Ces peptides correspondent aux séquences suivantes :

Peptide A (séquence 34-40)

Thr - Gly - His - Pro - Glu - Thr - Leu

Peptide B (séquence 107-115)

Ile - Ser - Asp - Ala - Ile - Ile - His - Val - Leu

Peptide C (Séquence 104-115)

Leu-Glu-Phe-Ile-Ser-Asp-Ala-Ile-Ile-His-Val-Leu

Peptide E (Séquence 117-131)

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

Peptide F (Séquence 117-135)

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

TABLEAU V

Le peptide B contenant le résidu d'histidine 113 est beaucoup plus radioactif que les autres peptides. Sa radioactivité est majeure par rapport à celle des autres peptides modifiés. Cependant le rendement en peptide CM His 113 est relativement faible (15 à 20 p. 100) par rapport à celui des autres peptides chymotrypsiques non marqués. Ce faible rendement peut être expliqué par le fait que seule une partie de la myoglobine a pu être alkylée au niveau de l'histidine 113 et qu'il y aurait de multiples formes de CM myoglobine, la forme contenant la CM histidine 113 étant cependant prépondérante. Nous avons donc essayé d'isoler la ou les carboxyméthyl myoglobines par séparation sur colonne de carboxyméthylcellulose et par la technique d'électrofocalisation.

B - ISOLEMENT DE LA CM Mb

1) Essais de séparation sur carboxyméthylcellulose

Nous avons tenté d'isoler la CM Mb par chromatographie sur colonne de carboxyméthylcellulose avec une élution au moyen de tampon phosphate de sodium 0,02 M de pH 6,9. Mais la chromatographie sur carboxyméthylcellulose est peu reproductible, car les phénomènes de

microhétérogénéité interviennent fortement (voir propriétés générales) et d'autre part la myoglobine se dissocie en partie en hème et en globine (la liaison hème-globine de la metmyoglobine est beaucoup plus labile que celle de l'oxymyoglobine).

2) Séparation par électrofocalisation

L'électrofocalisation utilise un gradient de pH : dans un tel gradient, les valeurs basses de pH se trouvent à l'anode et les valeurs élevées à la cathode ; ce gradient est stabilisé par un gradient de densité réalisé à l'aide d'un composant non ionique, en général le saccharose, afin de limiter au maximum les courants de convection. Le gradient de pH se forme lors du passage du courant par migration des ampholytes transporteurs jusqu'à leur point isoélectrique. Quand un échantillon de protéines, dont les points isoélectriques sont compatibles avec le gradient de pH utilisé, est soumis à l'électrophorèse de focalisation, chaque molécule protéique migre vers une valeur du pH qui correspond à son point isoélectrique. Les protéines sont donc "focalisées" en des points dont la valeur du pH est égale à celle du point isoélectrique.

§ Technique

Nous avons utilisé la colonne LKB 8122 de 440 ml refroidie à 4°C et un mélangeur de gradient LKB 8123.

La myoglobine est focalisée dans un gradient de pH 6-8 d'ampholines LKB et dans un gradient de densité de sucrose. La focalisation se poursuit pendant 48 heures sous une différence de potentiel de 1200 volts avec une intensité de courant qui diminue en cours d'expérience de 20 à 4 mA. L'élution est réalisée par aspiration du liquide contenu dans la colonne (2 ml/minute) ; des fractions de 5 ml sont récupérées dans un collecteur automatique. Chaque fraction est lue à 280 nm (protéine) et à 409 nm (bande de Soret).

Les différentes fractions obtenues peuvent être conservées sous cette forme une huitaine de jours à + 4°C sans qu'on observe de dénaturation ni de changement de forme héminique.

Dans certains cas (étude de la fixation d'oxygène), il est nécessaire de dialyser ces fractions contre de l'eau distillée pour éliminer le saccharose et les ampholines, puis contre un tampon approprié.

Résultats

Pour les études d'électrofocalisation, nous avons utilisé une préparation de CM-myoglobine radioactive. Après hydrolyse totale de la préparation nous avons retrouvé 0,46 résidu de 1 CM histidine et seulement des traces de 3 CM histidine par molécule de globine ; la carboxyméthylation n'a donc pas été poussée aussi loin que dans les essais précédents.

Le diagramme d'électrofocalisation de la CM Mb est comparable à ceux de la cyan-metmyoglobine ou de la myoglobine ; pour ces deux dérivés, on observe l'apparition d'un pic majeur et de 3 ou 4 pics mineurs d'importance décroissante qui sont les témoins de la microhétérogénéité des préparations. Dans le cas de la CM Mb radioactive (Figure 18), la radioactivité se répartit exclusivement sur les 3 pics mineurs : les comptages réalisés sur les 4 fractions montrent que les fractions I, II, III et IV représentent respectivement 7 %, 49 %, 36 % et 8 % de la radioactivité totale. La répartition protéique est par contre nettement différente (mesure des D.O. à 278 nm) : les fractions I, II, III et IV représentent respectivement 68 %, 15 %, 13 % et 4 % du poids des protéines mises en jeu dans le fractionnement.

Le pic II qui représente 15 p. 100 de la Mb totale est soumis à une électrophorèse en gel de polyacrylamide, parallèlement à une préparation de Mb native afin de vérifier son homogénéité.

3) Contrôle de pureté par électrophorèse en gel de polyacrylamide

§ Technique-

L'électrophorèse de la myoglobine a été réalisée dans un gel de polyacrylamide à 5 %, de pH 8,9 en urée 6 M, selon la méthode de ORNSTEIN (64). L'électrophorèse se poursuit pendant une durée de 20 heures sous une tension de 2 volts/cm. Le gel est ensuite démoulé et coupé en petites fractions. Chaque fraction est éluée avec une solution de NH_4OH N afin de récupérer la myoglobine.

§ Résultats

La myoglobine se dissocie en électrophorèse en gel de

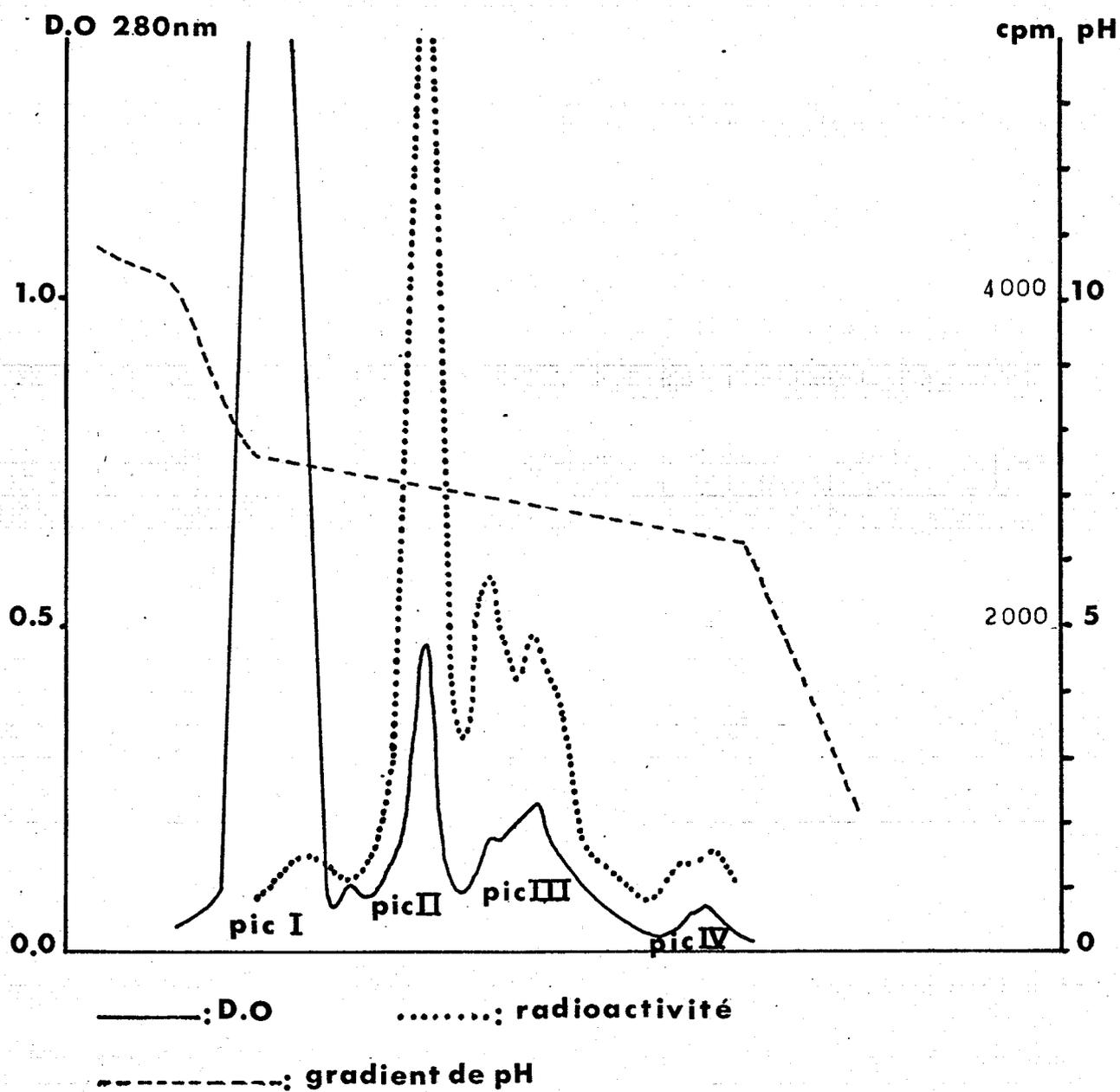


FIGURE 18

Courbe d'élution de la CM Mb ^{14}C après électrofocalisation dans un gradient de pH 6 à 8.



polyacrylamide pour donner une fraction mineure de la globine (coloration au bleu de Comassie, et parallèlement après élution, absorbance à 280 nm mais non à 409 nm), une fraction majeure contenant de la Mb (bande brune - colorabilité au bleu de Comassie et parallèlement après élution, absorbance à 280 nm et 409 nm) et une fraction hémunique mineure près du front d'électrophorèse (bande brune - pas de colorabilité au bleu de Comassie) (Figure 19).

