

50376
1974
195
Université des Sciences
et Techniques de Lille

Thèse de : 3e cycle
Discipline : Biochimie

N° d'ordre :
440

Nom du candidat : Bernard LAINE

JURY : Président : J. MONTREUIL, Professeur
Rapporteur : G. BISERTE, Professeur
Examineurs : J. KREMBEL et P. SAUTIERE

Titre de la Thèse : La structure primaire de l'histone riche en alanine, leucine
et lysine de chloroleucémie du Rat.

RESUME

Les histones, protéines basiques de la chromatine, participent à la régulation de l'information génétique des Eucaryotes. Il nous a semblé intéressant de comparer la structure primaire d'une histone d'un tissu néoplasique dans lequel la régulation de la transcription et de la réplication est perturbée, avec la structure primaire de l'histone homologue d'un tissu sain. Pour notre expérimentation, nous avons choisi une tumeur expérimentale du Rat, la chloroleucémie, dont nous avons isolé et étudié l'histone riche en alanine, leucine et lysine (ALK-histone). Deux histones de type ALK ont été isolées par chromatographie sur colonne d'Amberlite IRC-50. La composition en acides aminés a montré que chacune de ces protéines diffère de l'ALK-histone de thymus de Veau par une substitution. La détermination de la structure primaire des histones ALK-I et ALK-II de chloroleucémie a été réalisée par l'étude de l'hydrolysate tryptique de la protéine maleylée et par l'étude des peptides obtenus par hydrolyse de la protéine native avec la thermolysine.

La séquence complète en acides aminés a été établie par recouvrement des peptides tryptiques et "thermolysine" et par comparaison avec la séquence de l'ALK-histone de Veau. Dans l'ALK-histone de type I de Rat, la thréonine en position 16 est substituée par une arginine. Ces substitutions sont conservatives et ne modifient pas les propriétés de la molécule. L'ALK-histone semble plus évolutive que la GRK-histone qui présente une remarquable conservation de structure primaire dans des espèces différentes et dans les tissus cancéreux.



Soutenance prévue le : vendredi 22 février 1974

à 10 h 30

Bâtiment : Enseignement de Chimie (C₁)

Amphithéâtre : François



DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. H. LEFEBVRE, R. DEFRETIN

PROFESSEURS HONORAIRES des Anciennes Facultés de Droit et
Sciences Economiques, des Sciences et des Lettres

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

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. PARREAU

Professeur

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Générale
M. BECART Maurice	Physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie et Physico-Chimie Industrielle
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Mathématiques
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CELET Paul	Géologie
M. CONSTANT Eugène	Physique Industrielle-Electronique
M. CORSIN Pierre	Paléobotanique
M. DECUYPER Marcel	Mathématiques Générales
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Zoologie Générale et Appliquée
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique
M. GABILLARD Robert	Radio-Electricité-Electronique
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GUILLAUME Jean	Biologie Végétale
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LANSRAUX Guy	Physique
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique Expérimentale
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. MAILLET Pierre	Sciences Economiques et Sociales
M. MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M. MONTREUIL Jean	Chimie Biologique
M. POUZET Pierre	Informatique (Lille)
M. PROUVOST Jean	Géologie Minéralogie
Mme SCHWARTZ Marie-Hélène	Analyse Supérieure
M. TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M. TRIDOT Gabriel	Chimie
M. VAILLANT Jean	Mathématiques
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. VIVIER Emile	Biologie Animale
M. WERTHEIMER Raymond	Physique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mathématiques

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

M. BOUISSET Simon	Physiologie Animale
M. DELHAYE Michel	Chimie
M. DERCOURT Jean-Michel	Sciences de la Terre
M. LEBRUN André	Electronique (Lille)
M. LEHMANN Daniel	Mathématiques
M. LINDER Robert	Botanique
M. LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M. PARREAU Michel	Mathématiques Appliquées
M. SCHILTZ René	Physique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M. BELLET Jean	Physique
M. BILLARD Jean	Physique
M. BODARD Marcel	Botanique
M. BOILLET Pierre	Physique
M. BONNOT Ernest	Biologie
M. BRIDOUX Michel	I.U.T. Béthune
M. CAPURON Alfred	Chimie Minérale
M. DEPREZ Gilbert	I.U.T. Lille
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GRUSON Laurent	Mathématiques
M. GUILBAULT Pierre	Biologie
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie
M. LACOSTE Louis	Biologie
M. LANDAIS Jean	Chimie
Mme LEHMANN Josiane	Mathématiques
M. LOUCHEUX Claude	Chimie
M. MAES Serge	Physique
Mle MARQUET Simone	Mathématiques
M. MONTEL Marc	Physique
M. PANET Marius	I.E.E.A.
M. SALMER Georges	I.E.E.A.
M. SEGUIER Guy	I.U.T. Béthune

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions)

M. ADAM Michel	Economie Politique
M. ANDRE Charles	Sciences Economiques
M. ANGRAND Jean-Pierre	Géographie
M. ANTOINE Philippe	Mathématiques
M. BART André	Biologie
M. BEGUIN Paul	Mécanique des Fluides
M. BKOUCHE Rudolphe	Mathématiques
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M. BOSCOQ Denis	Mathématiques
M. BREZINSKI Claude	I.E.E.A.
M. BRUYELLE Pierre	Géographie et Aménagement Spatial
M. CARREZ Christian	I.E.E.A.
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. CORTOIS Jean	Physique
M. COQUERY Jean-Louis	Biologie
M. COULON Jean	I.E.E.A.
M. CROSNIER Yves	E.U.D.I.L.
M. COUTURIER Daniel	Chimie

