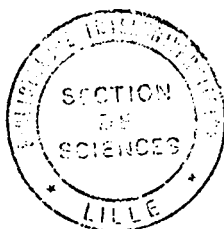


N° 382

50376  
1973  
249



50376  
1973  
249

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

MEMOIRE PRESENTE

A L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

pour obtenir

LE TITRE DE DOCTEUR DE 3<sup>e</sup> CYCLE EN BIOCHIMIE

par

**Daniel TETAERT**

LA STRUCTURE PRIMAIRE  
DE LA MYOGLOBINE DE MOUTON

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

Soutenu le 14 Juin 1973

Ce travail s'inscrit dans le cadre général de  
"LA DETERMINATION DE LA STRUCTURE COVALENTE DES MYOGLOBINES DE  
MAMMIFERES".

Il a fait l'objet des publications suivantes :

- en collaboration avec

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

"The partial amino-acid of Sheep Heart myoglobin"  
Z. Physiol. Chemie (1971) 352, 15

"The partial amino-acid of Sheep Heart myoglobin"  
Febs Letters (1971) 15, 116.

- en collaboration avec

HAN K., MOSCHETTO Y., DAUTREVAUX M. et KOPEYAN C.

"The covalent structure of Sheep Heart myoglobin"  
Europ. J. Biochem. (1972) 27, 585.

- en collaboration avec

HAN K., DAUTREVAUX M. et DUCASTAING S., HOMBRADOS I. et NEUZIL E.

"The N-terminal and C-terminal amino-acid sequence of Badger myoglobin"  
Febs Letters (1973) 29, 38.

"The covalent structure of Badger myoglobin"  
Europ. J. Biochem (1973) soumis au Comité de Lecture.

## TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION	I
<u>CHAPITRE I</u>	
GENERALITES	
I) PRESENTATION DE LA MOLECULE DE MYOGLOBINE	3
A) STRUCTURE PRIMAIRE	
1°) Composition en acides aminés	
2°) Séquence en acides aminés	
B) STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE	6
II) PREPARATION DE LA MYOGLOBINE	6
A) LES SOURCES	
B) METHODES d'ISOLEMENT	
C) CRITERES DE PURETE	7
 <u>CHAPITRE II</u>	
ETUDE COMPARATIVE DES HYDROLYSATS TRYPSIQUES DES MYOGLOBINES DE BOEUF ET DE MOUTON	8
I) SPECIFICITE DE LA TRYPSINE	9
II) CONDITIONS OPERATOIRES	10
III) REALISATION DU FRACTIONNEMENT PAR ELECTRO- CHROMATOGRAPHIE SUR PAPIER	12
A) L'ELECTROCHROMATOGRAPHIE	
B) IDENTIFICATION DES TACHES PEPTIDIQUES	
C) RESULTATS ET ETUDE DE LA CARTE PEPTIDIQUE	
D) DISCUSSION	
IV) REALISATION DU FRACTIONNEMENT PAR CHROMATO- GRAPHIE SUR COLONNE DE RESINE d'ECHANGE d'IONS	14
A) LE FRACTIONNEMENT	
1°) La chromatographie	
2°) Etablissement de la courbe d'élution	
B) RESULTATS ET ETUDE DES PEPTIDES TRYPSIQUES	
C) DISCUSSION	

### CHAPITRE III

ETUDE COMPARATIVE DES PEPTIDES OBTENUS APRES HYDROLYSE PAR LE BROMURE DE CYANOGENE DES MYOGLOBINES DE BOEUF ET DE MOUTON	18
I) ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE	
A) LE "CORE"	
B) MECANISME D'ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE	
C) CONDITIONS OPERATOIRES	
II) ETUDE DES FRACTIONNEMENTS SUR SEPHADEX G75	20
A) LE FRACTIONNEMENT PAR GEL-FILTRATION	
B) ETUDES DES HYDROLYSATS OBTENUS APRES ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE DES MYOGLOBINES DE BOEUF ET DE MOUTON	
III) ETUDE DES PEPTIDES MEDIAN-2 et C-TERMINAL	23
IV) ETUDE DU PEPTIDE N-TERMINAL	24
A) COMPARAISON DES COURBES D'ELUTION DES HYDROLYSATS TRYPSIQUES DES PEPTIDES N-TERMINAUX DE BOEUF ET DE MOUTON	
B) ETUDE DES PEPTIDES "EHRlich POSITIF"	
V) ETUDE DU PEPTIDE MEDIAN-1	25
A) SPECIFICITE DE LA CHYMOTRYPSINE	
B) COMPARAISON DES HYDROLYSATS CHYMOTRYP- SIQUES DES PEPTIDES MEDIANS DES MYOGLOBINES DE BOEUF ET DE MOUTON	
1°) Etude de la carte peptidique	
2°) Etude du fractionnement sur colonne de résine d'échange d'ions	
VI) DISCUSSION ET CONCLUSION	26

### CHAPITRE IV

ETUDE DIRECTE DES PEPTIDES ISOLES	
I) COMPOSITION EN ACIDES AMINES	28
A) Hydrolyse acide totale	
B) Hydrolyse totale enzymatique	
II) ETUDE DES ACIDES AMINES N-TERMINAUX	28
III) ETUDE DES ACIDES AMINES C-TERMINAUX	29

IV) METHODE DE DEGRADATION RECURRENTE D'EDMAN	29
A) MECANISME DE LA REACTION	29
1°) la première étape : la réaction de couplage	
2°) la seconde étape : la réaction de clivage	
3°) la troisième étape : la réaction de conversion	
B) CHOIX DES CONDITIONS OPERATOIRES	31
1°) Choix du tampon de couplage	
2°) Choix de l'acide qui effectuera la réaction de clivage et de cyclisation	
3°) Extraction de la thiazolinone	
C) LES METHODES INDIRECTES	32
1°) La méthode soustractive	
2°) La méthode de dégradation Dansyl-PTH	
* Principe	
* Protocole experimental	
D) LES METHODES DIRECTES	34
a) Les méthodes PTH-PTH manuelles	
* Principe	
* Protocoles expérimentaux	
* Identification des PTH	
b) La méthode PTH-PTH automatique	
* Fonctionnement de l'appareil	
* Préparation de l'échantillon	
* Résultats	
E) CONCLUSION ET DISCUSSION	39
 <u>CHAPITRE V</u>	
RESULTATS	42
 <u>CONCLUSION</u>	
I) STRUCTURE PRIMAIRE DE LA MYOGLOBINE DE MOUTON	
II) COMPARAISON AVEC LES AUTRES MYOGLOBINES	56
A) Relation structure et fonction	
B) Relation phylogénétique entre les myoglobines	59
III) CONCLUSION GENERALE	66
 APPENDICE TECHNIQUE	
BIBLIOGRAPHIE	

ABREVIATIONS UTILISEES DANS LE TEXTE

---

LYS	: Lysine	PTH	: Phénylthiohydantoïnes dérivés d'acides aminés
ARG	: Arginine	PTC-peptide	: Phénylthiocarbamyl- peptide
HIS	: Histidine	P.I.T.C.	: Phényl Isothiocyanate
ASP	: Acide aspartique	DNS	: Dansylacide aminé
GLU	: Acide glutamique	DNP	: Dinitrophénylacide aminé
ASN	: Asparagine	Mb	: Myoglobine
GLN	: Glutamine	Hb	: Hémoglobine
THR	: Thréonine		
SER	: Sérine		
1/2CYS	: Cystéine		
SCMCYS	: S.carboxyméthylcystéine		
CYa	: Acide Cystéique		
PRO	: Proline		
GLY	: Glycocolle		
ALA	: Alanine		
VAL	: Valine		
ILE	: Isoleucine		
LEU	: Leucine		
TYR	: Tyrosine		
PHE	: Phénylalanine		
MeS	: Methionine-Sulfone		

## INTRODUCTION

Au matériel distribué de façon universelle à toute matière vivante, en 1838 Gérald MULDER a donné le nom de protéine du grec πρωτεϊος qui signifie : prééminent, le plus important. Et, de tous les constituants de la matière vivante, les protéines sont sans aucun doute les composés les plus importants : la structure et les fonctions mêmes des êtres vivants en dépendent.

A la structure et aux fonctions des êtres vivants correspondent deux classes principales de protéines : les protéines fibreuses et les protéines globulaires.

Les protéines fibreuses telles que le collagène, la myosine, etc.. sont les éléments plastiques, véritables pierres de construction des êtres vivants. Ces protéines possèdent des poids moléculaires très élevés et mal définis.

Les protéines globulaires en sont les éléments fonctionnels. Leur chaîne peptidique constitue la trame des pigments, enzymes, hormones, anticorps, le support des substrats oxydables, des transporteurs d'hydrogène, d'oxygène ou d'ions sélectivement chargés. Ces protéines bien que souvent labiles et facilement dénaturées (par certains agents chimiques, par certains pH ou par des températures élevées) possèdent néanmoins des poids moléculaires peu élevés et bien définis.

Mais qu'il s'agisse de protéines fibreuses ou globulaires, tous les travaux réalisés sur la structure des protéines permettent de considérer qu'une molécule protéique est formée d'une ou de plusieurs chaînes polypeptidiques, résultant de l'enchaînement d'une vingtaine d'acides aminés différents. Cet enchaînement peptidique est obtenu par perte d'une molécule d'eau lors de la condensation des fonctions  $\alpha$ -aminées et des fonctions  $\alpha$ -carboxyliques des acides aminés, de la série L dans le règne animal et dans le règne végétal. Chez les microorganismes, des séquences contenant des résidus de la série D ont cependant été décelées, ainsi l'acide poly D-glutamique chez *Vibrio cholerae*.

Lorsque la Biochimie s'est attachée à l'étude des enchaînements en acides aminés des protéines, le problème essentiel était de pouvoir isoler à l'état pur, une protéine ayant un rôle important dans le



processus métabolique et possédant un poids moléculaire peu élevé. C'est pourquoi, les premières séquences en acides aminés qui ont été déterminées furent celles de protéines globulaires telles que l'Insuline en 1954 (SANGER - 1); la Ribonucléase en 1963 (SMYTH, MOORE et STEIN - 2).

Quant aux pigments respiratoires, ils furent parmi les premiers constituants des êtres vivants à être étudiés par les biologistes désireux de pénétrer le mécanisme du transport de l'oxygène dans l'organisme. Et, pendant que les recherches physiologiques permettaient d'acquérir des connaissances étendues sur les fonctions et les propriétés des composés assurant le transport de l'oxygène, la détermination de la structure primaire de l'hémoglobine et de la myoglobine; l'étude de leur structure tridimensionnelle, ont permis de donner une explication biochimique au problème du transport de l'oxygène.

Au laboratoire, les travaux effectués sur la structure primaire des protéines globulaires ont été consacrés jusqu'à présent à un pigment respiratoire simple, la myoglobine dont l'étude a été réalisée chez différentes espèces de mammifères (Cheval, Boeuf, Chien, Porc, Blaireau et Mouton).

Nous avons en particulier entrepris l'étude de la structure covalente de la myoglobine de Mouton, non pas pour l'intérêt physico-chimique ou "enzymologique" que suscite l'étude de la myoglobine en général, mais surtout en raison de son intérêt sur le plan de l'évolution des espèces; la connaissance de la myoglobine de Mouton et la comparaison de sa structure avec la séquence en acides aminés de myoglobines d'espèces animales différentes nous permettra d'envisager la construction d'un arbre phylogénétique, fondé non plus sur les caractères morphologiques des espèces, mais sur la structure de composés protéiques qui sont le reflet fidèle d'une partie du génome, siège de cette évolution.

GENERALITES

## I - PRESENTATION DE LA MOLECULE DE MYOGLOBINE

De toutes les molécules protéiques, la myoglobine est certainement la molécule la mieux connue. Dès 1932, les travaux de ROSSI-FANELLI (3) ont permis de considérer la myoglobine et l'hémoglobine comme étant des molécules totalement différentes à la fois du fait de leur constitution chimique et de leur localisation anatomique : la myoglobine est une molécule possédant une chaîne peptidique unique de poids moléculaire de 17.000 environ se trouvant dans le tissu musculaire tandis que l'hémoglobine est une protéine possédant quatre chaînes peptidiques de poids moléculaire de 68.000, localisée dans les érythrocytes.

Vers 1960, la connaissance des compositions en acides aminés et des résidus N et C-terminaux de la myoglobine de plusieurs espèces animales différentes, mais surtout la détermination de la première séquence en acides aminés de cette protéine (myoglobine de Cachalot : EDMUNDSON - 4) ont permis de préciser la nature de sa structure primaire. Parallèlement à ces travaux, l'étude des diagrammes de diffraction de rayons X au pouvoir de résolution de 1,4 Å de KENDREW et al. (5) ont permis d'établir la structure tridimensionnelle de la molécule.

### A) Structure primaire

La myoglobine se classe parmi les chromoprotéides à groupement prosthétique ferro-porphyrinique ; ce groupement ferro-porphyrinique ou hème est identique à celui de l'hémoglobine : il s'agit de la ferroprotoporphyrine IX appartenant à la série de l'étioporphyrine de type III. La structure primaire de la myoglobine de nombreuses espèces animales a été étudiée : la globine est une chaîne peptidique unique de 153 résidus.

#### 1°) Composition en acides aminés

La composition en acides aminés de la myoglobine de nombreuses espèces animales a été déterminée : chez les mammifères, elle est caractérisée par des teneurs très élevées en acide glutamique, en leucine, en lysine ainsi qu'en acide aspartique, en histidine et en glycocolle tandis que les teneurs en arginine, en méthionine, en tyrosine et en tryptophane sont très faibles. Nous constatons égale-

ment l'absence de résidu de cystéine, à l'exception toutefois des myoglobines de certains primates (Tableau I).

La composition en acides aminés de la myoglobine de Mouton a été établie après hydrolyse acide d'une myoglobine, préalablement dénaturée par la méthode de BÍSERTE et HOLLEMAN (6) et dosage des acides aminés à l'aide d'un analyseur automatique (type JEOL 5 AH). Deux temps d'hydrolyse (24 et 72 heures) ont été utilisés afin d'effectuer les extrapolations nécessaires pour tenir compte de la destruction partielle de la sérine et de la thréonine et de la libération plus lente des résidus de valine et d'isoleucine. Le tryptophane a été dosé selon la méthode de SPIES et CHAMBERS (7).

L'examen du Tableau I montre que par rapport aux autres espèces et en particulier par rapport au Boeuf, il existe peu de différences : notons néanmoins que le taux d'alanine est plus faible (17 au lieu de 20) et qu'il existe un résidu supplémentaire de méthionine (3 résidus au lieu de 2).

## 2°) Séquence en acides aminés

Si la composition en acides aminés de la myoglobine de nombreuses espèces de mammifères, de mollusques, d'oiseaux etc... a été déterminée, peu de séquences en acides aminés sont actuellement connues. La structure de la myoglobine de Cétacés (Cachalot - 8, Dauphin - 9, Marsouin - 10) celles du Phoque (11), du Kangourou (12), de Primates (Homme - 13, Gibbon - 14, Chimpanzé (15), Macaque et Babouin (16) sont totalement déterminées ainsi que celles de quelques ongulés (Cheval (17) et Boeuf (18)). D'autres structures ne sont que partiellement connues (myoglobines de Chien - (19), Porc (20), Blaireau (21), Baleine (22), Poulet (23), Manchot (24).

## B) Structure tridimensionnelle

KENDREW et al. (25) ont établi sur un diagramme à trois dimensions les cartes de densités électroniques des 2500 atomes de la myoglobine de Cachalot. SCOULOUDI (26) a entrepris une étude analogue sur la myoglobine de Phoque, ce qui a permis de préciser la nature de l'archi-

	PRIMATES					PINNI- PED-ES	CETACES			MARSU- PIAUX	ONGULES			
	HOMME (HERRERA et LEHMAN-27)	GIBBON (HERRERA et LEHMAN-28-)	CHIMPANZE (HERRERA et LEHMAN-29-)	BABOUIN (HERRERA et LEHMAN-30-)	MACAQUE (HERRERA et LEHMAN-31-)	PHOQUE (BRADSHAW et al. -32-)	CACHALOT (EDMUNDSON et al.-33-)	MARSOUIN (BRADSHAW et al.-34-)	DAUPHIN (KARADZOVA et al.-35-)	KANGOUROU (AIR et THOMPSON-36)	CHEVAL (DAUTREVAUX et al.-37-)	BOEUF (HAN et al. -38-)	MOUTON (DAUTREVAUX et al.-39-) (HAN et al. -40-)	
ASP	8	8	8	8	8	9	6	6	9	9	7	7		7
ASN	3	3	3	3	3	2	2	4	1	3	3	5	12,4	5
THR	4	4	4	4	4	5	5	6	5	5	7	5	5,0	5
SER	7	8	7	8	8	7	6	5	5	6	5	6	5,7	6
GLU	13	13	13	13	13	14	14	14	12	13	13	14	18,1	14
GLN	8	8	7	8	8	3	5	4	5	7	6	3	4	4
PRO	5	5	5	5	5	4	4	4	4	3	4	3	2,9	3
GLY	15	14	15	14	14	12	11	14	11	14	15	12	13,4	14
ALA	12	12	12	13	12	14	17	15	18	14	15	20	15,1	17
1/2CYS	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
VAL	7	7	7	7	8	6	8	6	7	6	7	9	10,3	9
MET	3	3	3	3	3	2	2	2	2	3	2	2	2,9	3
ILE	8	8	8	8	8	8	9	8	9	9	9	6	5,3	6
LEU	17	17	17	18	18	19	18	19	18	16	17	16	16,9	17
TYR	2	2	2	2	2	2	3	2	2	1	2	2	2,3	2
PHE	7	7	7	6	6	7	6	7	7	9	7	7	7,8	7
LYS	20	20	20	20	20	19	19	20	20	21	19	19	15,0	18
HIS	9	9	10	9	9	13	12	12	13	10	11	13	10,1	12
ARG	2	2	2	2	2	5	4	3	3	2	2	2	2,9	2
TRP	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2,0	2
TOTAL	153	153	153	153	153	153	153	153	153	153	153	153		153

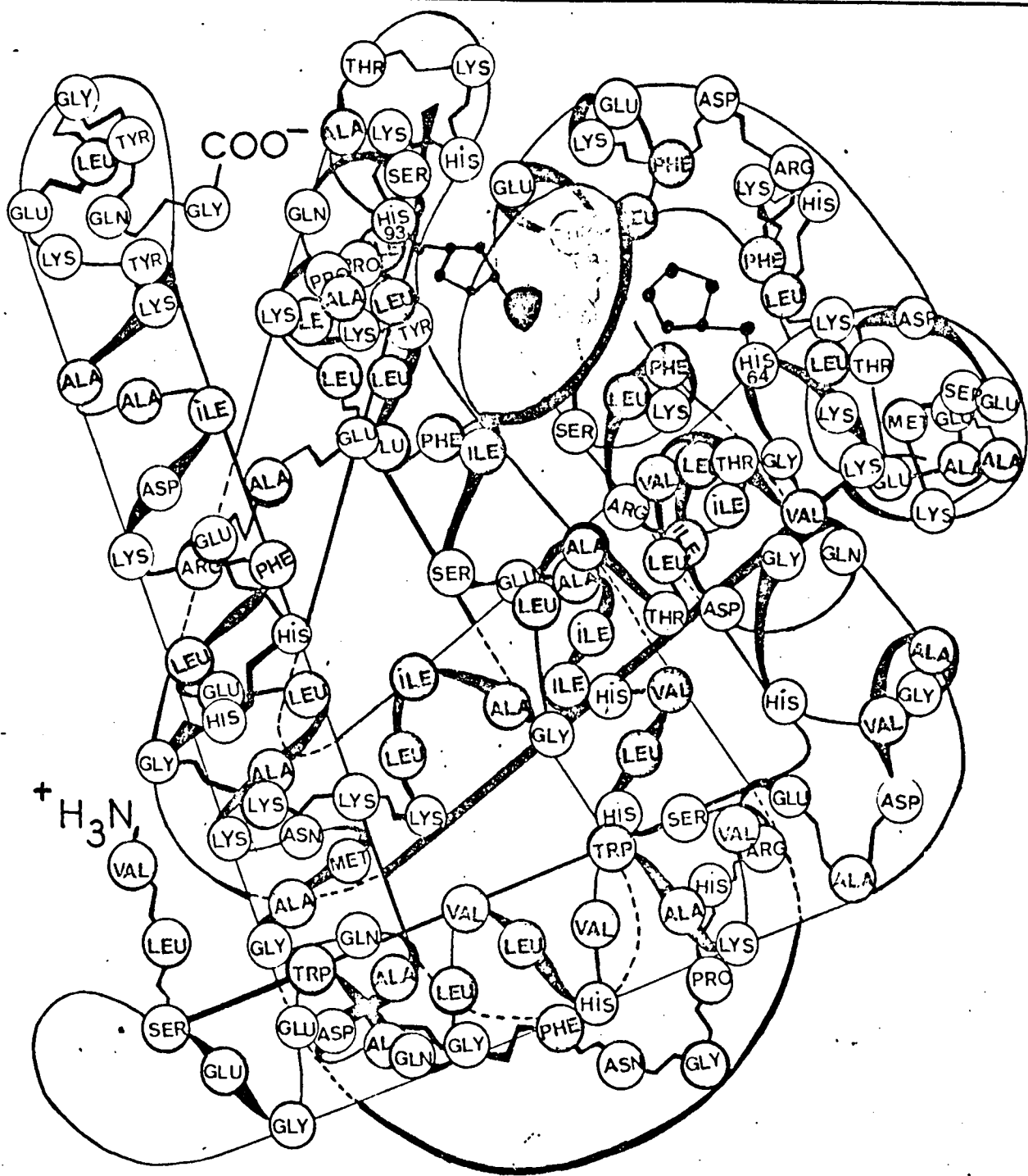
TABEAU I : COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE LA MYOGLOBINE DE QUELQUES MAMMIFERES (les compositions indiquées ont été déduites

tecture moléculaire de la myoglobine : la molécule de myoglobine se présente "grosso modo" comme une niche où se loge l'hème. Elle est formée de huit barreaux d'hélice  $\alpha$ -droite, unis entre eux par des coins et des segments en pelote statistique (random coil) et numérotés à partir de l'extrémité N-terminale par les lettres A à H. L'hème est le groupement actif de la molécule de myoglobine : c'est par son atome de fer qu'elle lie l'oxygène. Le rôle de la porphyrine et de la chaîne polypeptidique qui l'entoure est de protéger le fer ferreux contre l'oxydation et de lui donner l'aptitude à coordiner une molécule d'oxygène. (Figure 1)

Nous constatons qu'en surface se trouvent les résidus à chaînes latérales polaires (lysine, acide aspartique, sérine, etc...) assurant des liaisons internes. En profondeur, se trouvent en grande majorité les résidus non polaires disposés face à face à des distances de quelques angströms seulement. A ce niveau, s'exercent des forces de London, des forces de Van der Waals qui, avec le concours de forces électrostatiques et de liaisons hydrogène, assurent le maintien d'une crevasse, délimitée par les hélices C, E, F et les segments non hélicoïdaux CD, EF et FG dans laquelle se loge l'hème. L'ensemble forme alors un complexe non symétrique ayant la forme d'un prisme de base triangulaire dont les arêtes mesurent respectivement 45, 35 et 25 Å.

Cependant, c'est l'ensemble de la structure, d'aspect compact, qui assure la fonction de l'hème ; celui-ci n'agit que grâce à son environnement. En effet, la comparaison des différentes séquences en acides aminés des myoglobines actuellement connues, nous permet de noter l'existence d'un certain nombre de résidus dits "Invariants" qui oriente l'hème et le maintient à l'intérieur de la crevasse : le résidu PHE CD 1 (position 43) par l'intermédiaire de liaisons  $\pi$  ; les résidus à chaînes latérales importantes Val E 11 (68), Ala E 14 (71), Leu G 5 (104), Ile G 8 (107), Leu H 13 (137) par l'intermédiaire de liaisons Van der Waals avec les groupes vinyle de l'hème.

En plus de ces liaisons faibles, les études de KENDREW et al. (41) des diagrammes de diffractions aux rayons X ont permis de montrer que le fer impliqué dans l'hème possède la configuration  $d_2sp_3$  et qu'il est lié à la globine par ses 5ème et 6ème coordinances au résidu d'histidine

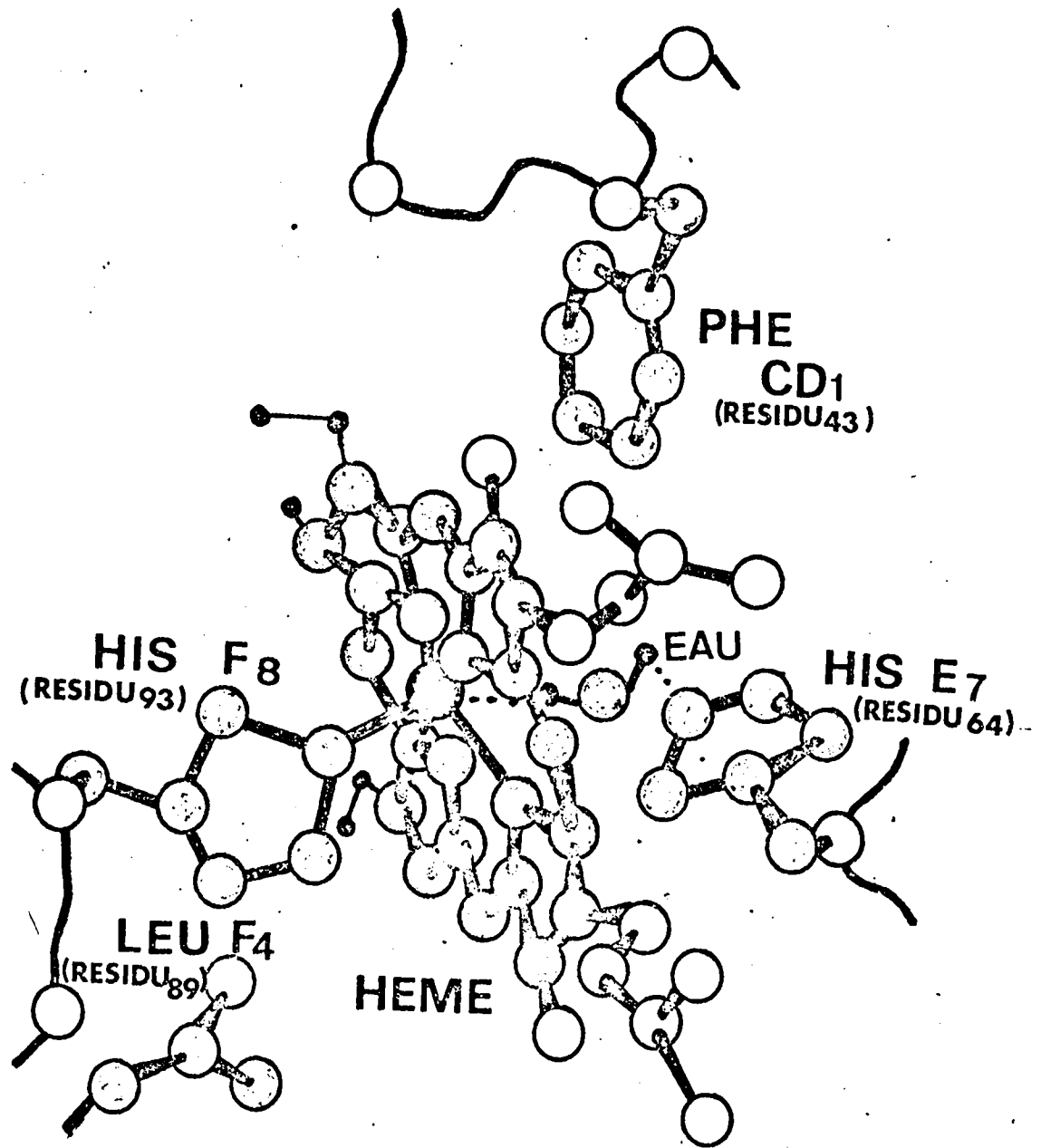


STRUCTURE TERTAIRE DE LA MYOGLOBINE DE CACHALOT

(d'après PERUTZ - 42)

(Les résidus apparaissant en gris, correspondent aux acides aminés à caractère hydrophobe)

FIGURE 1



ENVIRONNEMENT DE L'HEME DE LA MYOGLOBINE  
d'après DICKERSON et GEIS (48)

FIGURE 1 bis



F 8 (93) par une liaison covalente, et au résidu d'histidine E 7 (64) par liaison hydrogène lorsque le fer est sous la Fe 3+ et par liaison covalente lorsque le fer est sous la forme Fe 2+. Notons également qu'un résidu de leucine en F 4 (89) commun à toutes les myoglobines connues actuellement permet de maintenir le noyau imidazole de l'histidine F 8 perpendiculaire au noyau porphyrinique de l'hème (Figure 1 bis).

## II - PREPARATION DE LA MYOGLOBINE DE MOUTON

### A) Les sources

La concentration en myoglobine dans le muscle de l'Homme et des divers animaux est très variable. Elle est fonction de l'espèce et du type de muscle considéré, ou de l'activité physiologique de l'animal. KENDREW (43) a pu constater par exemple que la quantité de myoglobine est plus importante dans les muscles des mammifères marins (Cachalot, etc...) que dans les muscles des mammifères terrestres (Ongulés, etc...), que les muscles rouges sont plus riches que les muscles blancs. Pour un même animal, la concentration est plus élevée dans les muscles à contractions lentes et répétées (coeur des grands mammifères) (LAWRIE - 44).

Nous avons choisi d'isoler la myoglobine de Mouton à partir du muscle cardiaque.

### B) Méthodes d'isolement

Différentes méthodes ont été décrites pour isoler la myoglobine. THEORELL (45) préconise la méthode à l'acétate de plomb pour isoler la myoglobine de l'Homme. Cette méthode est très intéressante mais présente néanmoins un certain nombre d'inconvénients et en particulier, il est souvent nécessaire de procéder à une seconde purification par ultrafiltration ou par carboxyméthyl-cellulose.

HARDMAN (46) utilise la méthode de précipitation par l'éthanol en présence d'ions métalliques pour isoler la myoglobine de Cachalot, mais les fractions protéiques isolées se révèlent trop hétérogènes.

BOYER et al. (47) ont proposé l'ultrafiltration pour extraire la myoglobine humaine, mais cette technique ne permet d'isoler que de faibles quantités de myoglobine et demande ensuite de nombreuses opérations de purification.

Pour isoler la myoglobine de Mouton, nous avons repris la méthode du relargage par le sulfate d'ammonium, une méthode dérivée de celle décrite par BOARDMAN et ADAIR (49). Nous avons choisi une zone de relargage assez étroite (83 et 98 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium).

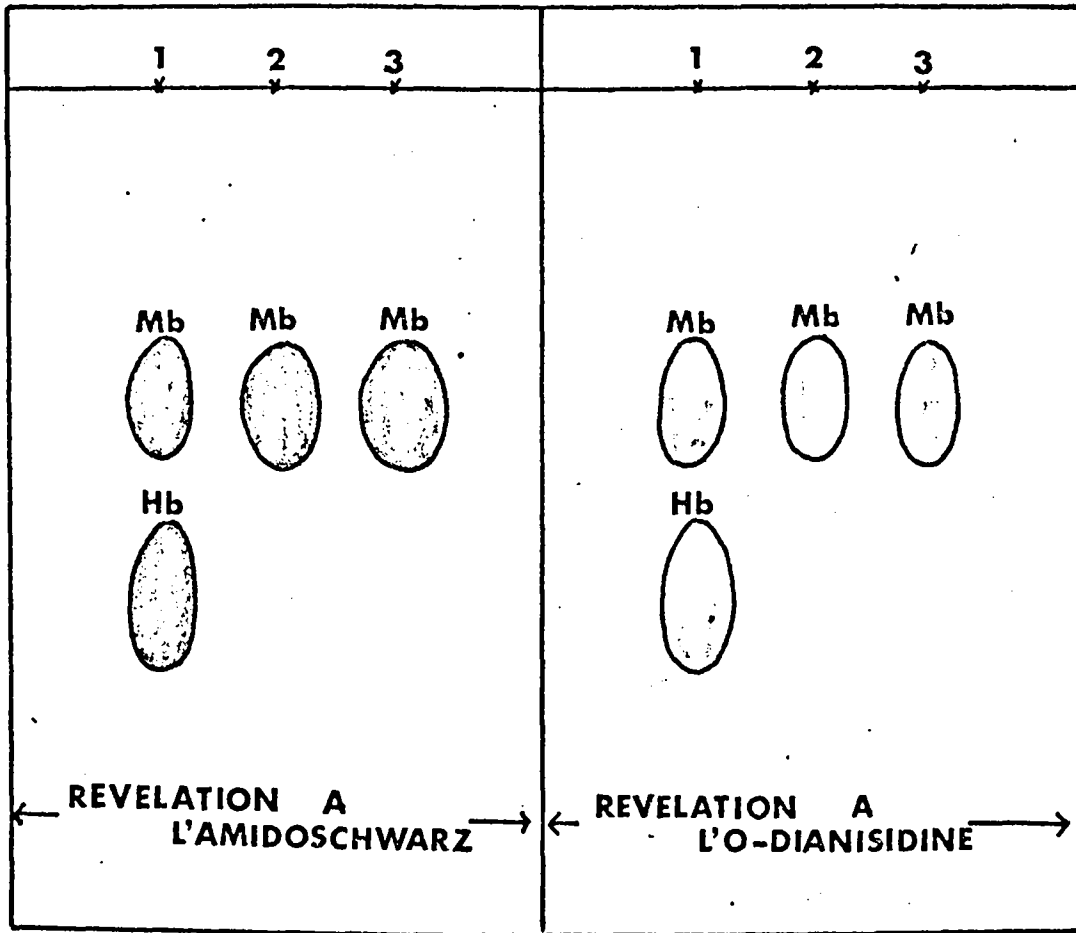
### C) Critères de pureté

Avant de commencer l'étude de la structure covalente de la myoglobine de Mouton, il est indispensable de vérifier l'homogénéité de la préparation. Le contaminant principal des préparations de myoglobine est l'hémoglobine. L'hémoglobine ne précipite en totalité à 83 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium que lorsque la proportion en hémoglobine dans le mélange de protéines est telle que le rapport des densités optiques à 409 et 278 nm est supérieur à 2. Cette vérification est d'ailleurs fréquemment réalisée au cours de la préparation et dans le cas d'une préparation pure ce rapport est de 5. Mais ce sont surtout des méthodes physico-chimiques telles que l'électrophorèse sur acétate de cellulose ou la chromatographie sur couche mince de Sephadex qui sont mises en oeuvre pour contrôler la pureté de la préparation.

D'autre part, la myoglobine possède une chaîne peptidique unique. Un contrôle de pureté peut donc être effectué en ne mettant en évidence qu'une seule extrémité N-terminale, soit par une réaction de dansylation ou par une réaction de dinitrophénylation. Nous avons pu ainsi identifier le résidu N-terminal de la myoglobine de Mouton comme étant le glycofolle, ce qui distingue nettement la myoglobine de son contaminant le plus fréquent : l'hémoglobine de Mouton possédant la valine et la méthionine en position N-terminale (BOYER et al.) (50) (Figure 2).

L'absence d'hémoglobine et d'autres composés protéiques dans nos préparations de myoglobine ayant été vérifiée, nous avons entrepris l'étude de la structure primaire de la myoglobine de Mouton.

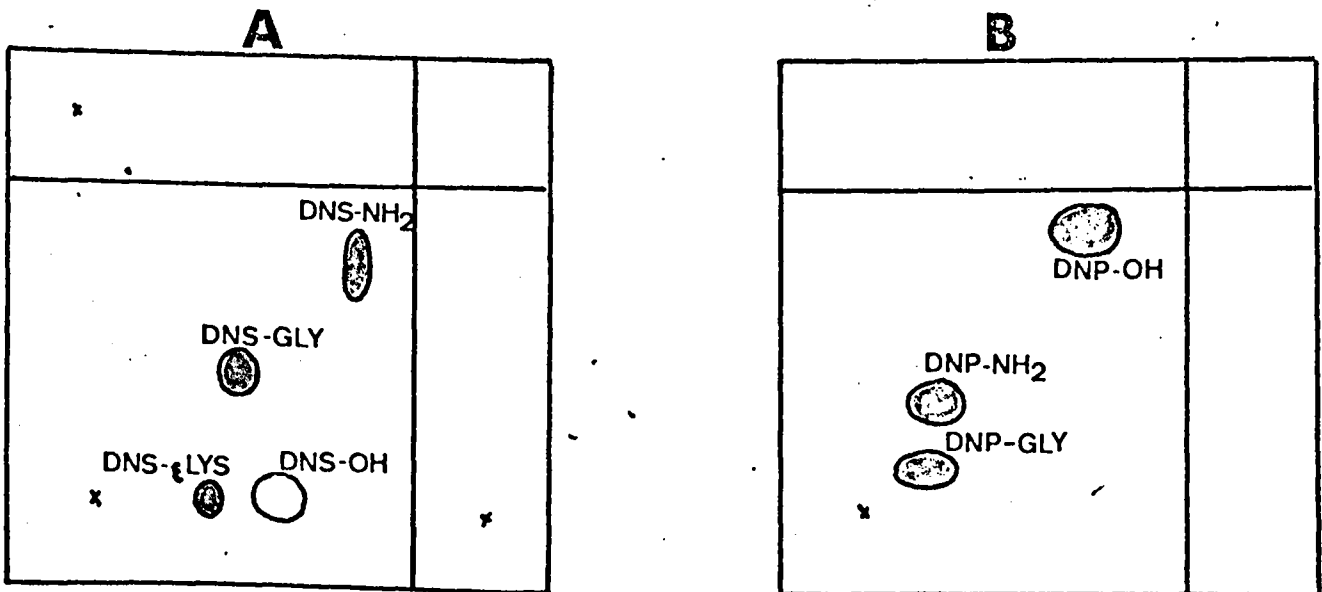
CRITERES DE PURETE



CHROMATOPLAQUE DE GEL DE FILTRATION SUR SEPHADEX G75

DES PREPARATIONS DE MYOGLOBINE DE MOUTON-3-

( 1: MELANGE D'HEMOGLOBINE ET DE MYOGLOBINE DE BOEUF; 2-MYOGLOBINE DE BOEUF )



MISE EN EVIDENCE D'UNE SEULE EXTREME N-TERMINALE  
DES PREPARATIONS DE LA GLOBINE DE MOUTON

A: APRES DANSYLATION (DNS-GLY)

B: APRES DINITROPHENYLATION (DNP-GLY)

FIGURE 2

ETUDE COMPARATIVE DES HYDROLYSATS  
TRYPSIQUES DES MYOGLOBINES DE BOEUF ET DE MOUTON

En vue de déterminer la structure covalente d'une myoglobine, deux stratégies classiques peuvent être utilisées : soit la combinaison des hydrolyses trypsiques et chymotrypsiques sur la globine carboxyméthylée, soit la combinaison de l'hydrolyse trypsique de la globine et de l'hydrolyse chymotrypsique et trypsique des fragments isolés après coupure par le bromure de cyanogène.

L'expérience des deux types de méthodes, que nous avons au laboratoire, nous a fait opter pour la seconde, en raison notamment de la complexité des hydrolysats chymotrypsiques de la globine carboxyméthylée ou non (40 à 90 peptides à isoler).

D'autre part, l'étude des myoglobines de Cheval et de Boeuf ayant été réalisée au laboratoire, il était tentant d'établir la séquence en acides aminés de la myoglobine de mouton en la comparant aux éléments homologues parfaitement connus des myoglobines de Cheval et de Boeuf.

La méthode comparative a d'ailleurs été préconisée par INGRAM (51) pour l'étude des hémoglobines humaines pathologiques. C'est une méthode simple qui consiste à comparer les propriétés physiques et chimiques, et notamment le comportement électrophorétique et chromatographique des peptides que libère la globine au cours de son hydrolyse par une enzyme très spécifique. Cependant, si INGRAM a pu facilement caractériser des hémoglobines anormales par cette méthode, c'est que les différences existant entre l'hémoglobine normale et l'hémoglobine pathologique sont minimes et se ramènent souvent à une simple substitution d'un seul acide aminé par un autre. Lorsque l'on veut comparer des myoglobines provenant d'une même espèce ou d'espèces différentes, le problème devient plus complexe, le nombre de substitutions étant plus important.

Dans le cas de la myoglobine de mouton, l'hypothèse initiale repose sur le fait que les myoglobines (myoglobines de Cheval et de Boeuf déjà connues et myoglobine de Mouton encore inconnue) présentent entre elles beaucoup plus d'analogies que de différences : nous avons ainsi choisi d'étudier des myoglobines d'espèces animales relativement voisines comme les Mammifères ongulés.

Ceci nous a amené à utiliser des méthodes identiques pour déterminer la structure covalente des myoglobines de Mouton et de Boeuf

(myoglobine de référence que nous avons choisie) : nous avons combiné l'hydrolyse partielle des globines par la trypsine à l'hydrolyse chymotrypsique des fragments isolés après coupure par le bromure de cyanogène.

#### ETUDE COMPARATIVE DES HYDROLYSATS TRYPSIQUES

Lorsque nous entreprenons une étude comparative, le problème de la reproductibilité est capital si nous voulons que la comparaison de deux hydrolysats soit rigoureuse. Il convient donc en premier lieu d'utiliser une enzyme très spécifique, d'en limiter s'il y a lieu les réactions secondaires, ensuite d'effectuer une hydrolyse des globines dans des conditions semblables et bien définies et enfin de localiser les peptides selon des protocoles de fractionnement et d'identification similaires. Les peptides différents pourront alors être étudiés et la structure primaire de la myoglobine inconnue déduite à la fois de la structure des peptides spécifiques et de la comparaison des peptides communs aux deux espèces.

##### I - Spécificité de la trypsine

Lorsque nous désirons déterminer la séquence en acides aminés d'une protéine, nous pensons en premier lieu à l'hydrolyser par la trypsine. L'utilisation de la trypsine est générale en chimie des protéines et s'explique surtout en raison de la spécificité très étroite de l'enzyme vis-à-vis des liaisons dans lesquelles sont impliqués les groupements carboxyliques de la lysine (LYS) et de l'arginine (ARG) : la trypsine est une endoprotéase et la coupure s'effectue uniquement au niveau des liaisons  $\text{--LYS} \downarrow \text{X}$  et  $\text{ARG} \downarrow \text{X}$  sauf si X est un résidu de proline.

Les préparations commerciales de trypsine sont cependant constamment souillées par la présence de chymotrypsine et de carboxypeptidases (la chymotrypsine et la trypsine étant toutes deux isolées à partir du pancréas), ce qui provoque de nombreuses coupures parasites, notamment au niveau des liaisons dans lesquelles la phénylalanine, la tyrosine, le tryptophane ou la leucine sont engagés par leur carboxyle. Afin de limiter au maximum les coupures résultant de l'activité chymotrypsique résiduelle, nous utilisons la trypsine préalablement traitée par le TPCK (N-tosyl Phénylalanine Chlorométhyl Cétone) selon la technique de WANG et CARPENTER (52) ou par le DCC (Chlorure de Diphényl Carbamyl) (ERLANGER et COHEN) (53). Le TPCK ou le DCC se fixent sur l'azote 3

du noyau imidazole de l'histidine qui appartient au site actif de la chymotrypsine et inhibent de façon irréversible l'action de cette enzyme. La trypsine ainsi traitée a une action remarquablement spécifique notons toutefois que la liaison - Leu  $\updownarrow$  X peut parfois être hydrolysée dans des cas particuliers très intéressants, que nous étudierons plus loin.