La CM MB II du pic II se répartit principalement en une fraction contenant de la globine radioactive (CM-globine), puis une petite fraction de myoglobine et une fraction hémunique importante : ce résultat semble montrer que la myoglobine se dissocie plus facilement lorsqu'elle est alkylée, car la fraction centrale contenant de la myoglobine est nettement diminuée (Figure 19).

Après élution de la globine radioactive est hydrolysée par HCl 5,6 N. Sa composition en acides aminés montre la présence de 0,92 résidu de 1 CM his. Le résidu de 1 CM His correspond donc à l'histidine 113 modifiée.

C - ETUDE DES PROPRIETES OPTIQUES DE LA CM Mb ET DE SA CAPACITE DE FIXATION D'OXYGENE

Introduction

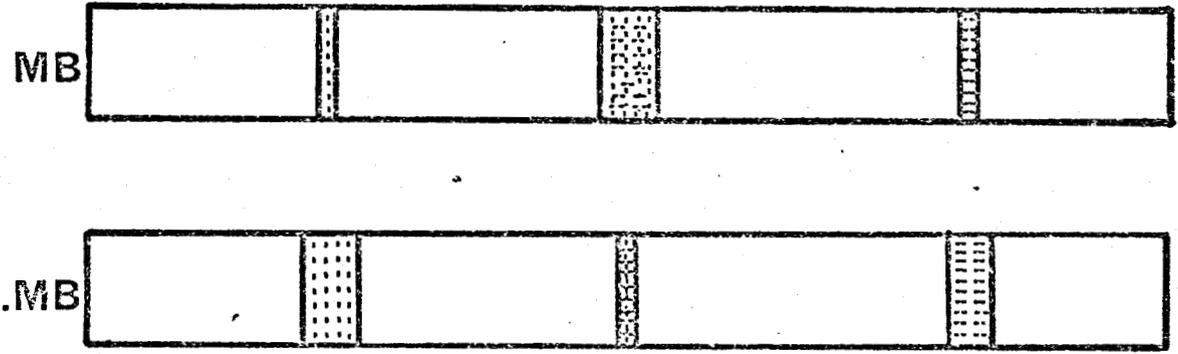
Après avoir isolé la 1 CM His 113 Mb par électrofocalisation, nous avons étudié les propriétés physicochimiques de cette Mb. Nous nous sommes surtout intéressés aux propriétés optiques de la myoglobine carboxyméthylée en les comparant à celles de la myoglobine native. Un changement du spectre d'absorption sera le reflet d'un changement de conformation de la protéine intervenu après la modification chimique. L'étude spectrale se fait entre 650 et 260 nm.

Nous avons étudié ensuite l'affinité de la CM Mb pour l'oxygène pour connaître les conséquences de la modification du résidu d'histidine 113 sur les propriétés physiologiques de la myoglobine.

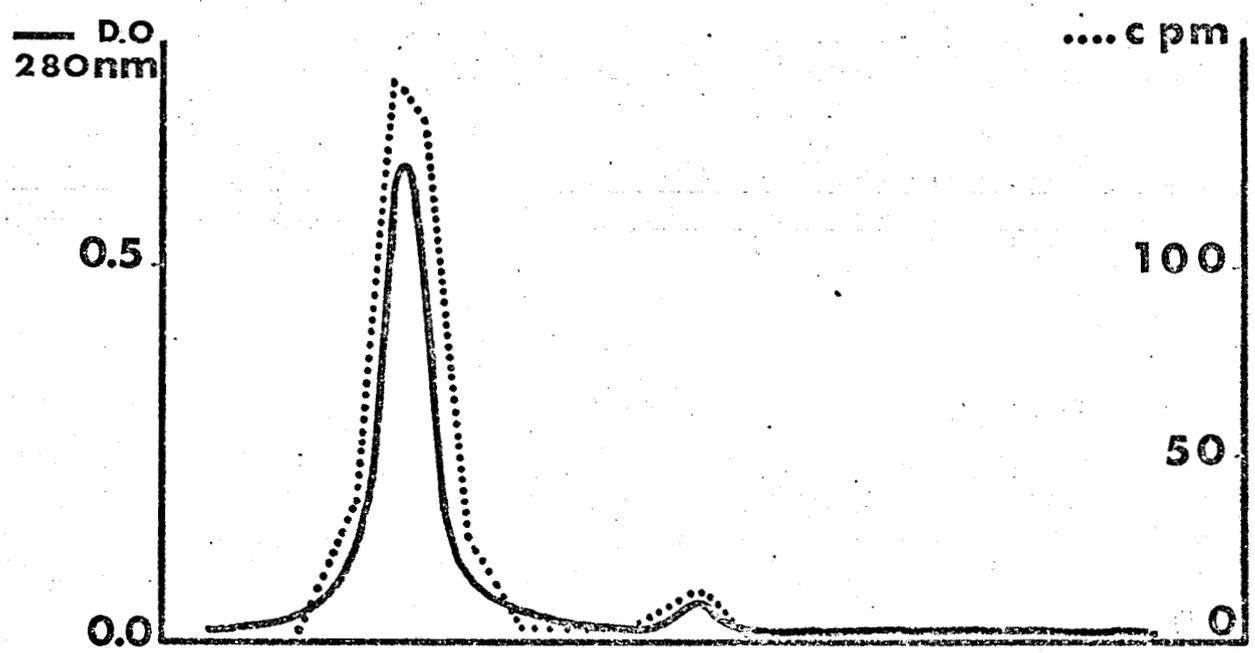
1) Comparaison des spectres d'absorption après électrofocalisation

La Mb a un spectre d'absorption caractéristique pour chaque état d'oxydation. Ce spectre révèle la nature de la liaison fer-ligand entre 500 et 650 nm, l'état d'oxydation du fer avec la bande de Soret entre 409 et 435 nm.

Q 409 nm :	0	+	+
Q 280 nm	+	+	0
leu de Comassie :	+	+	0
	Gb	Mb	Heme



GEL DE POLYACRYLAMIDE



ELUTION DU GEL APRES ELECTROPHORESE
DU PIC 2 D'ELECTROFOCALISATION DE LA CMb¹⁴C

FIGURE 19



Nous comparons les spectres de la Mb (Pic I) et de la CM Mb (Pic II) après leur séparation par électrofocalisation. Les deux sortes de myoglobine (Mb et CM Mb) se trouvent dans les mêmes conditions. Elles sont stockées dans la solution de saccharose qui a servi à préparer le gradient de densité. Cette solution est tamponnée par les ampholytes pH 8. Les spectres de la Mb I (native) sont comparés à ceux de la Mb II (carboxyméthylée). Nous faisons un spectre d'absorption par tube de fractionnement, donc une quinzaine de spectres pour chaque myoglobine. Nous avons ainsi les spectres pour des concentrations différentes. Une différence dans la position des maxima d'absorption ou des coefficients d'extinction de la CM Mb se traduira par l'intersection de la courbe d'absorption avec celle de la Mb.

La Figure 20 montre que toutes les courbes sont parallèles et que la modification chimique n'a pas altéré les propriétés optiques de la Mb. Cette identité des spectres d'absorption nous amène à la conclusion que la liaison fer-globine n'est pas modifiée après cette alkylation.

2) Réduction de la CM Met Mb par différents systèmes réducteurs

La CM Mb peut être réduite par des systèmes réducteurs divers tels que le BH_4Na , la dithionite, le phénazine méthosulfate couplé au NADH_2H^+ . Cette réduction en ferromyoglobine va nous permettre de comparer les spectres de l'oxy LCM His 113 Mb et de connaître sa capacité de fixation d'oxygène, la met Mb ne pouvant fixer l'oxygène.

§ Préparation de la myoglobine réduite

La myoglobine en solution 10^{-4}M est dialysée contre du tampon Tris 0,05 M, pH 7,5. La metmyoglobine est réduite sous forme de ferromyoglobine par addition de BH_4Na (1 mg).

La metmyoglobine se transforme progressivement en ferromyoglobine (10 minutes). La Figure 21 montre que la réduction de la Met CM Mb s'effectue normalement pour donner de la déoxy CM Mb. L'oxygène atmosphérique réagit instantanément avec la déoxy CM Mb pour donner de l'oxy CM Mb. La disparition totale des pics à 500 et 630 nm caractéristiques de la Met Mb indique que la réduction de la CM Met Mb s'effectue avec un rendement de 100 p. 100.

005
LITE

D.O

280

500

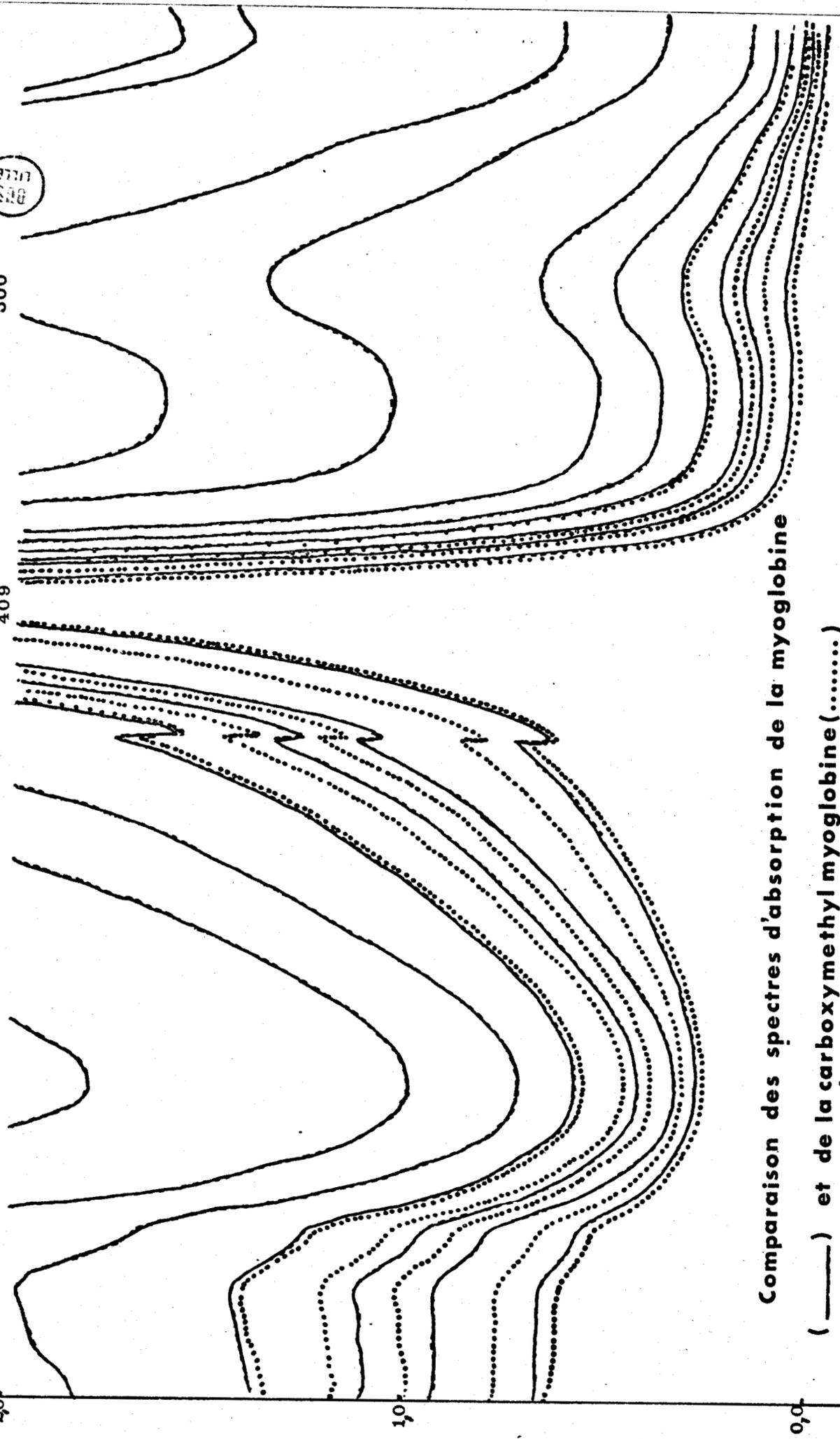
409

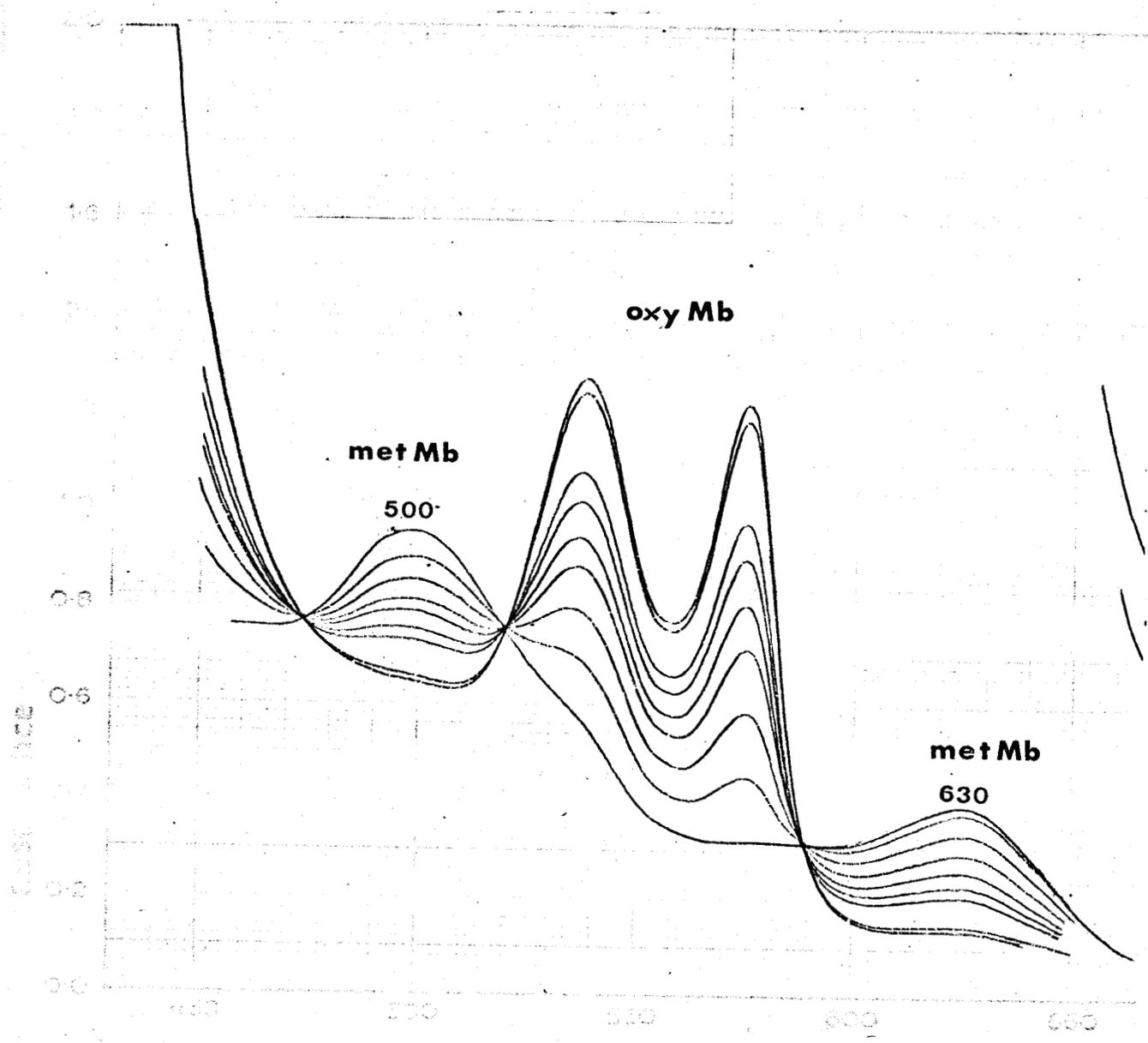
nm

Comparaison des spectres d'absorption de la myoglobine

(—) et de la carboxyméthyl myoglobine (.....)

Figure 20





Réduction de la ferri CM Mb en oxy ferro CM Mb

Figure 21



Nous avons le même résultat avec le système réducteur phénazine-méthosulfate NADH, .