## II- Conditions opératoires

Le choix de l'enzyme et celui des conditions opératoires sont importants si nous voulons obtenir des résultats reproductibles. L'hydrolyse par la trypsine peut en effet être réalisée, soit sur la myoglobine (STOCKELL - 54) ou soit sur la globine (DAUTREVAUX, HAN, BOULANGER - 55) et BISERTE ou encore LEHMAN (56).

LEHMAN par exemple, préfère utiliser la globine obtenue par précipitation d'une solution à 5 p. 100 de myoglobine par 20 volumes d'acétone contenant 1,5 p. 100 d'HCl à 0°C. L'hydrolyse de la globine (à 10 mg/ml) est ensuite conduite à pH 8,4 en milieu salin volatil de sesquicarbonate d'ammonium avec un rapport de concentration Enzyme/substrat de 1/50e : l'hydrolyse est poursuivie 2 heures à 38°C. Un insoluble précipite par acidification à pH 6,5 et chauffage à 90°C pendant 5 minutes on l'élimine par centrifugation.

Nous utilisons d'ailleurs une technique voisine de celle de LEHMAN : une solution de globine dénaturée selon la méthode de BISERTE et HOLLEMAN (57) à 5 p. 100 (Poids/volume) dans un milieu tamponné de sesquicarbonate d'ammonium et d'ammoniaque de pH 8,75, un rapport Enzyme/substrat de 4 p. 100 et une durée d'hydrolyse de 2 heures à 38°C (SMITH et al. - 58). Nous avons adopté ces conditions opératoires pour de nombreuses raisons : premièrement, il nous semble préférable d'effectuer l'hydrolyse sur la globine et non pas sur le chromoprotéide (l'hème interférerait lors des chromatographies). Nous utilisons ensuite un tampon de sesquicarbonate d'ammonium volatil afin d'éviter les effets de diffusion et d'étalement des taches qu'on pourrait observer en électrochromatographie sur papier. D'autre part, nous avons réalisé l'hydrolyse par la trypsine traitée par le DCC à une concentration en enzyme élevée, afin de minimiser l'effet de petites variations du

rapport Enzyme/Substrat sur l'hydrolyse de certaines liaisons difficiles à rompre. Il existe en effet dans la myoglobine un certain nombre de liaisons dont le taux d'hydrolyse est variable, ce qui représente une gêne au cours d'une étude comparative : l'existence de ces liaisons est matérialisée par le chevauchement de peptides comme Phe-Asp-Lys-Phe-Lys, Phe-Asp-Lys et Phe-Lys (résidus 43 à 47) ou par certains fragments possédant l'enchaînement Val-Leu en C-terminal : His-Gly-Asn-Thr-Val-Leu (résidus 64 à 69) Myoglobine de Boeuf.

### III- Réalisation du fractionnement par électrochromatographie

#### A ) L'électrochromatographie

INGRAM (59) réalise le fractionnement de l'hydrolysats tryptique sur papier Whatman n° 3 MM grâce au couplage bidimensionnel :

- d'une électrophorèse à pH 6,4 dans un tampon Pyridine/Acide acétique/Eau (100 : 4 : 1000) sous une tension de 19 volts par cm pendant 150 mn (dépôt du côté anodique). Mais en raison de l'échauffement produit, un refroidissement de la feuille d'électrophorèse est nécessaire (la feuille est insérée entre deux plaques refroidies);

- et d'une chromatographie ascendante dans le système Butanol/Acide acétique/Eau (3 : 1 : 1).

LEHMAN (60) effectue également une électrophorèse à pH 6,4, mais le système de refroidissement est différent : la feuille est immergée dans un solvant organique continuellement refroidi (système décrit par MICHL - 61). Il fait suivre l'électrophorèse d'une chromatographie ascendante dans le système solvant de BAGLIONI (62) 3-Méthyl/Butanol/Pyridine/Eau (6 : 6 : 7)

D'autres auteurs, comme KATZ (63) ou encore JEGOROV, KEIL et SORM (64) utilisent d'abord l'électrophorèse à haute tension dans des tampons plus pauvres en pyridine, donc moins coûteux. Ensuite, ils effectuent une chromatographie en seconde dimension : JEGOROV et al. par exemple, utilisent une chromatographie descendante dans le système solvant Butanol / Pyridine/ Acide acétique/ Eau (150 : 100 : 30 : 120) de WALEY et WATSON (65).



Le couplage électrochromatographique que nous utilisons est celui décrit par BISERTE et al. (66). Nous réalisons dans la première dimension une électrophorèse à pH 3,9 (Pyridine/Acide acétique/ Eau 30 : 100 : 4870) sur papier Whatman n° 3 dans un appareil d'électrophorèse en toit de type DURRUM sans système de refroidissement. En seconde dimension, une chromatographie descendante dans le système solvant Butanol/Acide acétique/Eau (4 : 1 : 5).

Ce système possède certainement un pouvoir de résolution inférieur à ceux de INGRAM ou de LEHMAN, mais l'habitude et la connaissance des cartes peptidiques que nous avons, grâce à l'étude des myoglobines de Cheval et de Boeuf, nous a toujours fait hésiter à en changer, d'autant que l'utilisation d'un tampon riche en pyridine de pH 6,4 se révèle beaucoup plus onéreux par rapport aux avantages relativement faibles qu'il semble présenter (l'utilisation du tampon de pH 6,4 est particulièrement onéreux en raison de sa concentration en Pyridine et également parce qu'il est pratiquement nécessaire d'utiliser un tampon neuf à chaque électrophorèse ; le tampon jaunit rapidement après une ou deux opérations). Nous avons néanmoins changé le système solvant de la chromatographie, ce qui nous a permis d'améliorer encore la séparation : nous avons utilisé le système de WALEY et WATSON (Butanol/Pyridine/Acide acétique/Eau - 150 : 100 : 30 : 120).

#### B ) Identification des taches peptidiques

L'identification des taches obtenues après révélation à la ninhydrine, s'effectue d'après leur position relative les unes par rapport aux autres. La révélation s'effectue au moyen d'une solution de ninhydrine à 1 p. 100 ou à 2 p. 100 dans l'acétone. Il est également possible de mettre en évidence non seulement les groupes aminés, mais aussi certaines chaînes latérales : c'est ainsi que nous pouvons révéler de façon spécifique les peptides contenant de l'histidine par la réaction de PAULY, par une méthode adaptée de BALDRIDGE et LEWIS (67); les peptides contenant de l'arginine au moyen de la réaction de SAKAGUCHI, adaptée par JEPSON et SMITH (68) ; les peptides à tyrosine par la méthode de ACHER et CROCHER (69) ; les peptides à tryptophane par la méthode d'Ehrlich, selon la technique de SMITH (70) et enfin les

peptides de méthionine selon la technique de TOENNIS et KOLB (71). Ces réactions étant réalisées aux dépens des chaînes latérales des acides aminés, nous pouvons donc, sans inconvénients les réaliser après réaction à la ninhydrine, mais il est cependant préférable de les effectuer après décoloration préalable des électrochromatographies selon la technique de BAGLIONI (72) : trempage de l'électrochromatogramme dans l'acétone chlorhydrique (Acétone/HCl 4 : 1).

Certaines de ces réactions spécifiques peuvent être non seulement associées avec la réaction à la ninhydrine, mais également entre elles. En utilisant toutes ces possibilités, nous avons établi la carte tryptique de la myoglobine de Mouton (Figure 3).

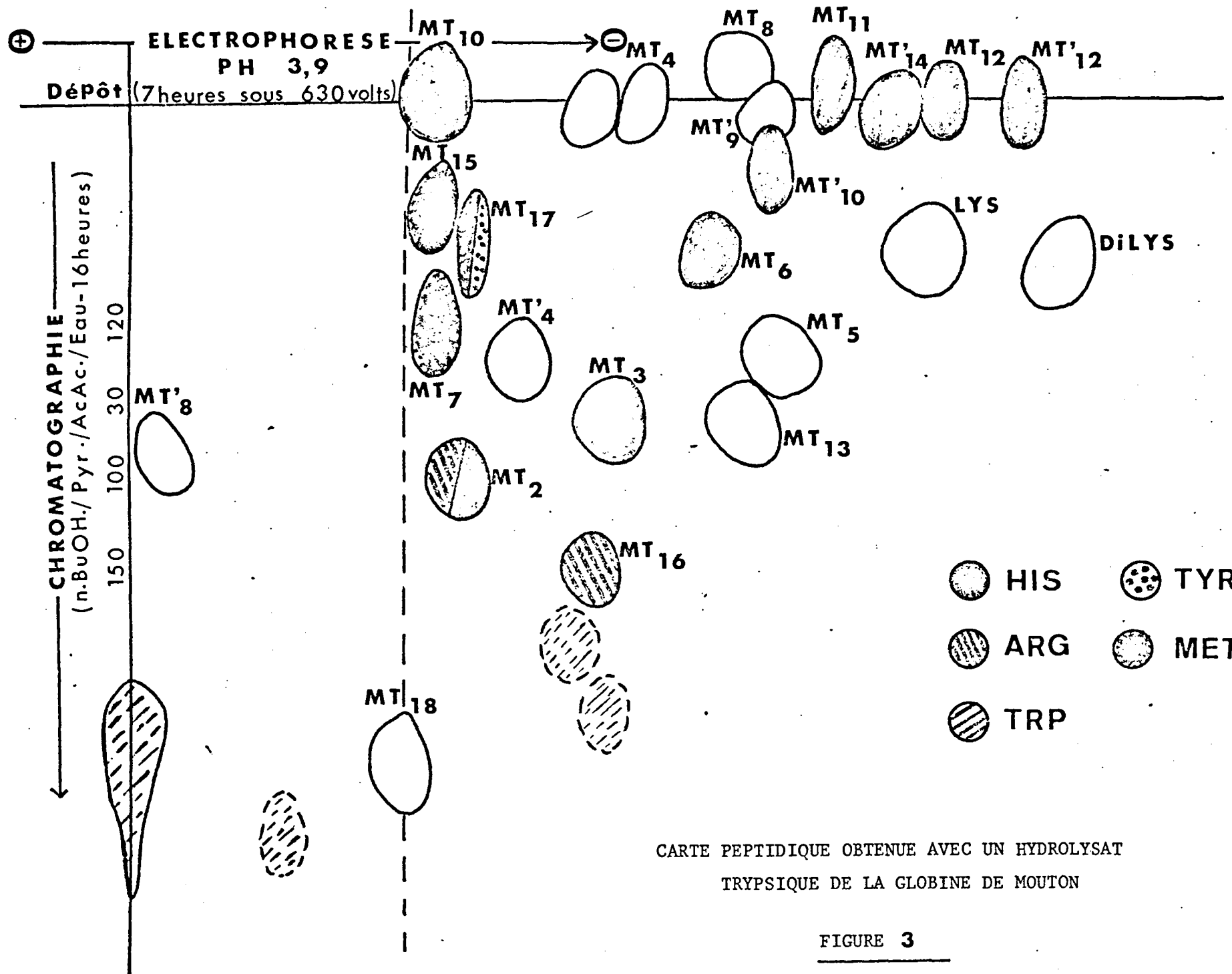
#### C ) Etude de la carte peptidique

La comparaison des myoglobines peut être envisagée par la méthode des "finger-prints". La sensibilité actuelle de la plupart des analyseurs d'acides aminés (1 à 10 nanomoles) permet l'isolement d'un spot peptidique sur un électrochromatogramme, la localisation de la tache peut alors être réalisée selon la technique de LEHMAN (73) : trempage de la feuille de papier dans une solution acétonique ninhydrine à 0,01/p. 100 et chauffage à 80°C, le temps juste suffisant pour faire apparaître les taches que nous voulons récupérer. La tache est découpée et cousue sur un fragment plus important de papier Whatman n° 3 et éluee par de l'acide acétique à 8 p. 100. L'éluat peut être recueilli directement dans un tube à hydrolyse afin de réduire les pertes au maximum.

#### D) Résultats et discussion

Il est intéressant de dresser la carte peptidique de la myoglobine de Mouton, car elle nous renseigne sur sa structure générale : nous voyons ainsi apparaître par rapport à la myoglobine de Boeuf, un troisième peptide à méthionine, contenant de la tyrosine (MT 17) ; nous observons également la présence d'un grand nombre de peptides dont le comportement en électrochromatographie est identifié à celui des myoglobines de Cheval et de Boeuf (Figure 3).

Cependant, pour différentes raisons, nous n'avons pas retenu cette méthode des "finger-prints" pour établir la séquence en acides aminés



CARTE PEPTIDIQUE OBTENUE AVEC UN HYDROLYSAT  
TRYPSIQUE DE LA GLOBINE DE MOUTON

FIGURE 3

de la myoglobine de Mouton, malgré la connaissance parfaite des cartes peptidiques des myoglobines d'espèces animales voisines (Cheval et Boeuf). Nous nous heurtons d'abord au problème de la reproductibilité de l'hydrolyse par la trypsine : bien que les conditions opératoires soient les mêmes, le pourcentage de désamidation de certains peptides est variable (Val-Leu-Gly-Phe-Gln-Gly en Val-Leu-Gly-Phe-Glu-Gly) (résidus 148-153) d'autres peptides par contre ne sont que partiellement hydrolysés (Phe-Asp-Lys-Phe-Lys) (résidus 43 à 47). L'analyse des cartes peptidiques est alors plus complexe.

D'autre part, les compositions en acides aminés après élution des spots peptidiques peuvent être entachées d'erreurs : le papier, l'eau servant à l'élution des spots peptidiques peuvent contenir des acides aminés libres ou combinés tels que l'acide glutamique, l'acide aspartique, le glycofolle, la sérine, la thréonine.

Une raison supplémentaire de ne pas utiliser cette méthode comparative sur papier est que pour deux peptides possédant un comportement identique en électrochromatographie sur papier, ces deux peptides peuvent être différents l'un de l'autre et les révélations multiples ne permettent pas toujours d'établir cette petite différence : par exemple, les peptides His-Lys-Ile-Pro-Ile-Lys (Cheval), His-Lys-Val-Pro-Ile-Lys (Boeuf) et His-Lys (Ile,Pro,Val)Lys (Mouton) possèdent un comportement identique en électrochromatographie sur papier et en révélation spécifique. La détermination complète de leur structure est indispensable. Or, le handicap le plus sérieux de cette méthode comparative est qu'elle ne permet d'isoler que de très faibles quantités de peptides. D'autre part, ces peptides ont leur acide aminé N-terminal partiellement consommé dans la révélation par la ninhydrine ; l'étude directe de ces peptides par la méthode d'Edman est alors compromise. Cette méthode paraît efficace surtout lorsque nous voulons préciser les ressemblances, mais non pour préciser les différences entre des petits peptides dont la composition peut être déterminée après isolement du peptide en quantité suffisante. De ce fait, nous avons entrepris un fractionnement sur colonne de résines à échanges de cations.

#### IV ) Réalisation du fractionnement par chromatographie sur colonne

La méthode comparative sur colonne présente l'avantage d'un pouvoir séparateur plus grand que sur papier, et d'une adaptation immédiate à l'isolement préparatif des peptides. Cependant, pour comparer deux hydrolysats, plusieurs possibilités nous sont offertes.

Ainsi, au laboratoire, pour comparer les myoglobines de Cheval et de Boeuf, DAUTREVAUX, HAN, CHAILA et BISERTE (74) effectuaient en premier lieu une chromatographie du mélange de l'hydrolysats tryptique de la myoglobine de Boeuf avec le peptide supposé identique provenant de la myoglobine de Cheval. Cette méthode dut être cependant abandonnée car elle nécessitait de multiples chromatographies qui impliquaient l'utilisation de témoins internes, et d'autre part un trop grand nombre de pics d'élution se révélaient hétérogènes en électrochromatographie sur papier. Ils proposèrent alors d'effectuer une chromatographie préparative des hydrolysats tryptiques de la myoglobine de Cheval puis une autre de ceux de la myoglobine de Boeuf. Les courbes d'élution sont établies par dosage à la ninhydrine et ils comparent les deux fractionnements (HAN, DAUTREVAUX, CHAILA et BISERTE) (75).

Ils identifient ensuite les peptides de la myoglobine étudiée à leur homologue de la myoglobine de référence: par leur temps de rétention sur la colonne de résine, leur comportement en électrochromatographie, leur composition en acides aminés, leur acide aminé N-terminal (par une réaction de dansylation). Les peptides qui se révèlent différents par leur comportement sont seuls étudiés sur le plan de la séquence ; le placement des peptides obtenus sur la chaîne peptidique est réalisé également de façon comparative par rapport à la séquence en acide aminé de la myoglobine de référence.

En vue de déterminer la séquence en acides aminés de la myoglobine de Mouton, nous avons utilisé cette méthode de comparaison avec la myoglobine de Boeuf comme myoglobine de référence.

#### A ) Fractionnement préparatif des hydrolysats tryptiques de la globine de Mouton et de la globine de Boeuf.

##### 1°) Chromatographie sur colonne de résine

La chromatographie est effectuée sur 100 à 150 mg d'hydrolysats tryptique repris par 1 ml d'acide acétique à 20 p. 100. L'hydrolysats est déposé sur une colonne (140 x 0,635 cm), garnie de résine polystyrène sulfonée à faible pourcentage de réticulation (résine "Chromobeads P" Technicon) à une température de 50°C. L'élution s'effectue au moyen de tampon formiate et acétate de pyridine de pH et de molarité croissants avec un débit de 36 ml/h, sous une pression

qui atteint en fin de chromatographie jusqu'à  $25 \text{ kg/cm}^2$ . Des fractions de 6 ml (une fraction toutes les 10 min) sont recueillies au bas de la colonne au moyen d'un collecteur automatique (Figure 4).

#### 2°) Etablissement de la courbe d'élution

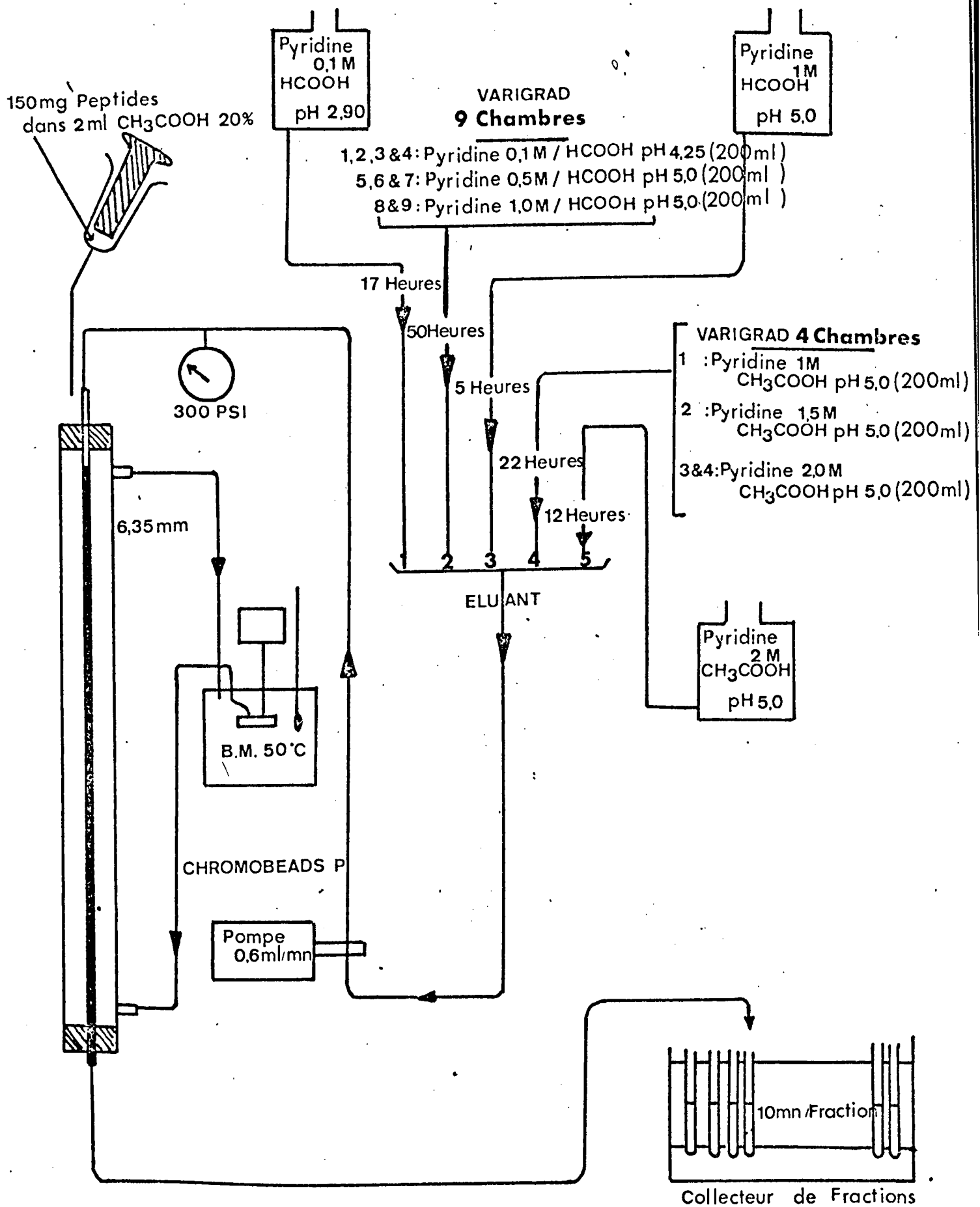
La courbe d'élution est établie par dosage à la ninhydrine sur un aliquot (0,32 ml) de chaque fraction au moyen d'une réaction automatique adaptée à l'autoanalyseur Technicon, en vue d'un dosage tube à tube (BOULANGER) (76). Cette réaction peut d'ailleurs être complétée par des réactions de PAULY ou de SAKAGUCHI qui mettent en évidence respectivement les peptides à histidine ou à arginine.

Les fractions correspondant à un même pic (peptide MT) sont rassemblées et lyophilisées.

#### B) Etude des peptides tryptiques

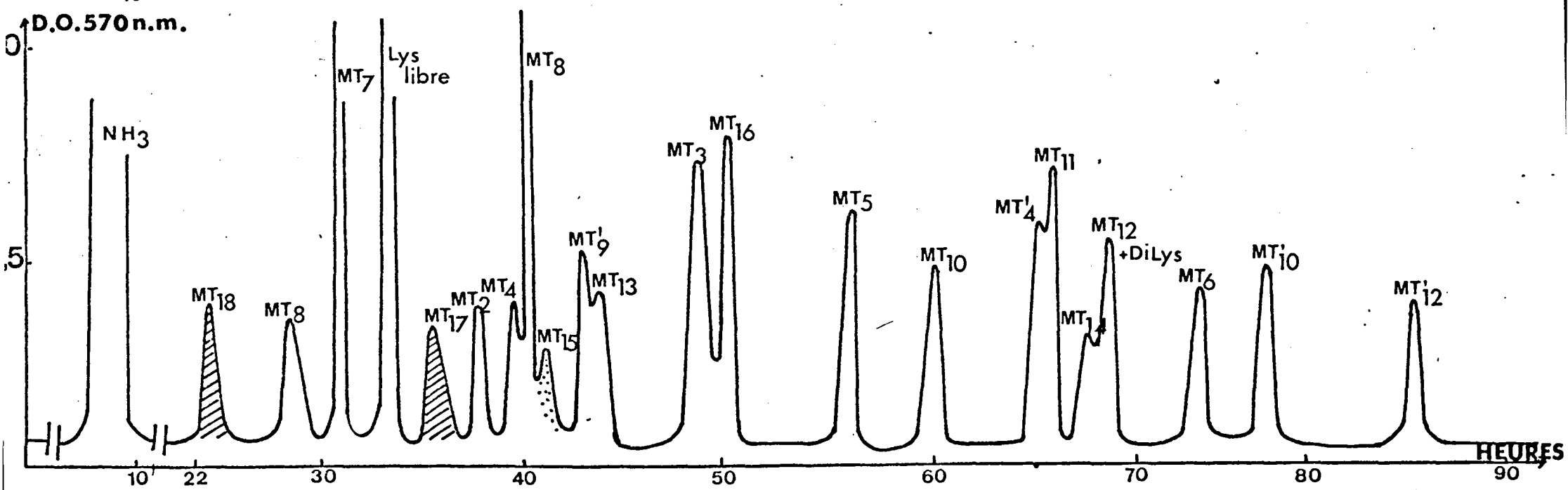
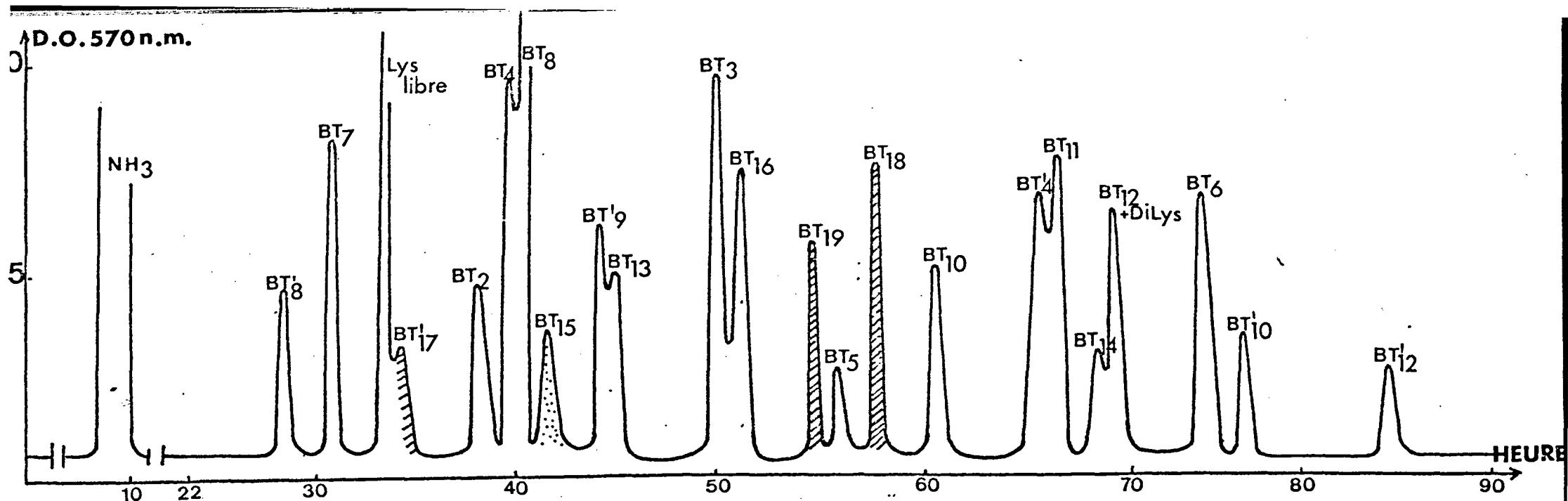
Le comportement en électrochromatographie, la composition en acides aminés (Tableau II), le temps de rétention sur la colonne de résine à échanges d'ions (Figure 5) et l'extrémité N-terminale (Dansyls) des peptides MT'8, MT 7, MT 2, MT 14, MT 8, MT'9, MT3, MT 16, MT 5, MT 10, MT'4, MT 11, MT'14, MT 12, MT 6, MT'10 et MT'12 sont identiques respectivement aux peptides tryptiques de Boeuf (BT et BT'). La séquence de ces peptides (MT et MT') a été déduite par analogie par rapport aux peptides tryptiques de Boeuf.

Les peptides MT 13, MT 17, MT 15 et MT 18 sont différents : le peptide MT 13 n'est différent de son homologue BT 13 que par son extrémité N-terminale (Isoleucine au lieu de valine en position 99). MT 17 est différent de son homologue BT'17 surtout par la composition (une méthionine supplémentaire et une lysine en moins) et un temps de rétention sur la colonne de résine légèrement supérieur (nous pouvons noter également que le peptide BT'17 a été hydrolysé en BT 17 et BT 18 et nous ne retrouvons pas les homologues chez le Mouton). MT 15 est différent de son homologue BT 15 par sa composition en acides aminés (un glycole supplémentaire et une alanine en moins). Le peptide MT 18 ne possède pas de lysine en composition en acides aminés : il s'agit donc du peptide tryptique C-terminal dont l'homologue chez le Boeuf est BT 19 (le résidu d'histidine en position 152 de BT 19 est remplacé par un résidu de glutamine, ce qui expliquerait le temps de rétention supérieur de BT 19). En tenant compte des possibilités de changement du code génétique et des résultats obtenus à partir de cette étude



CONDITIONS TECHNIQUES DU FRACTIONNEMENT SUR COLONNE DE RESINE A ECHANGE DE CATIONS DES HYDROLYSATS TRYPSIQUES OU CHYMOTRYPSIQUES DE GLOBINE DE LA MYOGLOBINE DE MOUTON

FIGURE 4



COURBES D'ELUTION DES HYDROLYSATS TRYPSIQUES DE GLOBINE DE LA MYOGLOBINE DE BOEUF (pic BT) ET DE LA MYOGLOBINE DE MOUTON (pic MT) - REACTION NINHYDRINE

FIGURE 5



**TABEAU II**  
**COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES TRYPSIQUES**  
**DE LA MYOGLOBINE DE MOUTON (MT)**

MT1	: non isolé : premier noyau tryptique insoluble : résidus 1 à 16
MT2	: résidus 17 à 31 HIS : 0,88 (1) ; ARG : 0,80 (1) ; ASP : 1,09 (1) ; GLU : 3,42 (3) ; GLY : 2,14 (2) ; ALA : 2,02 (2) ; VAL : 2,74 (3) ; ILE : 0,88 (1) ; LEU : 0,82 (1) Extrémité N-terminale : Valine (DNS-VAL)
MT3	: résidus 32 à 42 LYS : 1,07 (1) ; HIS : 0,93 (1) ; THR : 1,87 (2) ; GLU : 2,23 (2) ; PRO : 1,13 (1) ; GLY : 0,89 (1) ; LEU : 2,02 (2) ; PHE : 0,85 (1) Extrémité N-terminale : leucine (DNS-LEU)
MT4	: résidus 43 à 45 LYS : 0,96 (1) ; ASP : 1,06 (1) ; PHE : 0,98 (1) Extrémité N-terminale : phénylalanine (DNS-PHE)
MT5	: résidus 46-47 LYS : 1,02 (1) ; PHE : 0,98 (1) Extrémité N-terminale : Phénylalanine (DNS-PHE)
MT'4	: résidus 43 à 47 LYS : 2,08 (2) ; ASP : 0,93 (1) ; PHE : 2,00 (2) Extrémité N-terminale : Phénylalanine (DNS-PHE)
MT6	: résidus 48 à 50 LYS : 0,88 (1) ; HIS : 0,90 (1) ; LEU : 1,22 (1) Extrémité N-terminale : Histidine (DNS-HIS)
MT7	: résidus 51 à 56 LYS : 0,99 (1) ; THR : 0,94 (1) ; GLU : 2,13 (2) ; ALA : 1,07 (1) ; MET : 0,86 (1) Extrémité N-terminale : Thréonine (DNS-THR)
MT8	: résidus 57 à 63 LYS : 1,78 (2) ; ASP : 1,08 (1) ; SER : 1,04 (1) ; GLU : 1,19 (1) ; ALA : 1,03 (1) ; LEU : 0,88 (1) Extrémité N-terminale : Alabine (DNS-ALA)

TABLEAU II (suite)

MT'8	: résidus 57 à 62 LYS : 0,88 (1) ; ASP : 0,90 (1) ; SER : 0,85 (1) ; GLU : 1,12 (1) ; ALA : 0,94 (1) ; LEU : 1,38 (1) Extrémité N-terminale : Alanine (DNS-ALA)
MT9	: non isolé, deuxième noyau tryptique insoluble résidus 64 à 69
MT'9	: résidus 70 à 77 LYS : 0,95 (1) ; THR : 1,00 (1) ; GLY : 2,31 (2) ; ALA : 1,04 (1) ; ILE : 0,84 (1) ; LEU : 1,86 (2) Extrémité N-terminale : Thréonine (DNS-THR)
LYS-libre	: LYS résidu 78 LYS : 1,00 (1) (DNS-LYS)
DiLYS	résidus 78-79 LYS : 2,00 (2) (DNS-LYS)
MT10	: résidus 80 à 87 LYS : 1,04 (1) ; HIS : 1,78 (2) ; GLU : 1,83 (2) ; GLY : 1,11 (1) ; ALA : 1,26 (1) ; VAL : 0,97 (1) Extrémité N-terminale : Glycocolle (DNS-GLY)
MT'10	: résidus 79 à 87 LYS : 2,12 (2) ; HIS : 2,02 (2) ; GLU : 2,09 (2) ; GLY : 0,92 (1) ; ALA : 1,03 (1) ; VAL : 0,80 (1) ; Extrémité N-terminale : Lysine (DNS-LYS)
MT11	: résidus 88 à 96 LYS : 1,17 (1) ; HIS : 2,19 (2) ; ASP : 0,86 (1) ; SER : 0,81 (1) ; GLU : 0,98 (1) ; ALA : 1,95 (2) ; LEU : 1,04 (1) Extrémité N-terminale : Histidine (DNS-HIS)
MT12	: résidus 97-98 : LYS : 1,05 (1) ; HIS : 0,95 (1).
MT13	: résidus 99 à 102 LYS : 1,08 (1) ; PRO : 1,01 (1) ; VAL : 0,88 (1) ; ILE : 1,01 (1) ; Extrémité N-terminale : Isoleucine (DNS-ILE)

TABLEAU II (suite)

- MT'12 : résidus 97 à 102  
 LYS : 1,98 (2) ; HIS : 1,00 (1) ; PRO : 1,03 (1) ; VAL : 0,86 (1) ;  
 ILE : 1,11 (1) ;  
 Extrémité N-terminale : Histidine (DNS-HIS)
- MT14 : non isolé - troisième noyau tryptique insoluble  
 résidus 103 à 115
- MT'14 : résidus 116 à 118  
 LYS : 1,00 (1) ; HIS : 0,95 (1) ; ALA : 1,05 (1)  
 Extrémité N-terminale : Histidine (DNS-HIS)
- MT15 : résidus 119 à 133  
 LYS : 1,20 (1) ; HIS : 0,87 (1) ; ASP : 2,02 (2) ; SER : 1,93 (2) ;  
 GLU : 1,18 (1) ; PRO : 0,85 (1) ; GLY : 2,23 (2) ; ALA : 2,98 (3) ;  
 MET : 0,76 (1) ; PHE : 0,96 (1)  
 Extrémité N-terminale : histidine (DNS-HIS)
- MT16 : résidus 134 à 139  
 ARG : 0,86 (1) ; GLU : 1,04 (1) ; ALA : 1,03 (1) ; LEU : 2,16 (2) ;  
 PHE : 0,88 (1)  
 Extrémité N-terminale : Alanine (DNS-ALA)
- MT17 : résidus 140 à 147  
 LYS : 0,85 (1) ; ASP : 2,14 (2) ; GLU : 1,18 (1) ; ALA : 2,13 (2) ;  
 MET : 0,83 (1) ; TYR : 0,82 (1)  
 Extrémité N-terminale : asparagine ou acide aspartique (DNS-ASX)
- MT18 : résidus 148 à 153  
 GLU : 1,08 (1) ; GLY : 2,39 (2) ; VAL : 0,83 (1) ; LEU : 0,81 (1) ;  
 PHE : 0,86 (1)  
 Extrémité N-terminale : Valine (DNS-VAL et DNS-VAL-LEU-
-

comparative, nous avons établi la séquence provisoire des peptides tryptiques.

#### V ) Discussion

La technique chromatographique sur résine est plus sélective que la technique des "Finger-prints" ; en outre, l'utilisation de cette technique couplée avec les méthodes d'électrochromatographie sur papier, la détermination de la composition en acides aminés, etc... conduit à une certitude quant à l'identité des fractions peptidiques. Et lorsque le peptide est différent de son homologue dans la myoglobine de référence son étude complète sur le plan de la séquence est facilitée par la méthode de fractionnement utilisée, qui permet l'isolement d'une quantité de peptide beaucoup plus importante que par la méthode sur papier.

La caractérisation des peptides tryptiques ne permet de présenter qu'une structure partielle de la myoglobine de Mouton (Figure 6) en alignant ces peptides les uns à la suite des autres par analogie avec la séquence en acide aminé de la myoglobine de Boeuf.

Cette structure ne peut être que partielle car la difficulté essentielle de l'étude de la séquence en acides aminés des myoglobines réside dans l'existence du "Core" tryptique insoluble (dénomination d'EDMUNDSON -77). De ce fait, l'étude des peptides isolés des hydrolysats tryptiques de myoglobine ne permet jamais de recouvrir totalement la chaîne peptidique, mais seulement environ les deux tiers (dans les myoglobines, on note en général la présence d'un tiers de fragments peptidiques insolubles résistants à l'action de la trypsine : le "noyau" N-terminal (résidus de 1 à 16) et les deux "noyaux" "médiants" (résidus 64 à 77 et résidus 103 à 118 (Myoglobine de Cachalot - EDMUNDSON -78)).