3) Capacité de fixation d'oxygène

a) Réduction de la CM Met Mb et étude de la capacité de fixation d'oxygène par tonométrie

La réduction de la CM Met Mb en déoxy CM Mb rend celle-ci capable de fixer l'oxygène. La réduction s'effectuant dans un tonomètre, nous pouvons calculer ensuite la capacité de fixation d'oxygène. La méthode de tonométrie nous permet de tracer la courbe d'oxymyoglobine formée en fonction de la pression partielle en oxygène. Nous avons choisi le borohydrure de sodium comme système réducteur. Le BH_4Na a l'avantage de réduire la Met Mb et de déoxygéner la solution grâce au dégagement d'hydrogène provenant de la décomposition de l'excès de réactif. La myoglobine est d'abord dialysée contre du tampon Tris 0,05 M, pH 7,5 ; 4 ml de Met Mb 10^{-4} M sont introduits dans un tonomètre, on ajoute ensuite 1 mg de BH_4Na . La CM Met Mb se transforme en déoxy CM Mb. Pour éliminer toute trace d'oxygène, nous établissons un courant d'azote dans le tonomètre pendant 5 minutes (Figure 22). Un vide léger obtenu avec une trompe à eau (20 mmHg) terminera la déoxygénation et permettra d'introduire les volumes d'air nécessaires pour les mesures

b) Détermination de la pression en oxygène dans le tonomètre

A partir des lois des mélanges gazeux, on peut écrire que :

$$\frac{P_1 V_1}{T_1} = \frac{P_2 V_2}{T_2}$$

$$\frac{PO_2 (V_t - V_s)}{T^{\circ}b} = \frac{PO_2 \text{ atm} - \text{Contribution P.H}_2\text{O)} \times V_{\text{air}}}{T^{\circ}a}$$

$$\text{ou finalement } PO_2 = \frac{0,21 (P_{\text{atm}} - H.P.H_2O)}{T^{\circ}a} \times \frac{T^{\circ}b}{V_t - V_s} \times V_{\text{air}}$$

Vair : Volume d'air introduit dans le tonomètre

Vt : Volume du tonomètre

Vs : Volume de l'échantillon

H : Pourcentage de l'humidité de l'air

T[°]a : Température extérieure - T[°]b : Température du bain thermostaté

c) Détermination du pourcentage d'oxymyoglobine formée

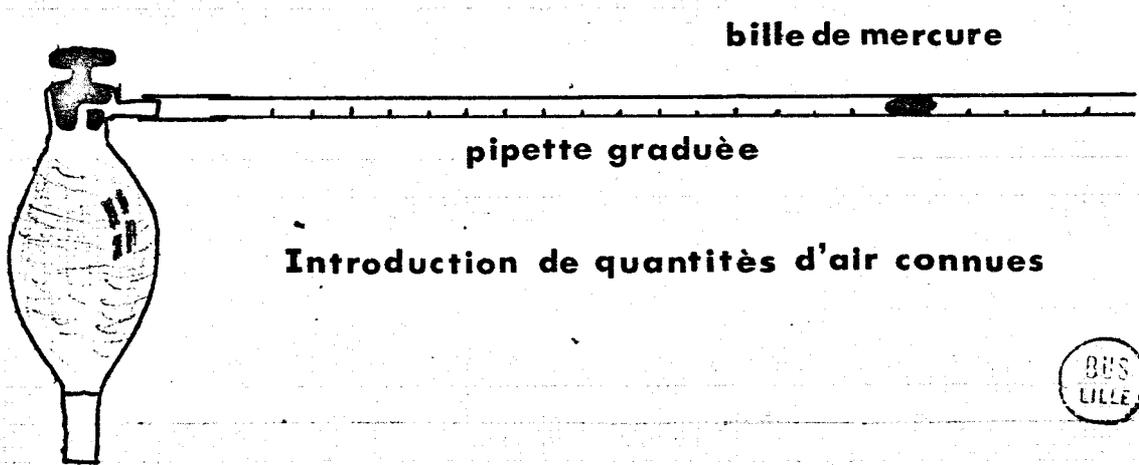
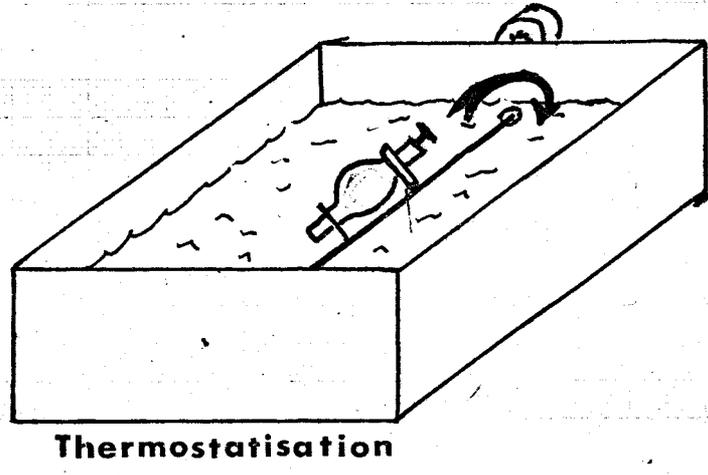
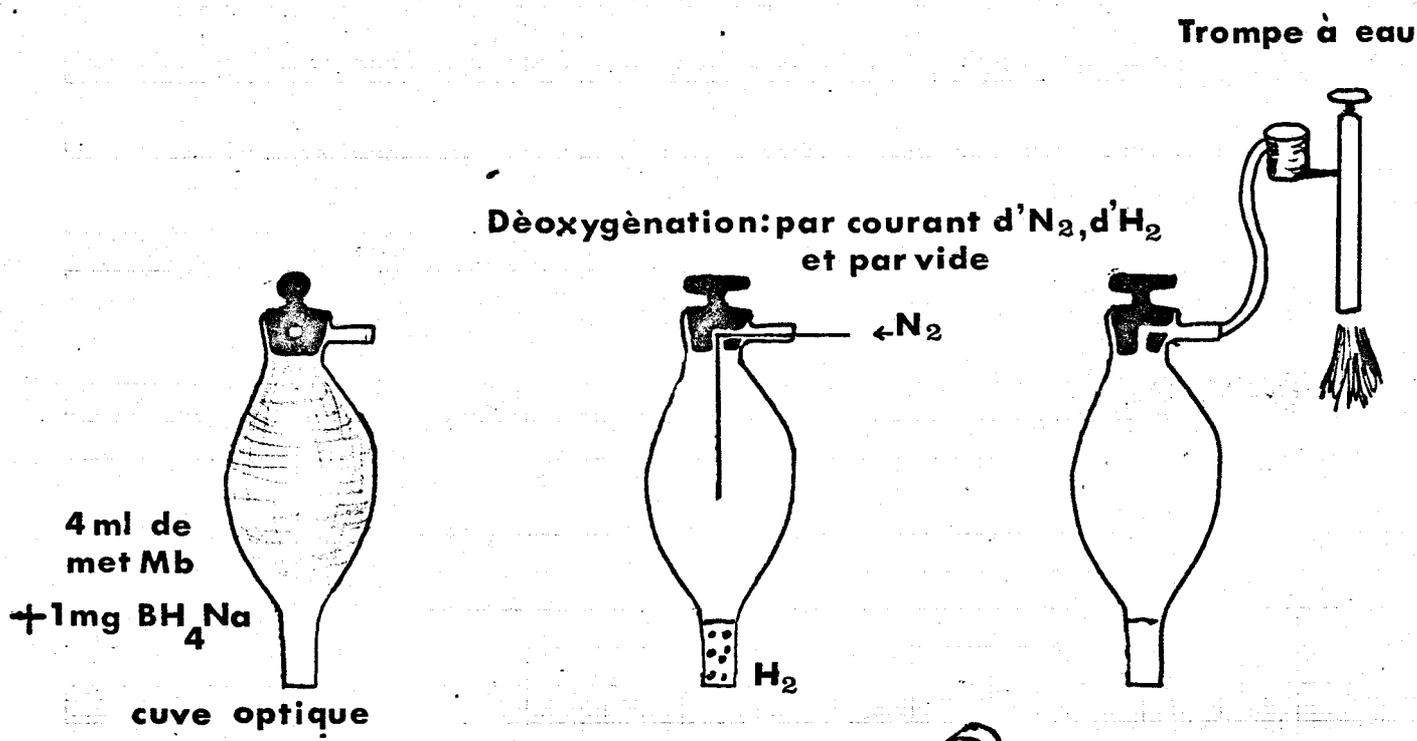
Au début de l'expérimentation, la myoglobine réduite et déoxygénée est sous forme de déoxymyoglobine ; celle-ci donne une bande d'absorption à 560 nm. Le pourcentage d'oxymyoglobine est nul et la D.O. à 560 nm correspond à 0 p. 100 d'oxyMb. Après un équilibre avec l'air atmosphérique, la myoglobine est sous forme d'oxymyoglobine caractérisée par 2 bandes d'absorption à 542 et 580 nm. La densité optique à 560 nm correspond alors à 100 p. 100 d'oxyMb. Les variations de la D.O. à 560 nm sont proportionnelles au pourcentage de MbO₂ formée, l'équilibre entre la déoxy et l'oxyMb étant mis en évidence par la présence de 4 points isobestiques. Le calcul est fait également à 542 et 580 nm et la valeur du pourcentage de l'oxymyoglobine est la moyenne des 3 valeurs données par le calcul à 560, 542 et 580 nm.

d) Courbe de dissociation de l'oxyCM Mb en fonction de la pression partielle en oxygène

Nous traçons un graphique avec la pression partielle en oxygène dans le tonomètre en abscisse et le pourcentage d'oxymyoglobine formé en ordonnée, et nous déterminons la pression partielle nécessaire pour une saturation à 50 p. 100 en oxymyoglobine (p 1/2)

e) Comparaison avec l'oxy Mb native

Lorsque la myoglobine est sous forme de déoxymyoglobine et que le tonomètre est thermostaté à 25°C, nous relevons son spectre d'absorption (UNICAM SP 800). Ensuite, le tonomètre reçoit des volumes d'air connus à l'aide d'une pipette graduée, reliée à celui-ci. Une bille de mercure située à l'intérieur de la pipette va indiquer, par son déplacement, le volume d'air introduit dans le tonomètre (Figure 22) ; la solution de Mb à l'intérieur du tonomètre est ensuite équilibrée avec l'oxygène introduit, en tournant doucement le tonomètre dans la cuve de thermostatisation à 25°C pendant 5 minutes. Ensuite, on relève le nouveau spectre. A chaque pression partielle en oxygène dans le tonomètre va correspondre un spectre d'absorption caractéristique de la quantité d'oxymyoglobine ou d'oxycarboxyméthyl-

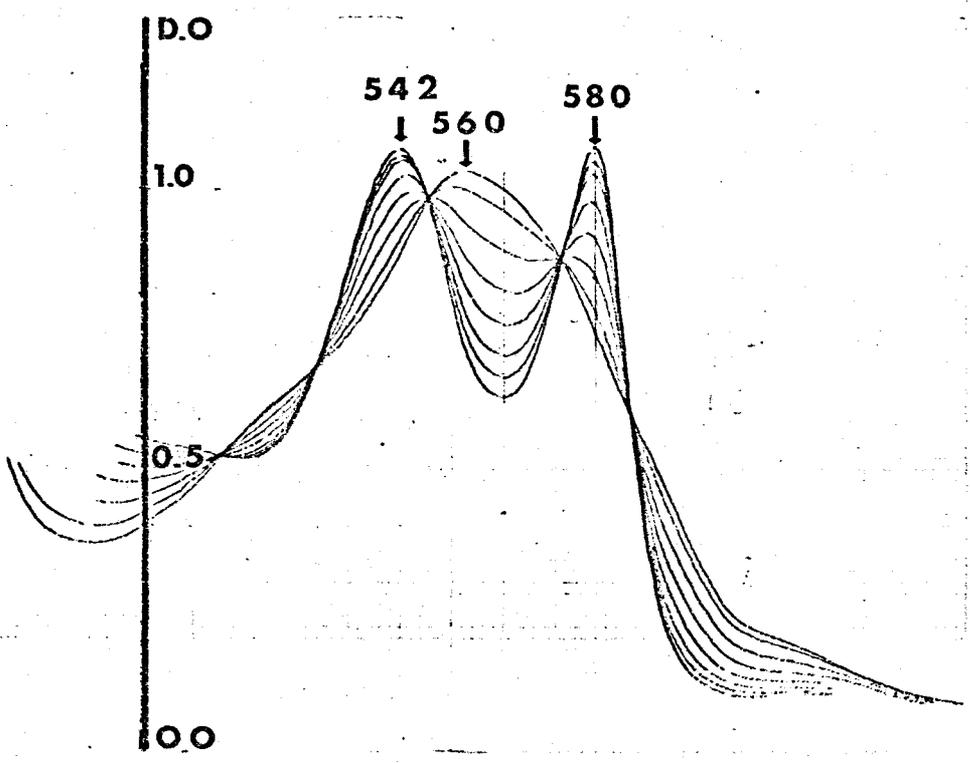


Différentes opérations pour l'étude de la capacité de fixation d'oxygène de la myoglobine.

Figure 22

myoglobine. Le cycle des opérations se poursuit jusqu'à oxygénation complète de l'échantillon.

La Figure **23** montre les courbes d'oxygénation de la 1 CM His 113 Mb. Les spectres de l'oxy et de la déoxy 1 CM His 113 sont comparables à ceux de la Mb native. L'oxycarboxyméthylmyoglobine a deux bandes d'absorption qui ont leurs maxima à 542 et 580 nm. ANTONINI (65) a montré qu'une oxymyoglobine qui est partiellement dénaturée ou qui contient un faible pourcentage de metmyoglobine à une densité optique à 542 nm supérieure à la D.O. à 580 nm ; le rapport est inversé pour la myoglobine native. L'oxy CM Mb (Figure **23**) ayant une D.O. à 580 nm plus élevée qu'à 542 nm, nous pouvons donc penser que cette protéine n'a pas subi de dénaturation après l'alkylation. La valeur de la pression partielle en oxygène pour 50 p. 100 de saturation en oxy CM MB est de 0,6 mmHg pour une solution tamponnée par du tampon Tris 0,05 M à pH 7,5. Cette valeur est identique à celle de la Mb non modifiée (Figure **24**). L'histidine 113 carboxyméthylée ne modifie donc pas la capacité de fixation d'oxygène de la Mb.



Spectres expérimentaux obtenus avec l'UNICAM SP 800

Oxygénation de la I CM His 113. Oxy Myoglobine

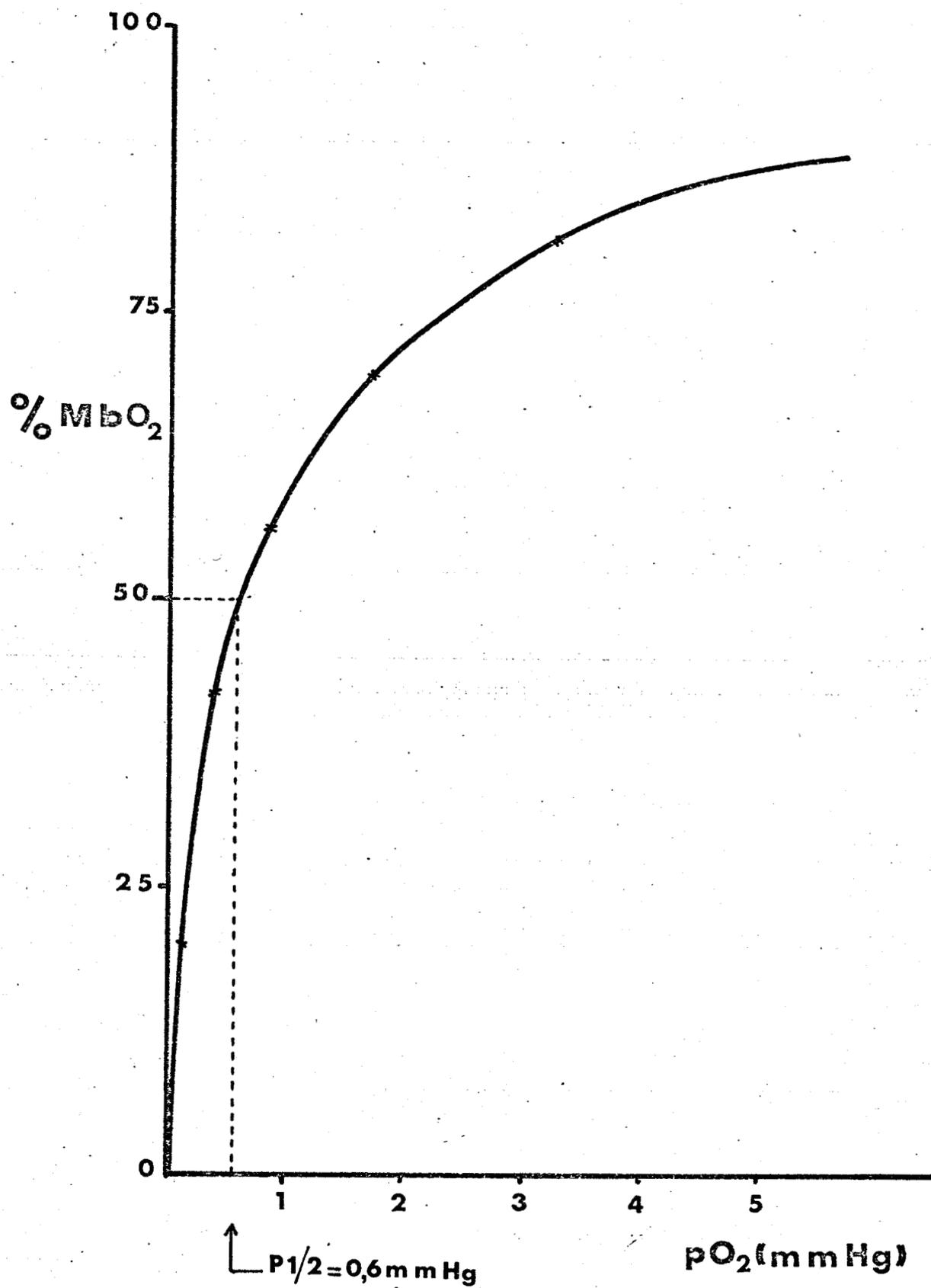
Système réducteur : BH_4Na , Tampon Tris pH 7,5 0,05 M