← BT<sub>2</sub> —……

BOEUF : 1 5 10 15 20  
 : GLY-LEU-SER-ASP-GLY-GLU-TRP-GLN-ALA-VAL-LEU-ASN-ALA-TRP-GLY-LYS-VAL-GLU-ALA-ASP-

MOUTON : GLY-....."PREMIER NOYAU TRYPSIQUE INSOLUBLE".....VAL(GLU,ALA,ASP,  
 ← MT<sub>2</sub> —……

... — BT<sub>2</sub> —————> ← ————— BT<sub>3</sub> —……

BOEUF : 25 30 35 40  
 : VAL-ALA-GLY-HIS-GLY-GLN-GLU-VAL-LEU-ILEU-ARG-LEU-PHE-THR-GLY-HIS-PRO-GLU-THR-LEU-

MOUTON : VAL,ALA,GLY,HIS,GLY,GLN,GLU,VAL,LEU,ILEU)ARG-LEU(PHE,THR,GLY,HIS,PRO,GLU,THR,LEU,  
 ... — MT<sub>2</sub> —————> ← ————— MT<sub>3</sub> —……

← BT<sub>4</sub>' —————>

... ← BT<sub>3</sub> —————> ← BT<sub>4</sub> —————> ← BT<sub>5</sub> —————> ← BT<sub>6</sub> —————> ← BT<sub>7</sub> —————> ← BT<sub>8</sub> —……

BOEUF : 45 50 55 60  
 : GLU-LYS-PHE-ASP-LYS-PHE-LYS-HIS-LEU-LYS-THR-GLU-ALA-GLU-MET-LYS-ALA-SER-GLU-ASP-

MOUTON : GLU)LYS-PHE-ASP-LYS-PHE-LYS-HIS-LEU-LYS-THR(GLU,ALA,GLU,MET)LYS-ALA(SER,GLU,ASP,  
 ... ← MT<sub>3</sub> —————> ← MT<sub>4</sub> —————> ← MT<sub>5</sub> —————> ← MT<sub>6</sub> —————> ← MT<sub>7</sub> —————> ← MT<sub>8</sub> —……

← MT<sub>4</sub>' —————>

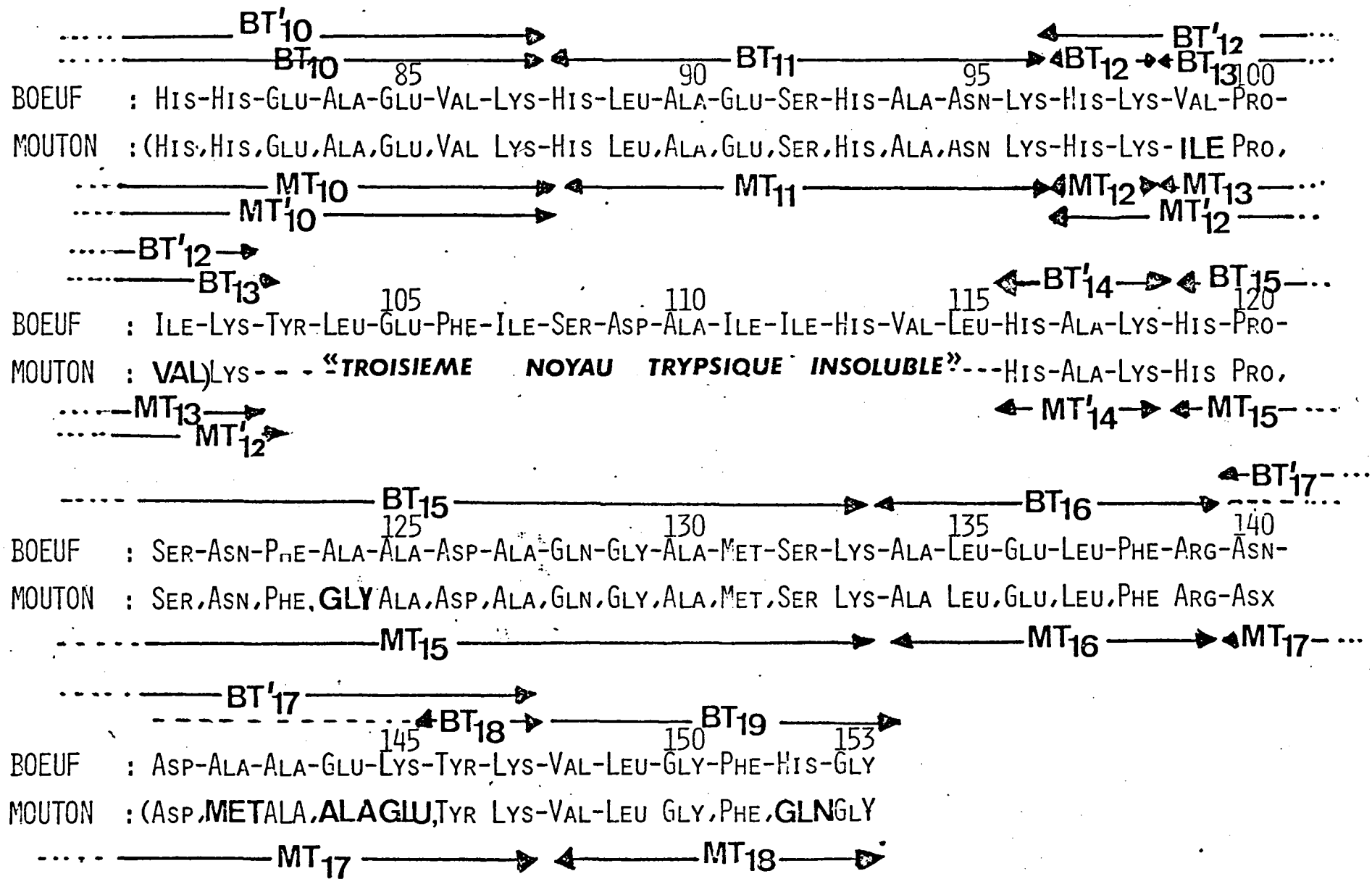
... ← BT<sub>8</sub>' —————>

... ← BT<sub>8</sub> —————> ← BT<sub>9</sub>' —————> ← BT<sub>10</sub>' —……

BOEUF : 65 70 75 80  
 : LEU-LYS-LYS-HIS-GLY-ASN-THR-VAL-LEU-THR-ALA-LEU-GLY-GLY-ILEU-LEU-LYS-LYS-LYS-GLY

MOUTON : LEU)LYS-LYS"SECOND NOYAU INSOLUBLE"THR(ALA,LEU,GLY,GLY,ILEU,LEU)LYS-LYS-LYS-GLY  
 ... ← MT<sub>8</sub> —————> ← MT<sub>9</sub>' —————> ← MT<sub>10</sub>' —……

... ← MT<sub>8</sub>' —————> ← MT<sub>10</sub>' —……



ETABLISSEMENT DE LA STRUCTURE PROBABLE DES PEPTIDES TRYPSIQUES DE LA GLOBINE DE MOUTON (MT) PAR ANALOGIE AVEC LES PEPTIDES TRYPSIQUES DE LA GLOBINE DE BOEUF (BT)

ETUDE COMPARATIVE DES PEPTIDES  
OBTENUS APRES HYDROLYSE PAR LE BROMURE DE  
CYANOGENE DES MYOGLOBINES DE BOEUF ET DE  
MOUTON

## I - ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE

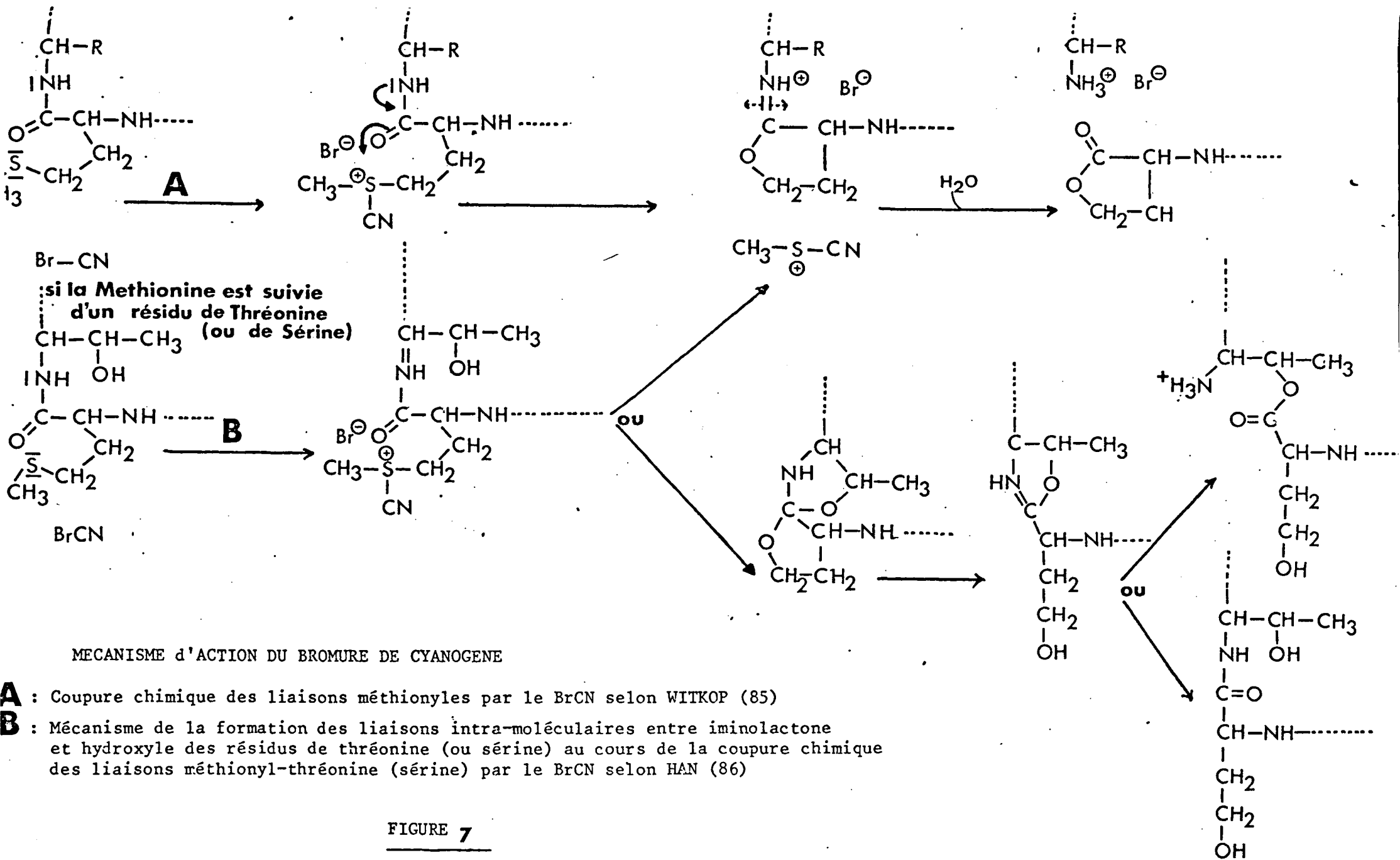
### A) Le "core"

L'existence de fragments peptidiques non attaqués par la trypsine ou par la chymotrypsine peut être expliquée par l'inégale répartition des acides aminés le long de la chaîne peptidique de la myoglobine. Nous notons ainsi dans la myoglobine de Cachalot à la fois: l'accumulation de résidus de lysine ou d'arginine en certains endroits de la molécule, ce qui crée des zones très basiques dans la chaîne peptidique et inversement laisse des zones qui en sont presque totalement dépourvues; et l'accumulation en d'autres endroits de certains résidus à caractère hydrophobe comme la leucine, l'isoleucine, la valine ou les acides aminés aromatiques. Cette répartition des acides aminés rend plus difficile l'étude de la structure de la myoglobine car la trypsine laisse subsister de larges fragments peptidiques inattaqués par l'enzyme et peu solubles dans les zones de pH utilisées habituellement pour le fractionnement peptidique (ainsi le segment N-terminal de la myoglobine de Cachalot correspondant à la séquence 1-16 ne contient ni lysine, ni arginine mais comprend 3 résidus de valine, 3 résidus de leucine et 2 résidus de tryptophane) ; d'autre part, la chymotrypsine fait apparaître des peptides à caractère très basique, comme le "centre" basique de la myoglobine de Cachalot correspondant à la séquence 76-86 (Leu-Lys-Lys-Lys-Gly-His-His .... Glu) qui ne sont pas élués lors du fractionnement peptidique sur colonne de résines.

De nombreuses stratégies ont donc été mises en oeuvre afin d'identifier la structure complète des myoglobines, comme l'action de la trypsine et la chymotrypsine sur une globine dont le "core" est solubilisé par modification chimique, soit par carboxyméthylation (EDMUNDSON - 79), soit par aminoéthylation (LEHMAN - 80) ou l'étude des peptides obtenus après action du bromure de cyanogène.

La solubilisation du "core" est possible s'il existe à l'intérieur de ces chaînes peptidiques des résidus modifiables par des substituants polaires : ainsi l'histidine **12** (du premier noyau peptidique insoluble), l'histidine **64** (du second noyau insoluble), l'histidine **113** (du troisième





noyau insoluble) de la myoglobine de Cachalot peuvent être carboxyméthylées. La 1/2 cystéine 110 de la myoglobine des Primates peut être S-aminoéthylée (le "core" ainsi solubilisé la structure des myoglobines de Cachalot et de Primates a pu être totalement déterminée après hydrolyse trypsique).

Au laboratoire, nous préférons utiliser l'action du bromure de cyanogène, car son action sur les myoglobines est plus générale (DAUTREVAUX - 81) ; le bromure de cyanogène coupe de façon sélective les liaisons méthionyles et comme la proportion de méthionine est faible dans les myoglobines (3 résidus de MET pour la myoglobine de Mouton), nous obtenons de longs polypeptides qui sont solubles et qui recouvrent la totalité de la séquence. Après isolement, leur hydrolyse par la trypsine fera certes apparaître des peptides insolubles, mais dans chacun des deux fragments contenant ces fragments insolubles, leur proportion par rapport aux peptides solubles est plus importante que pour la globine totale : il est alors possible de les isoler et de les identifier. De plus, une étude comparative peut alors être envisagée car la myoglobine de Boeuf a ainsi été déterminée, auparavant (82).

#### B) Mécanisme d'action

GROSS et WITKOP (83) ont montré que de nombreux agents d'alkylation et en particulier le BrCN pouvait se fixer sur le soufre en  $\delta$  de la liaison peptidique de la méthionine. En milieu acide et à température ambiante, l'alkylation de la méthionine est suivie de la coupure de la liaison peptidique.

D'après WITKOP (84), le mécanisme de coupure des liaisons méthionyles est le suivant : initialement, il se forme un bromure de cyanosulfonium, qui, en milieu acide se scinde en méthyl-thiocyanate et en bromhydrate de l'iminolactone d'homosérine ; la fonction imine se décompose spontanément avec libération d'une part de la lactone d'homosérine et de l'autre d'un fragment peptidique ayant en position N-terminale l'acide aminé dont le groupe  $\text{NH}_2$  était initialement lié au COOH de la méthionine (Figure 7). L'homosérine sous forme lactone, produit nouvellement apparu au cours de cette réaction, peut être mise en évidence lors du dosage automatique des acides aminés des peptides libérés dans le système de MOORE et STEIN (élution à 45°C avec un tampon de citrate de sodium 0,2 N de pH 3,25) la lactone d'homosérine est éluee sur la colonne des acides aminés basiques entre l'ammoniaque et l'arginine.

L'homosérine est éluée entre la sérine et l'acide glutamique.

Dans le cas où la liaison méthionyle est suivie d'un résidu de thréonine ou de sérine, c'est-à-dire d'un acide aminé possédant un groupement hydroxylé, la rupture de la liaison ne se réalise qu'avec des rendements assez faibles. Selon HAN, la diminution du rendement s'explique par une réaction intramoléculaire entre le groupe hydroxyle et l'iminolactone de l'homosérine : il se forme une oxazoline qui se décompose pour donner la thréonine (ou la sérine) et l'homosérine sans pour cela qu'il y ait rupture de la liaison peptidique homoséryl-thréonine (ou sérine) (Figure 7). (87)

### C) Protocole expérimental

La spécificité d'action du bromure de cyanogène vis-à-vis des liaisons méthionyles est liée directement aux conditions de température, de concentration en bromure de cyanogène et en protéines, de durée de réaction et de milieu réactionnel,

GROS et WITKOP (88) préconisent un milieu HCl 0,1 N et opèrent à température ordinaire pour couper la ribonucléase ; des conditions plus drastiques sont parfois nécessaires pour réaliser la coupure quantitative des liaisons méthionyles de certains complexes protéiques de poids moléculaires élevés : ainsi GREGORY et al. (89) préfèrent utiliser l'acide trichloroacétique pour hydrolyser la pancréatine II ; BROWN et al. (90) utilisent l'acide formique à 70 p. 100 pour hydrolyser la thiogalactosido-transacétylase.

HAN, DAUTREVAUX, CHAILA et BISERTE (91) préconisent la méthode permettant une coupure quantitative de la globine et notamment la coupure de la liaison méthionyl-sérine (131-132) difficile à rompre : l'hydrolyse s'effectue en milieu acide formique à 70 p. 100 à 30°C pendant 24 heures.

Nous vérifions que la réaction s'est effectuée quantitativement par une réaction de dansylation. L'identification des dansyls acides aminés est réalisée par chromatographie sur couche mince de silicagel (DNS-SER, DNS-LYS, DNS-ALA en plus du DNS-GLY).

## II - FRACTIONNEMENT PAR GEL-FILTRATION

### A) Fractionnement du produit de réaction sur Sephadex G75

150 mg sont déposés sur une colonne (4 x 120 cm) contenant 75 à 80 g de Sephadex G75 perlé : préalablement, le Sephadex a été mis à gonfler, puis a été dégazé dans une solution d'acide acétique 0,2 N,

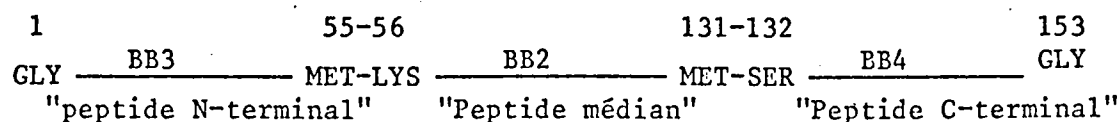
solution qui servira à l'élution des peptides. Le fractionnement est effectué avec un débit réglé à 1,2 ml par minute ; l'effluent est recueilli au moyen d'un collecteur automatique de fractions (fractions de 12 ml).

La courbe d'élution est établie par dosage automatique des peptides au moyen de la réaction de LOWRY, adaptée à l'analyseur avec lecture de la coloration à 660 nm. La Figure 8 montre la courbe d'élution obtenue lors de ce fractionnement. Cinq fractions peuvent être mises en évidence : elles correspondent à des polypeptides de poids moléculaire décroissant.

B) Etude du fractionnement

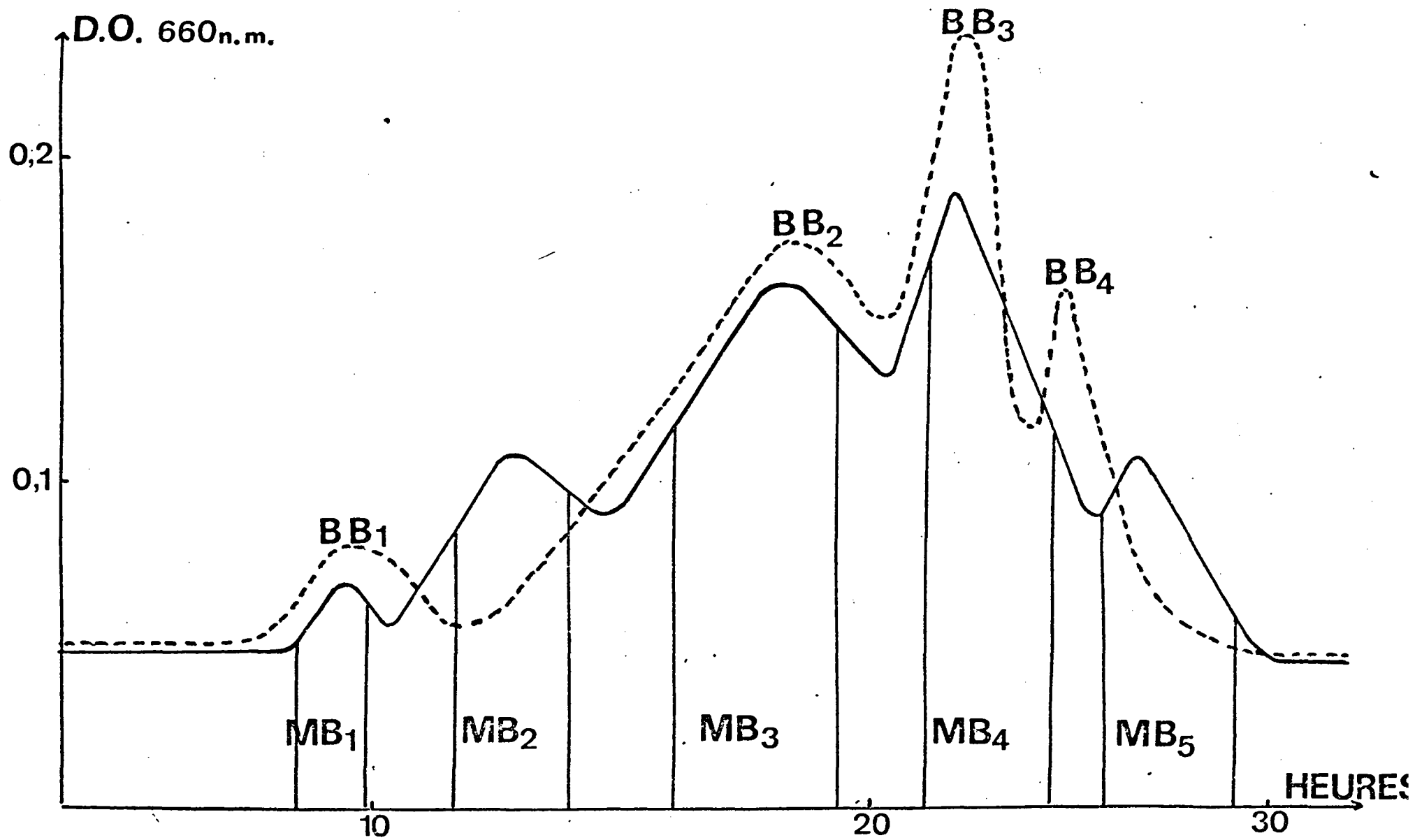
Les fractions correspondant à un même pic d'élution sont rassemblées et lyophilisées. Nous avons ensuite comparé les courbes d'élution des hydrolysats de la globine de Mouton et de Boeuf (Figure 8).

Soit la myoglobine de Boeuf :



Nous savons que la fraction BB1 correspond à la myoglobine de Boeuf qui n'a pas réagi avec le bromure de cyanogène. La fraction BB2 possède la lysine en position N-terminale et correspond au peptide médian. La fraction BB3 possède le glycolle en position N-terminale et correspond au peptide N-terminal de la globine de Boeuf. La fraction BB4 possède la sérine en position N-terminale et correspond au peptide C-terminal de 22 résidus.

Si nous superposons les profils de courbes d'élution des produits de réaction du bromure de cyanogène sur les globines de Boeuf et de Mouton, nous constatons que ces profils sont assez semblables. En particulier, les fractions BB1, BB2 et BB3 de la myoglobine de Boeuf correspondent respectivement aux fractions MB1, MB3 et MB4 de la myoglobine de Mouton. La détermination de l'acide aminé N-terminal, leur



FRACTIONNEMENT SUR SEPHADEX G 75 DES HYDROLYSATS DE LA GLOBINE DE BOEUF (BB --- ) ET DE LA GLOBINE DE MOUTON (MB — ) OBTENUS APRES ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE

FIGURE 8

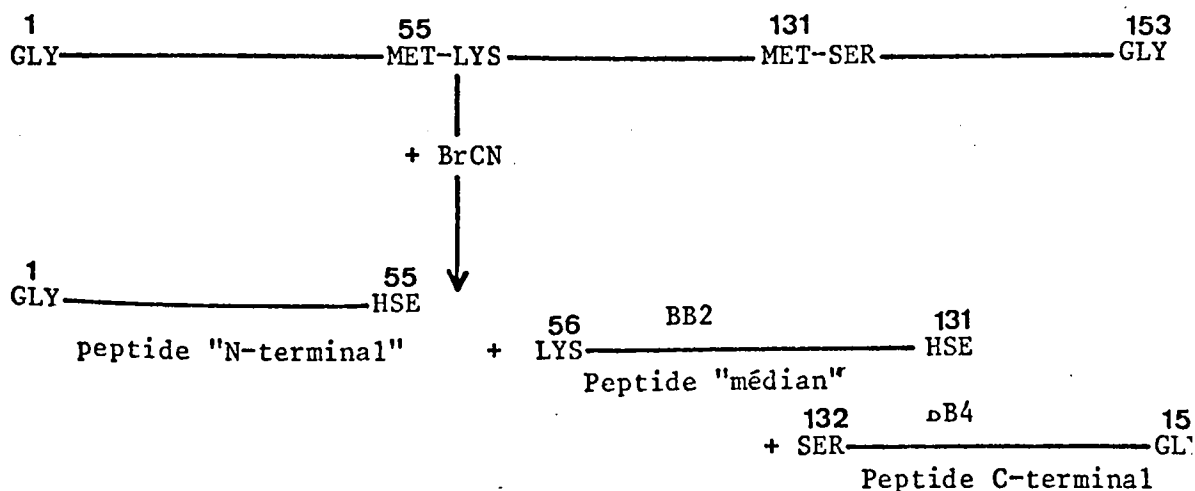
composition en acides aminés des différentes fractions confirme d'ailleurs cette hypothèse (Tableau III).

La fraction MB5 doit correspondre à la BB4 de la globine de Boeuf (peptide C-terminal). Or, nous constatons par dansylation une hétérogénéité de cette fraction MB5 (DNS-SER et DNS-ALA), le poids moléculaire est également plus faible. La purification de la fraction MB5 par électrochromatographie sur papier, l'isolement de deux peptides de 11 résidus chacun MB5 2 et MB5E1 ne possèdent pas de résidus d'HSE), permet de conclure qu'il s'agit de peptides terminaux médian-2 et C-terminal.

Quant à la fraction MB2 dont nous ne trouvons pas l'analogue dans le fractionnement de l'hydrolysate de myoglobine de Boeuf, nous pensons qu'il s'agit d'un produit d'hydrolyse incomplète ; comme nous l'avons montré précédemment, la rupture de la liaison méthionyl-sérine ne s'effectue qu'avec 70 p. 100 de rendement, d'autre part, le poids moléculaire élevé de cette fraction et l'existence d'une lysine N-terminale (DNS-LYS) nous permet de penser qu'il s'agit d'un segment LYS (56-142) HSE.

La composition en acides aminés révèle d'ailleurs l'existence d'un résidu d'arginine (position 139) dans cette fraction.

Si pour la globine de Boeuf nous avons :



### TABLEAU III

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES OBTENUS APRES  
ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE ET ISOLES APRES FRACTIONNEMENT SUR  
SEPHADEX G 75

---

#### MB2

86 résidus

LYS : 8,13 (8) ; HIS : 4,83 (5) ; ARG : 1,05 (1) ;  
ASP : 8,41 (8) ; THR : 4,53 (5) ; SER : 4,26 (4) ;  
HSE : 0,59 (1) ; GLU : 10,05 (10) ; PRO : 2,82 (3) ;  
GLY : 8,00 (8) ; ALA : 9,62 (10) ; VAL : 4,73 (5) ;  
ILE : 2,50 (2) ; LEU : 9,98 (10) ; TYR : 1,20 (1) ; PHE : 3,82 (4)

Extrémité N-terminale : Lysine (DNS-LYS)

---

#### MB3

Segment Médian-1

76 résidus

LYS : 11,04 (11) ; HIS : 9,28 (9) ; ASP : 6,44 (6) ; THR : 2,31 (4)  
SER : 3,26 (3) ; HSE : 0,37 (1) ; GLU : 6,31 (6) ; PRO : 2,00 (2)  
GLY : 6,19 (6) ; ALA : 8,80 (9) ; VAL : 4,15 (4) ; ILE : 3,83 (4)  
LEU : 8,59 (9) ; TYR : 0,96 (1) ; PHE : 2,40 (2)

Extrémité N-terminale : Lysine (DNS-LYS)

---

#### MB4

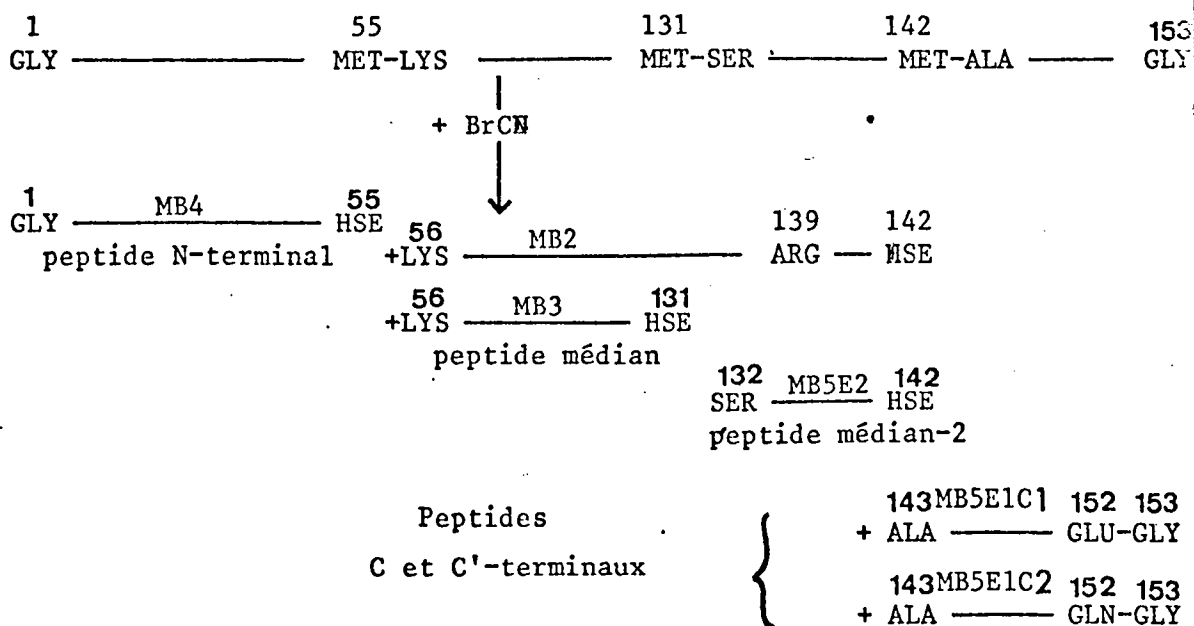
Segment N-terminal

55 résidus

LYS : 5,09 (5) ; HIS : 2,53 (3) ; ARG : 0,97 (1) ; ASP : 4,51 (4)  
THR : 2,75 (3) ; SER : 1,51 (1) ; HSE : 0,79 (1) ; GLU : 7,73 (8)  
PRO : 1,31 (1) ; GLY : 5,96 (6) ; ALA : 4,86 (5) ; VAL : 3,82 (4)  
ILE : 1,03 (1) ; LEU : 7,07 (7) ; PHE : 3,01 (3)

Extrémité N-terminale : Glycocolle (DNS-GLY)

La globine de Mouton réagit de la façon suivante :



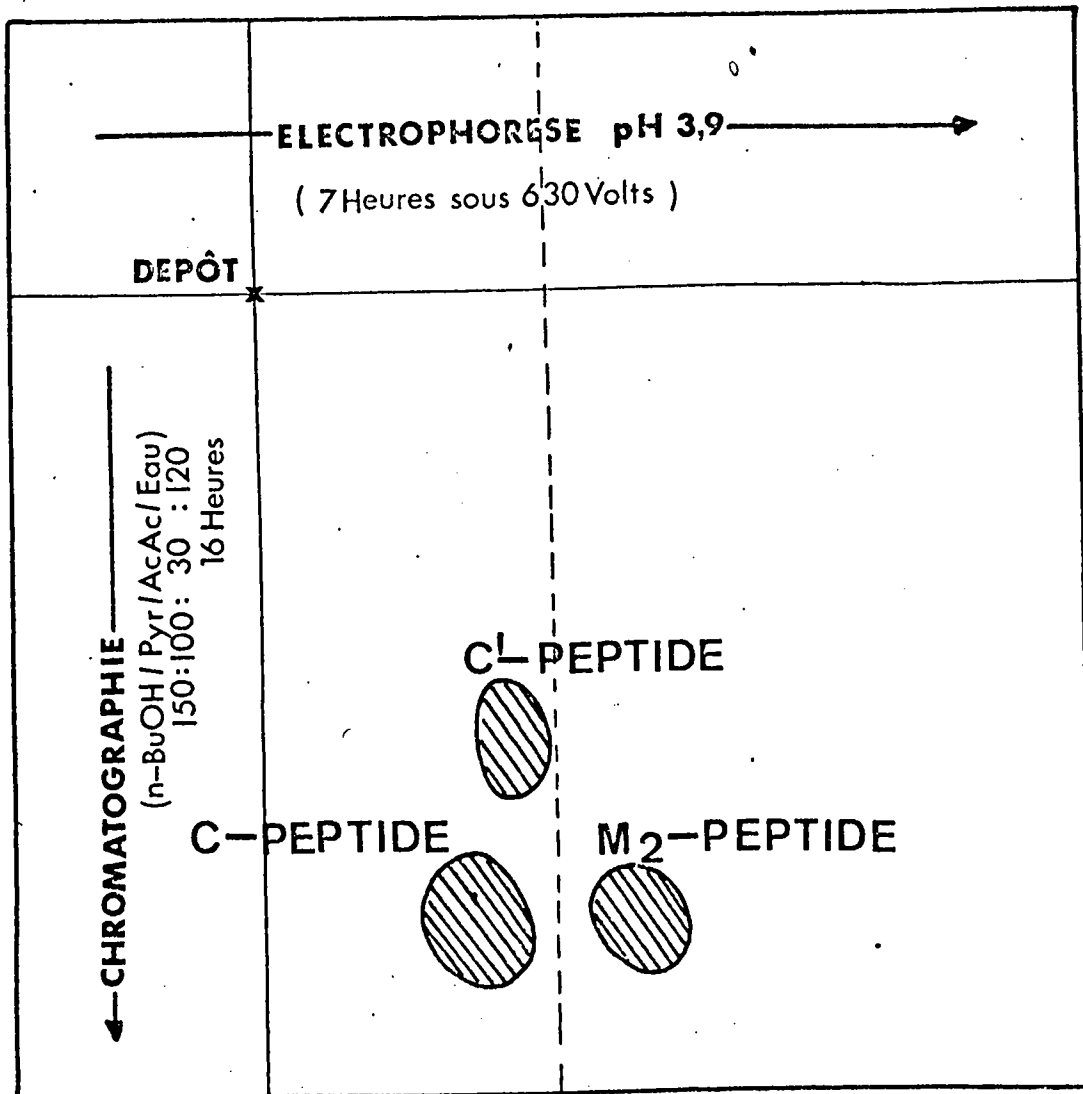
### III - ETUDE DES PEPTIDES MEDIAN-2 et C-TERMINAL

La fraction MB5 se révèle hétérogène par la méthode des dansyls acides aminés. Nous avons confirmé cette hétérogénéité par couplage électrochromatographique selon la technique décrite par PLAQUET, BISERTE et BOULANGER (92). Après révélation à la ninhydrine à 1 p. 100, nous observons la présence de 3 taches comme le montre la figure 9.

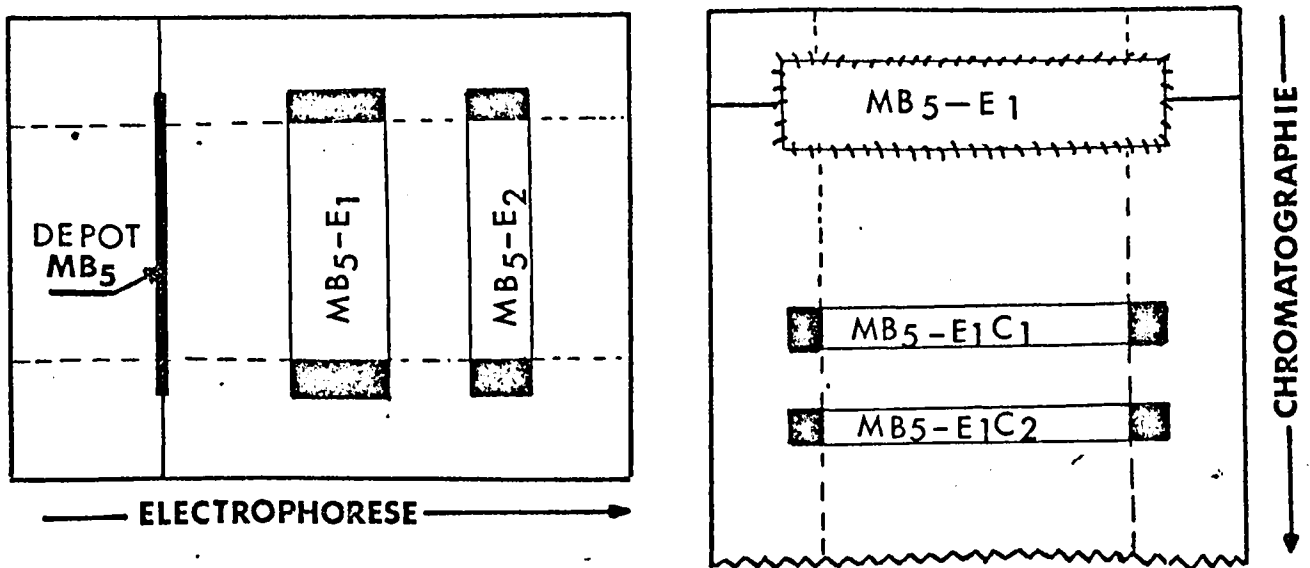
Le fractionnement préparatif des 3 peptides de la fraction MB5 a été réalisé selon une méthode identique par électrophorèse puis par chromatographie sur papier (Figure 9).

Les peptides sont élués, puis caractérisés par dansylation, par une composition en acides aminés (Tableau IV), par recouplement avec les peptides tryptiques obtenus précédemment et par comparaison avec le peptide C-terminal de la myoglobine de Cheval et de Boeuf en considérant les possibilités de remplacement des acides aminés en fonction du code génétique (NIRENBERG)(93) : nous pouvons alors proposer la séquence probable de ces peptides Médian-2 et C-terminal (Tableau IV).





**ELECTROCHROMATOGRAPHIE DE LA FRACTION MB<sub>5</sub> (sur Whatmann N°3)**



**SEPARATION DU MEDIAN-2 (MB<sub>5</sub>-E<sub>2</sub>) ET DES C-PEPTIDES (MB<sub>5</sub>-E<sub>1</sub>C<sub>1</sub> et MB<sub>5</sub>-E<sub>1</sub>C<sub>2</sub>)  
PAR ELECTROCHROMATOGRAPHIE PREPARATIVE**

**TABLEAU IV**  
**COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES**  
**C-TERMINAUX et MEDIAN-2**

---

MB5E1C1 : peptide C'-terminal  
 (11 résidus)

LYS : 0,97 (1) ; GLU : 2,40 (2) ; GLY : 2,17 (2)  
 ALA : 1,71 (2) ; VAL : 0,94 (1) ; LEU : 1,10 (1)  
 TYR : 0,73 (1) ; PHE : 0,92 (1)

Extrémité N-terminale : Alanine (DNS-ALA)

---

MB5E1C2 : peptide C-terminal  
 (11 résidus)

LYS : 1,09 (1) ; GLU : 2,00 (2) ; GLY : 2,17 (2) ;  
 ALA : 2,03 (2) ; VAL : 0,94 (1) ; LEU : 1,25 (1) ;  
 TYR : 0,88 (1) ; PHE : 0,92 (1)

Extrémité N-terminale : Alanine (DNS-ALA)

---

MB5E2 : peptide Médian-2  
 (11 résidus)

LYS : 1,30 (1) ; ARG : 0,89 (1) ; ASP : 2,06 (2) ;  
 SER : 0,97 (1) ; HSE : 0,37 (1) ; GLU : 1,10 (1) ;  
 ALA : 1,17 (1) ; LEU : 2,06 (2) ; PHE : 1,05 (1) ;

Extrémité N-terminale : Sérine (DNS-SER)

SEQUENCE PROBABLE DES PEPTIDES MEDIAN -2 et C-TERMINAL (132-153)

CHEVAL :  
 THR-LYS-ALA-LEU-GLU-LEU-PHE-ARG-ASN-ASP-ILE-ALA-ALA-LYS-TYR-LYS-GLU-LEU-GLY-PHE-GLN-GLY

BOEUF :  
 SER-LYS-ALA-LEU-GLU-LEU-PHE-ARG-ASN-ASP-ALA-ALA-GLU-LYS-TYR-LYS-VAL-LEU-GLY-PHE-HIS-GLY

MOUTON :  
 SER-LYS-ALA-LEU-GLU-LEU-PHE-ARG-ASN-ASP-MET-ALA-ALA-GLU-TYR-LYS-VAL-LEU-GLY-PHE-GLN-GLY 153

SER-----Médian-2-----HSE  
 ALA-----C-Terminal-----GLY

#### IV - ETUDE DU PEPTIDE N-TERMINAL APRES ACTION DE LA TRYPSINE

Une étude comparative des hydrolysats tryptiques des peptides N-terminaux obtenus après action du BrCN sur les globines de Boeuf et de Mouton a été entreprise. Cette étude comparative est identique à celle menée sur l'hydrolysats tryptique de la globine totale : établissement de la carte peptidique (Figure 10), réalisation d'un fractionnement sur colonne de résine d'échanges d'ions, comparaison des courbes d'élution et identification des différents peptides (peptides MBT).

D'autre part, les deux résidus de tryptophane existant dans la molécule de myoglobine sont situés dans le N-peptide au niveau du premier noyau insoluble et une étude particulière a donc été entreprise : une réaction d'Ehrlich effectuée sur toutes les fractions collectées nous a permis de localiser les peptides qui n'avaient pu être isolés lors du fractionnement de l'hydrolysats tryptique de la globine totale.

##### A) Comparaison des courbes d'élution (Figure 11)

Les courbes d'élution sont établies au moyen de la réaction à la ninhydrine. Le comportement en électrochromatographie, les compositions en acides aminés, la localisation sur la courbe d'élution et l'extrémité N-terminale déterminée par dansylation (Tableau V) des peptides MBT2, MBT3, MBT4, MBT'4, MBT5, MBT6, obtenus à partir de l'hydrolysats tryptique du N-peptide de la globine, sont identiques respectivement à ceux des peptides de Boeuf BBT2, BBT3, BBT4, BBT'4, BBT5, BBT6. D'ailleurs ces peptides avaient été isolés lors du fractionnement de l'hydrolysats tryptique de la globine totale excepté MBT6 qui ne diffère de MT6 que par un résidu de LYS et d'Homosérine (MBT6 est donc le peptide C-terminal de ce N-peptide, le peptide MBT'2 est un produit de désamidation du peptide MBT2).