Température du bain : 25°C

Pressions partielles en oxygène : p_1O_2 0 mm Hg
 p_2O_2 : 0,12 p_3O_2 : 0,41 p_4O_2 : 0,87
 p_5O_2 : 1,71 p_6O_2 : 3,39 p_8O_2 : pression atmosphérique

FIGURE 23





COURBE DE DISSOCIATION DE LA I.C.M.HIS.OXY.MYOGLOBINE

FIGURE 24



CONCLUSION

L'étude des produits d'alkylation de la myoglobine selon la méthode de GUNDLACH, STEIN et MOORE nous a permis d'étudier une modification chimique de la myoglobine sous trois angles différents. Dans un premier temps, il s'agissait de déterminer si la myoglobine possédait un résidu d'histidine "réactif" comme l'avait laissé prévoir les travaux de DAUTREVAUX et HAN et surtout de déterminer quel est ce résidu d'histidine. La composition en acides aminés de la CM Mb nous a montré qu'il y avait deux sortes d'histidine modifiée : la 1 CM Histidine et la 3 CM Histidine, le taux de la 1 CM Histidine (0,6 résidu) étant plus important que le résidu de 3 CM Histidine (0,4 résidu). Plusieurs stratégies d'études ont été nécessaires pour identifier les résidus d'histidine modifiés ; l'étude de l'hydrolysats trypsique de la globine de CM Mb ^{14}C après fractionnement sur colonne de résine échangeuse de cations nous a permis d'isoler deux peptides radioactifs correspondant aux séquences 51-56 (Thr Glu Ala Glu Met Lys) et 119-133 (His Pro Gly Asn Phe Gly Ala Asp Ala Glu Gly Ala Met Thr Lys).

Dans aucun de ces peptides nous ne retrouvons de CM Histidine : l'iodoacétate a en fait réagi avec la méthionine pour donner la SCM Méthionine sulfonium qui se décompose au cours de l'hydrolyse acide en homosérine homocystéine, méthionine sulfone et méthionine sulfoxyde. Nous n'avons en fait trouvé aucun peptide contenant de la CM Histidine dans ces hydrolysats trypsiques, peut être parce que le ou les résidus d'histidine alkylés se situent dans le noyau qui devient insoluble après hydrolyse trypsique.

Un autre enzyme susceptible de couper les liaisons impliquant ces résidus se révélait donc nécessaire pour résoudre ce problème : nous avons choisi la chymotrypsine, bien qu'elle soit moins spécifique que la trypsine. En raison de cette spécificité plus large, le nombre de peptides libérés sera plus élevé, mais tous les peptides obtenus seront solubles.

72

L'étude comparative des électrochromatographies de l'hydrolysate chymotrypsique de la myoglobine et de la carboxyméthyl myoglobine ne nous a pas permis de repérer de différence dans le comportement des peptides après alkylation : ceci se comprend maintenant mieux car le peptide modifié majeur ne représente guère que 20 p. 100 de la quantité de chaque peptide non modifié et que dans ces conditions, on ne peut s'attendre qu'à une faible diminution d'intensité de la tache correspondant au peptide 107-115, alors que nous escomptions sa disparition presque complète.

De même, l'étude des peptides radioactifs repérés par autoradiographie de l'électrochromatographie de la CM Mb ¹⁴C après hydrolyse chymotrypsique se révèle inopérante pour la détermination des résidus d'histidine modifiés, car les taches radioactives isolées étaient en fait constituées du mélange d'un peu de peptide carboxyméthylé et de peptides non modifiés. Par contre, après fractionnement sur colonne échangeuse de cations de l'hydrolysate chymotrypsique de la CM Mb ¹⁴C nous isolons 5 peptides radioactifs purifiés et repérés à partir des autoradiographies de leur chromatographie préparative sur papier. Ces peptides correspondent aux séquences suivantes :

Séquence 34-40

Thr Gly His Pro Glu Thr Leu

Séquence 107-115

Ile Ser Asp Ala Ile Ile His Val Leu

Séquence 104-115

Leu Glu Phe Ile Ser Asp Ala Ile Ile His Val Leu

Séquence 117-131

Ser Lys His Pro Gly Asn Phe Gly Ala Asp Ala Glu Gly Ala Met

Séquence 117-135

Ser Lys His Pro Gly Asn Phe Gly Ala Asp Ala Glu Gly Ala Met Thr
Lys Ala Leu

Le peptide 107-115 contenant de la 1 CM His est beaucoup plus radioactif que les autres peptides, bien que son rendement ne soit que de 15 à 20 p. 100 quand on l'exprime en nombre de moles par rapport à la quantité des autres peptides chymotrypsiques non marqués. Cette contradiction n'est en réalité qu'apparente : la 1 CM His ne représente en effet que 0,6 résidu par molécule de globine, le reste de la radioactivité étant le fait de la 3 CM His (0,4 résidu par molécule). Le rendement en peptide (15 à 20 p. 100) a d'autre part été établi par dosage des aminoacides réalisé d'une part sur le peptide 107-115 isolé et purifié par chromatographie sur papier et d'autre part sur des peptides non radioactifs pour lesquels l'étape de purification ne s'est pas révélée nécessaire : comme on peut estimer à plus de 50 p. 100 la perte de matériel lors de la récupération des peptides à partir des chromatographies sur papier, cela porte le rendement en peptide 107-115 à 30 à 40 p. 100 par rapport à celui des autres peptides non marqués, communs à la myoglobine non modifiée et aux diverses formes de carboxyméthylmyoglobine ; on comprend de ce fait que le peptide 107-115 puisse malgré ce faible rendement être quand même majeur par rapport aux peptides carboxyméthylés.

Les autres résidus d'histidine marqués sont l'histidine 36 et 119 : il n'y a donc pas à proprement parler d'histidine réactive dans la myoglobine native et la molécule d'histidine qui disparaît au cours de la modification représente la somme des alkylations à faible rendement de plusieurs résidus différents. Il est cependant évident que l'alkylation privilégiée du résidu d'histidine 113 est le résultat d'une réactivité ou d'une exposition particulière de ce résidu. La position de l'histidine 113 permet en effet de comprendre cette particularité chimique. On constate que celle-ci est située à l'extérieur de la molécule, le noyau imidazole étant orienté en dehors et que son environnement est hydrophobe. Nous retrouvons à l'examen du modèle moléculaire (*) de la myoglobine

(*) Modèles LABQUIP - 18 Rosehill Park Estate - CAVERSHAM READING RG4 8XE
ENGLAND

de Cheval construit avec les données de KENDREW (64) sur la myoglobine de Cachalot, l'histidine 113 à une distance de l'ordre de 5 à 9 Å des résidus d'His 116

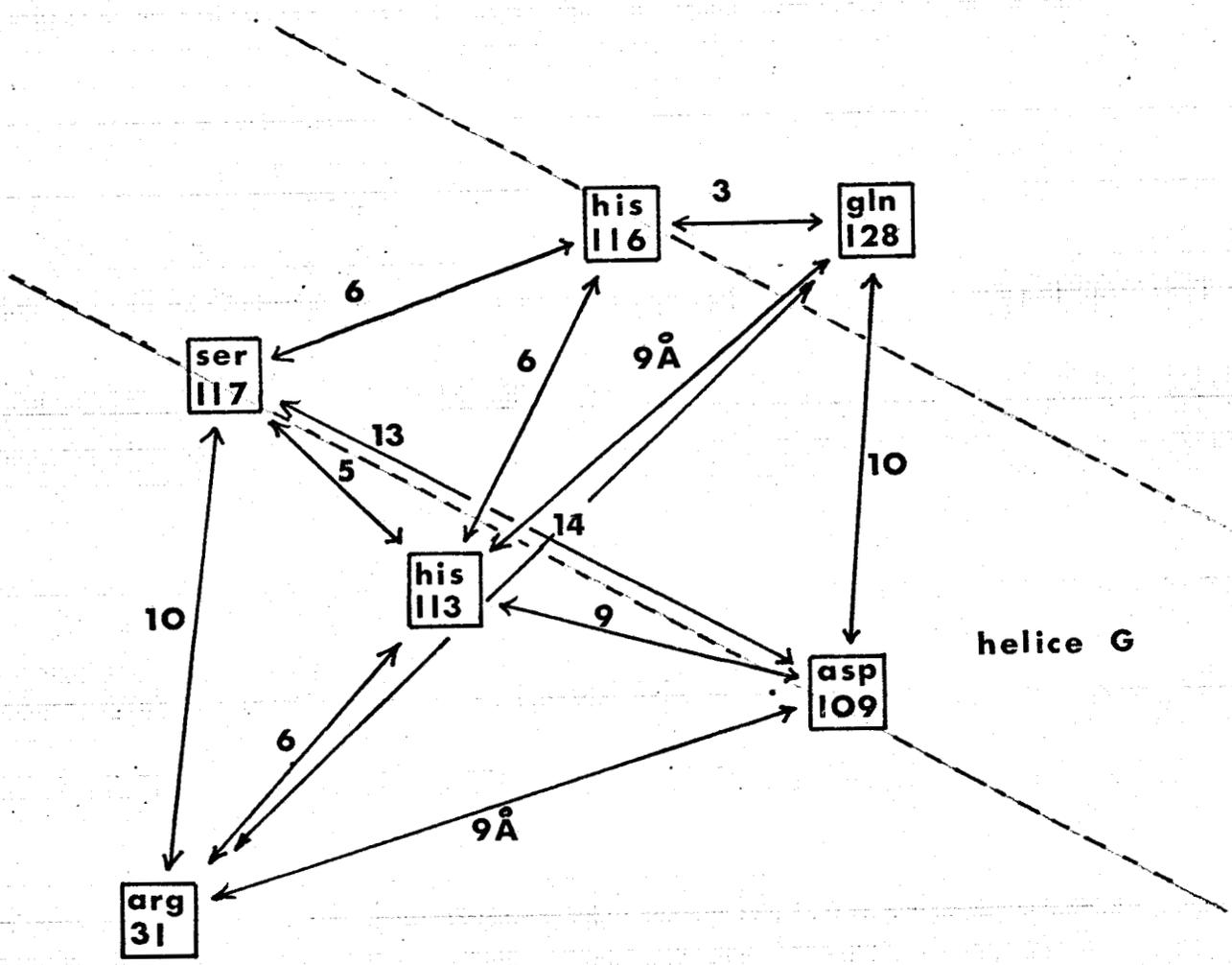
- Ser 117, Arg 31, Asp 109 et Gln 128, acides aminés qui sont tous hydrophiles (Figure 25) .

L'histidine 113 est donc à la fois accessible à l'iodoacétate et réactive en raison de son environnement.

Dans un deuxième temps, nous avons isolé la CM Mb de la myoglobine normale et des autres produits de carboxyméthylation. L'électrofocalisation s'est révélée une technique très intéressante pour séparer des protéines (Mb et CM Mb) différant seulement par un groupement carboxyméthyl. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide réalisée sur la CM myoglobine isolée par cette méthode a montré que le produit isolé est homogène, mais qu'il se dissocie en hème et globine plus facilement que la Mb native ; il est vraisemblable que cette fragilité n'est pas due à la carboxyméthylation du résidu d'histidine 113 mais plutôt à une dénaturation partielle de la globine au cours de l'électrofocalisation, car la myoglobine séparée par cette méthode (pic I) présente également cette particularité.

Dans un troisième temps, nous avons étudié les propriétés physicochimiques et physiologiques de la carboxyméthylmyoglobine après son isolement par électrofocalisation. Les spectres d'absorption de la CMMb dans le visible et l'UV (280 nm) sont identiques à ceux de la myoglobine. La liaison hème-globine n'est donc pas modifiée car les bandes d'absorption entre 500 et 650 nm sont caractéristiques de la liaison du fer avec le ligand et avec la globine et ces bandes d'absorption sont rigoureusement comparables ; la modification d'un résidu d'histidine à la périphérie de la molécule ne retentit donc pas sur le site de fixation de l'oxygène. Nous savons qu'il n'en est pas toujours de même car une alkylation plus poussée va perturber considérablement le spectre d'absorption : on constate ainsi que la carboxyméthylation à pH 7, selon BANASZAK et GURD (65) qui se traduit par la disparition de 6 résidus d'histidine conduit à un dérivé qui fixe très peu l'oxygène (25 p. 100 de dérivé oxygéné à $pO_2 = 150$ mmHg au lieu de 0,3 mmHg pour la myoglobine native).

Ile	Ser	Asp	Ala	Ile	Ile	His	Val	Leu	His	Ser
107			110			113			116	
G 8			G11			G14			G17	



Environnement de l'Histidine 113

FIGURE 25



La réduction de la CM Met Mb par différents systèmes réducteurs est analogue à celle de la Mb. De même, nous n'avons pas décelé une affinité différente de la CM Mb pour l'oxygène, la P 1/2 étant identique ainsi que la courbe de pression partielle d'oxygène en fonction de la saturation en oxymyoglobine.

Les propriétés physiologiques de la CM Mb ne sont donc pas altérées après une alkylation douce et cela peut nous amener à la conclusion qu'il est possible de modifier l'histidine 113 à l'extérieur de la molécule sans aucune perturbation et que la technique d'alkylation par elle-même ne provoque pas de changement dans les propriétés optiques et dans la capacité de fixation d'oxygène. Ce résidu d'histidine 113 n'est d'ailleurs pas nécessaire à l'activité physiologique de la myoglobine et il est remplacé par un résidu de glutamine chez l'Homme et certains primates comme le Gibbon, le Babouin et le Macaque.

(Références des séquences p. 83).

BIBLIOGRAPHIE

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

ANTONINI E., WYMAN J., ROSSI-FANELLI A. et CAPUTO A.

J. Biol. Chem., 1962, 237, 2773

Relation between molecular and functional properties of hemoglobin (49)

ANTONINI E., BRUNORI M. - 1971

North Holland Research Monographs. Frontiers of Biology, Volume 21

"Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands, p. 17 (65)

ATASSI M.Z. et SAPLIN J.B.

Biochem. J., 1966, 98, 82

Myoglobin from the finback whale : preparation physicochemistry and immunochemistry (21)

AZAKURA TOSHIO., YUMIKO KAWAI et HARUNISA YOSHIKAWA

Anal. Biochem., 1964, 7, 393

Use of sodium borohydride in determination of oxygen. Dissociation curves of hemoglobin (36)(38).

BAGLIONI C.

Biochim. Biophys. Acta, 1961, 48, 392

An improved method for the finger printing of human hemoglobin (57)

BALDRIDGE R.C. et LEWIS H.B.

J. Biol. Chem., 1953, 202, 169.

Diet and the ergothione content of blood (58)

BANASZAK L.J., ANDREWS P.A., BURGNER J.W., EYLAR E.H. et GURD F.R.W.

J. Biol. Chem., 1963, 238, 3307-3314

Carboxymethylation of sperm Whale myoglobin (3) (6)

BANASZAK L.J. et GURD F.

J. Biol. Chem., 1964, 239, 1836-1838

Carboxymethylation of sperm Whale metmyoglobin. Reactivity of the adjacent histidine residues (21).

BERNARD S., HAVEZ R., DAUTREVAUX M. et BISERTE G.

Bull. Soc. Chim. Biol., 1961, 43, 1281-1288

Etudes sur la myoglobine. Propriétés comparées des myoglobines de Cheval, de Boeuf, de Mouton et de Porc (51)

BISERTE G. et HOLLEMAN J.W.

Biochim. Biophys. Acta, 1959, 33, 143

Données nouvelles sur la structure de la myoglobine de Cheval (53)

BISERTE G., PLAQUET-SCHOONAERT, BOULANGER P. et PAYSANT P.

J. Chromato., 1960, 3, 25

Description d'un couplage de méthodes chromatographiques et électrophorétiques (55).

BRAY A.

Anal. Biochem., 1960, 1, 279.

A simple efficient liquid scintillation for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter (54)

CAANN J.R.

Biochemistry, 1965, 4, 2368

Contribution of aromatic residue interactions to the stability of myoglobin (19).

CRESTFIELD M., STEIN H. et MOORE S.

J. Biol. Chem., 1963, 238, 2413

Alkylation and identification of the histidine residues at the active site of ribonuclease (62).

DALZIEL K. et O'BRIEN J.P.

Biochem. J., 1957, 67, 119

Side reactions in the deoxygenation of dilute oxyhaemoglobin solutions by sodium dithionite (37).

DAUTREVAUX M., HAN K., BOULANGER Y. et BISERTE G.

Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, 2178-2182

Alkylation des radicaux d'histidine du centre actif de la myoglobine de Cheval (1)(63).

DAUTREVAUX M., BOULANGER Y., HAN K. et BISERTE G.

Europ. J. Biochem., 1969, 11, 267

Structure covalente de la myoglobine de Cheval (7).

FISHER H. et ORTH H.

Die chemie des Pyrrols - Akadem. Verlagsges., LEIPZIG, Germany, 1937 (8).

GRAY W.R. et HARTLEY B.J.

Biochem. J., 1963, 89, 59p et 379

- A fluorescent end-group reagent for proteins and peptides
- The structure of a chymotrypsic peptide from pseudomonas cytochrome c-551 (55)

GROS G. et LABOUESSE B.