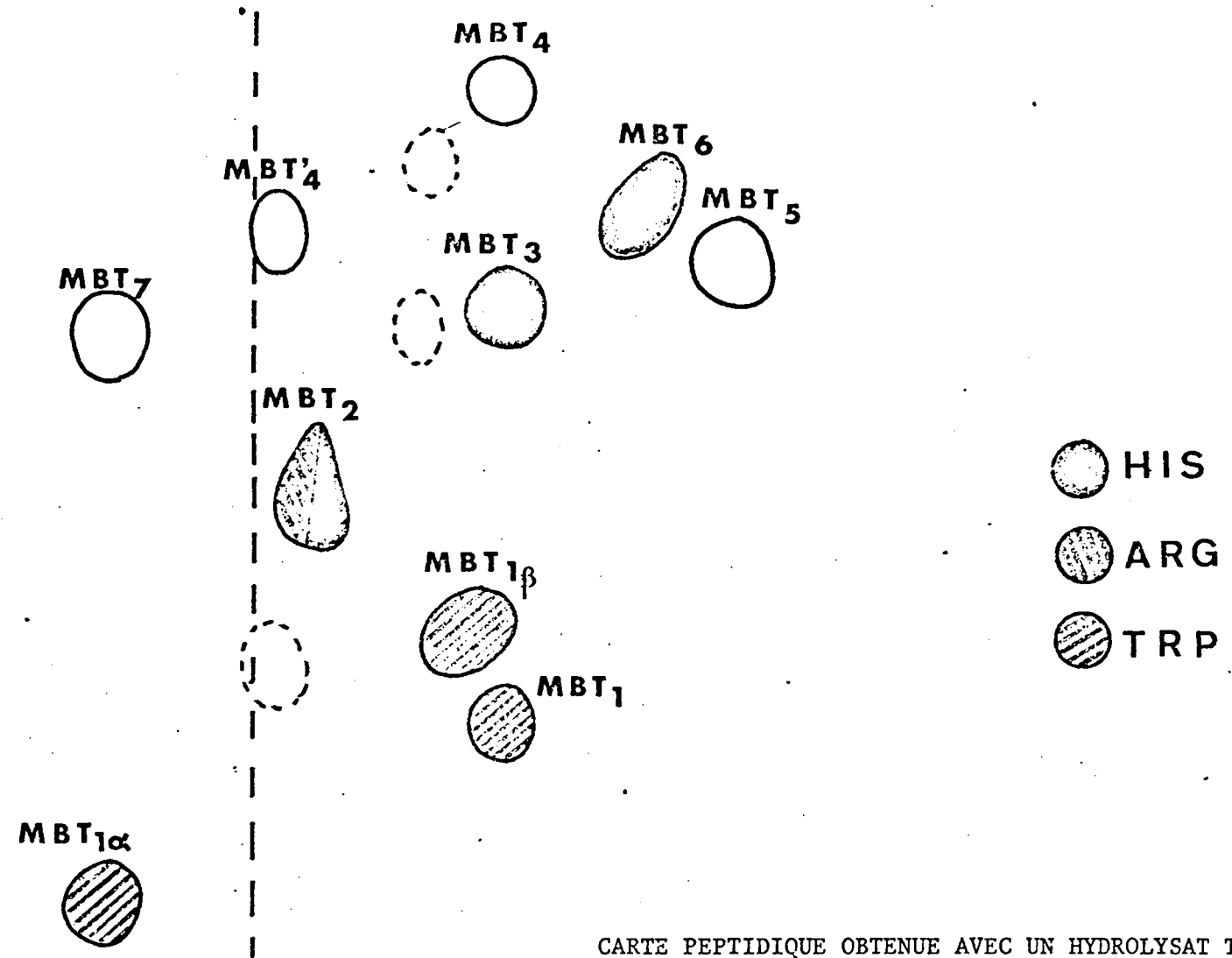
##### B) Etude des peptides "Ehrlich positif"

Les peptides contenant les résidus de tryptophane ont fait l'objet d'une étude particulière. En premier lieu, nous avons utilisé la technique d'élution de taches de LEHMAN (94). Elle n'est cependant applicable qu'aux petits peptides. Néanmoins, elle nous a permis de caractériser le peptide correspondant à la séquence 12 à 16 ASN-ALA-TRP-GLY-LYS (MBT1 $\beta$ ) (Fig. 10): nous avons effectué une électrochromatographie, la feuille est révélée au réactif d'Ehrlich. Les spots peptidiques révélés sont découpés, élués puis hydrolysés. La composition en acides aminés qualitatives du peptide MBT1 $\beta$  des différents résidus a été analysée par

Dépôt

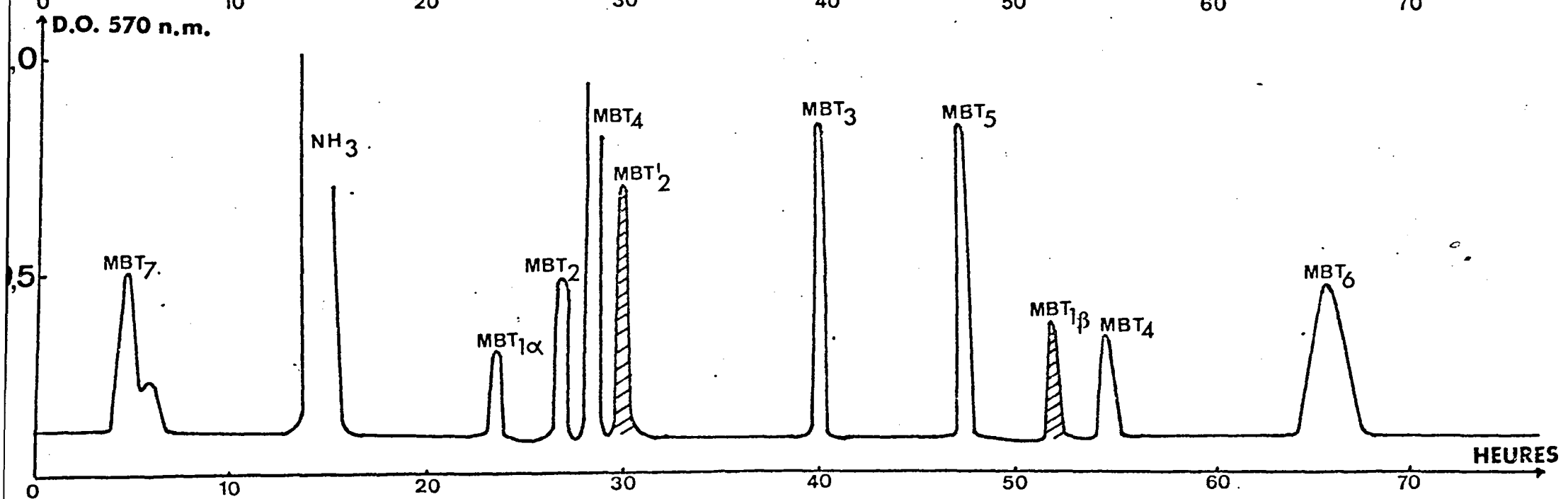
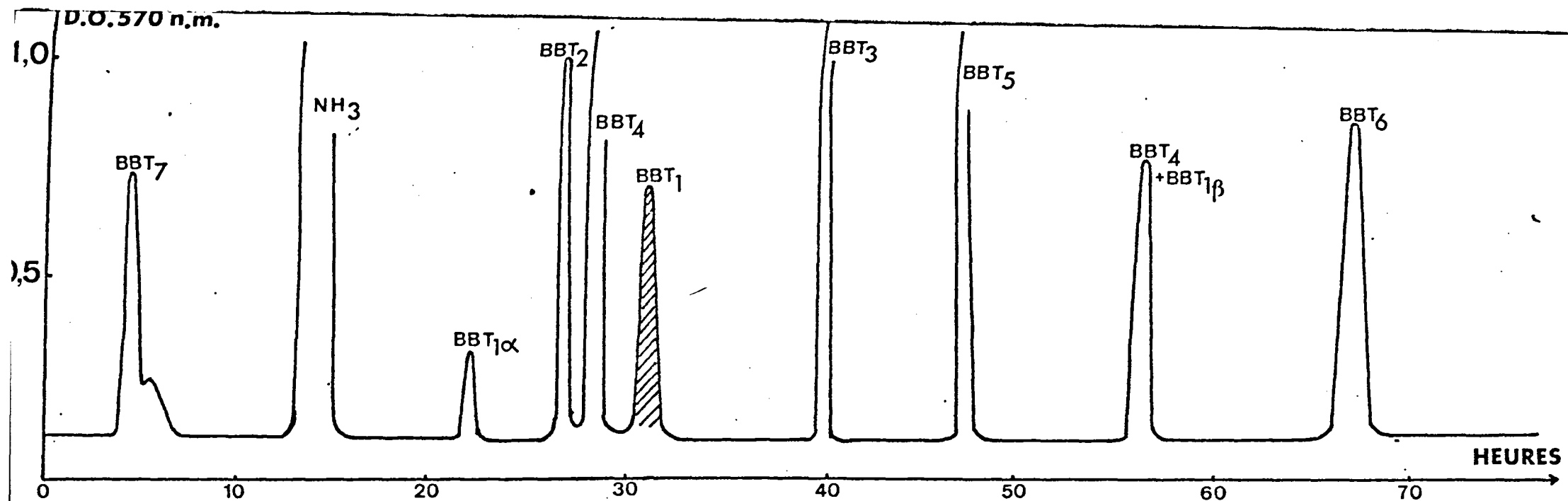
⊕ ————— ELECTROPHORESE PH 3,9 ————— ⊖  
(7 heures sous 630 volts)

CHROMATOGRAPHIE  
(n BuOH/ Pyr/ AcAc/ Eau - 16 heures)  
150 100 30 120



CARTE PEPTIDIQUE OBTENUE AVEC UN HYDROLYSAT TRYPSIQUE  
DU SEGMENT N-TERMINAL (MB4 OBTENU APRES ACTION DU BrCN) DE LA  
MYOGLOBINE DE MOUTON

FIGURE 10



COURBES d'ELUTION DES HYDROLYSATS TRYSIQUES DES SEGMENTS N-TERMINAUX (BB3 et MB4 OBTENUS APRES ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE) DE LA GLOBINE DE BOEUF (pics BBT) ET DE LA GLOBINE DE MOUTON (pics MBT) - REACTION NINHYDRINE

**TABLEAU V**  
COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES ISOLES  
APRES HYDROLYSE TRYPSIQUE DU SEGMENT N-TERMINAL (MB4) DE LA MYOGLOBINE  
DE MOUTON

---

<u>MBT1</u> $\alpha$	: r�s <span>�</span> sidus 1 � 11 ASP : 1,17 (1) ; SER : 1,01 (1) ; GLU : 2,11 (2) ; GLY : 2,17 (2) ; VAL : 0,70 (1) ; LEU : 2,82 (3) Extrémité N-terminale : Glycocolle (DNS-GLY)
<u>MBT1</u> $\beta$	: r�s <span>�</span> sidus 12 � 16 LYS : 0,91 (1) ; ASP : 1,18 (1) ; GLY : 0,98 (1) ; ALA : 0,94 (1) Extrémité N-terminale : acide aspartique ou asparagine (DNS-ASX)
<u>MBT2</u>	: r�s <span>�</span> sidus 17 � 31 HIS : 0,90 (1) ; ARG : 0,82 (1) ; ASP : 1,23 (1) ; GLU : 2,98 (3) ; GLY : 1,92 (2) ; ALA : 2,12 (2) ; VAL : 3,02 (3) ; ILE : 0,83 (1) ; LEU : 1,18 (1) Extrémité N-terminale : Valine (DNS-VAL)
<u>MBT3</u>	: r�s <span>�</span> sidus 32 � 42 LYS : 1,07 (1) ; HIS : 0,93 (1) ; THR : 1,87 (2) ; GLU : 2,23 (2) ; PRO : 1,13 (1) ; GLY : 0,89 (1) ; LEU : 2,02 (2) ; PHE : 0,85 (1) Extrémité N-terminale : Leucine (DNS-LEU)
<u>MBT4</u>	: r�s <span>�</span> sidus 43 � 45 LYS : 0,96 (1) ; ASP : 1,06 (1) ; PHE : 0,98 (1) Extrémité N-terminale : Phénylalanine (DNS-PHE)
<u>MBT5</u>	: r�s <span>�</span> sidus 46-47 LYS : 1,02 (1) ; PHE : 0,98 (1) Extrémité N-terminale : Phénylalanine (DNS-PHE)
<u>MBT'4</u>	: r�s <span>�</span> sidus 43 � 47 LYS : 2,08 (2) ; ASP : 0,93 (1) ; PHE : 2,00 (2) Extrémité N-terminale : Phénylalanine (DNS-PHE)
<u>MBT6</u>	: r�s <span>�</span> sidus 48 � 50 LYS : 0,88 (1) ; HIS : 0,90 (1) ; LEU : 1,22 (1) Extrémité N-terminale : Histidine (DNS-HIS)
<u>MBT7</u>	: r�s <span>�</span> sidus 51 � 55 THR : 1,29 (1) ; HSE : 0,33 (1) ; GLY : 2,10 (2) ; ALA : 1,27 (1) Extrémité N-terminale : Thréonine (DNS-THR)

électrochromatographie sur papier. Le peptide MBT1 $\alpha$  (résidus 1 à 11) n'a pu être étudié par cette technique en raison de sa taille trop importante.

Le fractionnement sur colonne de résine d'échange d'ions, nous a permis d'isoler des peptides qui réagissent avec le réactif d'Ehrlich. Après détermination de leur composition en acides aminés (Tableau VI), les séquences de ces peptides peuvent être déduites par analogie : MBT1 $\alpha$  est identique à BBT1 $\alpha$  ; MBT1 $\beta$  ne se différencie de son homologue BBT1 $\beta$  que par la leucine au lieu d'une alanine (position 9). (Figure 12)

#### V - ETUDE DU PEPTIDE MEDIAN 1 APRES ACTION DE LA CHYMOTRYPSINE

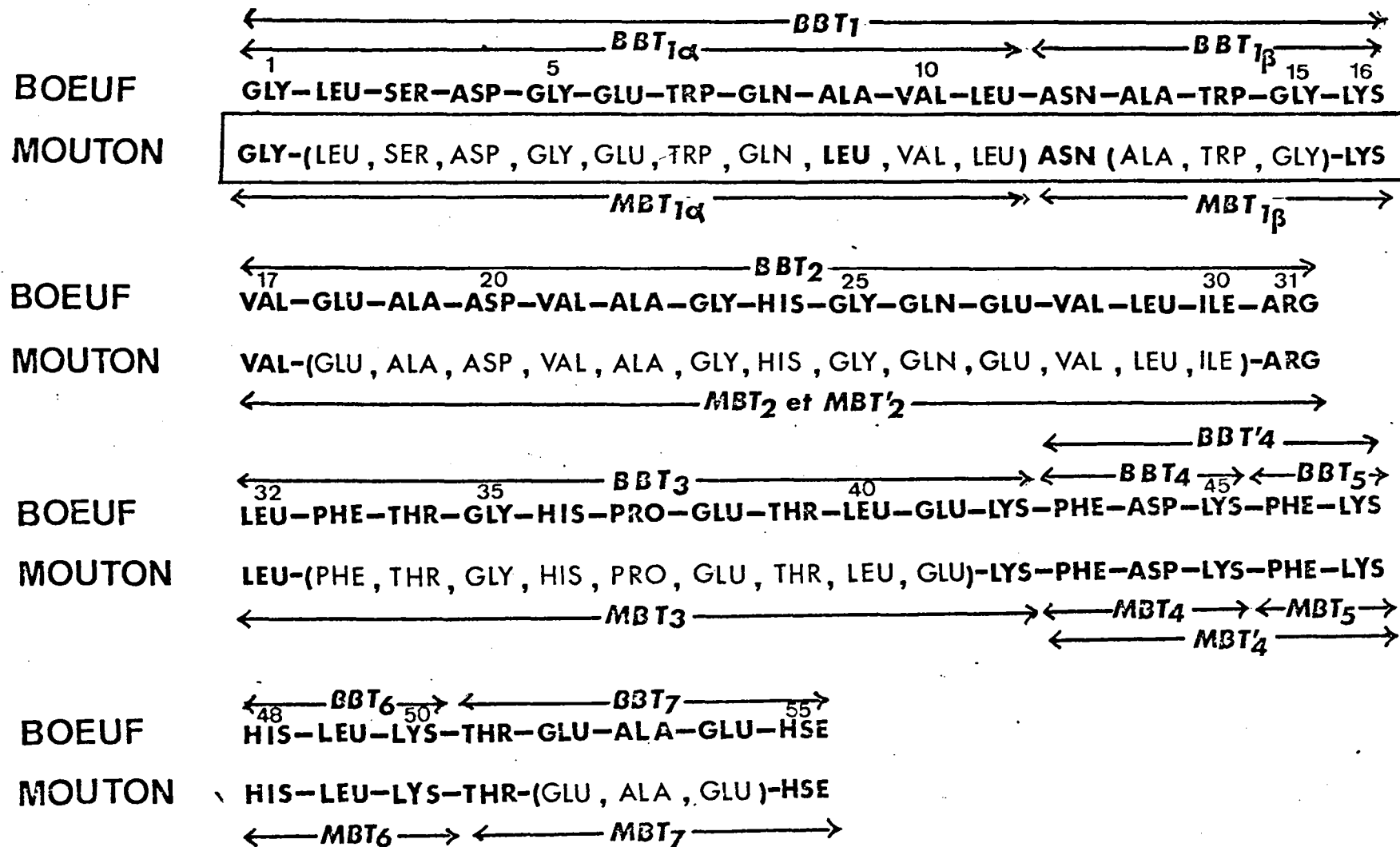
Le dosage des acides aminés de la fraction MB3 indique qu'elle comporte 76 résidus. En outre, elle contient les deux peptides du "Core". De ce fait, nous avons hydrolysé ce polypeptide par la chymotrypsine afin d'effectuer des recoupements avec les peptides tryptiques. D'ailleurs une étude similaire de l'hydrolysate chymotrypsique du peptide médian de Boeuf a été réalisée au laboratoire : nous pourrions donc entreprendre une étude comparative.

##### A) Spécificité de la chymotrypsine

La spécificité d'action de la chymotrypsine est plus large que celle de la trypsine : la coupure des liaisons peptidiques a principalement lieu au niveau des fonctions carboxyliques des acides aminés aromatiques (Tyrosine, Phénylalanine et Tryptophane) mais secondairement, la coupure peut s'effectuer au niveau des liaisons leucyle, méthionyle et histidyle.

D'autre part, les préparations commerciales de chymotrypsine sont généralement souillées par la trypsine : pour éviter cette contamination, nous pouvons traiter l'enzyme par un inhibiteur spécifique de la trypsine (par le T.L.C.K. par exemple : le N-tosyl-LYSYL-chlorométhyl-cétone) mais l'activité résiduelle de la trypsine reste suffisante pour hydrolyser certaines liaisons lysyles.

Néanmoins, après action de la chymotrypsine, il nous est impossible d'isoler le "centre basique" : le peptide correspondant à la séquence 77 à 86 contenant 3 résidus de lysine et 2 résidus d'histidine est fortement retenu sur la résine d'échange d'ion en raison de son caractère très basique.



ETABLISSEMENT DE LA STRUCTURE PROBABLE DES PEPTIDES TRYPSIQUES  
 DU SEGMENT N-TERMINAL DE LA MYOGLOBINE DE MOUTON (MBT) AVEC LES PEPTIDES TRYPSIQUES  
 DU SEGMENT N-TERMINAL DE LA MYOGLOBINE DE BOEUF (BBT)



B) Etude comparative des hydrolysats chymotrypsiques des peptides "Médian" de Boeuf et de Mouton

1°) Etude de la carte peptidique (Figure 13)

Nous avons effectué une électrochromatographie de l'hydrolysat chymotrypsique du M-peptide de Mouton. La révélation des spots peptidiques par la ninhydrine 1 p. 100 nous a permis de juger la ressemblance des cartes peptidiques. Après récupération des taches peptidiques selon la technique de LEHMAN ( 95 ), nous avons pu ainsi caractériser deux peptides neutres, à caractère hydrophobe ; VAL-LEU (résidus 114-115) toujours difficile à isoler donnant après dansylation DNS-VAL et DNS-VAL-LEU et GLY-GLY-ILE-LEU (résidus 72 à 76 - DNS-GLY).

Afin d'étudier les peptides plus importants, nous avons effectué un fractionnement de l'hydrolysat chymotrypsique sur colonne de résine d'échange d'ion.

2°) Comparaison des courbes d'élution (Figure 14)

Les courbes d'élution sont établies au moyen de la réaction à la ninhydrine. La localisation des peptides sur la courbe d'élution, le comportement en électrochromatographie, la composition en acides aminés (Tableau VI ), le dansyl-acide aminé N-terminal des peptides chymotrypsiques des peptides médians de Boeuf et de Mouton sont identiques. Seul le peptide MBC-14 ne se différencie de son homologue BBC-14 que par sa composition en acide aminé et son dansyl - acide aminé GLY au lieu de ALA (Boeuf) en position **124**.

3°) Résultats

Tous ces résultats nous permettent l'établissement d'une structure provisoire du segment de la myoglobine de Mouton (Figure 15)

VI - CONCLUSION ET DISCUSSION

L'enchaînement des acides aminés de la myoglobine de Mouton a donc été abordé par l'étude comparative des peptides libérés par action de la trypsine et par action au bromure de cyanogène sur la globine. La présence d'une troisième méthionine en position **142** n'a pas été gênante car le fragment C-terminal est alors coupé en deux par le bromure de cyanogène et le fractionnement des fragments N-terminal et Médian par gel-filtration s'en trouve facilité. Les deux peptides bromure de

Dépôt

⊕

ELECTROPHORESE

PH 3,9

⊖

(7 heures sous 630 volts)

CHROMATOGRAPHIE  
(n. BuOH/ Pyr / AcAc / Eau - 16 heures)

150 100 30 120

MBC'14



MBC14



MBC7



MBC13



MBC2



MBC11



MBC8



MBC9



MBC1



MBC3



MBC'4



MBC4



MBC5



MBC10



MBC12



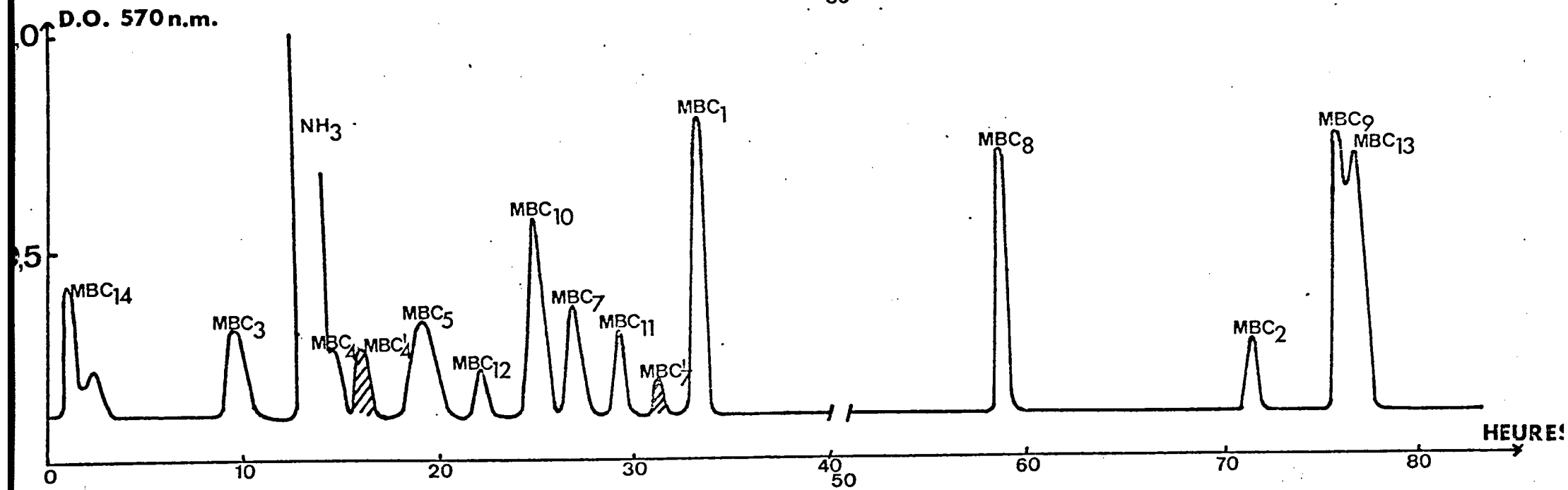
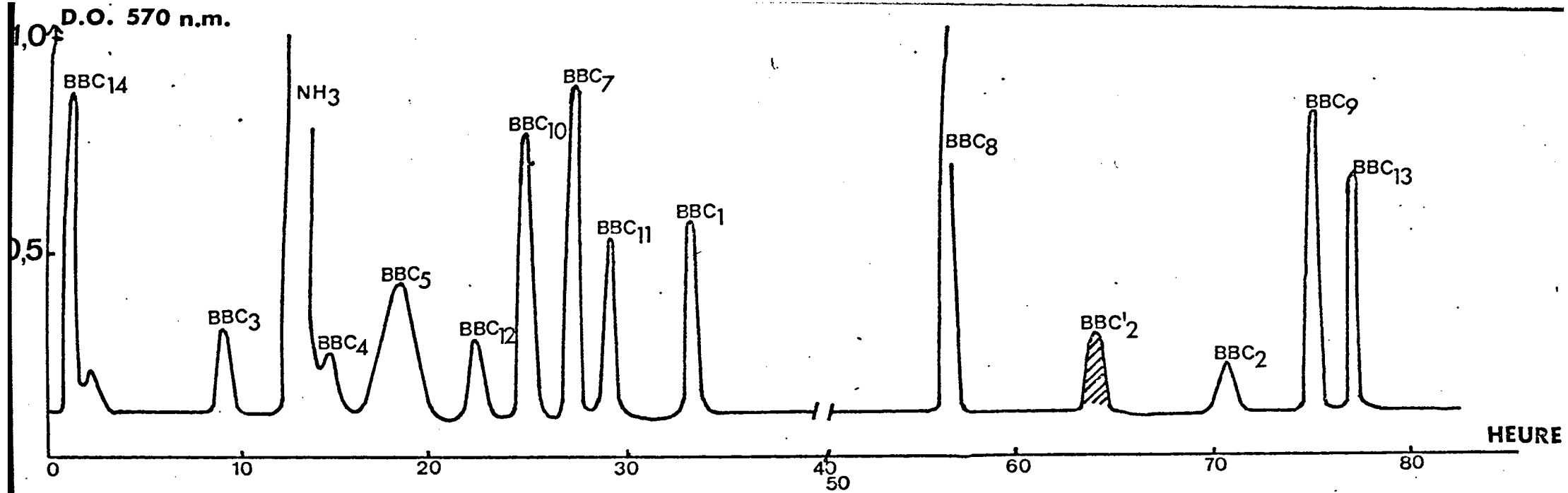
HIS



TYR

CARTE PEPTIDIQUE OBTENUE AVEC UN HYDROLYSAT  
CHYMOTRYPSIQUE DU SEGMENT MEDIAN-1 (MB3 OBTENU APRES ACTION  
DU BrCN) DE LA GLOBINE DE MOUTON

FIGURE 13



COURBES D'ELUTION DES HYDROLYSATS CHYMOTRYPSIQUES DES SEGMENTS MEDIANS (BB2 ET MB3 OBTENUS APRES ACTION DE BrCN)  
DE LA GLOBINE DE BOEVIN (BBC) ET DE LA GLOBINE DE MOUTON (MBC)

FIGURE 14

**TABLEAU VI**  
COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES  
DU PEPTIDE MEDIAN-1 DE LA MYOGLOBINE DE MOUTON, OBTENUE APRES ACTION DU  
BROMURE DE CYANOGENE

---

MBC1 : résidus 56 à 61

LYS : 0,93 (1) ; ASP : 1,05 (1) ; SER : 0,91 (1) ; GLU : 1,05 (1)

ALA : 1,04 (1) ; LEU : 1,00 (1)

Extrémité N-terminale : Lysine (DNS-LYS)

MBC2 : résidus 62 à 64

LYS : 1,61 (2) ; HIS : 1,39 (1)

Extrémité N-terminale : Lysine (DNS-LYS)

MBC3 : résidus 65 à 69

ASP : 1,15 (1) ; THR : 0,85 (1) ; GLY : 1,03 (1) ; VAL : 0,88 (1) ;

LEU : 1,08 (1)

Extrémité N-terminale : Glycocolle (DNS-GLY)

MBC4 : résidus 70 à 72

THR : 0,78 (1) ; ALA : 1,12 (1) ; LEU : 1,09 (1)

Extrémité N-terminale : Thréonine (DNS-THR)

MBC'4 : résidus 70 à 76

THR : 0,49 (1) ; GLY : 1,64 (2) ; ALA : 1,56 (1) ; ILE : 1,04 (1) ;

LEU : 2,28 (2)

Extrémité N-terminale : Thréonine (DNS-THR)

MBC5 : résidus 73 à 76

GLY : 1,97 (2) ; ILE : 0,96 (1) ; LEU : 1,07 (1)

Extrémité N-terminale : Glycocolle (DNS-GLY)

MBC6 : non isolé

"centre basique" de la myoglobine - résidus 77 à 89

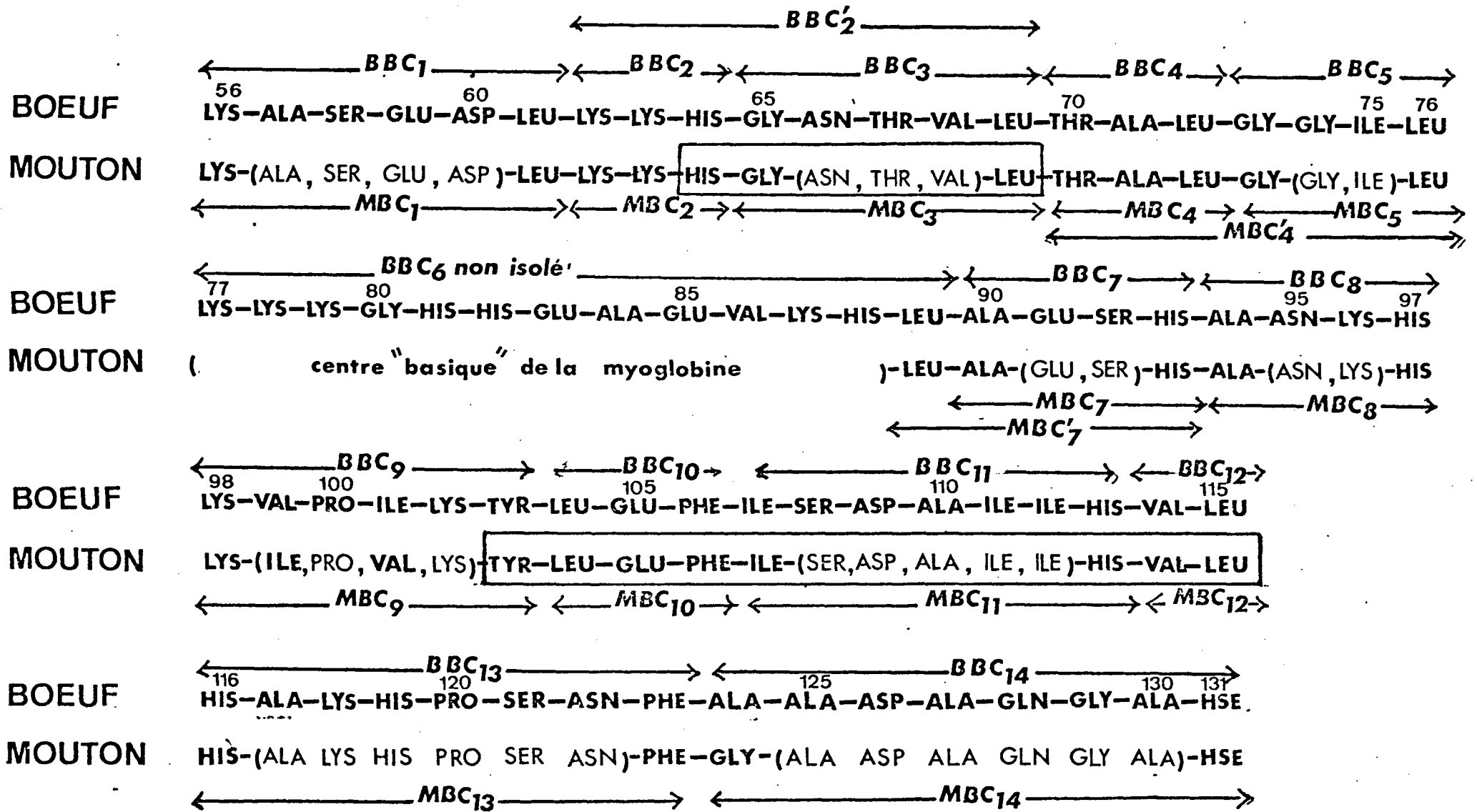
MBC7 : résidus 90 à 93

HIS : 0,85 (1) ; SER : 0,95 (1) ; GLU : 1,00 (1) ; ALA : 1,00 (1)

Extrémité N-terminale : Alanine (DNS-ALA)

TABLEAU VI (suite)

- MBC'7 : résidus 89 à 93  
HIS : 0,49 (1) ; SER : 1,13 (1) ; GLU : 1,16 (1) ; ALA : 1,13 (1)  
LEU : 1,07 (1)  
Extrémité N-terminale : Leucine (DNS-LEU)
- MBC'8 : résidus 94 à 97  
LYS : 0,91 (1) ; HIS : 1,00 (1) ; ALA : 1,05 (1)  
Extrémité N-terminale : Alanine (DNS-ALA)
- MBC9 : résidus 98 à 103  
LYS : 2,24 (2) ; PRO : 1,00 (1) ; VAL : 0,98 (1) ; ILE : 0,85 (1)  
TYR : 0,92 (1)  
Extrémité N-terminale : Lysine (DNS-LYS)
- MBC10 : résidus 104 à 106  
GLU : 1,03 (1) ; LEU : 0,99 (1) ; PHE : 0,98 (1)  
Extrémité N-terminale : Leucine (DNS-LEU)
- MBC11 : résidus 107 à 113  
HIS : 0,95 (1) ; ASP : 0,82 (1) ; SER : 0,74 (1) ; ALA : 0,73 (1)  
ILE : 3,54 (3)  
Extrémité N-terminale : Isoleucine (DNS-ILE)
- MBC12 : résidus 114-115  
VAL : 1,00 (1) ; LEU : 0,99 (1)  
Extrémité N-terminale : Valine (DNS-VAL)
- MBC13 : résidus 116 à 123  
LYS : 1,20 (1) ; HIS : 1,81 (2) ; ASP : 1,02 (1) ; SER : 0,91 (1)  
PRO : 1,06 (1) ; ALA : 0,97 (1) ; PHE : 1,04 (1)  
Extrémité N-terminale : Histidine (DNS-HIS)
- MBC14 : résidus 124 à 131  
ASP : 0,91 (1) ; HSE : 0,64 (1) ; GLU : 1,09 (1) ; GLY : 2,19 (2)  
ALA : 3,16 (3)  
Extrémité N-terminale : Glycocolle (DNS-GLY)



ETABLISSEMENT DE LA STRUCTURE PROBABLE DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES DU SEGMENT  
 MEDIAN-1 DE LA MYOGLOBINE DE MOUTON (MBC) PAR ANALOGIE AVEC LES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES DU

SEGMENT MEDIAN DE LA MYOGLOBINE DE BOEUF (MBC)

FIGURE 15

cyanogène en position C-terminale sont facilement isolés par électrochromatographie sur papier : ce dernier fractionnement est cependant fréquemment compliqué par la désamination partielle de glutamine en position 152 (peptide C-terminal) et de Asparagine en position 140 (peptide médian-2). Si les "cores" restent inaccessibles à l'hydrolyse trypsique, la coupure de la globine par le BrCN et l'hydrolyse chymotrypsique des fragments obtenus permettent de vérifier l'alignement des unités tryptiques libérées à partir de la globine totale et de déterminer la structure des peptides du "Core".

L'étude de chaque peptide libéré, par comparaison avec l'homologue dans la myoglobine de référence (comportement en électrochromatographie, localisation sur les courbes d'élution, composition en acides aminés, le dansyl acide aminé N-terminal, les recoupements possibles avec les peptides tryptiques de la globine totale) a permis l'établissement de la structure primaire provisoire de la myoglobine de Mouton (96)

La structure primaire de la myoglobine de Mouton établie grâce à la méthode comparative, doit néanmoins être confirmée par une étude directe de la structure des peptides et principalement de celle des peptides qui se révèlent différents de ceux de la myoglobine de référence. En effet, même pour des peptides qui ont un comportement ou une composition en acides aminés identique à celui de leur homologue de la myoglobine de référence, il peut exister des inversions dans la chaîne peptidique telles que HIS-LYS-VAL-PRO-ILE-LYS-TYR (Boeuf) et HIS-LYS-ILE-PRO-VAL-LYS-TYR (Mouton). De plus, dans le cas de peptide différents, il faut localiser la mutation sans se contenter des probabilités que donne le code génétique.

ETUDE DIRECTE DES PEPTIDES ISOLES.



L'étude directe des peptides fait intervenir l'hydrolyse totale acide et enzymatique, l'étude des extrémités N et C-terminales et la méthode de dégradation récurrente d'EDMAN.

#### I - COMPOSITION EN ACIDES AMINES :

##### 1°) Hydrolyse acide totale

La composition en acides aminés de chaque peptide est déterminée après hydrolyse chimique par HCl 5,6 N en tube scellé sous vide à 105°C pendant 24 heures. Lorsque le peptide contient de nombreux acides aminés hydrophobes (Ile-Val-Leu), il est nécessaire d'effectuer l'hydrolyse pendant 72 heures car les liaisons Ile-Ile ou Val-Leu sont difficiles à rompre. La composition en acides aminés de chaque hydrolysats est ensuite déterminée au moyen d'un analyseur automatique d'acides aminés (type JEOL 5 AH).

##### 2°) Hydrolyse totale enzymatique

Lorsque la composition de l'hydrolysats révèle la présence d'acides aminés dicarboxyliques ou lorsque nous soupçonnons la présence de tryptophanne (réaction d'Ehrlich positive), nous devons effectuer une hydrolyse enzymatique par l'aminopeptidase M pendant 24 heures. Le dosage de l'hydrolysats à l'autoanalyseur nous permet alors de distinguer les deux amides (Glutamine et Asparagine) des autres acides aminés dicarboxyliques correspondant et le Tryptophanne qui serait détruit lors d'une hydrolyse acide.

#### II - ETUDE DES ACIDES AMINES N-TERMINAUX

Les acides aminés N-terminaux peuvent être identifiés par la méthode des dinitrophényl acides aminés de SANGER (97) ou par la méthode des Dansyls acides aminés de GRAY et HARTLEY (98). La méthode des DNS-acides aminés est plus sensible (2 à 10nmoles) que la méthode des DNP-acides aminés (20 à 50nmoles) et elle est d'une pratique plus simple : c'est la méthode qui est la plus couramment utilisée.

La séquence N-terminale des peptides est étudiée à l'aide des cinétiques d'hydrolyse par l'Aminopeptidase M : des aliquots de la solution peptidique soumise à l'hydrolyse enzymatique sont prélevés à des temps variables et les acides aminés libérés sont dosés par un analyseur d'amino-acides.

### III - ETUDE DES ACIDES AMINES C-TERMINAUX

Les acides aminés C-terminaux peuvent être identifiés par des méthodes chimiques (hydrazinolyse) ou après action des carboxypeptidases A ou B. En particulier, les carboxypeptidases hydrolysent les acides aminés de configuration L ayant une fonction carboxylique libre : la carboxypeptidase A n'agit pas lorsque l'acide aminé C-terminal est la proline ou l'hydroxyproline, la lysine, l'arginine ou si l'acide aminé qui précède le résidu C-terminal est l'acide glutamique ou la proline ; la carboxypeptidase B hydrolyse les peptides dont le résidu C-terminal est la lysine, l'arginine ou l'ornithine.

Une cinétique d'hydrolyse par les carboxypeptidases peut également nous permettre de déterminer la séquence peptidique C-terminale. Cependant, lorsque le peptide possède la lactone de l'homosérine en position C-terminale, il convient de régénérer l'homosérine par hydrolyse à l'aide d'une solution de pyridine et d'acide acétique à pH 6,5 avant de pouvoir faire agir les carboxypeptidases.

### IV - METHODE DE DEGRADATION RECURRENTE D'EDMAN

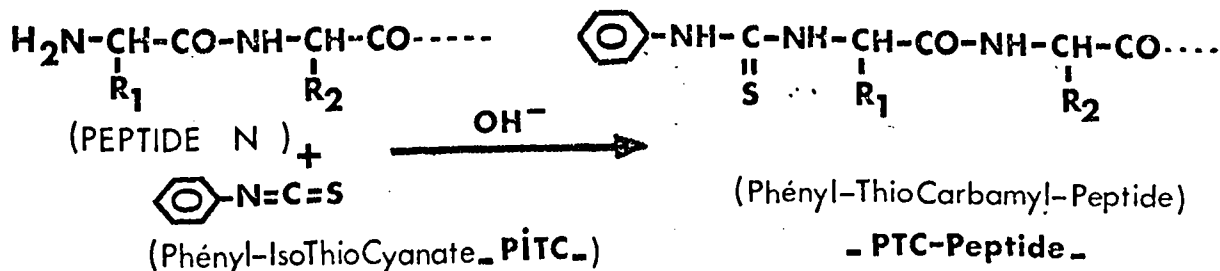
Dès 1930, ABDERHALDEN et BROKMAN ( 99 ) avaient observé que le phénylthioisocyanate (PITC) pouvait se fixer sur les fonctions  $\alpha$ -aminés des peptides et des protéines. Utilisant cette réaction de N-arylation, EDMAN (100) a mis au point une méthode de dégradation récurrente permettant la détermination de la séquence en acides aminés d'un peptide ou d'une protéine.

#### A) Mécanisme de la réaction

EDMAN (101) effectue une réaction de fixation du PITC sur la fonction  $\alpha$ -aminée libre du peptide, en milieu pyridine/eau (1 : 1)(v/v) à pH 8,6 et à 40°C. En milieu anhydre et acide le phénylthiocarbamyl peptide se cyclise et la première liaison peptidique est rompue : il se forme d'une part une phénylhydantoïne que l'on peut identifier et d'autre part un peptide dont la fonction  $\alpha$ -aminée libre correspond au second résidu de la chaîne peptidique initiale ; ce peptide peut alors subir un nouveau cycle de dégradation.

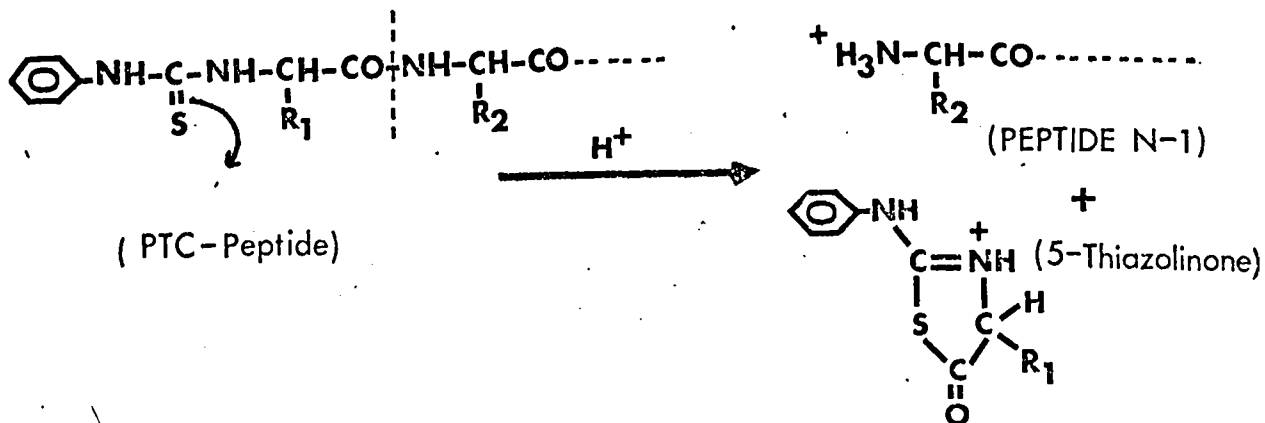
Cette réaction de dégradation récurrente d'Edman s'effectue en trois étapes successives :

a) Première étape : la réaction de couplage



La fixation de PITC sur les fonctions  $\alpha$ -aminées libres du premier des N-résidus que compte la chaîne peptidique, n'est effective qu'en réalisant la réaction en milieu aqueux à pH 8,5 - 9,5 et à 40°C-50°C.

b) Seconde étape : la réaction de clivage

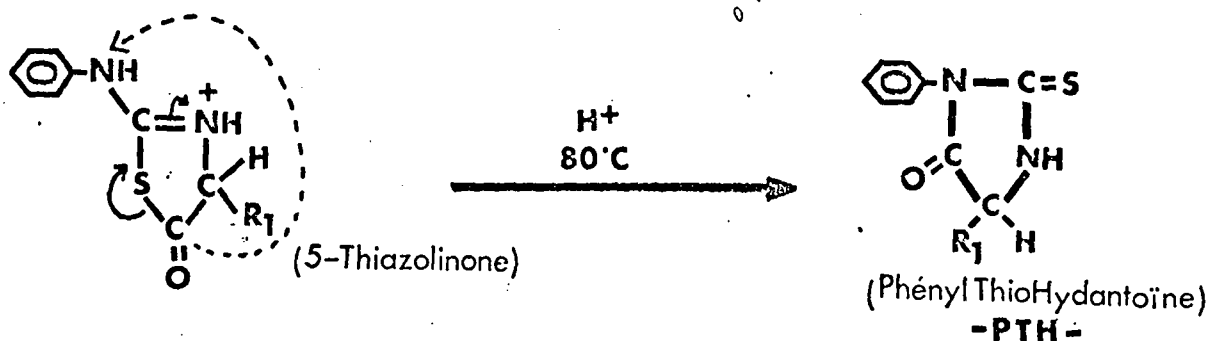


Un acide fort et anhydre permet la rupture de la liaison peptidique : il y a formation d'une 5-thiazolinone et régénération d'une fonction  $\alpha$ -aminée. Le peptide dépossédé du premier de ses résidus peut alors être soumis à un second cycle de dégradation.

Notons cependant qu'il est nécessaire d'effectuer préalablement un séchage poussé du tube de réaction avant d'entreprendre cette réaction de clivage étant donné que l'étape précédente était réalisée en milieu basique et surtout en présence d'eau.

c) Troisième étape : la réaction de conversion

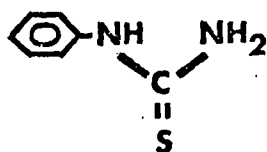
La 5-thiazolinone formée au cours de l'étape précédente n'est cependant pas stable. Elle est alors transformée en phénylthiohydantoïne (PTH) plus stable.



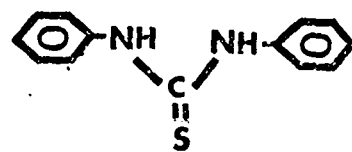
La thiazolinone soluble dans les solvants organiques peut être séparée du peptide résiduel. Puis, à chaud et en milieu acide dilué, la thiazolinone est convertie en PTH.

Remarques :

Lorsque les différentes étapes ne sont pas effectuées sous atmosphère d'azote, ou encore que les conditions opératoires ne sont pas convenablement respectées, il se forme des produits de décomposition (Mono ou Di-phénylthiourées)



(Mono-PhénylThioUrée)



(Di-PhénylThioUrée)

B) Choix des conditions opératoires

1°) Choix du tampon de couplage

Le choix du tampon de couplage est important pour obtenir une fixation quantitative du PITC sur le peptide ou la protéine. Deux critères guident ce choix : le pH, qui doit être entre 8,5 et 9,5 et la solubilité du peptide dans le tampon. Notons toutefois que le système tampon choisi est en général volatil : il peut ainsi être facilement éliminé avant d'effectuer la réaction de clivage.

EDMAN (102) utilise un tampon pyridine/eau. De nombreux auteurs ont préconisé un système tampon particulier, nous pourrions en dresser un catalogue. Citons néanmoins ceux qui sont les plus couramment utilisés.

- Pyridine/Dioxane/Eau - pH 9,0 (103)
- Pyridine/Eau/Diméthylallylamine (DMAA) - pH 9,0 (104)
- n-propanol/Eau/Diméthylallylamine (DMAA) - pH 9,5 (105)
- N,N,N',N'-tetrakis (2-hydroxypropyl) éthylène diamine. (Quadrol) /Eau/Diméthylallylamine (DMAA) - pH 9,0 (106)

2°) Choix de l'acide qui effectuera la réaction de clivage et de cyclisation

EDMAN effectue la réaction de clivage successivement en solution acide diluée (Nitrométhane/HCl -107 ), en solution acide concentré (acide acétique/HCl 2 M -108 ), Acide acétique glacial/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> M et il constate certes une coupure rapide du PTC-peptide, mais le rendement de la réaction est peu élevé. Ce n'est qu'en utilisant un acide fort anhydre (acide trifluoroacétique, acide heptafluorobutyrique) qu'il observe une coupure quantitative de la liaison peptidique. (109) Si nous voulons effectuer une réaction en milieu anhydre cela suppose donc un séchage très poussé du tube de réaction et l'utilisation d'un acide préalablement déshydraté.

3°) Extraction de la thiazolinone

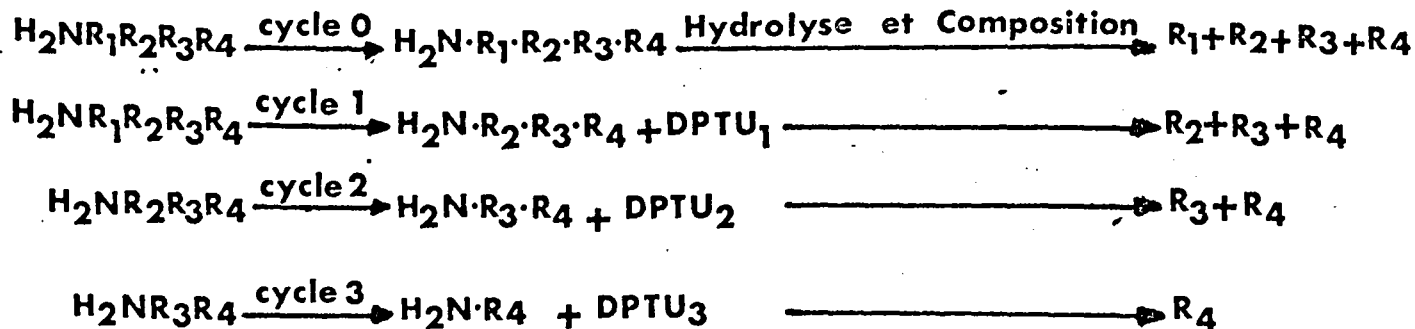
La thiazolinone est soluble dans les solvants organiques. Généralement le chlorure d'éthylène (110 ) ou l'éther (111 ) sont utilisés pour extraire la thiazolinone.

L'analyse d'une séquence en acide aminé après dégradation récurrente d'EDMAN peut être envisagée selon différentes techniques : les méthodes indirectes (méthode EDMAN-Dansyl et méthode SOUSTRACTIVE) ou les méthodes directes (méthode EDMAN manuelle et automatique).

C) Les méthodes indirectes

1°) Méthode soustractive (112)

La dégradation est effectuée et la composition en amino-acide du peptide résiduel (un aliquot) est déterminée à l'analyseur automatique : l'acide aminé N-terminal est alors identifié par différence.

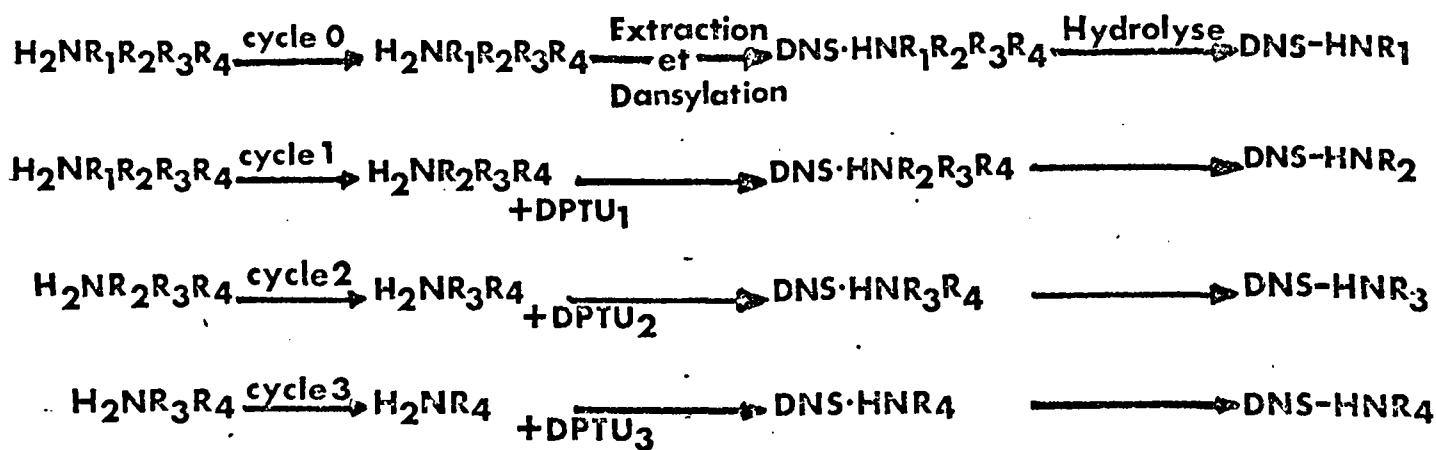


Cependant, cette technique demande une quantité importante de peptide au départ et nous ne l'avons pas retenue.

2°) La méthode de dégradation EDMAN-DANSYL

a) Principe

La réaction de dansylation est très sensible (2 à 10<sup>10</sup> moles de peptide sont suffisantes pour en identifier l'extrémité N-terminale). GRAY (113) a préconisé une dégradation suivie d'une identification de la fonction α-aminée du résidu nouvellement apparu par une réaction de dansylation.



b) Protocole expérimental

200 µl d'une solution peptidique (200 à 500 nanomoles) dans l'eau distillée sont placés dans un tube conique spécial. On ajoute 200 µl de pyridine Merck (le pH est alors compris entre pH 8 et pH 9) et 15 µl de phénylthioisocyanate (PITC, Pierce Chemical). On agite vigoureusement et on laisse le mélange sous bullage d'azote dans un bain-marie à 45°C pendant 90 minutes. Le PTC-peptide est séché sous vide à 60°C sur P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, NaOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Si le résidu est huileux, on ajoute 50 µl d'alcool éthylique et on sèche à nouveau. Au résidu sec on ajoute ensuite 200 µl d'acide trifluoroacétique anhydre, on agite et on laisse le tube conique 30 minutes au bain-marie à 45°C. Après un nouveau séchage sous vide en présence de soude en pastilles, le résidu est repris par 200 µl d'eau distillée et 1 ml d'acétate de butyle afin d'éliminer la thiazolinone et les thiourées formées. Après agitation, on centrifuge et on élimine la phase supérieure organique. Cette extraction est répétée deux fois. On sèche alors sous vide et sur soude en pastilles la phase aqueuse rési-

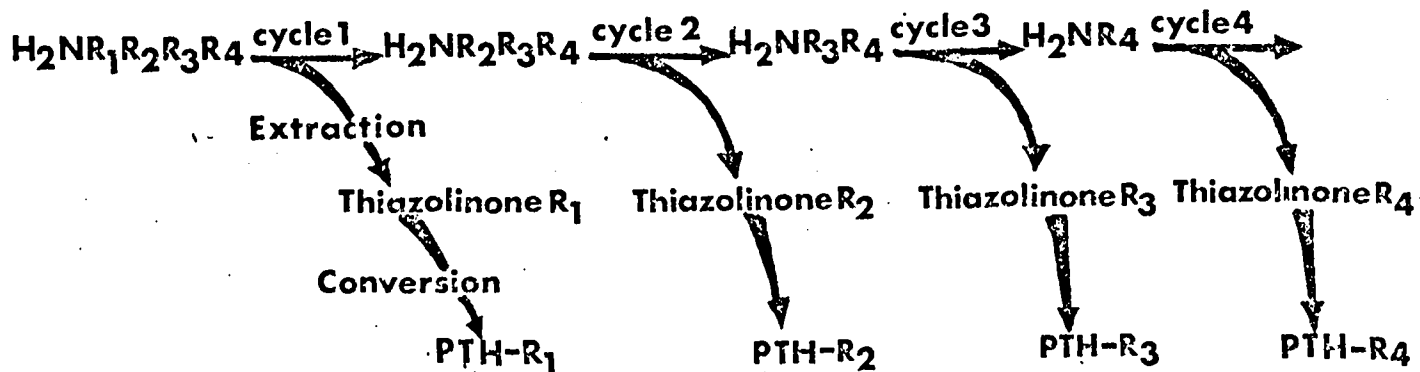
duelle, on reprend ensuite par 200 µl d'eau, on prélève 5 µl pour déterminer l'acide aminé N-terminal par la méthode des Dansyls décrite plus loin. Le peptide résiduel peut alors être soumis à un nouveau cycle de dégradation.

C) Les méthodes directes

1°) Méthodes manuelles

a) Principe

La méthode manuelle permet d'identifier des acides aminés N-terminaux d'une chaîne peptidique sous forme de PTH acide aminé (\*)



b) Mode opératoire

α) Couplage

1 µMole de peptide sous forme d'un résidu sec et lyophilisé est placée dans un tube conique. On le dissout dans 100 µl de tampon Propanol/Eau/N-allyl-NN' diméthylamine (15 : 10 : 1,2 ml) de pH 9,5 (ajuster au pH par une solution d'acide trifluoroacétique à 10 p. 100 dans l'eau bidistillée). On ajoute 5 µl de phénylthioisocyanate (PITC) (PIERCE CHEMICALS). La réaction de couplage s'effectue sous atmosphère d'azote (passage d'azote dans le tube de réaction pendant 10 à 15 secondes, pendant 40 mn à 50°C, en agitant le mélange toutes les 5 minutes. Cette réaction doit être réalisée en présence d'un excès de PITC : en passant le tube sous un courant d'eau froide, le PITC doit

(\*) Le terme PTH-aminoacide est utilisé pour désigner les phénylthiohydantoïnes dérivées des acides aminés.

précipiter en fin du temps de réaction ; sinon, le couplage doit être poursuivi, en ajoutant à nouveau 5  $\mu$ l de PITC sous atmosphère d'azote, pendant 20 minutes.

#### $\beta$ ) Elimination des thiourées

Les thiourées sont éliminées par extraction avec le benzène : on ajoute 1 ml de benzène dans le tube de réaction, celui-ci est centrifugé et on élimine la phase organique supérieure (le PTC-peptide précipite à l'interphase). L'opération est recommencée 7 fois de suite. La phase aqueuse est séchée par un courant d'azote. Afin de se placer en milieu organique et parfaire le séchage, nous ajoutons 1 ml d'acétate d'éthyle dans le tube à réaction en imprégnant soigneusement les parois, puis le tube est séché par un courant d'azote.

#### $\gamma$ ) Clivage

Le tube est mis à sécher sur  $P_2O_5$  à 60°C sous vide pendant 30 minutes. Le résidu sec est repris par 150  $\mu$ l d'acide trifluoroacétique anhydre et la réaction de clivage est effectuée à 50°C pendant 7 minutes sous atmosphère d'azote. Le tube est séché totalement par un courant d'azote.

La thiazolinone formée est alors extraite par un mélange éther/Ethylmercaptan (50 ml : 50  $\mu$ l) : le contenu du tube est repris 3 fois de suite par 1 ml du mélange éthéré, le peptide résiduel précipite dans le fond du tube ; nous grattons les parois du tube à l'aide d'une tige de verre, nous centrifugeons afin de séparer le peptide résiduel de la phase organique. La phase organique contenant la thiazolinone est transvasée dans un autre tube conique, tandis que le tube contenant le peptide résiduel est mis à sécher sous vide sur KOH, avant de recommencer un nouveau cycle de dégradation.

#### $\delta$ ) Conversion

Le tube contenant la thiazolinone est séché par un courant d'azote, puis on lui ajoute 200  $\mu$ l d'HCl N et la réaction de conversion est effectuée à 80°C (bain d'huile) sous atmosphère d'azote pendant 10 minutes. Nous effectuons l'extraction du PTH formé par l'acétate d'éthyle, on ajoute 700  $\mu$ l d'acétate d'éthyle, on agite vigoureusement et on centrifuge (3 fois de suite). La phase organique supérieure, dans laquelle la majorité des PTH-acides aminés sont solubles, est transvasée dans un autre tube conique, puis séchée par un courant



d'azote. La phase aqueuse inférieure pouvant contenir les PTH-arginine, histidine et acide cystéique est conservée et évaporée à sec.

Une seconde méthode de dégradation manuelle, dans laquelle les conditions de température (45°C) et de tampon de couplage (Pyridine/Eau/Diméthylallylamine) sont changées, peut être utilisée.

### Remarques

Les thiazolinones de la sérine et de la thréonine sont très instables et elles se décomposent rapidement ; les PTH correspondants sont alors accompagnés de produits de décomposition (PTH-déhydroalanine et PTH déhydrothréonine principalement).

### c) Identification des PTH-acides aminés

Quatre grandes méthodes de séparations ont été jusqu'à présent utilisées : la chromatographie sur papier (SJOQUIST -114 ) a été la première méthode utilisée mais a été avantageusement remplacée par la chromatographie sur couche mince, la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse. La spectrométrie de masse demandant l'acquisition d'un appareillage important et coûteux, n'a pu être utilisée.

#### α) La chromatographie sur couche mince

La chromatographie sur couche mince plus sensible, plus rapide et permettant une meilleure résolution a été préférée à la chromatographie sur papier. Différents supports ainsi que différents systèmes solvant sont utilisés pour identifier les PTH-acides aminés.

#### \* Le support

L'adsorbant doit être réparti uniformément sur la plaque de verre. Or, l'étalement mécanique conduit à une mauvaise répartition du gel (Kieselgel GF 254 selon Stahl), la vitesse de migration varie d'un bord à l'autre de la plaque et donne une distorsion du front avec tous les inconvénients que cela suppose (CHERBULIEZ - 115 ). Nous préférons donc utiliser des plaques de verre sur lesquelles ont été coulé un gel de silice mélangé à un liant et à un solvant volatil, ce qui évite l'étalement mécanique (Plaques Merck, Kieselgel F254) ou encore des plaques de plastique recouvertes de polyamide (Plaques Merck - DC Plastic F254).

#### \* Les solvants

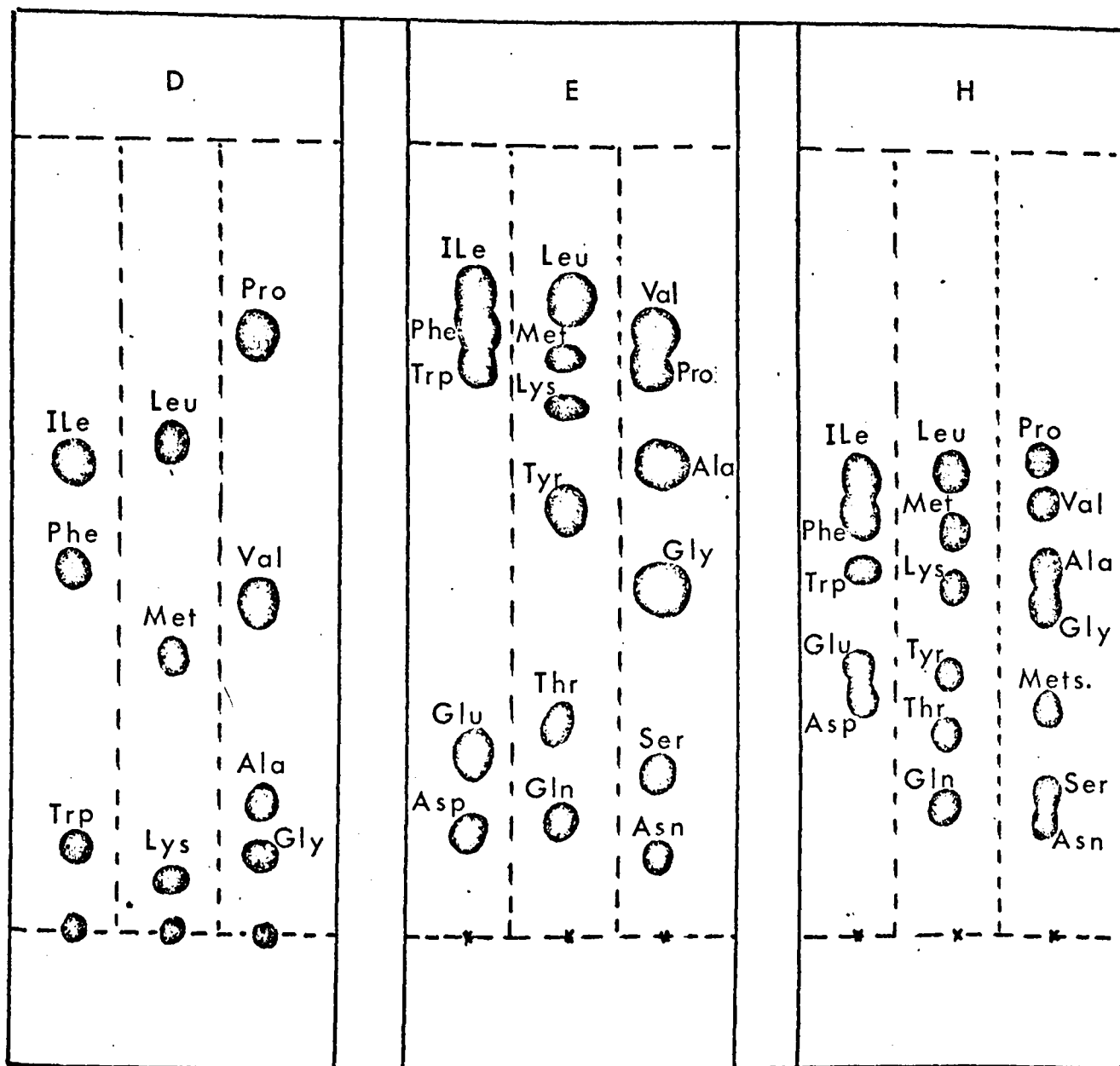
Afin de séparer les PTH-acides aminés, nous utilisons les différents systèmes solvants d'EDMAN et SJOQUIST (116) : le système D (Xylène et formamide/acétone (3 : 7) permet de séparer en chromatographie monodimensionnelle (60 mm) les PTH-acides aminés apolaires ; le système H1 (chlorure d'éthylène/acide acétique 60 : 14) et le système E modifié (acétate de butyle saturé et eau (97 : 3) et acide propionique-formamide (3 : 4) permet de séparer en une chromatographie monodimensionnelle les PTH-acides aminés polaires (Figure 16).

#### \* Révélation

Après la chromatographie, la plaque est placée 5 à 10 mn à l'étuve à 110°C afin d'évaporer le solvant (le PTH-tryptophane apparaît en jaune, dans le système D après séchage dans l'étuve le PTH-glycocolle apparaît en rose). Les PTH-acides aminés peuvent être mis en évidence grâce à leur fluorescence violette à 269 nm ; ils apparaissent en noir sur fond vert à 254 nm. Nous pouvons obtenir une coloration spécifique des PTH-acides aminés en trempant la plaque dans une solution acétonique de ninhydrine à 0,2 p. 100 (117) et révélation par chauffage à 110°C pendant 15 mn ; les PTH-glycocolle, asparagine et thréonine sont colorés en jaune, les PTH-glutamine, acide glutamique, acide aspartique et méthionine sont colorés en brun, tandis que les autres PTH sont colorés en rose. Comme la coloration est fugace nous pouvons la fixer par le Kawereau. Nous pouvons également pulvériser sur la plaque une solution d'iode/azide (on mélange volume à volume une solution aqueuse de I<sub>2</sub> 0,01 M et IK 0,5 M et une solution aqueuse de NaN<sub>3</sub> 0,5 M), (118) les PTH apparaissent alors en blanc sur fond brun ; ces colorations de plaques sont plus sensibles que la révélation aux U.V. (0,1 µg au lieu de 0,2 µg aux U.V.).

#### β) La chromatographie en phase gazeuse

La chromatographie en phase gazeuse est très intéressante pour l'analyse qualitative et quantitative des peptides par la méthode des PTH. Cette méthode est très sensible (0,01 µg de PTH peuvent être identifiés) : au cours de la dégradation d'un peptide les rendements



SEPARATION DES PTH-ACIDES AMINES SUR COUCHE MINCE DE SILICAGEL PAR CHROMATOGRAPHIE MONODIMENSIONNELLE DANS LES SYSTEMES SOLVANTS d'EDMAN-SJOQUIST (119)

Système D : Xylène (75 ml) ; Acétone/Formamide (7 : 3) (60 min)

Système E : Acétate de Butyle saturé d'eau (97 : 3)  
Acide propionique/Formamide (3 : 4) (75 min)

Système H<sub>1</sub> : Chlorure d'Ethylène/Acide acétique (60 : 14) (65 min)

FIGURE 16

sont de plus en plus faibles et il est parfois nécessaire d'utiliser la chromatographie en phase gazeuse surtout lorsque l'on parvient à la fin d'une dégradation.

Au laboratoire, nous utilisons la méthode de PISANO et BRONZER (120) qui permet l'identification de tous les PTH-acides aminés, à l'exception du PTH-arginine. La chromatographie est réalisée à l'aide de l'appareil Carlo Erba sur une colonne de verre de 1,20 m x 3 mm siliconnée (DC 560/XE 60/OV 22). Un gaz vecteur d'azote R, un débit de 150 ml/mn et une programmation de température de 190 à 270°C permet la séparation de tous les PTH-acides aminés (Figure 17). Les difficultés rencontrées pour les PTH-sérine, thréonine, asparagine, glutamine et les acides aminés basiques peu volatils ont été résolues par la triméthylsilylation.

#### 8) Identification des PTH-acides aminés solubles dans la phase aqueuse : PTH-Histidine, Arginine et acide cystéique

Le résidu sec du tube contenant la phase aqueuse est repris par 50 µl d'eau pour être soumis à une électrophorèse à pH 3,9 (ceci permet l'élimination des sels minéraux). Cependant, les PTH-arginine et Histidine sont principalement identifiés par des réactions colorées spécifiques (SAKAGUCHI et PAULY). Lorsque nous soupçonnons la présence du PTH-acide cystéique, l'acide aminé doit être régénéré sous forme d'acide cystéique libre par une hydrolyse acide (HCl 5,6 N, 105°C, 24 heures) avant d'effectuer l'identification par une électrophorèse à pH 3,9. (121)

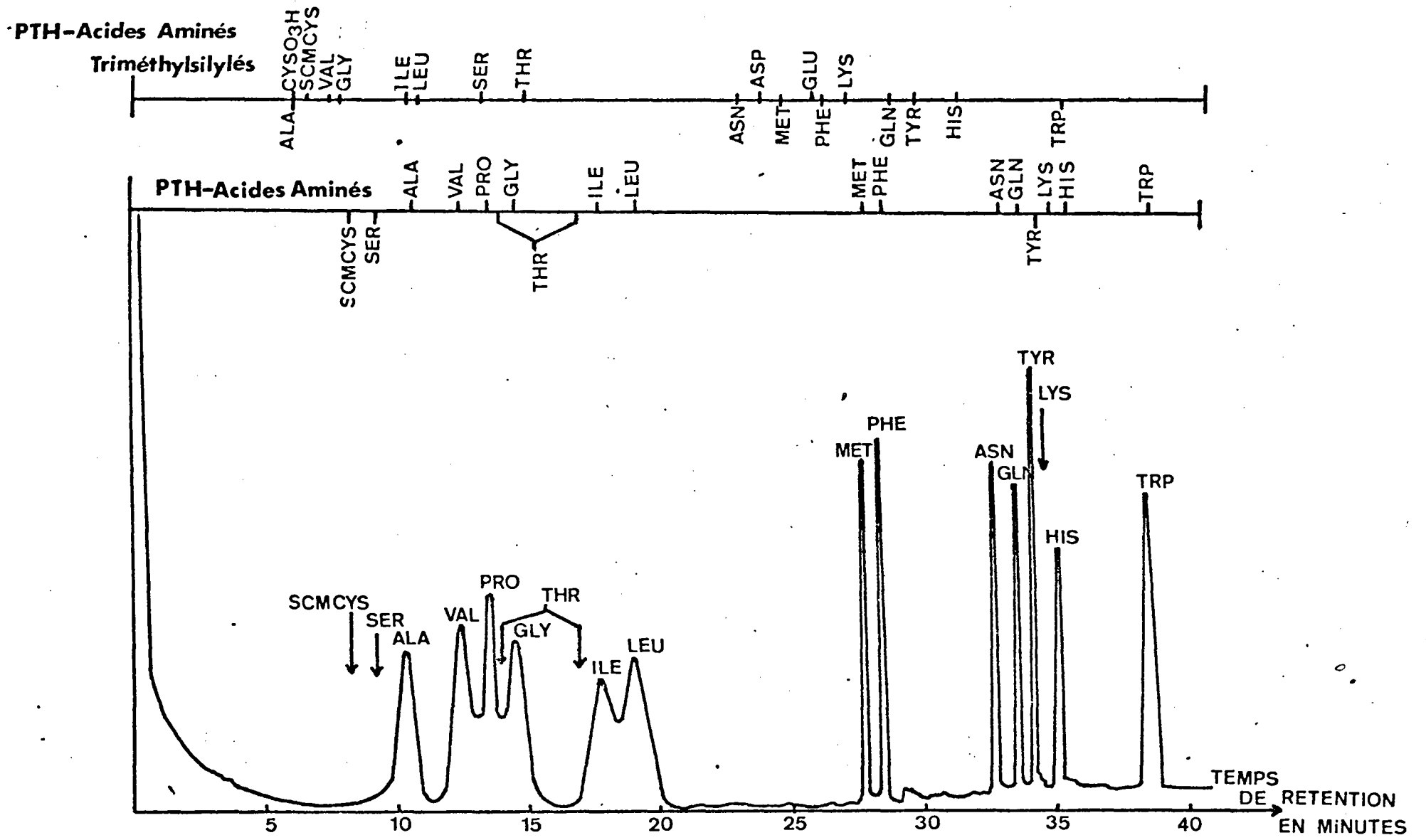
#### 2°) Dégradation automatique

EDMAN et BEGG ont conçu un appareil qui effectue les réactions de couplage et de clivage de façon automatique : un séquenceur conforme à l'appareil décrit par EDMAN et BEGG a été utilisé pour confirmer la structure de la myoglobine de Mouton (SOCOSI).

#### a - Fonctionnement de l'appareil (Fig. 18)

La plus importante modification apportée au séquenceur que nous avons utilisé par rapport à celui d'EDMAN est l'introduction d'un programmeur électronique indépendant. Celui-ci permet d'éventuels changements en cours de manipulation : changement du temps de réaction, d'admission des solvants par exemple.

Le programme choisi pour l'étude de la myoglobine de Mouton est indiqué au Tableau VII



SEPARATION DES PTH-ACIDES AMINÉS PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

(PISANO et BRONZER - 122)

FIGURE 17

β - Préparation de l'échantillon (123)

L'échantillon (300 nmoles de globine - 153 résidus - ou 1 μmole de polypeptide M<sub>1</sub>-76 résidus) préalablement dissous dans 200 μl d'acide trifluoroacétique anhydre est introduit dans la chambre de réaction. Le peptide a du être centrifugé au préalable à faible vitesse (15 mn à 1500 t/m) afin d'éliminer des particules insolubles. L'échantillon est séché par mise sous vide de la chambre à réaction. L'acide trifluoroacétique résiduel est éliminé par lavage au chlorobutane puis par un séchage sous vide restreint (1 mn) et sous vide poussé (3 mn) (délai de 10 secondes avec rentrée d'azote entre les deux étapes de vide). Ensuite, l'acide heptafluorobutyrique est introduit dans la chambre de réaction afin de dissoudre la protéine ou le polypeptide et on sèche sous vide. Le réactif au PITC est alors ajouté et le premier cycle peut avoir lieu suivant le programme standard d'EDMAN-BEGG. Aux cycles suivant le Quadrol (réactif 2) est ajouté au lieu d'acide heptafluorobutyrique. Les autres étapes sont effectuées selon le programme normal d'EDMAN (Tableau VII). Nous obtenons alors les thiazolinones (collecteur de fractions refroidi) qui sont converties en PTH. Les PTH sont identifiés grâce aux méthodes décrites précédemment.

γ - Résultats

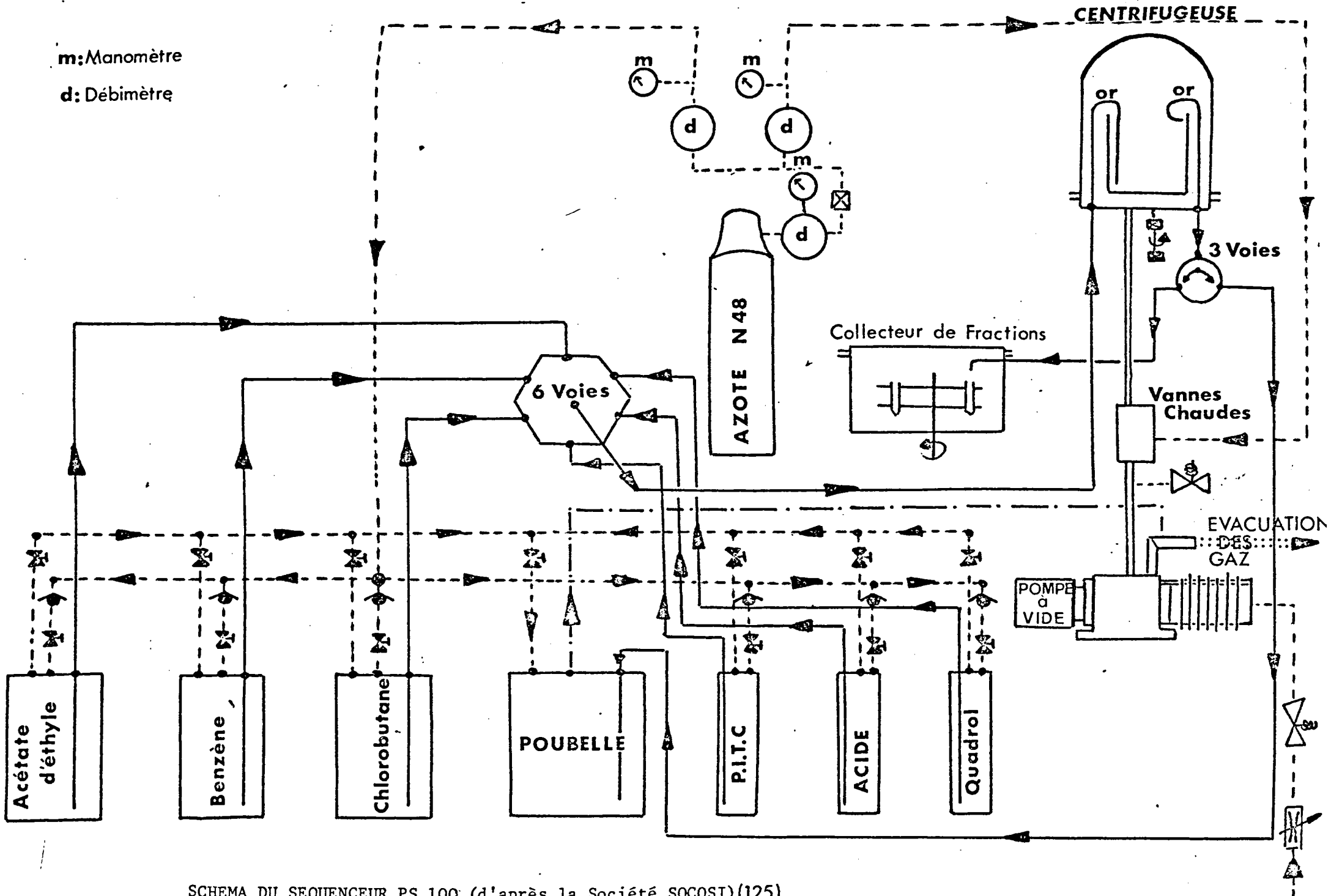
La dégradation automatique n'est utilisée que pour des protéines ou des peptides de taille importante. L'analyse de la globine du peptide Médian 1 à l'aide du séquenceur PS100 de la Société SOCOSI nous a néanmoins permis de confirmer leur séquence N-terminale et ainsi confirmer la structure primaire de la myoglobine de Mouton.

Séquence 1 à 46 de la globine (confirmée par les travaux de  
VOTSCH et ANDERER (124)

Séquence 56 à 94 du peptide Médian-1.

D) Discussion et conclusion

Le Tableau VIII où sont schématisées les différentes méthodes de dégradation utilisées, nous permet une comparaison de celle-ci. En couplant la méthode d'EDMAN à celle des dansyls, nous notons que seulement 200 à 500 nmoles de peptides sont nécessaires pour effectuer plusieurs cycles de dégradation (les 11 résidus du peptide correspondant à la séquence 148-153 ont dû être identifiés par cette méthode). Les points délicats de cette méthode Dansyl-Edman se situent surtout au



m: Manomètre  
 d: Débitmètre

SCHEMA DU SEQUENCEUR PS 100 (d'après la Société SOCOSI)(125)

FIGURE 13

No	ETAPES FONCTIONS	TEMPS en secondes	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1	Avance Collecteur
																			Lest
1	PHENYL ISOTHIOCYANATE	4										○			○				○
2	QUADROL	4 0							○										○
3	REACTION 1'	1 5 0 0				○							○						○
4	REACTION 1'	3 0 0											○						○
5	PREVIDE	2 0 0											○						○
6	VIDE	4 5 0											○						○
7	RENTREE D'AZOTE	1 0											○						○
8	BENZENE	2 1 0				○	○								○				○
9	ACETATE D'ETHYLE	3 3 0				○					○				○				○
10	RETARD	6 0													○				○
11	PREVIDE	2 0 0											○						○
12	VIDE	1 0 0											○						○
13	PURGE	4											○						○
14	VIDE	2 0 0											○						○
15	RENTREE D'AZOTE	1 0											○						○
16	AC. HEPTAFLUOROBUTYRIQUE	1 6				○	○								○				○
17	REACTION 2	1 8 0											○						○
18	PREVIDE	7 0											○						○
19	VIDE	9 0											○						○
20	RENTREE D'AZOTE	1 0											○						○
21	CHLOROBUTANE (COLLECTEUR)	6 5				○				○				○					○
22	RETARD	6 0												○					○
23	PREVIDE	2 0 0											○						○
24	VIDE	1 0 0											○						○
25	RENTREE D'AZOTE	1 0											○						○
26	AC. HEPTAFLUOROBUTYRIQUE	1 6				○	○								○				○
27	REACTION 2'	1 8 0											○						○
28	PREVIDE	7 0											○						○
29	VIDE	9 0											○						○
30	RENTREE D'AZOTE	1 0											○						○
31	CHLOROBUTANE (COLLECTEUR)	1 4 0				○				○				○					○
32	AVANCE COLLECTEUR	4				○									○				○
33	RETARD	6 0												○					○
34	PREVIDE	2 0 0											○						○
35	VIDE	1 0 0											○						○
36	PURGE	4											○						○
37	VIDE	2 0 0											○						○
38	RENTREE D'AZOTE	1 0											○						○

TABLEAU VII

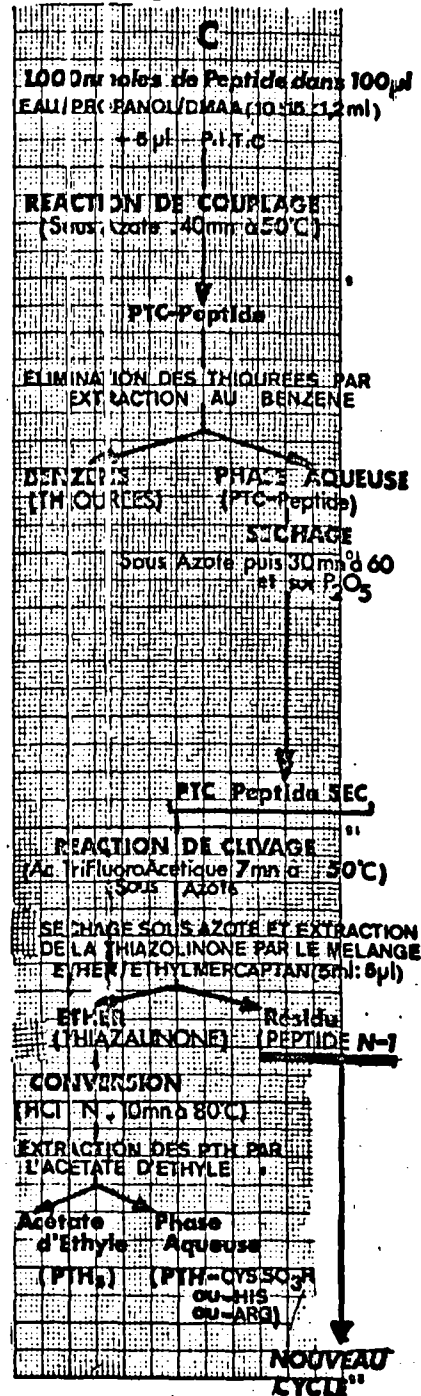
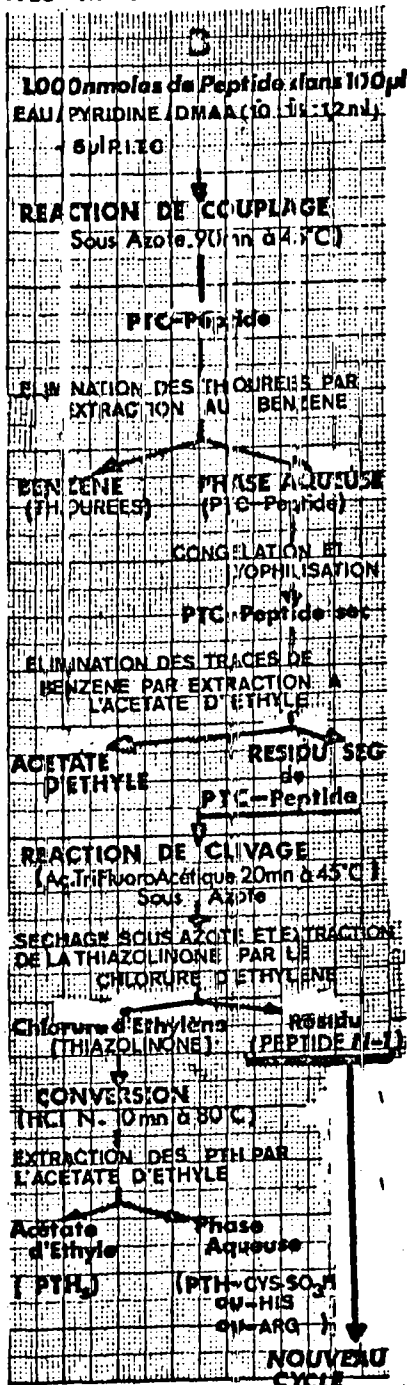
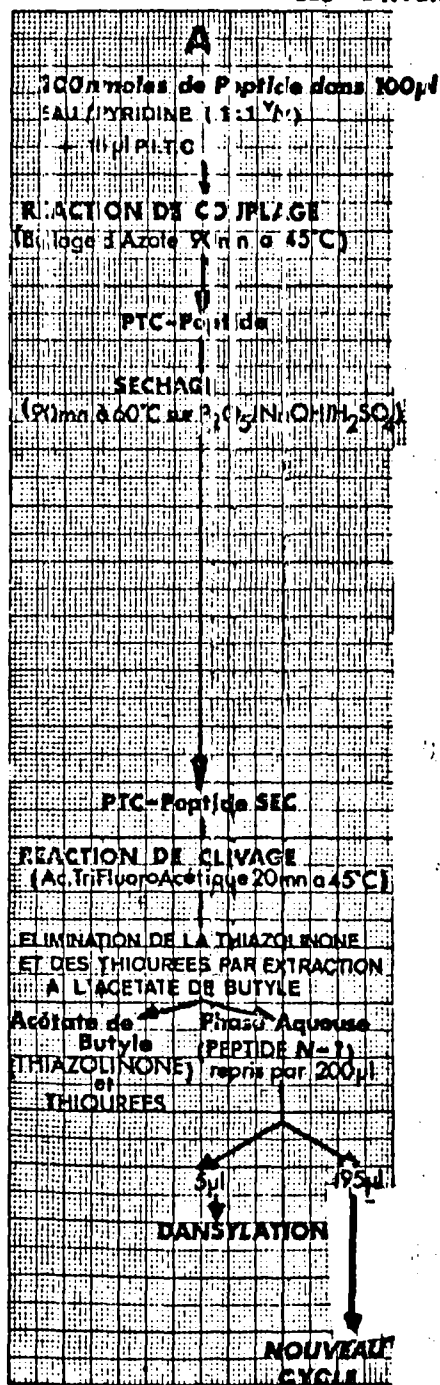
PROGRAMME UTILISE POUR LA DEGRADATION AUTOMATIQUE DE LA GLOBINE DE MOUTON ET  
DU SEGMENT MEDIAN-1 (MB3) DE LA GLOBINE DE MOUTON (126)

(○ : fiches introduites dans le programmeur électronique)



# TABLEAU VIII

## LES DIFFERENTES METHODES DE DEGRADATION UTILISEES



niveau de la réaction de couplage : le bullage d'azote doit être lent et régulier afin que la fixation du PITC soit effective, sans pour cela qu'il y ait coupure du peptide, ce qui entraînerait une contamination du dansyl d'un cycle par celui du cycle suivant (ce que les anglo-saxons appellent les "overlapping"). Les problèmes de séchage de la phase de couplage ou de la formation de produits de réactions secondaires n'entrent pas en ligne de compte dans cette méthode puisqu'il s'agit d'isoler le peptide résiduel et non d'isoler la thiazolinone. La méthode Dansyl-Edman ne permet pas néanmoins d'identifier les résidus de glutamine, d'asparagine et de tryptophane (lors de l'hydrolyse acide du peptide dansylé, les résidus de glutamine et d'asparagine sont désamidés et le tryptophane est détruit).

Par contre, les méthodes manuelles avec identification du PTH permettent la caractérisation des résidus de glutamine, d'asparagine et de tryptophane. D'autre part, l'identification des PTH est moins sujette à caution que l'identification des dansyls : il existe de nombreuses méthodes de révélation et de coloration spécifique qui permettent de mettre en évidence sans ambiguïté les différents PTH-acides aminés ; la méthode des DNS est trop sensible et permet la mise en évidence des "overlapping" ou des impuretés existant même en faible concentration dans l'eau ou l'acétone des réactifs, ce qui fausse l'interprétation des résultats.

Cependant, nous pouvons rencontrer des difficultés au cours d'une dégradation directe, notamment au cours de la réaction de couplage le peptide peut ne pas être soluble dans le tampon Propanol/Eau/Diméthylallylamine. C'est pourquoi, il est intéressant d'avoir à notre disposition deux systèmes tampons de couplage. Notons néanmoins que lorsque l'on utilise le tampon Pyridine/Eau/Diméthylallylamine qui est moins volatil, nous sommes contraints de prendre certaines précautions et d'effectuer plusieurs opérations de séchage et d'extractions supplémentaires si bien que la dégradation ne s'effectue alors qu'avec de mauvais rendements (4 à 5 cycles seulement ont été réalisés sur le C-peptide correspondant à la séquence 143-153).