Europ. J. Biochem., 1969, 7, 463

Study of the dansylation reactions of amino-acids, peptides and proteins (56).

GUNDLACH N., STEIN W.H. et MOORE S.

J. Biol. Chem., 1959, 234, 1754

Amino-acid residues involved in the inactivation of ribonuclease by iodoacetate (2)(50)(52)(65)

HARRIS C.M. et HILL L.

J. Biol. Chem., 1969, 244, 2195-2203

The carboxymethylation of human metmyoglobin (24)

HARTLEY B.J.

Biochem. J., 1970, 119, 805

Strategy and tactics in protein chemistry (61)

HAUROWITZ F.

Z. Physiol. Chem., 1935, 232, 125-145

Blood pigment methemoglobin and his compounds with H_2O_2 , with cyanides fluorides and sulfides. (32)

HILL R.

Proc. Roy. Sc., 1936, B120, 472

Oxygen dissociation curves of muscle hemoglobin (42)

HARKER D., KARTHA G. et BELLO J.

Nature, 1967, 213, 862

Tertiary structure of ribonuclease (5).

KAJITA A., NOGUCHI K. et RYOTI SHUKUYA

Biochem. Biophys. Res. Commun., 1970, 39, 1199

A simple non enzymatic method to regenerate oxyhemoglobin from methemoglobin (39)

KENDREW J.C., DICKERSON R.E., STRANBERG B.E., HART R.G., DAVIES D.R.,
Phillips d.c; et SHORE V.C.

Nature, 1958, 181, 662

A three dimensional model of the myoglobin molecule obtained by X-ray analysis (9).

KENDREW J.C., DICKERSON R.E., STRANBERG B.E., HART R.G., DAVIES D.R.,
PHILLIPS D.C. et SHORE V.C. (10)(34)

Nature, 1960, 185, 422

Structure of myoglobin. A three dimensional fourier synthetis at 2 Å resolution (10) (34)(64)

MOORE S.

Bull. Soc. Chim. Biol., 1964, 46, 1739

La structure et l'activité de la ribonucléase pancréatique (4).

NOBBS C.L., WATSON N.C. et KENDREW J.C.

Nature, 1966, 209, 339

Structure of deoxymyoglobin crystallographic study (11).

OORD A.H.A. VAN DEN,

Protids of the Biological Fluids, 17th Colloquium 1969, édité by Peeters H., p. 227. (28)

ORNSTEIN L.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 1964, 121, 321

Disc electrophoresis. Background and theory (64)

PAULING L. et CORYELL C.D.

Proc. Natl. Acad. Sci., 1936, 22, 210

Magnetic propriétés and structure of hemoglobin, oxyhemoglobin and carbonmonoxyhemoglobin (13).

PAULING L.

in "Haemoglobin" edited by ROUGHTON F.J.W. et KENDREW J.C.
Butterworth London, 1949, p. 57 (15)

PAULING L. et HAYWARD R., The architecture of molecules, 1964, WH FREEMAN:
Editeur - San Francisco (12)(17).

PERUTZ M.F.

J. Mol. Biol., 1965, 13, 656

A tentative atomic model of horse oxyhaemoglobin (16)(20)

PERUTZ M.F.

Nature, 1970, 228, 726-739

Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin (18)

PERUTZ M.F.

Nature, 1970, 228, 726

Stereochemistry of cooperative effects in haemoglobin (17)

RAY D.K. et GURD F.

J. Biol. Chem., 1967, 242, 2062-2068

Some interrelations between carboxymethylation and heme reactions in
sperm Whale myoglobin (21)

ROSSI-FANELLI A. et ANTONINI E.

Arch. Biochem. Biophys., 1956, 65, 587

Heterogeneity of human myoglobin (38)

ROSSI-FANELLI A., ANTONINI E., et MONDOVI B.

Arch. Biochem. Biophys., 1957, 68, 341-354

Enzymatic reduction of ferrimyoglobin (35)

ROSSI-FANELLI A. et ANTONINI E.

Arch. Biochem. Biophys., 1958, 77, 478-492

Studies on the oxygen and carbon monoxide equilibria of human Mb
(41)(43)(44)

ROSSI-FANELLI A., ANTONINI E., DE MARCO C. et BENERECETTI S.

Ciba Found. Symp. Biochem. Human Genet., 1959, p. 144 (45)

ROSSI-FANELLI A. et ANTONINI E.

Nature, 1960, 186, 895

Oxygen equilibrium of myoglobin from thunnus Thynnus (46)

STRICKLAND E.H., ACKERMAN E. et ANTHONY A.

Am. J. Physiol., 1959, 197, 211 (48)

Effects of altitude acclimatization on the equil. Const. of rat oxymyoglobin (48)

STROTHER G.K., ACKERMAN E. et ANTHONY A.

Am. J. Physiol., 1959, 196, 517

Effects on altitude acclimatization on rat myoglobin (47)

STRYER L., KENDREW J.C. et WATSON H.C.

J. Mol. Biol., 1964, 8, 96-104

The mode of Attachment of the azide ion to sperm Whale metmyoglobin (35)

THEORELL H.

Biochem. Z., 1934, 268, 46

Light absorption of oxy-carboxy meta and reduced myoglobin. O binding curve of myoglobin (42)

THEORELL H.

Adv. In Protein Chemistry, 1947, 7, 265-303

Heme-linked groups and mode of action of some hemoproteins (33)

THEORELL H. et EHRENBERG A.

Acta Chem. Scand., 1951, 5, 823

Spectrophotometric, magnetic and titrimetric studies on the heme-linked groups in myoglobin (30)(33)

THEORELL H.

Inst. Intern. Chim. Conseil Chim 9th Conseil, Brussels, 1953, 301-41

Some relations between prosthetic groups and proteins (14)

THEORELL H. et AKESON A.

Ann. Acad. Sci. Fennicae, 1955, 60, 303-312.

Reversible splitting of a homogenous horse myoglobin (31).

TONY E. HUGLI and FRANK R.N. GURD

J. Biol. Chem., 1970, 245, 1930

Carboxyméthylation of sperm Whale myoglobin with crystalline state (25)

TONY E. HUGLI and FRANK R.N. GURD

J. Biol. Chem., 1970, 245, 1959

Carboxyméthylation of sperm whale myoglobin in the dissolved state (26)

WALEY S.G. et WATSON J.

Biochem. J., 1953, 55, 328

The action of trypsin on polylysine (56)

WANG J.H.

in "Oxygenases" O. HAYASHI, editor Acad. Press, N.Y., 1962, p. 484 (29)

WYMAN J.

J. Biol. Chem., 1939, 127, 1

Analysis of the titration data of oxyhemoglobin of the horse by a thermal method (6)

WYMAN J.

J. Biol. Chem., 1939, 127, 581

The heat of oxygenation of hemoglobin (7)

SEQUENCES DES MYOGLOBINES

PRIMATES

HOMME

HERRERA A.E.R. et LEHMANN H.

Nature (New Biology), 1971, 232, 149.

GIBBON HERRERA A.E.R. et LEHMANN H.

Biochim. Biophys. Acta, 1971, 251, 482.

CHIMPANZE

HERRERA A.E.R. et LEHMANN H.

Biochim. Biophys. Acta, 1972, 278, 62-67.

BABOUIN

MACAQUE

HERRERA A.E.R. et LEHMANN H.
Biochim. Biophys. Acta, 1972, 278, 465-481.

PINNIPEDES

PHOQUE

BRADSHAW R.A. et GURD F.R.N.
J. Biol. Chem., 1969, 244, 2167

CETACES

CACHALOT

EDMUNDSON A.B. et HIRS C.H.W.
Nature, 1961, 190, 663.

DAUPHIN

KARADSOVA M., EDKOV P., BAKARDJIEVA A. et GENOV M.
Biochim. Biophys. Acta, 1970, 221, 136.

MARSOUIN

BRADSHAW R.A. et GURD F.R.N.
J. Biol. Chem., 1969, 244, 2167.

ONGULES

CHEVAL

DAUTREVAUX M., HAN K., BOULANGER Y. et BISERTE G.
Bull. Soc. Chim. Biol., 1962, 44, 965.

BOEUF

HAN K., DAUTREVAUX M., CHAILA X. et BISERTE G.
Europ. J. Biochem., 1970, 16, 465.

MOUTON

HAN K., TETAERT D., DAUTREVAUX M., MOSCHETTO Y. et BISERTE G.
Febs Letters, 1971, 15, 116.

MARSUPIAUX

KANGOUROU

AIR G.M. et THOMPSON E.O.P.
Aust. J. Biol. Sci., 1971, 24, 75.

OISEAUX

POULET

DECONNINCK M.
Thèse Université Libre de Bruxelles - Faculté des Sciences
(1973).

MANCHOT

PEIFFER S.
Thèse Université Libre de Bruxelles - Faculté des Sciences
(1973).