D'autre part, lorsque nous effectuons une dégradation directe, il convient d'éliminer au maximum les thiourées par extraction au

benzène mais le peptide peut passer dans la phase benzénique (cas des peptides riches en lysine qu'il est nécessaire de méthyler).

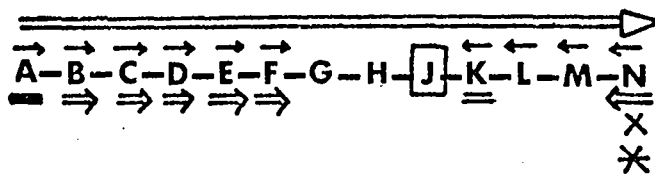
Le séchage de la phase de couplage est également une étape importante si l'on veut obtenir d'excellents rendements de la réaction de clivage (qui doit être effectuée en milieu absolument anhydre). Enfin, nous pouvons rencontrer des difficultés au niveau de l'identification des PTH-acides aminés : les thiourées, mal éliminées peuvent freiner la migration du PTH (dans le système D par exemple, le PTU (monophénylthiourée) reste au point de départ et le DPTU (diphénylthiourée) migre entre le PTH-MET et le PTH-VAL) ; les PTH-sérine et thréonine difficiles à identifier sont souvent accompagnés de produits de décomposition.




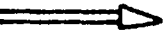






La méthode de dégradation directe reste cependant essentielle lorsque l'on veut déterminer la séquence en acides aminés d'un peptide isolé en quantité suffisante contenant de la glutamine, de l'asparagine ou du tryptophane qui sont toujours les résidus les plus difficiles à identifier. La méthode n'est cependant pas très sensible (1  $\mu$ Mole de peptide est nécessaire pour réaliser la dégradation), mais dans un proche avenir, nous espérons, grâce à l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse ou de la spectrométrie de masse abaisser le seuil de la sensibilité de la méthode.

## RESULTATS

---

Dans ce chapitre, nous avons rassemblé nos résultats. Les différentes étapes de la détermination de la séquence des différents peptides ont été schématisées de la façon suivante :



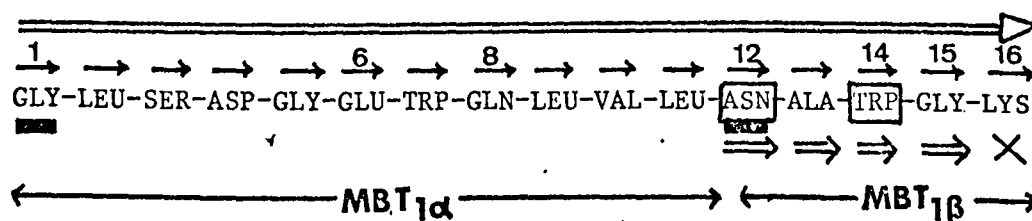
- A, B, C ... : les résidus d'acides aminés
-  : Acides aminés N-terminaux identifiés par dansylation
-  : Séquence en acides aminés déterminée par dégradation récurrente DANSYL-PTH
-  : Séquence en acides aminés déterminée par dégradation récurrente PTH-PTH manuelle
-  : Séquence en acides aminés déterminée par dégradation récurrente PTH-PTH automatique
-  : Acide aminé placé en position C-terminale en raison de la spécificité de la trypsine ou du bromure de cyanogène
-  : acide aminé placé en position C-terminale en raison de la spécificité de la chymotrypsine
-  : Séquence déduite de l'action des carboxypeptidases
-  : Elimination de l'homosérine suivie de l'action des carboxypeptidases.
-  : Acide aminé identifié par hydrazinolyse
-  : Acide aminé identifié après action de l'aminopeptidase M

L'étude de la composition en acides aminés (Tableaux II, III, IV, VI) et de l'extrémité N-terminale (identifiée par une réaction de dansylation) des différents peptides a permis l'établissement d'une structure probable de la myoglobine de Mouton. Les séquences sont alors présentées les unes à la suite des autres d'après les peptides dont la position dans la chaîne peptidique de la myoglobine est déduite de leur structure par analogie avec les peptides homologues de la myoglobine de Boeuf. Ensuite, l'étude directe des peptides isolés nous a permis de confirmer la structure covalente de la myoglobine de Mouton.

SEQUENCE N-TERMINALE (1 à 55).

La séquence 1 à 55 a été établie après l'étude des peptides tryptiques de la globine (peptides MT) et des peptides tryptiques du segment N-terminal (segment MB 4) obtenu après action du bromure de cyanogène (peptides MBT).

Séquence 1 à 16 : Peptides MBT<sub>1α</sub> et MBT<sub>1β</sub>



L'étude des peptides tryptiques de la globine ne permettait pas la caractérisation de cette séquence (le peptide MT1 n'est pas isolé, il correspond au "premier noyau tryptique" insoluble).

L'étude du premier noyau tryptique insoluble a donc été envisagée par l'étude des deux peptides tryptiques MBT<sub>1α</sub> et MBT<sub>1β</sub>. La coupure anormale par la trypsine de la liaison leucyle 11 du segment MB4 a facilité l'étude de cette séquence.

Le peptide MBT<sub>1α</sub> possède en N-terminal le glycolle (DNS-GLY) et donne une réaction positive au réactif d'Ehrlich (cependant, MBT<sub>1α</sub> ne peut être isolé à l'état pur lors du fractionnement par électrochromatographie sur papier).

Le peptide MBT<sub>1β</sub> possédant en N-terminal l'asparagine ou l'acide aspartique (DNS-ASX), donnant une réaction positive au réactif d'Ehrlich a été simultanément isolé par électrochromatographie sur papier et par chromatographie sur colonne de résine. Après fractionnement par électrochromatographie sur papier, élution du spot peptidique et hydrolyse acide totale nous obtenons la composition suivante :

Lys : 1,17 (1) ; Asp : 0,98 (1) ; Gly : 0,99 (1) ; Ala : 0,88 (1).

Un fractionnement par électrochromatographie suivie d'une coloration spécifique du tryptophane a été effectué et les spots peptidiques donnant

une réaction positive au réactif d'Ehrlich sont élués puis hydrolysés. Il se forme alors un précipité brun-violacé ne permettant pas une analyse de la composition en acides aminés. Nous avons donc évalué la composition par électrochromatographie sur papier (remarque : le précipité brun-violacé formé peut sans doute être éliminé par centrifugation).

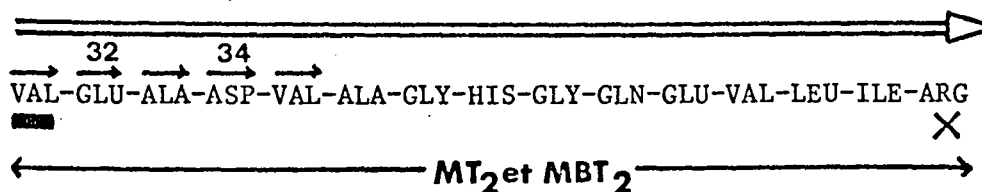
L'étude du peptide MBT1  $\beta$  sur le plan de la séquence n'a pu être réalisée qu'à partir du peptide isolé par fractionnement sur colonne de résine. Une hydrolyse par l'aminopeptidase M a donné la composition suivante :

Trp : 0,37 (1) ; Lys : 1,33 (1) ; Amide : 1,04 (1) ; Gly : 0,74 (1) ; Ala : 0,88 (1).

et a permis de confirmer l'existence d'asparagine (position **12**) et de tryptophane (position **14**). Une dégradation par la méthode récurrente Dansyl-Edman a été poursuivie jusqu'à la mise en évidence du Dansyl glycolle (position **15**). Notons qu'au troisième cycle de la dégradation, aucun Dansyl acide aminé n'est identifiable car DNS-TRP est détruit.

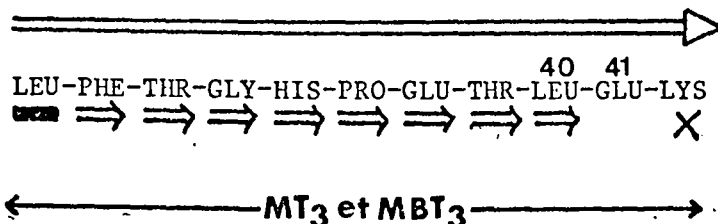
La séquence 1-16 a également été confirmée par une dégradation directe manuelle (tampon de couplage Propanol/Eau/diméthylallylamine) du peptide N-terminal MB4 et en particulier nous avons montré l'existence d'acide glutamique (**6**), de glutamine (**8**).

Séquence 17 à 31 : Peptides MT2 et MBT2



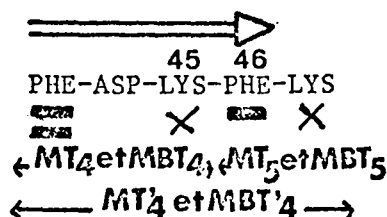
La séquence a été caractérisée par l'étude des deux peptides MT2 et MBT2 : ces peptides sont identiques et proviennent respectivement de l'hydrolyse trypsique de la globine totale et du segment MB4: ils possèdent la valine en N-terminal (DNS-VAL) et donnent une réaction positive au réactif de SAKAGUCHI. Une dégradation directe manuelle dans le tampon de couplage pyridine/eau/diméthylallylamine) a été poursuivie permettant la mise en évidence du PTH-acide glutamique (**32**), du PTH-acide aspartique (**34**) et jusqu'au PTH-valine.

Séquence 32 à 42 : Peptides MT3 et MBT3



La séquence a été caractérisée par l'étude des deux peptides MT3 et MBT3 possédant en N-terminal la leucine (DNS-Leu-) et donnant une réaction positive au réactif de Pauly. Une dégradation récurrente DNS-Edman a été entreprise jusqu'à la caractérisation du DNS-LEU en position **40**.

Séquence 43 à 47 : Peptides MT'4 et MBT'4 - Peptides T4, MBT4, T5 et MBT5

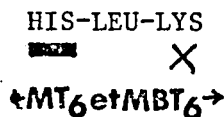


Cette séquence représente un produit d'hydrolyse incomplète par la trypsine de la globine ou du segment MB4 ; les peptides MT'4 et MBT'4 possèdent tous les deux la phénylalanine en N-terminal (DNS-PHE). La séquence 43-47 se retrouve partiellement inattaquée comme chez le Boeuf et le Cheval dans nos conditions d'hydrolyse. Elle est retrouvée accompagnée des peptides PHE-ASP-LYS (MT4 et MBT4 possédant la phénylalanine en N-terminal à la fois dans l'hydrolysats tryptique de la globine et celui du segment MB4. Le ralentissement de l'action de la trypsine au niveau de la liaison lysyle **45** est probablement dû à la présence simultanée d'acide glutamique en **41** et d'acide aspartique en **44**).

Remarque : Une dégradation récurrente automatique de la globine au séquenceur nous a permis d'ailleurs de confirmer l'enchaînement en acides aminés des 46 premiers résidus de la myoglobine de Mouton et en particulier de différencier les amides de l'acide glutamique ou de l'acide aspartique.

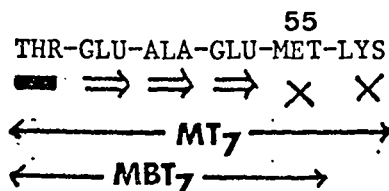


Séquence 48 à 50 : peptides MT6 et MTB6



La séquence a été établie grâce à l'étude des peptides MT6 et MTB6 qui possèdent en N-terminal l'histidine (DNS-HIS) et qui donnent une réaction positive au réactif de PAULY.

Séquence 51 à 56 : peptides MT7 et MTB7

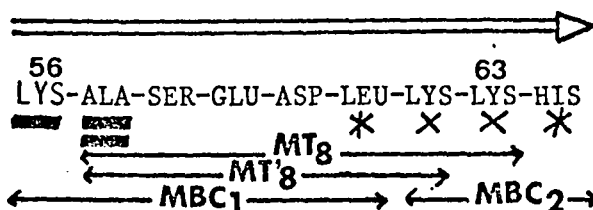


La séquence a été caractérisée par l'étude des peptides MT7 et MTB7 possédant la thréonine en N-terminal (DNS-THR). Le peptide MT7 donne une réaction positive au réactif spécifique de la méthionine. La position de la méthionine (55) a été déduite par l'étude des peptides trypsiques du segment MB4. En effet, le peptide MBT7 ne se différencie dans sa composition en acides aminés de son homologue MT7 que par l'absence d'un résidu de lysine ; d'autre part, la méthionine étant transformée en homosérine. Nous avons également mis en évidence l'absence d'amides dans cette séquence en effectuant une hydrolyse du peptide MT7 par l'aminopeptidase M : on obtient la composition suivante :  
 LYS : 0,96 (1) ; THR : 0,99 (1) ; GLU : 2,08 (2) ; ALA : 1,00 (1) ;  
 MET : 0,97 (1)  
 et une dégradation récurrente DNS-Edman du peptide MBT7 a permis la détermination complète de la séquence.

SEQUENCE MEDIANE-1 : résidus 56 à 131

La séquence 56 à 131 de la myoglobine de Mouton a été établie à la fois, grâce à l'étude des peptides tryptiques de la globine (peptides MT) et, par recoupement, avec les peptides chymotrypsiques (peptides MBC) du segment MB3 (segment médian-1). La séquence 56-94 a également été confirmée par une dégradation récurrente au séquenceur du segment MB3 permettant en outre, l'identification de glutamine, d'asparagine ou d'acide glutamique, ou encore d'acide aspartique.

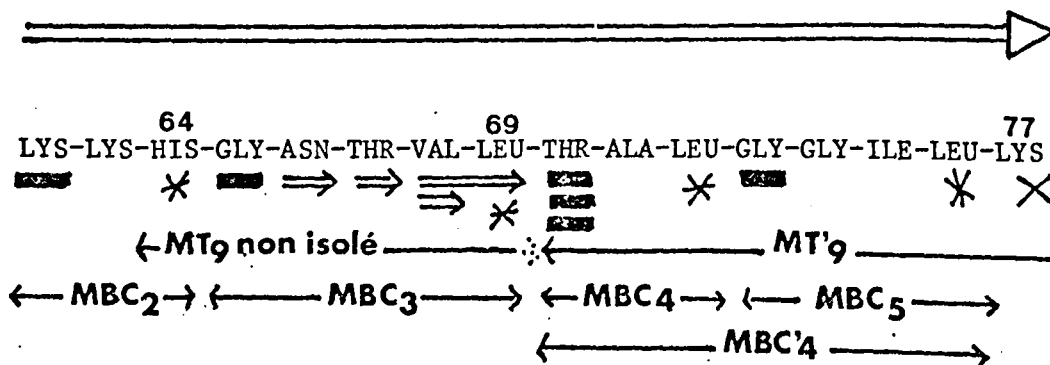
Séquence 56 à 63 : peptides MT'8 et MT8 - peptides MBC1 et MBC2



La séquence 56-63 a été établie grâce à l'étude des peptides tryptiques MT'8 et MT8 possédant l'alanine en position N-terminale (DNS-ALA). Le peptide MT8 est un produit d'hydrolyse incomplète de la globine : nous le retrouvons d'ailleurs accompagné du peptide MT'8 et de lysine libre.

La séquence a été également caractérisée par l'étude des peptides chymotrypsiques MBC1 (résidus 56-61) possédant la lysine en N-terminal (DNS-LYS) et MBC2 (résidus 62-64) possédant la lysine en N-terminal.

Séquence 64-77 : peptide MT'9 - peptides MBC2, MBC3, MBC4, MBC5 et MBC'4



L'étude des peptides tryptiques de la globine ne permettait pas la caractérisation de la séquence 64-69 (second noyau tryptique insoluble). La coupure tryptique anormale de la globine au niveau de la liaison leucyle 69 avait cependant permis la caractérisation de la séquence

70-77 (MT'9 possédant la thréonine en N-terminal).

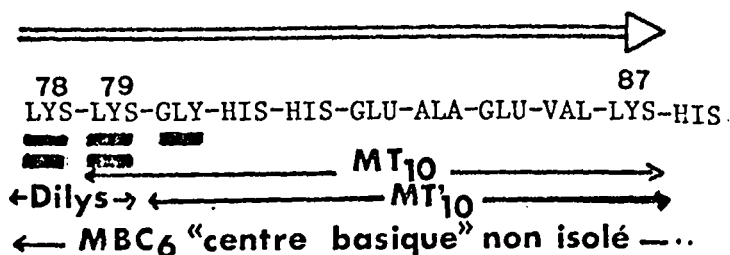
L'étude du second noyau trypsique insoluble a donc été envisagée par l'étude des peptides chymotrypsiques :

- MBC2 possède la lysine en N-terminal (DNS-LYS) et donne une réaction positive au réactif de PAULY.
- MBC3 possède le glycofolle en N-terminal (DNS-GLY) et la dégradation récurrente Dansyl-Edman a été poursuivie jusqu'à la mise en évidence du DNS-VAL (68) et du DNS-VAL-LEU (68-69) (la liaison VAL-LEU est difficile à rompre et les conditions d'hydrolyse du dansyl ne permettent qu'une coupure imparfaite de cette liaison. De ce fait, il est possible de mettre en évidence à la fois le DNS-VAL et le DNS-VAL-LEU).

D'autre part, la séquence 70-77 a été caractérisée également par recouplement grâce à l'étude des peptides chymotrypsiques MBC4, MBC5 et MBC'4.

Notons qu'une hydrolyse incomplète du segment MB3 par la chymotrypsine au niveau de la liaison leucyle **72** nous a permis d'obtenir de peptide MBC'4 (possédant la thréonine en N-terminal DNS-THR) correspondant à la séquence 70-76 accompagné des peptides <sup>70</sup>THR-<sup>72</sup>ALA-LEU (MBC4 possédant la thréonine en N-terminal -DNS-THR) et <sup>73</sup>GLY-GLY-ILE-LEU (MBC5 possédant le glycofolle en N-terminal - DNS-GLY).

Séquence 78 à 87 : peptide MT10 et lysine libre, MT'10 et di-lysine



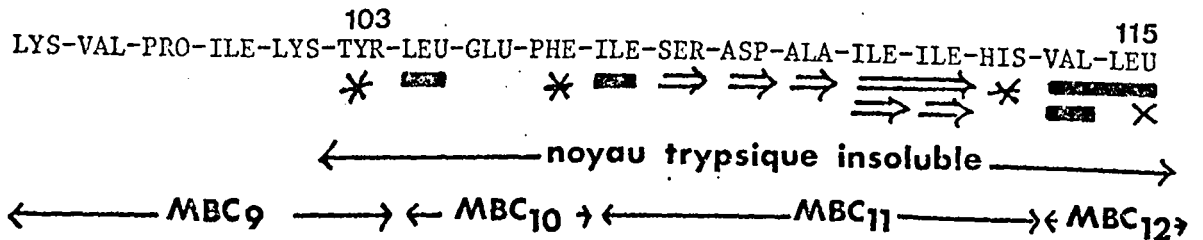
L'étude de la séquence a été facilitée du fait de l'hydrolyse trypsique incomplète de la globine au niveau des liaisons lysyles **77**, **78**, **79**. Nous retrouvons en effet le peptide MT10 correspondant à la séquence 79-87 et possédant la lysine en N-terminal (DNS-LYS) accompagné à la fois du peptide GLY-HIS-HIS-GLU-ALA-GLU-VAL-LYS (MT'10 possédant le glycofolle en N-terminal - DNS-GLY), de la lysine libre (**78**) et de la lysine (**78-79**).

Cependant, nous n'avons pas pu effectuer le recouplement de cette séquence à l'aide des peptides chymotrypsiques : le peptide MBC6



(DNS-LYS) et qui donne une réaction positive au réactif spécifique de la tyrosine. Une dégradation récurrente Dansyl-Edman du peptide MBC9 poursuivie jusqu'au DNS-LYS (résidu 102) nous a permis la détermination de la séquence complète de ce peptide.

Séquence 103 à 115 : peptides MBC9, MBC10, MBC11 et MBC12



L'étude des peptides tryptiques de la globine ne permettait pas la détermination de cette séquence (le peptide MT14 n'est pas isolé, il correspond au "troisième noyau tryptique" insoluble). Nous avons donc envisagé l'étude de cette séquence par l'étude des peptides chymotrypsiques :

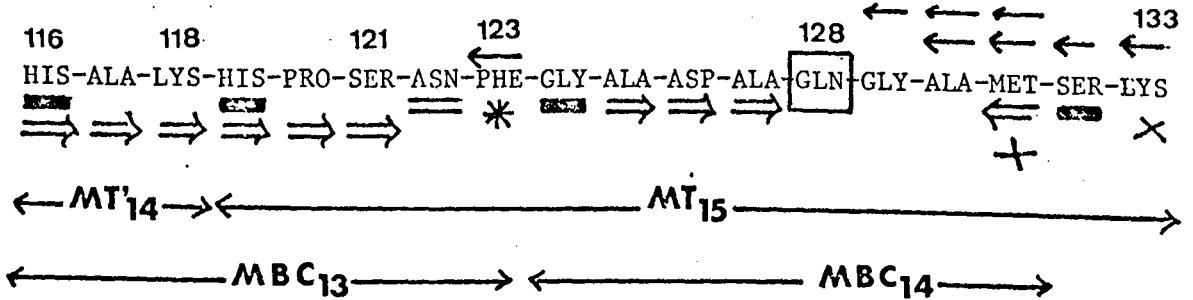
MBC9 possédant la tyrosine en C-terminal en raison de la spécificité de la chymotrypsine ;

MBC10 possédant la leucine en N-terminal (DNS-LEU)

MBC11 possédant l'isoleucine en N-terminal (DNS-ILE) donnant une réaction positive au réactif de Pauly et dont la dégradation récurrente Dansyl-Edman a permis la détermination de la séquence complète de ce peptide. (Notons qu'au 4ème cycle de dégradation nous mettons en évidence à la fois le DNS-ILE et le DNS-ILE-ILE ; la liaison ILE-ILE est également une liaison difficile à rompre dans nos conditions d'hydrolyse des Dansyl-peptides).

MBC12 possédant la valine en N-terminal (DNS-VAL et DNS-VAL-LEU).

Séquence 116 à 133 : peptides MT'14 et MT15 - peptides MBC13 et MBC14



Deux peptides trypsiques de la globine (MT'14 et MT15) recouvrent cette séquence.

La coupure anormale par la trypsine de la globine au niveau de la liaison leucyle **115** a permis la libération du peptide MT'14 possédant l'histidine en N-terminal (DNS-HIS) recouvrant la séquence 116-118.

Le peptide MT15 possède l'histidine en N-terminal (DNS-HIS) et donne une réaction positive à la fois au réactif de PAULY et au réactif spécifique de la méthionine. L'action de la carboxypeptidase B suivie de l'action de la carboxypeptidase A a permis de caractériser la séquence C-terminale de ce peptide (ALA-MET-SER-LYS).

La caractérisation de la séquence a également été possible grâce à l'étude des peptides chymotrypsiques du segment MB3 (MBC13 et MBC14).

Le peptide MBC13 possède l'histidine en N-terminal (DNS-HIS) et donne une réaction positive au réactif de Pauly. Son étude sur le plan de la séquence a été envisagée du côté N-terminal par une dégradation récurrente DNS-Edman jusqu'au DNS-SER (**121**) ; du côté C-terminal, une hydrolyse par la carboxypeptidase A pendant 2 heures a permis l'identification de la phénylalanine (**123**) ; ensuite une hydrazinolyse du produit d'hydrolyse sur la carboxypeptidase a montré la présence d'un résidu d'asparagine (**122**).

Le peptide MBC14 possède le glyco-colle en position N-terminale (DNS-GLY) et l'homosérine y a été placée en position C-terminale en

raison de la spécificité du bromure de cyanogène vis-à-vis des liaisons méthionyles. Son étude a été abordée à la fois par l'extrémité N-terminale et l'extrémité C-terminale : du côté N-terminal, une dégradation récurrente DNS-Edman a été réalisée jusqu'au résidu **128** (DNS-GLX) ; l'hydrolyse totale (24 h) pour l'aminopeptidase M a d'autre part montré que l'acide glutamique (**128**) était présent sous forme de glutamine

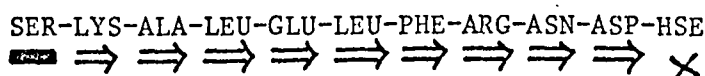
ASP : 0,93 (1) ; Amides : 0,81 (1) ; Hse : 0,51 (1) ; GLY : 2,40 (2) ; Ala : 3,30 (3).

Du côté C-terminal, l'homosérine a d'abord été régénérée à partir de sa lactone par un tampon pyridine-acide acétique de pH 6,5, puis le peptide a été soumis à l'action de la carboxypeptidase A pendant 4 h, ce qui permet la caractérisation de la séquence 129-131 : -(Gly-Ala)-Hse.

Séquence C-terminale 132-153

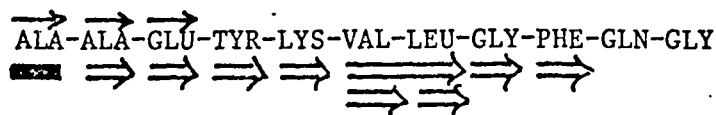
La séquence C-terminale de la myoglobine de Mouton a été déterminée à partir d'une part des fragments C-terminal et Médian-2 obtenus par coupure au bromure de cyanogène et d'autre part des peptides tryptiques MT15 à MT18 (Figure 18 bis).

- Peptide Médian-2 (MB5E2) (résidus 132 à 142)



Ce peptide possède la sérine en N-terminal (DNS-Ser) et donne une réaction positive au réactif de SAKAGUCHI. Sa séquence a été déterminée totalement par dégradation récurrente Dansyl-Edman.

- Peptides C-terminal (MB5E1C1 et MB5E1C2) (résidus 143 à 153)



Ces peptides possèdent l'alanine en position N-terminale (DNS-Ala) et donnent une réaction positive à l'α-nitroso-β-naphtol ; ils représentent la forme amidée (MB5E1C2) et désamidée (MB5E1C1) de la même séquence 143 à 153 qui contient le résidu **152** sous forme de glutamine.

Sa structure a été déterminée par dégradation directe DNS-Edman jusqu'à PHE **151**. Il est a noter que dans la dégradation DNS-Edman, il est mis en évidence à la 5ème étape à la fois DNS-VAL et DNS-VAL-LEU (stabilité de la liaison VAL-LEU à l'hydrolyse acide).

- Peptides tryptiques MT15 à MT18

Les peptides obtenus après hydrolyse tryptique de la globine de myoglobine de Mouton permettent de raccorder le segment MB5E2 au segment MB3 (segment médian 1) et le segment MB5E2 au segment MB5E1C2.

\* MT15 : sa séquence C-terminale -SER-LYS (action de la carboxypeptidase B puis de la carboxypeptidase A) représente la séquence N-terminale du segment MB5E2.

\* MT16 : la séquence de ce peptide à l'arginine a été entièrement déterminée par la méthode de Dansyl-Edman.

\* MT17 : Ce peptide a été isolé en trop faible quantité pour que sa séquence ait pu être déterminée totalement. L'enchaînement ASN-ASP plutôt que ASP-ASN a été indiqué par analogie avec les autres myoglobines.

\* MT18 : ce peptide correspond à la séquence C-terminale de la myoglobine de Mouton. Sa structure a été entièrement déterminée par dégradation de Dansyl-Edman.



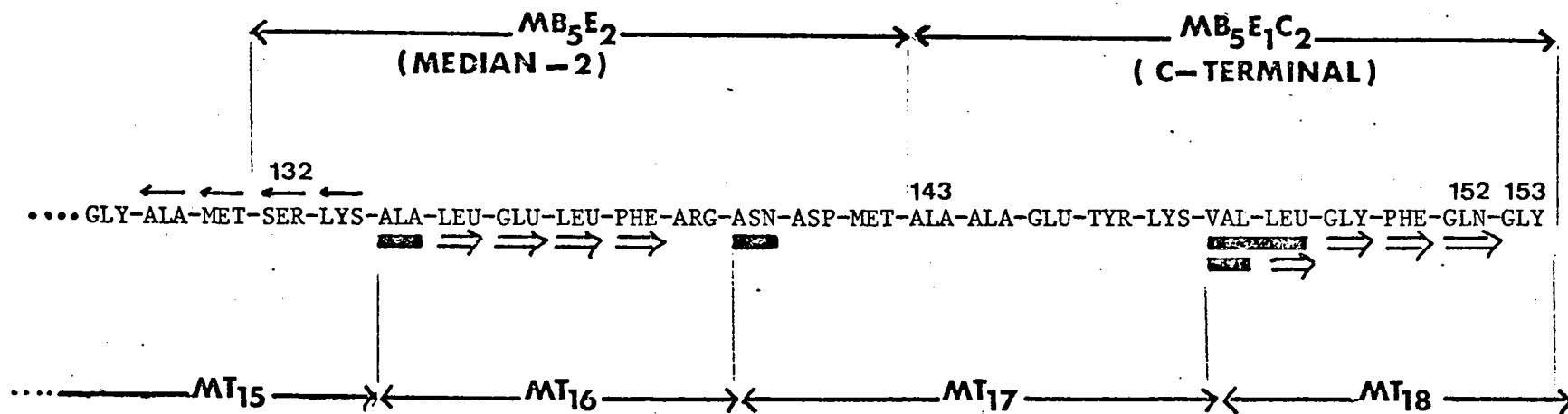


FIGURE 18 bis

1	5	10	15	20
GLY-LEU-SER-ASP-GLY-GLU-TRP-GLN-LEU-VAL-LEU-ASN-ALA-TRP-GLY-LYS-VAL-GLU-ALA-ASP-				
	25	30	35	40
VAL-ALA-GLY-HIS-GLY-GLN-GLU-VAL-LEU-ILE-ARG-LEU-PHE-THR-GLY-HIS-PRO-GLU-THR-LEU-				
	45	50	55	60
GLU-LYS-PHE-ASP-LYS-PHE-LYS-HIS-LEU-LYS-THR-GLU-ALA-GLU-MET-LYS-ALA-SER-GLU-ASP-				
	65	70	75	80
LEU-LYS-LYS-HIS-GLY-ASN-THR-VAL-LEU-THR-ALA-LEU-GLY-GLY-ILE-LEU-LYS-LYS-LYS-GLY-				
	85	90	95	100
HIS-HIS-GLU-ALA-GLU-VAL-LYS-HIS-LEU-ALA-GLU-SER-HIS-ALA-ASN-LYS-HIS-LYS-ILE-PRO-				
	105	110	115	120
VAL-LYS-TYR-LEU-GLU-PHE-ILE-SER-ASP-ALA-ILE-ILE-HIS-VAL-LEU-HIS-ALA-LYS-HIS-PRO-				
	125	130	135	140
SER-ASN-PHE-GLY-ALA-ASP-ALA-GLN-GLY-ALA-MET-SER-LYS-ALA-LEU-GLU-LEU-PHE-ARG-ASN-				
	145	150	153	
ASP-MET-ALA-ALA-GLU-TYR-LYS-VAL-LEU-GLY-PHE-GLN-GLY				

STRUCTURE PRIMAIRE DE LA MYOGLOBINE DE MOUTON

DISCUSSION ET CONCLUSION

Les stratégies utilisées pour déterminer la structure primaire des protéines sont relativement nombreuses. Dans le cas de la myoglobine de Mouton, nous avons choisi une stratégie alliant l'étude de l'hydrolysats trypsique de la globine totale à celle de l'hydrolysats chymotrypsique des fragments isolés après action du bromure de cyanogène. D'autre part, comme nous possédions au laboratoire une connaissance parfaite à la fois de la structure et des méthodes d'études de la myoglobine de Boeuf, l'application de la méthode comparative a représenté un apport non négligeable dans la détermination de la myoglobine de Mouton. Nous avons alors considéré qu'il était possible d'attribuer une structure aux peptides isolés après action de la trypsine sur la globine de Mouton, lorsque ceux-ci possédaient une composition en acides aminés, un résidu N-terminal ainsi qu'un comportement en chromatographie sur papier, sur colonne de résine identiques aux peptides tryptiques de la globine de Boeuf. Nous avons pu présenter une structure partielle de la myoglobine de Mouton, structure qui recouvre environ les 2/3 de sa chaîne peptidique. Ensuite, en vue d'étudier les fragments peptidiques qui nous avaient échappé, nous avons fait agir le bromure de cyanogène sur le peptide correspondant à la séquence 1 à 16, contenant les résidus de tryptophane, a pu être déterminé après action de la trypsine sur le N-peptide ; les peptides correspondant aux séquences 64 à 72 et 103 à 115 ont été déterminés par étude de l'hydrolysats chymotrypsique du M1-peptide.

Certes, l'application de stratégies classiques faisant appel à l'action d'endopeptidases, à l'action du bromure de cyanogène et aux méthodes non moins classiques de détermination de petits peptides (hydrolyse acide totale, dansylation, etc...), associée à la méthode comparative nous a permis l'établissement de la structure complète de la myoglobine de Mouton. Néanmoins, nous avons utilisé une technique "récente" de dégradation récurrente d'Edman automatique pour confirmer la structure établie et également pour valider la méthode comparative utilisée.

La dégradation d'Edman automatique ne permet toutefois que l'étude de séquences N-terminales plus ou moins larges (séquence 1 à 46 de la globine totale, séquence 55 à 94 du M1-peptide). Il ne semble donc pas que cette méthode automatique puisse bouleverser profondément la stratégie générale de l'étude des protéines ou des myoglobines en particulier : elle ne permet pas actuellement d'éviter la solubilisation du peptide résiduel, surtout lorsque celui-ci ne possède plus qu'une dizaine de résidus ; la méthode reste donc limitée à l'établissement de structure partielle. Elle peut néanmoins se révéler très utile, notamment en facilitant l'étude du core N-terminal de la myoglobine, toujours le plus difficile à isoler. C'est sans doute l'utilisation des méthodes manuelles de dégradation récurrente d'Edman (Dansyl-Edman et méthode directe d'Edman) facilitant l'application de stratégies classiques qui nous permettra dans un proche avenir d'acquérir des connaissances plus étendues sur la structure covalente des myoglobines et des protéines en général.

#### COMPARAISON DES SEQUENCES DES MYOGLOBINES

##### A) Structure et fonction de la myoglobine

Dans la plupart des protéines, l'ordre d'enchaînement des acides aminés se fait absolument au hasard. Néanmoins, la présence d'enchaînement caractéristique est une condition essentielle pour l'existence d'activités physiologiques spécialisées. La comparaison des différentes séquences en acides aminés des globines (séquence des myoglobines et des chaînes de l'hémoglobine, sa proche parente) nous permettra de mettre en évidence la relation liant la structure et la fonction des transporteurs d'oxygène.

La comparaison des séquences en acides aminés des myoglobines des 12 espèces actuellement connues, avec des chaînes de l'hémoglobine (chaîne  $\alpha$  de l'hémoglobine humaine, chaînes de l'hémoglobine ovine et de l'hémoglobine de Cheval), avec la séquence en acides aminés de la myoglobine de Mouton montre l'existence d'un certain nombre de résidus d'acides aminés invariants (Tableau VIII ).

Surtout depuis que la structure tertiaire de la myoglobine de Cachalot est connue, nous pensons que ces acides aminés invariants sont responsables de l'activité physiologique spécialisée de la myoglobine, possèdent un rôle fondamental d'une part au niveau des interactions

vis-à-vis de l'hème et d'autre part pour le maintien de la structure tertiaire (DICKERSON et GEIS -128 ). Le rôle important de ces résidus communs à toutes les myoglobines et à la myoglobine de Mouton en particulier est rappelé dans les paragraphes qui suivent.

### 1°) Interactions avec l'hème

Comme pour les myoglobines de Cachalot et de Phoque dont la structure tridimensionnelle a été déterminée, les acides aminés HIS E7, HIS F8, PHE CD1 et LEU F4 de la myoglobine de Mouton doivent collaborer afin de faciliter l'action de l'hème (Cf chapitre I) . Nous ne négligeons pas non plus l'importance des motifs à caractère hydrophobe (VAL, LEU, ILE, MET, PHE et TRP) qui occupent deux sortes d'emplacements.

\* Certains bordent la frange interne des hélices

TRP A12, PHE GH5, VAL A15 etc... permettent la protection de l'hème vis-à-vis du milieu extérieur.

\* D'autres forment un tapis hydrophobe à l'intérieur de la "crevasse" où s'encastre l'hème :

VAL E11, ALA E14, LEU C15, ILE G8, LEU H13

Bien que l'hème n'ait pas de liaisons covalentes avec la globine en dehors de ses liens au sein du complexe de coordination, nous pouvons penser que les principales forces stabilisatrices qui maintiennent l'hème en place sont apparemment les attractions hydrophobes et les liaisons de Van der Waals décrites précédemment. Cependant, des liaisons hydrogènes ou salines entre certains résidus de la protéine et les chaînes latérales propioniques de l'hème favorisent également le maintien de l'hème dans la "crevasse" : ainsi, le groupement propionique qui se replie vers l'hélice F fait une liaison hydrogène avec l'un des azotes du cycle de l'HIS FG3 et l'autre groupement est lié à LYS CD3 elle-même retenue par ASP E3.

### 2°) Maintien de la structure tertiaire

La majeure partie de la molécule est faite d'hélices très stables. Il existe donc des résidus "formateurs d'hélice" du côté où débutent les hélices pour amorcer la spiralisation (les résidus acide glutamique) et des résidus capables d'interrompre le processus à l'autre extrémité (les résidus de lysine).

Cependant, il est impossible de construire une molécule globulaire uniquement à partir d'hélices sans les replier les unes sur les

SITES INVARIANTS *				SITES PRESQUE TOUJOURS INVARIANTS **			
N°	Numérotation correspondant à la structure tridimensionnelle	Acide aminé	MOUTON	n°	Numérotation correspondant à la structure tridimensionnelle	Acide aminé	MOUTON
14	A12	TRP	TRP	16	A14	LYS	LYS
25	B6	GLY	GLY	17	A15	VAL	VAL
37	C2	PRO	PRO	31	B12	ARG	ARG
39	C4	THR	THR	40	C5	LEU	LEU
43	CD1	PHE	PHE	45	CD3	ARG	LYS
46	CD4	PHE	PHE	60	E3	ASP	ASP
49	CD7	LEU	LEU	71	E14	ALA	ALA
64	E7	HIS	HIS	80	EF3	GLY	GLY
65	E8	GLY	GLY	96	FG2	HIS	HIS
68	E11	VAL	VAL	99	FG5	ILE	ILE
89	F4	LEU	LEU	100	G1	PRO	PRO
93	F8	HIS	HIS	104	G5	LEU	LEU
133	H9	LYS	LYS	107	G8	ILE	ILE
146	H22	TYR	TYR	123	G15	PHE	PHE
				137	H13	LEU	LEU

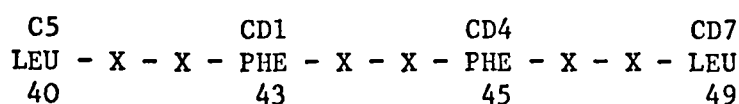
\* Le relevé des sites non mutés a été réalisé en se basant sur la comparaison effectuée au niveau des globines par DICKERSON et GEIS(127) en y incluant les myoglobines dont les séquences ont été entièrement déterminées.

\*\* sites non mutés importants mais pour quelques globines (en particulier certaines chaînes de l'hémoglobine) la position est occupée par un acide aminé équivalent (mutation conservative de LYS en ARG par exemple).

TABLEAU VIII

autres, ce qui force la chaîne à former des coudes. La présence des résidus de PRO (C2 et C11) et de GLY (EF3) semble une condition suffisante mais non nécessaire pour former un coude.

La région non hélicoïdale CD n'est pas sans importance. Elle s'incurve de façon à ramener côte à côte les groupes hydrophobes à l'aide de la séquence



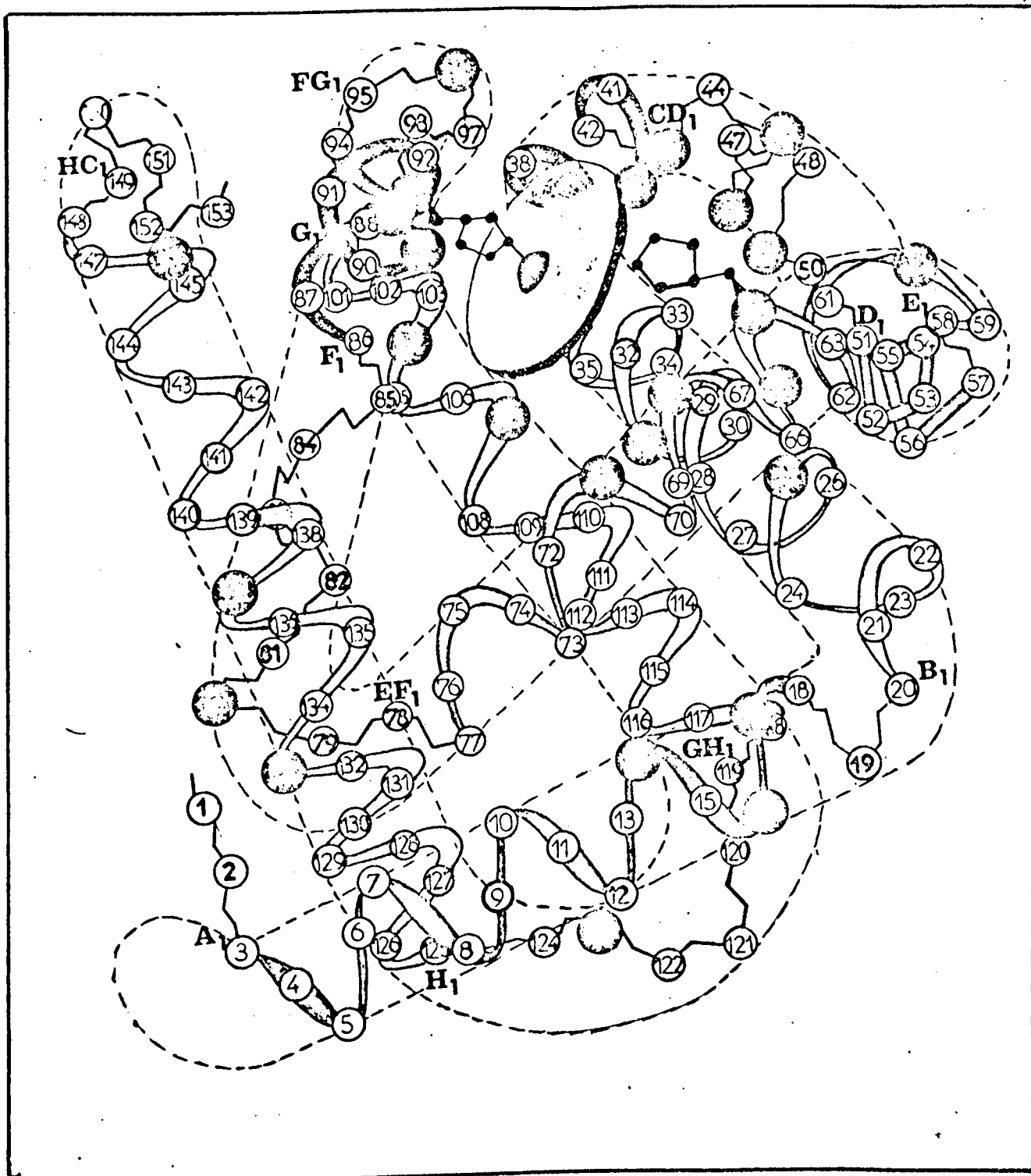
D'autres acides aminés ont une importance non négligeable pour le maintien de la structure tertiaire de la molécule. Par exemple le GLY (B6 et E8) sont à la surface de contact des hélices B et E à des endroits où il n'y a pas de place pour des chaînes latérales.

D'autre part, si on examine la structure tertiaire de la myoglobine (Figure 19) nous avons l'impression qu'il y a relativement peu d'endroits où les chaînes latérales ont des associations spécifiques dans le but d'obliger les hélices à s'agencer d'une certaine façon (les 11 résidus de sérine et de thréonine de la myoglobine de Cachalot n'opèrent de liaisons hydrogène qu'avec leur carbonyle). Cependant, la Thr C4 fait exception (elle forme avec l'HIS C1 une liaison hydrogène croisée aidant à la formation du tournant CD) ainsi que la TYR H22 qui fait avec l'ILE FG5 une liaison hydrogène d'une importance vitale : certains auteurs (en particulier PERUTZ (129) et LEHMAN (130) sur l'hémoglobine) ont montré que la fixation d'oxygène s'effectue grâce au déplacement de l'axe Fer-HIS F8 perpendiculairement au plan de la porphyrine ; l'hélice F se resserre en direction du centre de la molécule vers l'hélice H et expulse de son emplacement TYR H22 ; ceci entraîne la rupture des ponts salins et hydrogènes et favorise alors la conformation Oxy-globine.

### 3°) Conclusion

La connaissance de la structure primaire de la myoglobine de Mouton apporte des arguments supplémentaires en faveur du rôle joué par les différents acides aminés invariants. En effet, parmi les mutations observées pour la myoglobine de Mouton, aucune n'affecte ces acides aminés importants, responsables de l'activité physiologique spécialisée et du maintien de la structure tertiaire de la myoglobine. Ceci nous





POSITION DES DIFFERENTS ACIDES AMINES "INVARIANTS"  
 (apparaissant en sombre)  
 DANS LA STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE LA MYOGLOBINE (d'après PERUTZ - 131)

FIGURE 19

permet également d'avoir plus que des présomptions quant à la nature de la structure tridimensionnelle de la myoglobine de Mouton : elle est sans doute identique à celle décrite dans la littérature pour la myoglobine de Cachalot (KENDREW et al.) (132).

B) Relations phylogénétiques entre les myoglobines

1°) Généralités

La conception darwinienne de l'évolution des espèces basée sur la sélection naturelle et la phylogénie classique (Taxonomie) étudient l'histoire du développement des espèces en faisant appel à des critères morphologiques et en ayant essentiellement recours aux données fournies par la paléontologie, l'anatomie, l'ostéologie comparée et le comportement immunologique des espèces. Cependant, dès que quelques structures covalentes de protéines homologues furent élucidées, on s'est rapidement rendu compte qu'il devait exister une relation entre le temps d'apparition des diverses familles animales et les différences dans les séquences en acides aminés observées pour une même protéine d'une espèce à l'autre (évolution à l'échelle moléculaire). En effet, la séquence en acides aminés est le reflet fidèle de la séquence nucléotidique de la partie correspondante du génome contenant l'information génétique d'une espèce donnée : chaque acide aminé est codé par un triplet de nucléotides et l'altération ou le remplacement d'un nucléotide produit un changement dans la séquence protéique (mutation ponctuelle).

L'étude comparative des séquences en acides aminés d'une même variété de protéines nous permet ainsi d'aboutir, d'une part, à la construction d'arbre phylogénétique avec, entre les diverses branches une échelle de temps (cf. l'arbre phylogénétique établi à partir de la structure des cytochromes c par FITCH et MARGOLIASH (133) et d'autre part à la déduction des séquences en acides aminés des protéines que possédaient l'ancêtre commun. L'étude comparative des séquences en acides aminés d'une même variété de protéines a permis également une comparaison de la taxonomie classique avec les études de l'évolution à l'échelle moléculaire.

Nous avons envisagé les problèmes de l'évolution moléculaire par le biais des séquences en acides aminés des myoglobines. Les relations phylogénétiques entre les différentes myoglobines basées sur des critères

les plus fréquemment utilisés (pourcentage moyen de similitude, le nombre minimum de bases différentes MBD) ont été établies et discutées dans les paragraphes qui suivent et nous ont permis d'envisager la construction d'un arbre phylogénétique .

## 2°) Pourcentage moyen de similitude

Dans le problème de l'évolution moléculaire, le nombre d'acides aminés communs relevés dans les structures covalentes de protéines homologues s'exprime par un paramètre simple : le pourcentage moyen de similitude.(134) .

Le nombre des acides aminés communs aux différentes myoglobines, comparées deux a deux, a été repris (cases situées au dessus de la diagonale du Tableau IX ). Le pourcentage de similitude est alors obtenu en divisant ce nombre d'acides aminés communs par le nombre total des 153 résidus constituant la molécule (chiffres situés dans les cases sous la diagonale du Tableau IX ).

A partir des séquences disponibles dans la littérature, les myoglobines peuvent être réparties en quatre groupes, correspondant au groupe des Cétacés (pourcentage moyen de similitude de 88,7), au groupe des ongulés (90,8), au groupe des Primates (97,1) et au groupe des Marsupiaux (82,4). D'après ce critère, la myoglobine de Mouton apparaît comme ayant divergé presque en même temps que les myoglobines de Cheval et de Boeuf, ce qui s'avère en concordance avec les théories classiques de l'évolution.

Cependant, étant donné le caractère très approximatif de la méthode et le trop petit nombre de séquences disponibles, aucun classement précis ne peut être dégagé en ce qui concerne les Mammifères, mais tout au plus, permet de rassembler les différentes espèces en divers groupes animaux. Notons néanmoins qu'une légère différence est décelée pour le Kangourou (82,4) telle que, l'ordre des Marsupiaux apparaît plus ancien que ceux auxquels appartiennent les autres Mammifères.

Si l'on compare la myoglobine et la chaîne  $\alpha$  de l'hémoglobine de Mouton, une trentaine de correspondances en acides aminés sont observées sur 141 résidus. Cette faible ressemblance confirme la différenciation précoce des chaînes des myoglobines et de l'hémoglobine. Cette différenciation apparaît même bien plus précoce que celle des diverses espèces envisagées (la myoglobine de Mouton se révèle plus proche de la myoglobine de Kangourou que de la chaîne  $\alpha$  de l'hémoglobine

	CACHALOT	MARSOUIN	DAUPHIN	PHOQUE	HOMME	GIBBON	CHIMPANZE	MACAQUE	BABOUIN	KANGOUROU	CHEVAL	BOEUF	MOUTON
CACHALOT		138	144	127	128	127	129	128	127	120	134	123	126
MARSOUIN	90,2		141	136	133	132	134	131	131	124	137	130	130
DAUPHIN	94,1	92,2		129	127	126	128	126	126	120	132	124	125
PHOQUE	83,0	88,9	84,3		129	128	130	130	130	126	133	125	126
HOMME	83,7	87,0	83,0	84,3		152	152	146	147	131	134	124	130
GIBBON	83,0	86,3	82,4	83,7	99,3		151	147	148	130	133	123	129
CHIMPANZE	84,3	87,6	83,7	85,0	99,3	98,7		145	146	130	135	125	131
MACAQUE	83,7	85,6	82,4	85,0	95,4	96,1	94,8		152	133	135	124	130
BABOUIN	83,0	85,6	82,4	85,0	96,1	96,7	95,4	99,3		133	135	124	130
KANGOUROU	78,4	81,0	78,4	82,4	85,6	85,0	85,0	87,0	87,0		125	118	124
CHEVAL	87,6	89,5	86,3	87,0	87,6	87,0	88,2	88,2	88,2	81,7		135	137
BOEUF	80,4	85,0	81,0	81,7	81,0	80,4	81,7	81,0	81,0	77,1	88,2		145
MOUTON	82,4	85,0	81,7	82,4	85,0	84,3	85,6	85,0	85,0	81,0	89,5	94,8	

NOMBRE D'ACIDES AMINES COMMUNS AUX DIFFERENTES MYOGLOBINES (cases au-dessus de la diagonale) - POURCENTAGE DE SIMILITUDE ENTRE LES MYOGLOBINES COMPAREES (cases sous la diagonale)  
(en médaillon : pourcentage moyen de similitude pour les mammifères regroupés suivant leur appartenance à un même ordre)

TABLEAU IX

de Mouton).

### 3°) Nombre minimum de bases différentes (MBD)

Le nombre minimum de mutations nécessaires pour passer du gène codant une protéine d'une espèce au gène codant cette même protéine pour une autre espèce est également un paramètre fréquemment utilisé pour approcher le problème de l'évolution moléculaire.(135)

Les nombres minimum de bases différentes sont donnés dans le Tableau X (cases sous la diagonale) : dans un premier temps, nous avons relevé le nombre de résidus différents en comparant deux à deux les différentes séquences en acides aminés des myoglobines (cases au dessus de la diagonale du Tableau) ; nous avons relevé le nombre de mutations simples (ex. : VAL codé par GUX remplacé par GLY codé par GGX) correspondant aux chiffres inscrits dans la partie gauche de cette case ; nous avons ensuite relevé le nombre de mutations doubles (CYS codé par UGX remplacé par ALA codé par GCX) correspondant aux chiffres inscrits dans la partie droite de cette case.

Le nombre de bases différentes est alors obtenu en additionnant le nombre de mutations simples au nombre de mutations doubles multiplié par 2.

### 4°) Construction d'un arbre phylogénétique

Le nombre minimum de bases différentes nous permet d'envisager la construction d'un arbre phylogénétique.

Dans un premier temps, les valeurs du Tableau nous ont permis de rassembler les différentes familles animales : nous avons considéré la distance séparant deux espèces, comme étant le nombre minimum de mutations ; ces distances sont ensuite distribuées selon deux axes (en abscisses, les distances observées par rapport au Mouton et en ordonnées, les distances observées par rapport à l'Homme). Nous constatons ainsi l'existence de groupes animaux homogènes inscrits dans un même triangle (Figure 20) : les Primates (Homme, Gibbon, Chimpanzé, Babouin, Macaque), les Ongulés (Cheval, Boeuf et Mouton), les Cétacés (Marsouin, Dauphin et Cachalot) auxquels nous pouvons adjoindre le Phoque (Pinnipède).

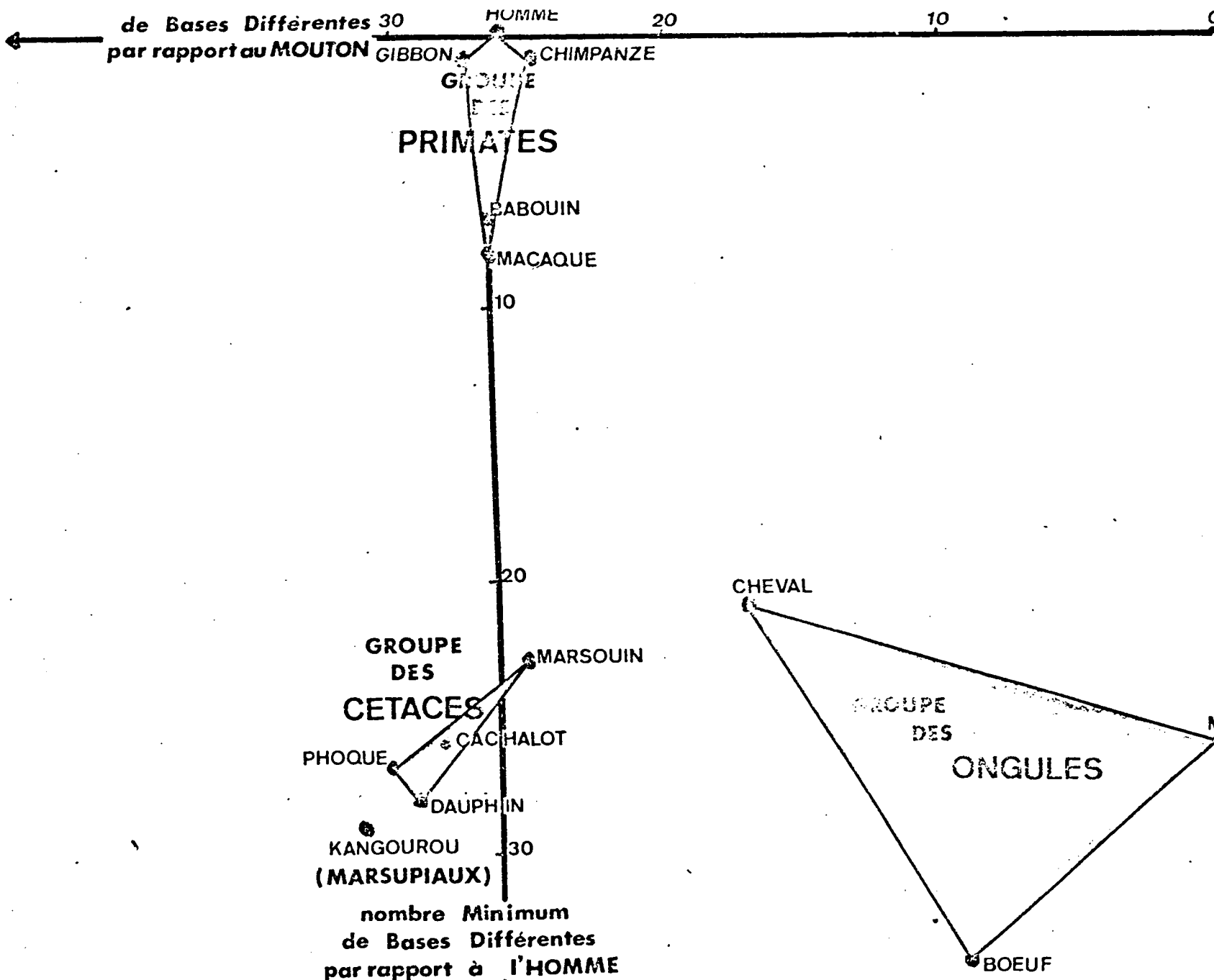
Ce résultat est d'ailleurs en accord avec ceux obtenus à partir

	CACHALOT	MARSOUIN	DAUPHIN	PHOQUE	HOMME	GIBBON	CHIMPANZE	MACAQUE	BABOUIN	KANGOUROU	CHEVAL	BOEUF	MOUTON
CACHALOT		15 <sub>12</sub> 3 8	9 <sub>1</sub> 23 3 24	26 <sub>1</sub> 25 1 25	25 <sub>1</sub> 26 1 23	26 <sub>1</sub> 24 1 25	24 <sub>1</sub> 25 0 26	25 <sub>0</sub> 26 0 31	26 <sub>0</sub> 33 2 17	19 <sub>2</sub> 30 2 27	30 <sub>3</sub> 27 3 26	27 <sub>1</sub>	
MARSOUIN	18		12 <sub>10</sub> 2 15	17 <sub>2</sub> 20 3 18	20 <sub>3</sub> 21 3 16	21 <sub>3</sub> 19 3 19	19 <sub>3</sub> 22 3 20	22 <sub>2</sub> 22 2 25	22 <sub>2</sub> 29 4 13	16 <sub>3</sub> 23 5 21	23 <sub>5</sub> 23 2 21	23 <sub>2</sub>	
DAUPHIN	10	14		24 <sub>22</sub> 2 24	26 <sub>2</sub> 27 2 23	27 <sub>2</sub> 25 2 26	25 <sub>2</sub> 27 1 26	27 <sub>1</sub> 27 1 29	33 <sub>4</sub> 21 3 26	21 <sub>3</sub> 29 3 27	29 <sub>3</sub> 28 1 27	28 <sub>1</sub>	
PHOQUE	29	19	26		24 <sub>21</sub> 3 22	25 <sub>3</sub> 20 3 20	23 <sub>3</sub> 20 3 21	23 <sub>2</sub> 24 3 17	27 <sub>3</sub> 20 3 23	20 <sub>3</sub> 28 5 24	28 <sub>5</sub> 27 3 24	27 <sub>3</sub>	
HOMME	26	23	28	27		1 1 0 1 0	1 0 7 0	6 6 0 15	22 7 17 2	19 2 24 5	29 5 20 3	23 3	
GIBBON	27	24	29	28	1		2 2 0 6 6 0	5 5 0 16	23 7 18 2	20 2 25 5	30 5 21 3	24 3	
CHIMPANZE	25	22	27	26	1	2		8 8 0 7 7 0	16 23 7 16 2	18 2 23 5	28 5 19 3	22 3	
MACAQUE	25	24	28	26	7	6	8		1 1 0 17 20 3	16 18 2 26 3	29 3 21 2	23 2	
BABOUIN	26	24	28	25	6	5	7	1		16 20 4 17 18 1	29 3 22 1	23 1	
KANGOUROU	35	33	37	30	29	30	30	23	24		25 28 3 30 5 27 2	29 2	
CHEVAL	21	19	24	23	21	22	20	20	19	31		15 18 3 15 1	16 1
BOEUF	33	28	32	33	34	35	33	32	32	40	21		7 8 1
MOUTON	28	25	29	30	26	27	24	25	24	31	17	9	

NOMBRE d'ACIDES AMINE DIFFERENTS ENTRE LES DIFFERENTES MYOGLOBINES COMPAREES  
(cases au dessus de la diagonale) Dans ces cases sont également indiqués le nombre de mutations simples (chiffre de gauche, en petit caractère) et le nombre de mutations simples (chiffre de droite en petit caractère)

**TABEAU X**

NOMBRE MINIMUM DE BASES DIFFERENTES PAR CODON POUR LES DIFFERENTES MYOGLOBINES COMPAREES  
(cases sous la diagonale)



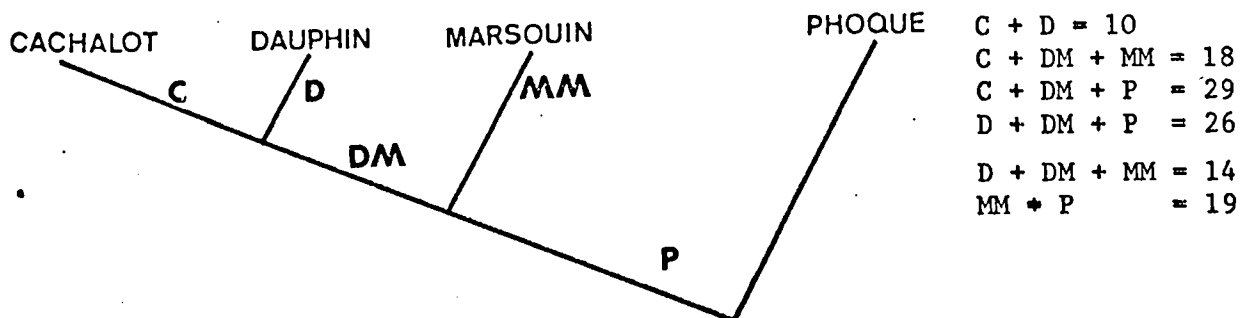
RASSEMBLEMENT DES DIFFERENTES ESPECES DE MAMMIFERES  
DONT LA STRUCTURE PRIMAIRE DE LA MYOGLOBINE EST DETERMINEE  
(Les espèces sont distribuées selon leur **MBD**—Nombre Minimum de Bases Différentes par codon—  
par rapport au Mouton—Axe des Abscisses— et par rapport à l'Homme—Axe des ordonnées—

du calcul du pourcentage moyen de similitude, mais l'existence de groupe animal peut ainsi être visualisée. D'autre part, en vue de construire l'arbre phylogénétique, ce résultat nous permet d'envisager les différents groupes animaux indépendamment les uns par rapport aux autres.

Pour construire cet arbre phylogénétique, nous nous sommes inspiré de la méthode simple de FITCH et MARGOLIASH (136). Les espèces d'un même groupe animal sont tout d'abord réparties dans un même plan, selon les distances correspondant au nombre minimum de bases différentes et de telle sorte que les distances entre les différentes espèces soient respectées.

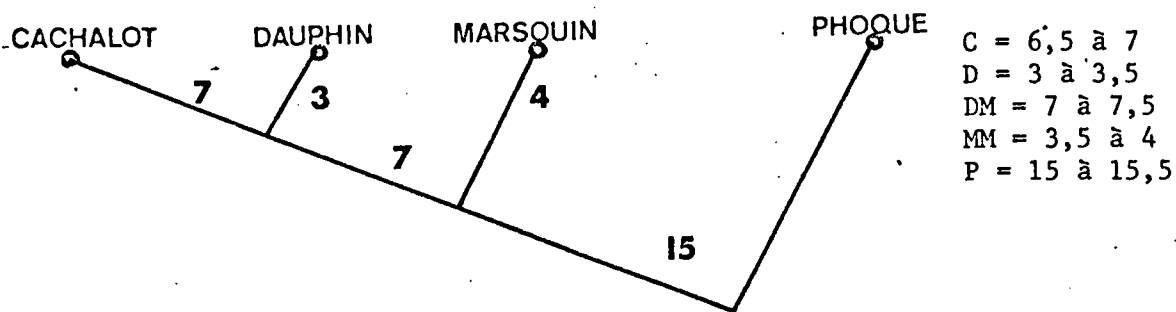
Exemple : le groupe des Cétacés

Il existe 10 différences entre le gène qui a codé la myoglobine de Cachalot et celui qui a codé la myoglobine de Dauphin ; 18 entre le Cachalot et le Marsouin ; 14 entre le Dauphin et le Marsouin ; 29 entre le Cachalot et le Phoque ; 19 entre le Marsouin et le Phoque ; 26 entre le Dauphin et le Phoque ; ces différences correspondent à des distances, telles que



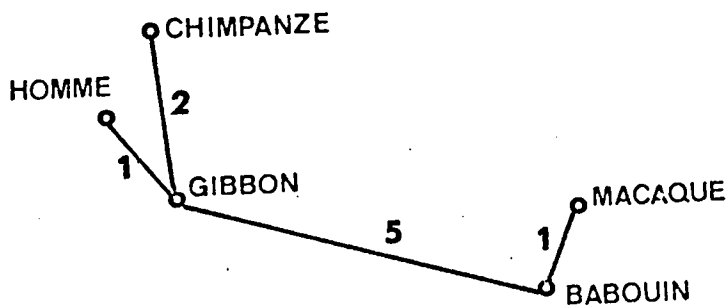
Nous avons un système d'équations à plusieurs inconnues qui est facilement résolu et nous obtenons :



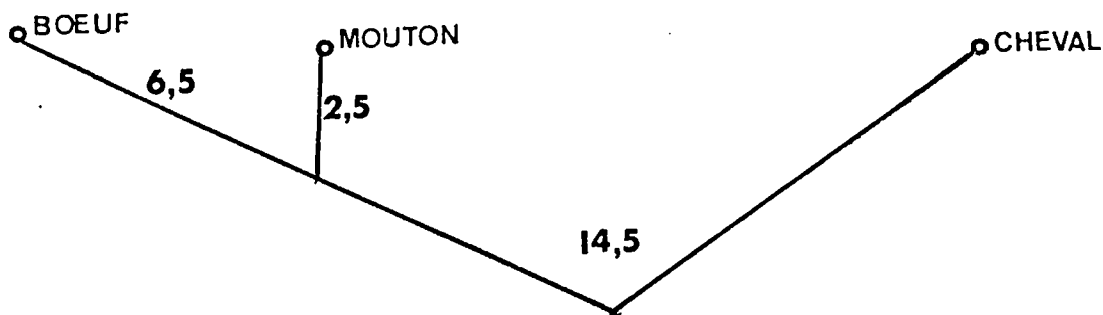


\* Remarques : Les distances entre les différentes espèces ne correspondent pas à des nombres entiers, mais elles sont comprises dans une certaine "fourchette" de valeurs. Sans doute, cela tient au fait que notre mesure de la divergence évolutionnelle basée sur le MBD n'est pas rigoureuse. Ce problème sera d'ailleurs discuté plus loin.

Nous avons ensuite considéré les Primates :

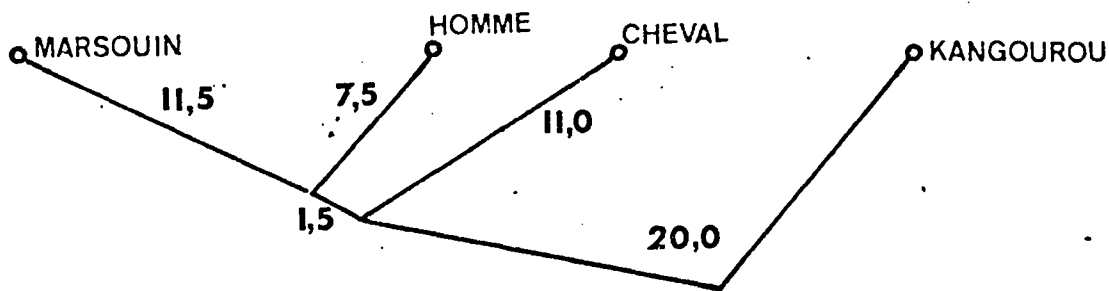


Ensuite le groupe des Ongulés :

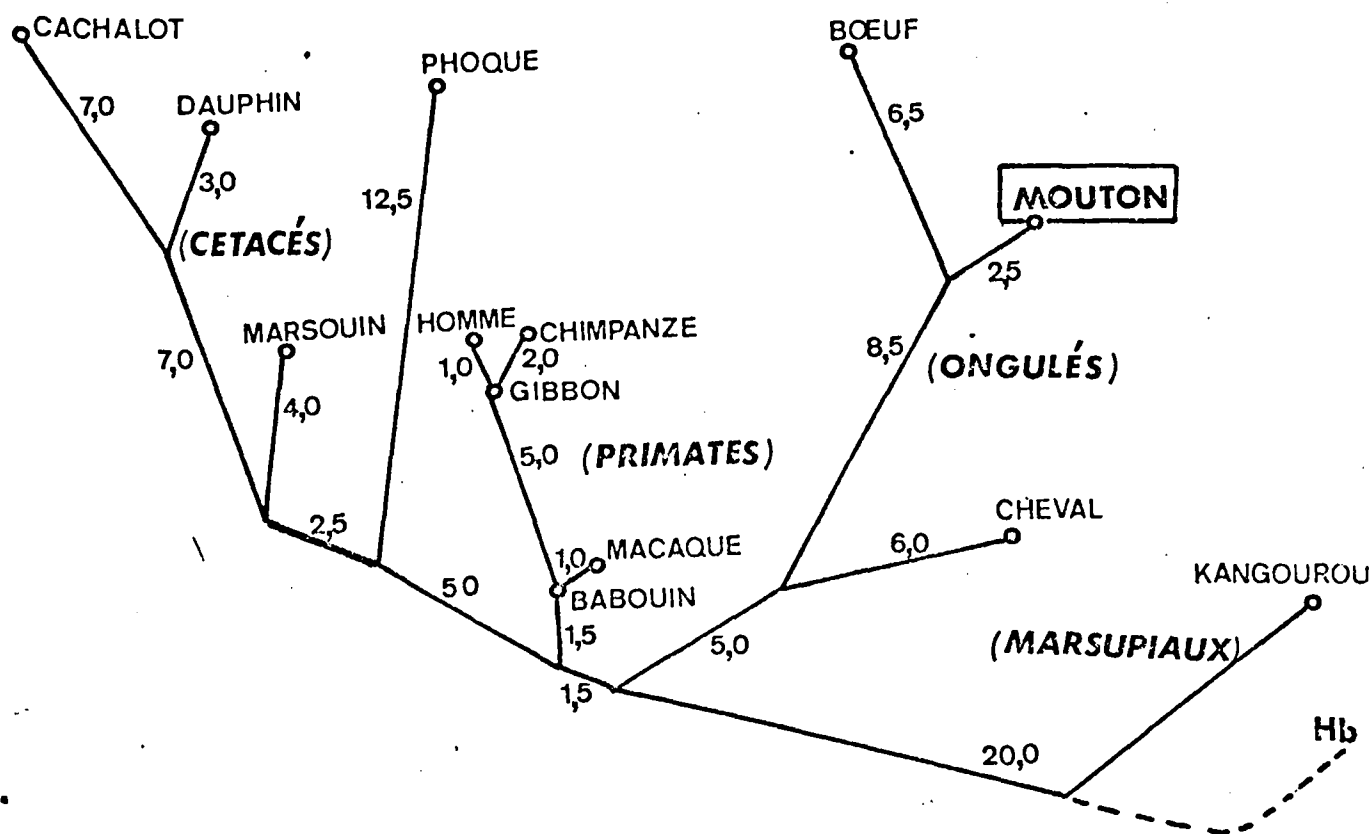


Afin de réunir les différentes familles animales, nous considérons un représentant de chaque groupe : l'Homme pour l'ordre des Primates, le Marsouin (l'ordre des Cétacés) et le Cheval (super ordre des Ongulés), les espèces les plus proches de l'Homme et le Kangourou (Ordre des Marsupiaux).

Nous obtenons :



Nous avons ensuite rassemblé les résultats obtenus :



### 5°) Discussion et Conclusion

La comparaison phylogénétique des myoglobines fait apparaître celle du Mouton comme appartenant au groupe des Mammifères Ongulés. Cependant, les divers modèles envisagés ne s'avèrent pas suffisamment précis et rigoureux pour élaborer une classification phylogénétique valable de toutes les espèces animales considérées, même si les résultats obtenus permettent une approche qualitative du problème de l'évolution moléculaire.

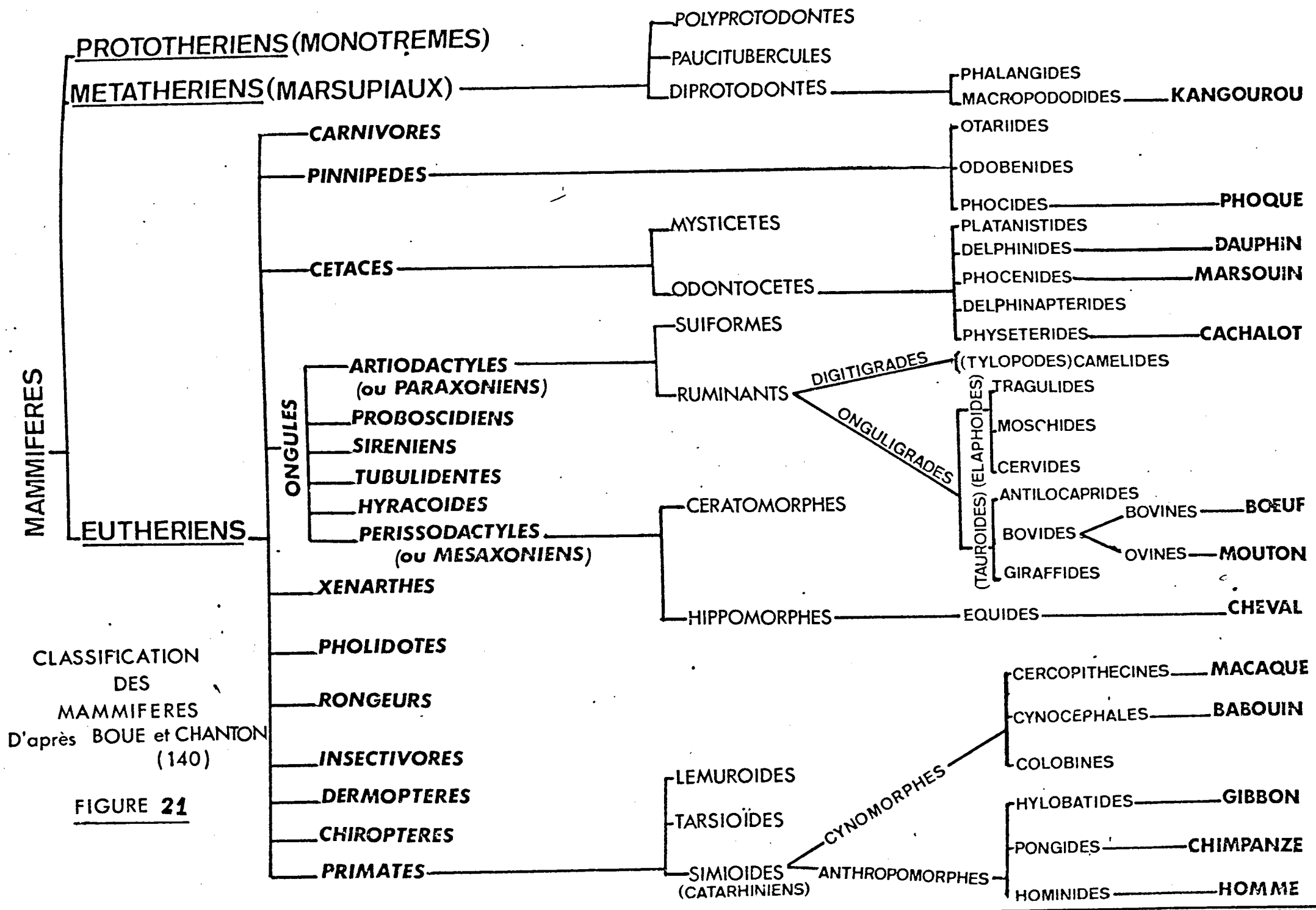
En effet, le nombre de séquences disponibles dans la littérature reste insuffisant. D'autre part, les comparaisons basées sur l'examen des structures covalentes de la même mesure de la divergence évolutionnelle sur la base du nombre minimum de différences de bases (MBD) ne tiennent nullement compte des facteurs statistiques qui jouent cependant un rôle non négligeable dans le processus de l'évolution. Ces facteurs statistiques pouvant intervenir sont :

- les mutations multiples à un même site ;
- les mutations retour ;
- les mutations qui se produisent sur une base non significative d'un triplet et qui ne conduisent donc à aucune substitution d'acides aminés (dégénérescence du code - WATSON -137 )
- la viabilité du mutant (les mutations ont certainement eu, dans leur immense majorité un effet létal ; en général, ne sont tolérées que des mutations entraînant des substitutions d'acides aminés à caractère conservateur ; cependant, lorsque la mutation conduit à un organisme non viable, la mutation ne peut être observée).

Certains auteurs ont tenté de faire intervenir ces facteurs statistiques, DAYHOFF et al. (138) par exemple utilisent le P.A.M.S. (Punct occupied mutations/100 résidus), HOLMQUIST et al. (139) introduisent le R.E.H. (Random evolutionary hits), des paramètres plus élaborés que le MBD. Le P.A.M.S. et le R.E.H. ne rendent qu'imparfaitement compte des événements mutationnels et de plus, ceux-ci font appel à l'informatique et à certains critères mathématiques, toujours difficiles à manipuler.

Ces quelques considérations montrent qu'il est impossible d'imaginer des relations simples entre les changements mutationnels et les modifications de protéines qui sont observées ; les relevés des différences, basés sur de simples comparaisons entre protéines homologues ne constituent donc à l'heure actuelle qu'une grossière estimation du nombre d'événements mutationnels ayant dû exister pour permettre le passage d'une protéine à une autre.

D'autre part, l'examen de l'arbre phylogénétique nous permet de penser que le groupe des Cétacés fait partie des familles animales les plus évoluées, à l'inverse de ce qui est constaté en taxonomie classique (Figure 21 ). Sans doute, les Cétacés en s'adaptant au milieu marin



CLASSIFICATION  
DES  
MAMMIFÈRES  
D'après BOUE et CHANTON  
(140)

FIGURE 21

ont dû augmenter leur capacité de fixation d'oxygène et la myoglobine s'en trouve transformée d'autant. On peut alors croire que le type d'évolution envisagé (basé sur la structure des myoglobines) ne soit surtout valable que pour certaines protéines (les transporteurs d'oxygène) et qu'il en soit tout autrement pour une protéine différente (une protéine de structure par exemple).

Une étude complète de l'évolution des espèces à l'échelle moléculaire verrait donc son dénouement que lorsque les études comparatives de nombreuses protéines homologues de fonctions diverses auraient abouti.

### III - CONCLUSION GENERALE

Le but de notre travail a été d'apporter une contribution à l'étude des myoglobines de Mammifères (celle des Ongulés en particulier). La structure covalente de la myoglobine de Mouton a en effet été élucidée en utilisant à la fois des méthodes classiques et des méthodes plus récentes (dégradation d'Edman automatique). Les différentes propriétés utilisées pour caractériser la molécule ont fait apparaître une grande analogie, essentiellement au niveau des comportements en électrophorèse et chromatographie, vis-à-vis de la myoglobine de Boeuf (nous notons l'existence de 8 acides aminés différents).

La structure covalente de la myoglobine de Mouton nous a permis également de préciser la relation existant entre la structure et la fonction de la myoglobine. Et parmi les mutations observées chez le Mouton, aucune ne semble susceptible d'introduire une modification sensible au niveau des acides aminés importants, impliqués soit dans les interactions avec l'hème ou soit ceux qui permettent le maintien de la structure tertiaire.

La structure covalente de la myoglobine de Mouton nous a permis d'ébaucher une étude générale des relations phylogénétiques des diverses myoglobines. Nous avons noté que les changements majeurs en acides aminés de la myoglobine de Mouton concernaient essentiellement une seule base de codon ; jamais les 3 bases d'un codon ne subissent en même temps une mutation. Des critères tels que le pourcentage moyen de similitude, le nombre de bases différentes (MBD) nous ont permis la construction d'un arbre phylogénétique. D'autre part, ces résultats

nous permettent de penser qu'il existait en des temps très anciens un ancêtre primitif commun à toutes les espèces considérées. Cet ancêtre possédait une seule hémoprotéine capable de fixer l'oxygène (comme la Lamproie qui ne possède qu'une seule hémoprotéine). Cette protéine était codée par un certain gène. Des mutations ont affecté ce gène au hasard en provoquant des changements d'acides aminés dans la séquence. De telles modifications de séquence au cours du temps, génération après génération ont eu lieu de façon très lente. Ce gène particulier s'est dédoublé à un certain moment de l'histoire des espèces (selon un processus bien connu des généticiens - DIXON - [14] ) ; chaque gène ainsi formé a synthétisé une protéine : un gène synthétisant une protéine qui stockerait l'oxygène (la myoglobine), l'autre une protéine assurant le transport de l'oxygène (l'hémoglobine).

Les résultats obtenus nous permettent de penser également que la différenciation de la myoglobine des Marsupiaux (Kangourou) a été plus précoce que celle des Mammifères. Cependant, si la comparaison entre les structures covalentes de protéines homologues, des myoglobines en particulier est un outil intéressant dans l'analyse des rapports évolutifs entre les différentes espèces animales, on réalisera aisément qu'à l'heure actuelle cette méthode ne saurait, en raison du trop petit nombre de séquences de myoglobine disponibles dans la littérature (13 espèces) et de l'imprécision dans les méthodes d'évaluation de la divergence évolutionnelle utilisées, constituer à elle seule la base d'une taxonomie valable.

Il reste donc indispensable de poursuivre les études des structures covalentes des protéines chez divers animaux choisis préférentiellement au niveau des embranchements majeurs de l'arbre phylogénétique.

APPENDICE TECHNIQUE

---

## I - PREPARATION DE LA MYOGLOBINE DE MOUTON

La préparation est réalisée sur une quinzaine de kilos de coeur, soit une centaine de coeurs environ : ceux-ci sont débarrassés des tissus adipeux et conjonctifs, des oreillettes et des artères coronaires ainsi que des caillots de sang, afin que la solution de départ soit le moins possible souillée d'hémoglobine et de protéines autre que la myoglobine. Le muscle cardiaque est ensuite découpé, haché et finement broyé en présence d'eau distillée à l'aide de l'Ultra-Turrax, type 1812 (1250 ml d'eau distillée par kilo de coeur haché) jusqu'à l'obtention d'une bouillie homogène et liquide. A la purée musculaire obtenue, nous ajoutons environ 20 ml de toluène afin d'éviter la prolifération des bactéries. Nous laissons la préparation 24 heures à 4°C.

La préparation est ensuite centrifugée à 4 000 t/mn et le surnageant est alors filtré afin d'éliminer les particules grasses : la filtration est réalisée sur filtre Büchner de 30 cm de diamètre à travers une double couche de papiers whatman n° 1 et n° 3.

La solution rougeâtre obtenue est ajustée à 83 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium par addition, par petites portions, de 562 g de  $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$  par litre de solution en essayant de maintenir le pH aux environs de pH 7,0 par addition d'ammoniaque concentrée. Lorsque la totalité du sulfate d'ammonium a été introduite, nous ajustons définitivement le pH à 7,0 et nous laissons sous forte agitation durant 5 heures l'hémoglobine et les protéines non hémiques précipitent. Le précipité est éliminé par filtration sur une double épaisseur de papier Whatman n° 1. Le filtrat obtenu est ajusté à 98 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium en ajoutant par petites portions 127,5 g de sulfate d'ammonium tout en maintenant le pH à 7,0 comme précédemment. Après deux heures d'agitation, le précipité est recueilli sur verre fritté n° 3 en prenant bien soin de ne pas laisser sécher la préparation sur le verre fritté. La préparation est lavée par un litre de solution molaire de sulfate d'ammonium. La myoglobine est ensuite dissoute dans le minimum d'ammoniaque 0,01 N et dialysée en boudin de cellophane contre 10 litres d'eau distillée durant 2 à 3 jours (l'eau distillée est renouvelée plusieurs



fois par jour) ; finalement, la solution de myoglobine est lyophilisée, les flacons sont conservés en chambre froide à + 4°C.

A partir de 15 kg de coeur, nous pouvons isoler 3,5 g de myoglobine.

## II - CRITERES DE PURETE

### 1°) Chromatographie sur couche mince de Sephadex (142)

10 g de Sephadex G 75 superfine sont introduits dans 150 ml d'un tampon Tris-hydroxyméthylaminométhane 0,05 M et KCl 0,1 M de pH 7,5. Nous laissons gonfler le gel pendant une nuit afin qu'il présente la consistance souhaitable pour être étalé sur une plaque de verre de 20 x 40 cm, sur une épaisseur d'un mm ; 5 µl d'une solution protéique de 12 mg/ml sont déposés sur le gel et une chromatographie descendante est réalisée (sur un plan incliné de 10° par rapport à l'horizontale) dans une chambre humide saturée avec le tampon Tris/KCl de pH 7,5, à 20°C et pendant 15 heures. Après séchage sous un séchoir à air chaud, la plaque est révélée à l'Amidoschwarz et l'O-dianisidine (colorant spécifique des chromoprotéines à activité peroxydasique).

### 2°) Electrophorèse sur acétate de cellulose :

L'homogénéité de la préparation est contrôlée en électrophorèse sur acétate de cellulose à pH 8,6 sous 250 volts. La révélation est faite au Rouge Ponceau.

### 3°) Dinitrophénylation

La dinitrophénylation est effectuée sur la myoglobine débarrassée partiellement de son hème.

### - Synthèse de la DNP-globine :

20 à 30 mg de globine sont dissous dans 5 ml d'une solution de bicarbonate de sodium 10 p. 100. Nous y ajoutons 10 ml d'une solution alcoolique de 2-4 Dinitrofluorobenzène à 5 p. 100 ; le mélange est maintenu 3 heures à 38°C sous agitation, à l'obscurité. La solution est ensuite acidifiée par HCl concentré jusqu'à ce qu'il n'y ait plus d'effervescence et le précipité obtenu par centrifugation est lavé par HCl 0,05 N, 3 fois par l'acétone puis 3 fois par l'éther. Nous laissons le précipité sécher pendant une nuit à l'obscurité.

- Hydrolyse de la DNP-globine

La DNP-globine est hydrolysée en tube scellé sous vide par HCl 5,6 N à 105°C (un échantillon pendant 8 heures et un autre pendant 24 heures). L'hydrolysate est dilué par 4 fois son volume d'eau distillée et le DNP-amino-acide est extrait 3 fois par l'éther. Cet extrait est lavé par l'acide sulfurique N/20 puis séché et évaporé à sec. Afin d'éliminer l'excès de dinitrophénol, l'extrait éthéré est sublimé sous pression réduite à 70°C pendant 45 mn.

- Identification

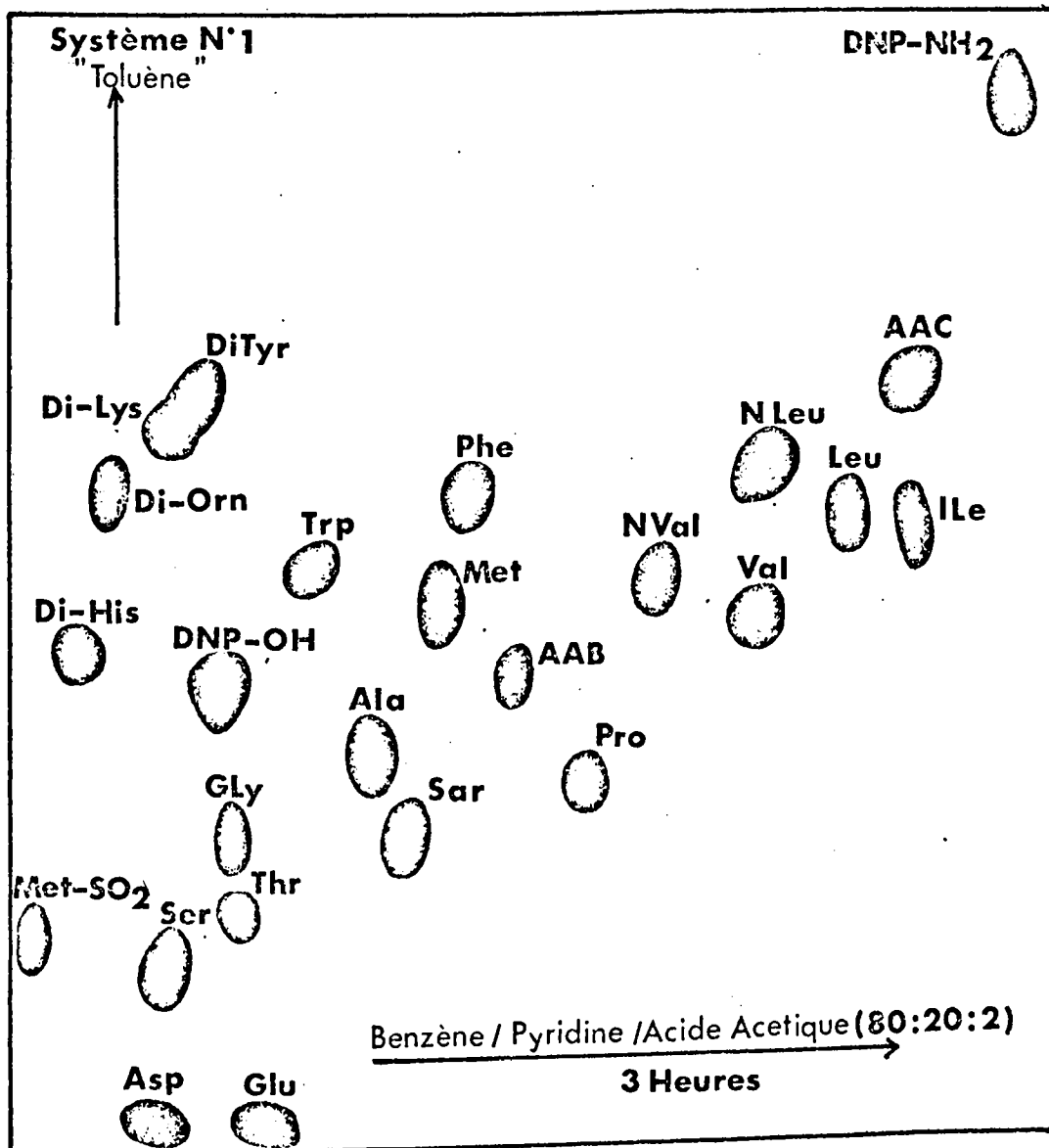
L'extrait éthéré peut alors être soumis soit à une chromatographie bidimensionnelle sur papier ou soit à une chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de silicagel. La chromatographie sur papier est réalisée sur papier Whatman n° 1 : une chromatographie ascendante pendant 15 heures dans le système de BISERTE et OSTEUX (143) Toluène/Pyridine/Monochlorhydrine du glycol/Ammoniaque 0,8 N (100:30:60:60). Après séchage, on effectue perpendiculairement à la première dimension une chromatographie descendante pendant 15 heures dans le tampon Phosphate 1,5 M pH 6,0 (LEVY - 144).

La chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de Silicagel on réalise une chromatographie ascendante dans le système toluène/Pyridine/Monochlorhydrine du Glycol/Ammoniaque 0,8 N (100:30:60:60). Après réactivation de la plaque, 15 mn à 100°C, on effectue une chromatographie ascendante perpendiculairement à la première dimension dans le système solvant Benzène/Pyridine/Acide acétique (80:20:2) pendant 120 mn. (Figure 22)

4°) Dansylation (GRAY et HARTLEY - 145 )

- Synthèse de la DNS-globine

La DNS-globine est préparée en mélangeant 20 µl de solution protéique (soit 2 mg de globine dans 20 µl d'eau distillée) à 20 µl de bicarbonate de sodium 0,2 M et à 40 µl d'une solution de 1-diméthyl-amino-naphtalène-5-sulfochlorure (chlorure de Dansyl) dans l'acétone (1 mg/1 ml d'acétone), l'ensemble dans un petit tube en verre (20 mm x 6 mm diamètre). Le mélange est laissé à réagir pendant une heure à l'obscurité au bain-marie à 45°C puis desséché à 60°C en présence



CARTE CHROMATOGRAPHIQUE DES DINITRO PHENYL-ACIDES AMINES SUR  
COUCHE MINCE DE SILICAGEL

Chromatographie bidimensionnelle dans les systèmes solvants  
décrits par NIEDERWIESER et PATAKI ( )

système toluène : Toluène/Pyridine/Chloro<sub>2</sub>-Ethanol/Ammoniaque 0,8 N  
(50:18:30:30) (80 mm)

FIGURE 22

d'acide sulfurique, de soude et d'anhydride phosphorique.

- Hydrolyse de la DNS-globine

Le résidu sec est repris par 50  $\mu$ l d'HCl 5,6 N et le tube à dansylation est placé dans un tube à hydrolyse scellé (35 cm de long x 1, cm de diamètre) dont le tiers inférieur, isolé par un étranglement, est rempli d'HCl 5,6 N. L'hydrolyse est effectuée à 105°C pendant 5 à 16 heures. L'hydrolysate est séché sous vide à 60°C sur  $P_2O_5$ ,  $H_2SO_4$ , NaOH, puis repris par 50  $\mu$ l d'un mélange Acétone-acide acétique (3:2) en vue d'effectuer l'identification.

- Identification

Le DNS-amino acide est alors soumis à une chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de silicagel. Nous avons utilisé les systèmes solvants décrits par GROS et LABOUESSE (146). Nous déposons les 50  $\mu$ l dans le coin gauche de la plaque (20 x 20 cm) à 3 cm de chacun des bords. Puis, nous entreprenons une première chromatographie dans le sens inverse du sens du coulage de la plaque, dans le système solvant Benzène/Pyridine/acide acétique (80 : 20 : 5) pendant 45 mn environ et une seconde chromatographie dans le sens perpendiculaire dans le système solvant Toluène/Monochlorhydrine du glycol/Ammoniaque (30:50:20) pendant 75 mn environ. (Figure 23)

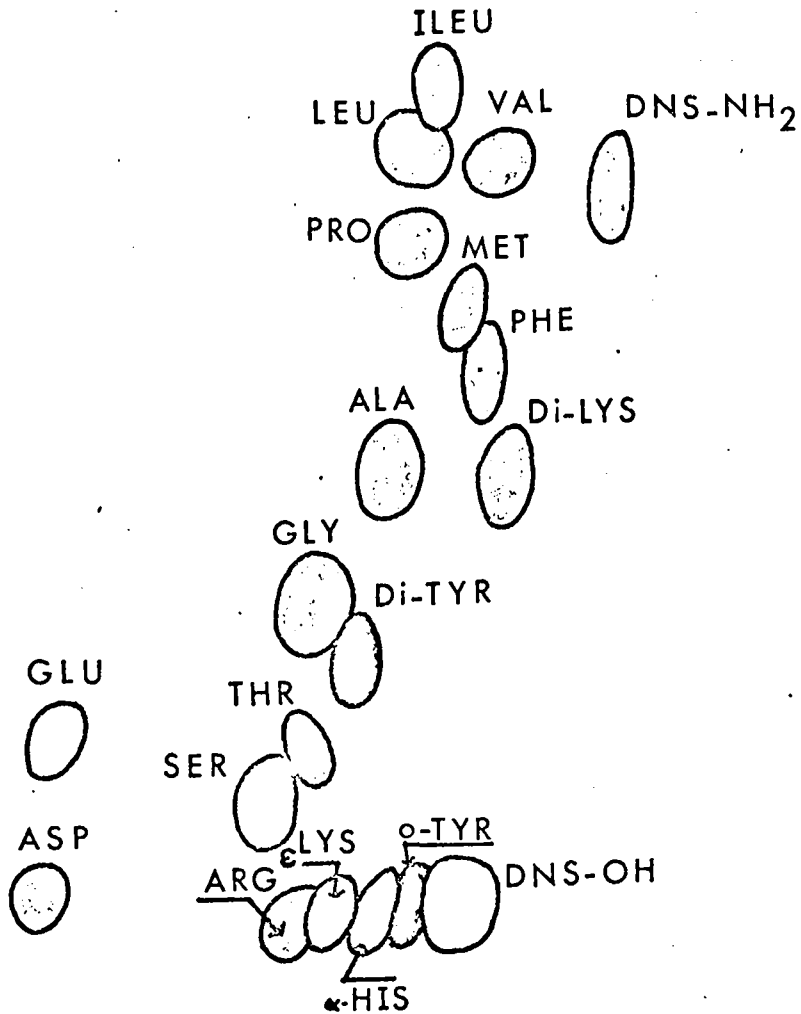
III - DENATURATION DE LA MYOGLOBINE

Afin de faciliter l'action de la trypsine et du bromure de cyanogène, nous avons éliminé l'hème de la myoglobine en utilisant une technique douce de dénaturation par l'éthanol et le chlorhydrate de guanidine (BISERTE et HOLLEMAN - 147). A une solution aqueuse de myoglobine à 10 mg/ml, on ajoute du chlorhydrate de guanidine jusqu'à une concentration de 19,1 mg/ml (0,2 M). Puis, goutte à goutte 2 ml d'éthanol absolu pour 10 ml de solution de myoglobine. On laisse en contact toute une nuit sous agitation à température ambiante. Le lendemain, on ajuste lentement par 8 volumes d'acétone contenant 1 p. 1000 d'HCl concentré pour précipiter totalement la globine partiellement dénaturée et pour laisser l'hémine en solution. Le précipité recueilli après centrifugation est redissous sous agitation pendant une heure dans la quantité minimale d'HCl N/20. On ajoute ensuite 6 volumes d'acétone chlorhydrique pour précipiter totalement la globine et parfaire l'élimination de l'hème. On centrifuge et on recommence deux fois la

T  
X

X

2



T  
X

CARTE CHROMATOGRAPHIQUE DES DANSYL-ACIDES AMINES SUR COUCHE MINCE DE SILICAGEL  
Chromatographie bidimensionnelle dans les systèmes solvants décrits par  
GROS et LABOUESSE (148)

: Benzène/Pyridine/Acide acétique (80:20:5) (70 mn)

: Ammoniaque/Chloro-2-Ethanol/Toluène (20 : 50 : 30) (85 mn)

FIGURE 23

même opération. Enfin, on lave le précipité de globine obtenue par l'acétone anhydre. Après séchage, sous le vide partiel d'une trompe à eau, on obtient une poudre grise de globine soluble dans l'eau.

#### IV - HYDROLYSE PAR LES ENDOPEPTIDASES

##### 1°) Hydrolyse par la trypsine

La trypsine, traitée par le chlorure de diphénylcarbonyl (DCC) est achetée chez SERAVAC : elle est dépourvue d'activité chymotrypsique. L'hydrolyse trypsique est conduite de la manière suivante : 150 mg de globine ou de peptide N-terminal sont dissous dans 10 ml de tampon sesquicarbonate d'ammonium à 1 p. 100 (ajuster le pH à 8,75 par l'ammoniaque).

La trypsine est ajoutée en une seule fois de façon à obtenir un rapport Enzyme/substrat (P/P) de 4 p. 100. L'hydrolyse est poursuivie pendant 2 heures 30 à 38°C sous agitation et à l'obscurité. On arrête l'hydrolyse par congélation et l'hydrolysate est ensuite lyophilisé.

##### 2°) Hydrolyse par la chymotrypsine

La chymotrypsine a été traitée par le T.L.C.K. selon la technique de SHAW et al. (149) 150 mg de peptide médian sont dissous dans 10 ml de tampon sesquicarbonate d'ammonium 1 p. 100, pH 8,75. La chymotrypsine est ajoutée en une seule fois de manière à obtenir un rapport Enzyme/substrat (P/P) de 2 p. 100. L'hydrolyse est poursuivie 6 heures à 38°C sous agitation et à l'obscurité. On arrête l'hydrolyse par congélation et l'hydrolysate est lyophilisé.

#### V - ETUDE DES CARTES PEPTIDIQUES : COLORATIONS SPECIFIQUES

##### 1°) Révélation de l'électrochromatogramme à la ninhydrine et décoloration

L'électrochromatogramme est trempé dans une solution de ninhydrine à 1p.1000 dans l'acétone et placé ensuite à l'étuve à 80°C, le temps nécessaire pour faire apparaître les peptides sous forme de spots roses, bleu-violet. Après avoir entouré d'un trait de crayon les spots, en trempant l'électrochromatogramme dans un mélange acétone-HCl (4:1) les peptides déjà localisés sont décolorés et ceci nous permet ensuite de réaliser plusieurs réactions spécifiques sur le même électrochromatogramme.

2°) Révélation des peptides à méthionine

L'électrochromatogramme est trempé dans le mélange extemporané obtenu en ajoutant dans l'ordre :

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

Les peptides à méthionine apparaissent après quelques minutes sous forme de spots blancs sur fond rose.

3°) Révélation des peptides à tryptophanne

L'électrochromatogramme est trempé dans une solution fraîche à 0,1 P; 100 de para diméthyl aminobenzaldéhyde dans l'acétone chlorhydrique (9:1) ; les peptides apparaissent sous forme de spots gris-violet sur fond jaune.

4°) Révélation des peptides à histidine

L'électrochromatogramme est trempé dans une solution de NaCO 2 M. Après séchage, on pulvérise un mélange extemporané à volumes égaux d'une solution d'acide sulfanilique à 1 g dans HCl concentré/eau (8:100) et d'une solution de NaNO à 0,69 p. 100. Les peptides à histidine apparaissent sous forme de spots rouge-rose.

5°) Révélation des peptides à tyrosine

On trempe l'électrochromatogramme dans une solution à 0,1 p. 100 d' $\alpha$ -nitroso- $\beta$ -naphtol dans l'éthanol . On sèche sous un courant d'air froid, puis on le trempe dans une solution d'acide nitrique à 10 p. 100 dans l'eau. On chauffe alors 15 minutes à l'étuve à 100°C. Les peptides apparaissent sous forme de spots roses sur fond vert pâle.

6°) Révélation des peptides à arginine

L'électrochromatogramme est trempé dans une solution acétonique de 8-hydroxy-quinoléine à 0,1 p. 100. On laisse sécher puis on trempe la feuille dans une solution de BrONa (Brome 0,2 ml dans 100 ml de NaOH 0,5 N) : les peptides à arginine apparaissent sous forme de spots fugaces rouge orange.

\* Remarque :

Lorsque nous effectuons des révélations multiples, il faut terminer par les révélations des peptides à Histidine, soit des peptides

à tyrosine ou soit des peptides à arginine. En effet, les solutions alcalines utilisées pour ces révélations ne permettent plus ensuite d'autres révélations.

#### VI - HYDROLYSE PAR LE BROMURE DE CYANOGENE

5,1 g de globine sont dissous dans 20 ml d'acide formique 70 p. 100 (concentration protéique d'environ 10 mg/ml d'acide formique). D'autre part, 7,2 g de bromure de cyanogène sont dissous dans 20 ml d'acide formique 70 p. 100 (70 moles de bromure de cyanogène par résidu de méthionine). Après mélange, nous laissons agir le BrCN à 30°C pendant 24 heures sous agitation magnétique ; nous arrêtons la réaction en ajoutant de l'eau distillée (qsp 2 litres), nous effectuons une dialyse d'une journée en changeant l'eau deux à trois fois. L'adialysable est concentré par lyophilisation.

#### VII - ETUDE DES PEPTIDES ISOLEES

##### 1°) Composition en acides aminés

##### - Hydrolyse acide totale

Dans un tube à hydrolyse (25 x 7 cm de diamètre) on ajoute 2 ml de solution peptidique (0,05 à 0,3 moles), 2 ml d'acide chlorhydrique concentré (HCl 32 p. 100 Merck) et 2 à 3 gouttes de solution de phénol à 5 p. 100 dans l'eau (afin d'éviter la destruction de certains acides aminés oxydables tels que la tyrosine). Un étranglement est pratiqué dans la partie supérieure du tube. La solution acide est congelée dans un mélange acétone-neige carbonique et soigneusement dégazée sous vide avant de sceller le tube sous vide au niveau de l'étranglement. On laisse le tube 24 ou 72 heures dans l'étuve à 105°C, puis l'hydrolysate est séché à l'Evapo-Mix ; la composition en acides aminés de chaque hydrolysate est déterminée au moyen d'un analyseur automatique d'acides aminés (JEOL 5 AH).

##### - Dosage du tryptophane par la méthode de SPIES et CHAMBERS (150)

Cette technique est basée sur la réaction du tryptophane avec le p.diméthylaminobenzaldéhyde (P.DMAB) en solution acide pour former une coloration bleue-violette après oxydation par le nitrite de sodium. On mélange dans un tube conique bouché environ : 30 mg de P.DMAB, 9 mg d'acide sulfurique, 9 ml d'acide sulfurique concentré et la solution à doser dans 1 ml de soude 1 N. Le mélange est gardé à 25°C pendant 1 heure à l'obscurité. 0,1 ml d'une solution de nitrite de sodium 0,04 p. 100



(p/v) préparée extemporanément, est ajouté pour développer la coloration. Après une incubation de 30 minutes, la densité optique est mesurée à 595 nm par rapport à un blanc ne contenant que de la p.DMAB. Une courbe étalon est préparée en utilisant des solutions contenant des quantités connues de TRP (5 à 120 gammas) dans la soude 1 N.

La quantité de tryptophane dans la solution à doser doit être inférieure à 120 gammas.

#### - Hydrolyse totale enzymatique

0,5 à 1  $\mu$ Mole de peptide est repris dans 2 ml de tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M de pH 8,0 (ajuster avec l'ammoniaque concentrée). On y ajoute 200  $\mu$ l d'une solution d'aminopeptidase M (Aminopeptidase M ROHM HASS ; Labo-Service à WAVRIN) dans le tampon bicarbonate d'ammonium. L'hydrolyse est poursuivie pendant 24 heures à 38°C à l'obscurité. On arrête l'hydrolyse par congélation, puis on lyophilise l'hydrolysate. Les amides sont identifiées par électrochromatographie bidimensionnelle sur papier Whatman n° 3 : électrophorèse à pH 2,4 (acide acétique N) pendant 15 heures sous 400 volts (système DURRUM), suivie d'une chromatographie dans le système n-butanol/acide acétique/Pyridine/Eau (150:30:100:120) pendant 18 heures. L'électrochromatogramme est révélé par une solution acétonique de ninhydrine à 1 p. 100. L'hydrolysate enzymatique peut être également analysé par dosage au moyen de l'analyseur d'acides aminés.

Une étude cinétique peut être envisagée pour déterminer une séquence N-terminale : des prélèvements sont effectués à des temps donnés et les acides aminés libérés sont dosés à l'analyseur d'acides aminés.

#### 2°) Etude des extrémités N-terminales

##### - Dansylation

A 5  $\mu$ l de solution peptidique dans l'eau distillée (2 à 5 nmoles), on ajoute 5  $\mu$ l de bicarbonate de sodium 0,2 M et 10  $\mu$ l d'une solution acétonique de chlorure de dansyl (1 mg/1 ml d'acétone). La réaction est effectuée selon un protocole déjà décrit.

Cependant, l'identification du DNS-amino acide est réalisée par chromatographie sur feuille de polyamide. Cette chromatographie a

l'avantage sur celle sur couche mince de silicagel d'être plus rapide et plus sensible. Des feuilles de plastique 15 x 15 cm recouvertes de micropolyamide sur les deux faces (Schleicher et Schüll) sont découpées en neuf fragments carrés de 5 cm de côté. 2 µl de la solution de DNS-amino-acide repris par 15 µl d'acétone et 10 µl d'acide acétique sont déposés dans un angle à 3 mm de chacun des bords de la plaque.

La chromatographie est réalisée dans les deux ou trois solvants successifs décrits par HARTLEY (151) ; la première migration est effectuée dans l'acide formique à 1,5 p. 100 (V/V) dans l'eau, pendant 10 mn. La seconde migration réalisée perpendiculairement à la première dans le solvant benzène/acide acétique (9 : 1), pendant 15 à 20 mn ; la troisième migration réalisée dans le même sens que la précédente utilise le solvant acétate d'éthyle/méthanol/acide acétique (20.1:1). Cette troisième migration est nécessaire pour séparer notamment certains groupes d'acides aminés tels que les groupes Sérine-Thréonine ; aspartique glutamique ; lysine-arginine-histidine. (Figure 24)

\* Remarque : les DNS-LEU et DNS-ILE sont difficilement séparés. Il convient alors d'ajouter un témoin interne : lorsque nous avons soupçonné la présence de l'un ou de l'autre DNS, dans un deuxième temps, nous déposons 2 µl de la solution à identifier et 2 µl de DNS-témoin mis à migrer ensemble.

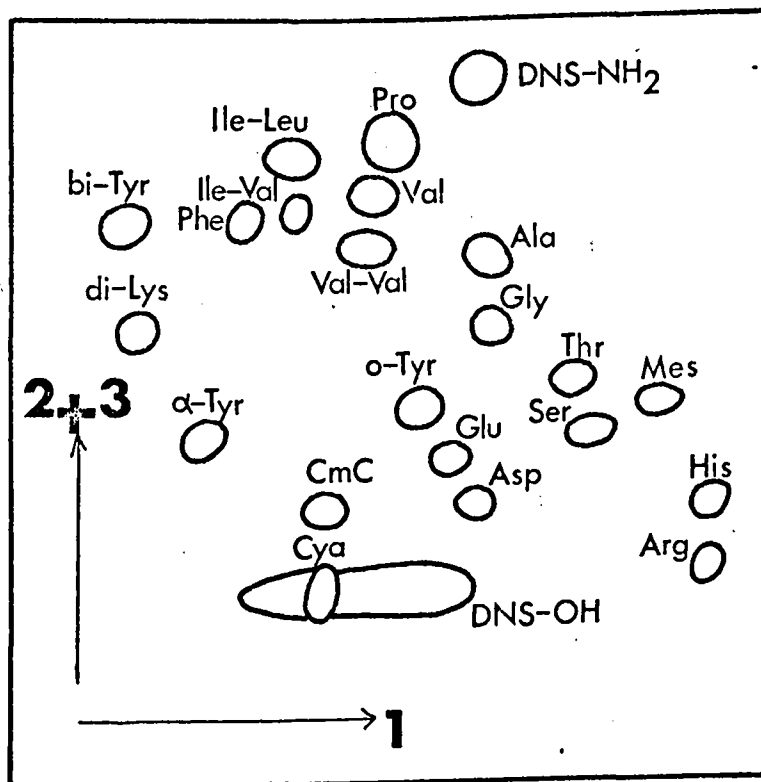
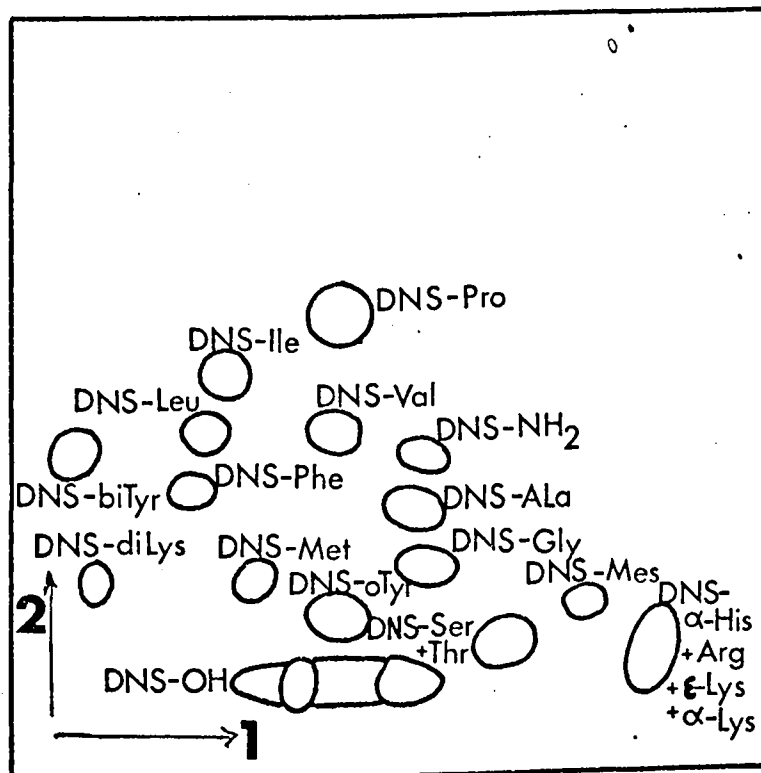
#### - Hydrolyse par la leucineaminopeptidase

A 500 µl d'une solution peptidique (0,5 à 1 mole) dans l'eau, nous ajoutons 500 µl de tampon véronal 0,1 M de pH 8,5 et 500 µl de MnCl 0,01 M ; 100 µl d'une solution de leucine-aminopeptidase (LAP Sigma, lot n° 98 B 1750) sont additionnés au mélange. L'hydrolyse est conduite à 38°C pendant 24 heures. Une étude cinétique peut être envisagée en effectuant des prélèvements à des temps donnés : les acides aminés libérés sont dosés à l'analyseur automatique d'acides aminés (JEOL 5 AH).

#### 3°) Etude des extrémités C-terminales

##### - Hydrazinolyse

Nous avons utilisé une technique dérivée de celle de NIU et FRANKEL-CONRAT (152). Le peptide (0,5 µmole) en solution dans l'eau est placé dans un tube conique (10 cm de long dont 2 cm de partie conique et 2 cm de rodage pour bouchon rodé ; 10 mm de diamètre intérieur). Le peptide est évaporé à sec en dessiccateur sous vide poussé, en présence



CARTE CHROMATOGRAPHIQUE DES DANSYLS ACIDES AMINES SUR COUCHE MINCE DE POLYAMIDE.

Chromatographie bidimensionnelle dans les systèmes solvants décrits par HARTLEY (153)

1 : Acide formique 1,5 p. 100

2 : Benzène/Acide acétique glacial (9 : 1)

3 : Acétate d'éthyle/Méthanol/Acide acétique glacial (20:1:1)

FIGURE 24

d'anhydride phosphorique. On ajoute ensuite 1 ml d'hydrazine à 98 p. 100 et on place le tube conique dans un tube à essai que l'on scelle. L'ensemble est maintenu pendant une nuit (16 heures) à 70°C. Le contenu du tube est alors évaporé à sec sous vide en présence d'acide sulfurique, puis repris par 1 ml d'eau et centrifugé ; le surnageant est extrait 3 fois par 1 ml de benzaldéhyde (afin d'éliminer les hydrazides). L'excès de benzaldéhyde est extrait à l'éther (1 ml) et la phase aqueuse est séchée sous vide sur soude en pastilles. On reprend le contenu du tube par 500 µl d'eau pour identifier l'acide aminé C-terminal par électrochromatographie pH 2,4/butanol.

- Régénération de la lactone d'homosérine C-terminale :

0,5 à 1 µmole de peptide sont dissous dans 2 ml d'une solution de pH 6,5 (10 ml de pyridine, qsp 100 µl d'eau distillée ; ajuster le pH à 6,5 par de l'acide acétique 0,4 p. 100), placés dans un tube conique. Le tube est mis dans un tube à essai que l'on scelle. L'ensemble est maintenu dans une étuve à 110°C pendant une heure. Le peptide est concentré à sec par lyophilisation juste avant d'effectuer une hydrolyse par une carboxypeptidase ou d'effectuer un dosage à l'analyseur d'acides aminés.

- Action des carboxypeptidases

\* Préparation de la carboxypeptidase A :

On prélève 5 µl de la suspension de DFP-carboxypeptidase A (Sigma lot 124 B1850) que l'on dilue dans 50 µl d'une solution de chlorure de lithium (10 g/100 ml). L'ensemble est placé dans un tube à dansyl, bouché par une feuille de parafilm M, toute une nuit à 4°C. Le lendemain, la solution enzymatique est limpide et propre à l'emploi.

\* Préparation de la carboxypeptidase B .

On prélève 10 µl d'une suspension commerciale de DFP-carboxypeptidase B (Sigma, lot 17 B1070) dilués dans 100 µl de chlorure de lithium (10 g/100 ml). Nous procédons ensuite comme pour la carboxypeptidase A.

\* Hydrolyse par les carboxypeptidases

1 µmole de peptide sont dissous dans 2 ml de tampon acétate d'ammonium 0,1 M de pH 7,5 (100 ml d'ammoniaque 0,2 M que l'on ajuste à pH 7,5 par de l'acide acétique glacial). La solution peptidique est placée 20 mn à 38°C. On ajoute ensuite 25 µl de la solution de carboxypeptidase B, 5 à 10 µl de carboxypeptidase A. Des additions d'enzymes sont effectuées au bout de 4 à 8 heures d'hydrolyse. La réaction est arrêtée par

0

congélation et lyophilisation. Les acides aminés libérés sont dosés à l'analyseur d'acides aminés ou peuvent être identifiés par électrochromatographie à pH 2,4/n-butanol. Une étude cinétique peut être envisagée en effectuant des prélèvements à des temps donnés.

## BIBLIOGRAPHIE

---

- ABDERHALDEN, A. et BROCKMAN, H. (1930) *Biochem. Z.* 2, 225-386. (99)
- ACHER, R. et CROCKER, C. (1952) *Biochim. Biophys. Acta* 9, 704 (69)
- AIR G.M. et THOMPSON, E.O.P. (1971) *Austr. J. Biol. Sci.* 24, 75 (12, 36)
- BAGLIONI, C. (1961) *Biochim. Biophys. Acta* 48, 392 (62, 72)
- BALDRIDGE, R.C. et LEWIS, H.B. (1953) *J. Biol. Chem.* 202, 169 (67)
- BISERTE, G. et HOLLEMAN, J.W. (1959) *Biochim. Biophys. Acta* 33, 143 (6, 57, 147)
- BISERTE, G., HOLLEMAN, J.W., HOLLEMAN-DEHOVE, J. et SAUTIERE, P. (1959)  
*J. Chromatog.* 2, 225 (97)
- BISERTE, G. et OSTEUX, R. (1951) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 33, 50 (143)
- BLOMBACK, B., BLOMBACK, M., EDMAN, P. et HESSEL, B. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 115, 371 (109)
- BOARDMAN, N.K. et ADAIR, G.S. (1956) *Nature* 177, 1078 (49)
- BOUE, H. et CHANTON, R. in "Zoologie, tome II : Mammifères et Anatomie Comparée. G. DOUIN et Cie, ed. 1965 (40)
- BOULANGER, Y. Thèse de Doctorat ès-Sciences, Janvier 1968 (76)
- BOYER, S.H., FAINER, D.C. et NAUGHTON, M.A. (1963) *Science* 140, 1228 (47)
- BOYER, S.H., HATHAWAY, P., PASCASIO, F., BORDLEY, J., ORTON, C. et NAUGHTON, M.A. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 2211 (50)
- BRADSHAW, R.A. et GURD, F.R.N. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 2167 (10, 11, 32, 34)
- BROWN, J.L., BROWN, D.M. et ZABIN, J. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 4254 (90)
- CHANCE, R.G., (1968) *Science* 161, 165-67 (103)
- CHERBULIEZ, E. (1964) *Helv. Chim. Acta* 46, 2447 (115)
- DAUTREVAUX, M. Colloque de Montpellier sur le Développement récent dans l'étude chimique de la structure des protéines (Sept. 1971) (81)
- DAUTREVAUX, M., HAN, K., BOULANGER, Y. et BISERTE, G. (1962) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 44, 965 (40, 45)
- DAUTREVAUX, M., HAN, K., CHAILA, X. et BISERTE, G. (1969) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 51, 989 (17, 37, 74)

- DAYHOFF, M.O., ECK, R.V. et PARK, C.M. (1972) in "Atlas of Protein Sequence and structure 5, 89 (138)
- DECONNINCK, M. Thèse de l'Université libre de Bruxelles - Faculté des Sciences (Février 1973) (23, 127, 134, 135)
- DICKERSON, R.E. et GEIS, I. dans "Structure et action des protéines" Edition française, 1972 - Ediscience ed. (48, 128) .
- DIXON, G.H. dans "Essay in Biochemistry, P.N. CAMPBELL et G.D. GREVILLE éd. vol. 2, academic press New-York (1966) p. 147 (141)
- DUMUR, V., DAUTREVAUX, M. et HAN, K. (1972) Febs Letters 26, 241-44 (19)
- EAKER, D. Communication personnelle (104)
- EDMAN, P. (1949) Arch. Biochem. Biophys. 22, 475-76 (100)
- EDMAN, P. (1953) Acta Chem. Scand. 7, 700-01 (107)
- EDMAN, P. (1956) Nature 177, 667-68 (101, 108)
- EDMAN, P. (1956) Acta Chem. Scand. 10, 161-68 (102, 109)
- EDMAN, P. et BEGG, G. (1967) Europ. J. Biochem. 1, 80 (22, 106, 124)
- EDMAN, P. et SJOQUIST, J. (1956) Acta Chem. Scand. 10, 1057 (110, 119)
- EDMUNDSON, A.B. (1965) Nature 190, 663 (79)
- EDMUNDSON, A.B. et HIRS, C.H.W. (1961) Nature 190, 663 (48, 33, 77, 78)
- ERIKSSON, S. et SJOQUIST, J. (1960) Biochim. Biophys. Acta 45, 490 (110)
- ERLANGER, B.F. et COHEN, W. (1965) J. Am.Chem. Soc. 85, 348 (53)
- FEIGL, F. in "Spots tests in organic analysis, p. 228, AMSTERDAM, LONDON, NEW-YORK, Elsevier Publi. Co (1956) (118)
- FITCH, W.M. et MARGOLIASH, E. (1967) Science 155, 279 (133, 136)
- FLOCH, R., DAUTREVAUX, M. et HAN, K. (1973) Biochimie 55, 95-98 (20)
- GRAY, W.R. in "Methods in Enzymology (HIRS, C.H.W. ed.) (1971), vol. XI, p. 139, NEW-YORK Academic Press (113)
- GRAY, W.R. et HARTLEY, B.S. (1963) Biochem. J. 89, 379 (98, 145)
- GREGORY, H., HAROY, P.M., JONES, D.S., KENNER, G.W. et SHEPPARD, R.C. (1964) Nature, 204, 931 (89)
- GROS, G. et LABOUESSE, B. (1969) Europ. J. Biochem. 7, 463 (146, 148)
- GROSS, E. et WITKOP, B. (1962) J. Am. Chem. Soc., 83, 1850 (83, 88)
- GROSS, E. et WITKOP, B. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1856 (84, 85)
- HAN, K. Thèse de Doctorat en Biologie Humaine, Novembre 1970 (82, 86, 87)
- HAN, K., DAUTREVAUX, M., CHAILA, X. et BISERTE, G. (1970) Europ. J. Biochem. 16, 465 (18, 38, 58, 75, 91)

- HAN, K., PLANCHON, B., DAUTREVAUX, M. et BISERTE, G. (sous presse)  
Ann. Pharm. Franç. (117, 125, 121, 126)
- HAN, K., TETAERT, D., DAUTREVAUX, M., MOSCHETTO, Y. et BISERTE, G. (1971)  
Febs Letters 15, 116 (40, 96)
- HARDMAN, K.D., EGLAR, E.M., RAY, D.K., BANASZAK, L.J. et GURD, F.R.N. (1966)  
J. Biol. Chem. 241, 432 (46)
- HARTLEY, B.J. (1970) Biochem. J. 119, 805 (151, 153)
- HERRERA, A.E.R. et LEHMAN, H. (1971) Nature (New Biology) 232, 149 (13, 27, 80)
- HERRERA, A.E.R. et LEHMAN, H. (1971) Biochim. Biophys. Acta 251, 482 (14, 28,  
73, 94, 95)
- HERRERA, A.E.R. et LEHMAN, H. (1972) Biochim. Biophys. Acta 278, 62 (15, 29)
- HERRERA, A.E.R. et LEHMAN, H. (1972) Biochim. Biophys. Acta 278, 465 (16, 30, 3)
- HIRS, C.H.W. in "Methods in Enzymology", vol. XI, p. 151 (112)
- HOLMQUIST, R. (1972) J. Mol. Evol. 1, 115-211 (139)
- INGRAM, V.M. (1962) Biochem. Biophys. Acta 62, 456 (51, 59)
- JEGOROV, C., KEIL, B. et SORM, F. (1965) Coll. Czechoslov. Chem. Communic.  
30, 105 (64)
- JEPSON, J.B. et SMITH, I. (1953) Nature, 172, 1100 (68)
- JOHANSSON, B.G. et RYMO, L. (1955) Acta Chem. Scand. 16, 599 (142)
- KARADZOVA, M., NEDKOV, P.T., ATANASOV, B., KEIL, B. (1963) Coll. Czechosl.  
Chem. Communic. 28, 2969 (9, 35)
- KATZ, A.M., DREYER, W.J. et ANFINSEN, C.B. (1959), J. Biol. Chem. 234, 2897  
(63)
- KENDREW, J.C. (1963) Science 139, 1259 (41)
- KENDREW, J.C., DICKERSON, R.E., STRANBERG, B.E., HART, R.G., DAVIES, D.R.,  
PHILLIPS, D.C. et SHORE, V.C. (1960) Nature 185, 422 (5, 25, 132)
- KENDREW, J.C., PARRISCH, R.G., MARRACK, J.R. et ORLANS, E.S. (1954) Nature,  
174, 946 (43)
- LAWRIE, R.D. (1953) Nature, 171, 1069 (44)
- LEHMAN, H. (1971) Nature, 232, 408 (130)
- LEVY, A.L. (1954) Nature, 174, 126 (144)
- MICHL, H. (1951) Monasth. Chem. 82, 489 (61)
- NIREMBERG, M.W., LEDER, P., BERFELD, M., BRIMACOMBE, R., TURPIN, J., ROTTMAN, F  
et O'NEAL, C. (1965) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 53, 1161 (93)
- NIU, C.I. et FRAENKEL-CONRAT (1955) J. Am. Chem. Soc. 77, 5882 (152)





- PERUTZ, M.F. (1965) *J. Mol. Biol.* 13, 656 (42, 131)
- PERUTZ, M.F. (1970) *Nature* 228, 726 (129)
- PETERSON, J.D., NEURLICH, S., OYER, P.E. et STEINER, D.F. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 4866 (105, 111)
- PFEIFFER, S. Thèse de l'Université Libre de Bruxelles - Faculté des Sciences (Février 1973) (24)
- PLAQUET, R., BISERTE, G., SCHCONAERT, T., BOULANGER, P. et PAYSANT, P. (1960) *J. Chromatog.* 3, 25 (66, 92)
- PISANO, J.J. et BRONZERT, J. (1969) *Biochem. J.* 24, 5597 (120, 122)
- ROSSI-FANELLI, A. (1940) *Arch. Soc. Biol.* 24, 244 (3)
- SANGER, F., RYLE, A.P., SMITH, L.F. et KITAI, R. (1954) *Biochem. J.* 59, 1 (1)
- SCOULOUDI, H. (1969) *J. Mol. Biol.* 40, 35 (26)
- SHAW, E., MARES-GUIA, M. et COHEN, W. (1965) *Biochemistry* 4, 2219 (149)
- SICK, K., BEALE, D., IRVINE, D., LEHMAN, H., GOODALL, P.T. et McDOUGHAL, S. (1967) *Biochim. Biophys. Acta* 140, 231 (56, 50)
- SJOQUIST, J. (1953) *Acta Chem. Scand.* 7, 447 (114)
- SMITH, I (1953) *Nature* 171, 43 (70)
- SMYTH, E.L., MOORE, S. et STEIN, W.H. (1963) *J. Biol. Chem.* 238, 227 (2)
- SPIES, J.R. et CHAMBERS, D.C. (1949) *Anal. Chem.* 21, 1249 (7, 150)
- STOCKELL, A. (1961) *J. Mol. Biol.* 3, 362 (54)
- TETAERT, D., HAN, K., et DAUTREVAUX, M., DUCASTAING, S., HOMBRAPOS, I. et NEUZIL, E. (1973) *Febs Letters*, 29, 38-42 (21)
- THEORELL, H. et de DUVE, C. (1947) *Arch. Biochem. Biophys.* 12, 113 (45)
- TOENNIS, G. et KOLB, J.J. (1951) *Anal. Chem.* 23, 189 (71)
- VOTSCH, W. et ANDERER, F.A. (1972) *Z. Naturfus.* 27b, 157 (124)
- WALEY, S.G. et WATSON, J. (1953) *Biochem. J.* 55, 228 (65)
- WANG, S.S. et CARPENTER, F.H. (1965) *J. Biol. Chem.* 240, 1619 (52)
- WATSON, J.D. in "Molecular Biology of the gene 2nd, p. 398 - W.A. BENJAMIN Inc. N.Y. Edit. (137)