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés de fonctions) suite

M ^{lle} DACCHARI Monique	Géographie et Aménagement Spatial
M. DEBOURSE Jean-Pierre	Sciences Economiques et Sociales
M. DEBRABANT Pierre	Sciences Appliquées
M. DHAINAUT André	Biologie
M. DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques et Sociales
M. DERIEUX Jean-Claude	Biologie (I.U.T.)
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique
M. DRIEUX Baudouin	I.E.E.A.
M. DUEE Gérard	Sciences de la Terre
M. DYMENT Arthur	Mathématiques
M. ESCAIG Bertrand	Physique
M ^{me} EVRARD Micheline	Chimie (I.U.T.)
M. FONTAINE Jacques-Marie	I.U.T. Lille
M. FOURNET Bernard	I.U.T. Lille
M. FROELICH Daniel	Sciences Appliquées
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Mathématiques
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GUILLAUME Henri	Sciences Economiques et Sociales
M. HECTOR Joseph	S.E.N. Calais
M. HERMAN Maurice	Physique
M. HUARD DE LA MARRE Pierre	I.E.E.A.
M. JOURNEL Gérard	Sciences Appliquées
M ^{lle} KOSMANN Yvette	Mathématiques
M. KREMBEL Jean	Chimie
M. LAURENT François	Automatique
M ^{lle} LEGRAND Denise	Mathématiques
M ^{lle} LEGRAND Solange	Mathématiques
M. LENTACKER Firmin	Géographie et Aménagement Spatial
M. LEROY Jean-Marie	E.N.S.C.L.
M. LEROY Yves	Electronique (Lille)
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique
M. LOUAGE Francis	Sciences Appliquées
M. LOUCHET Pierre	I.U.T. Lille
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique (I.U.T. Lille)
M ^{me} N ^o Guyen Van Chi Régine	Géographie et Aménagement Spatial
M. MAIZIERES Christian	I.E.E.A.
M. MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques et Sociales
M. MESSELYN Jean	Physique
M. MIGEON Michel	Chimie (Sciences Appliquées)
M. MOTZKIN Joseph	Mathématiques
M. MONTUELLE Bernard	I.U.T. Lille
M. NICOLE Jacques	Chimie (E.N.S.C.L.)
M. PAQUET Jacques	Sciences Appliquées
M. PARSY Fernand	Mathématiques
M. PECQUE Marcel	Chimie (Béthune)
M. PERROT Pierre	Chimie
M. PERTUZON Emile	Biologie
M. PONSOLLE Louis	Chimie (Valenciennes)
M. POVY Jean-Claude	Sciences Appliquées
M. RACZY Ladislas	Physique
M. ROGALSKI Marc	Mathématiques
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M. ROY Jean-Claude	Biologie
M. SIMON Michel	Psychologie
M. SLIWA Henri	Chimie

MAITRES DE CONFERENCES (et Chargés de Fonctions) suite

M. SMET Pierre	Physique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Chimie Biologique
M. THERY Pierre	Calais
M. TOULOTTE Jean-Marc	Sciences Appliquées
M. TREANTON Jean-René	Sciences Economiques et Sociales
M. VANDORPE Bernard	Chimie Physique
M. VILETTE Michel	Génie Mécanique (Béthune)
M. WERNER Georges	Informatique (I.U.T. Lille)
M. WATERLOT Michel	Géologie
Mme ZINN JUSTIN Nicole	Mathématiques

Ce travail a été réalisé dans l'équipe de recherches de Monsieur Pierre SAUTIERE, sous la direction de Messieurs G. BISERTE et P. SAUTIERE, dans les laboratoires de l'Unité de Recherches n° 16 de l'INSERM sur la Biochimie des Protéines Normales et Pathologiques (Directeur : Professeur Paul BOULANGER) et dans les laboratoires de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille (Directeur : Professeur Gérard BISERTE) et de l'Unité de Recherches Ultrastructurales et Biochimiques sur la Cellule Normale et Cancéreuse (U 124 INSERM) (Directeur : Professeur Gérard BISERTE).

Que tous ceux qui m'ont accordé leur aide et leur amitié trouvent dans ce travail l'expression de ma reconnaissance.

Ce travail a fait l'objet de la présentation suivante :

"The covalent structure of rat chloroleukemia ALK-histone"

LAINÉ B., SAUTIERE P. and BISERTE G.

9th International Congress of Biochemistry, Stockholm, 1973.

et de la publication :

"The covalent structure of rat chloroleukemia ALK-histone"

LAINÉ B., SAUTIERE P. and BISERTE G.

Biochemistry (1974) (soumis au Comité de lecture).

ABREVIATIONS UTILISEES DANS LE TEXTE

ADN	: acide désoxyribonucléique
ARN	: acide ribonucléique
ARN-m	: acide ribonucléique messenger
DNP	: désoxyribonucléoprotéine
DNS	: dansylamino-acide
GuCl	: chlorhydrate de guanidine
PTH	: phényl thiohydantoïnes d'acides aminés
ALK-Histone	: histone riche en alanine, leucine et lysine
ARE-Histone	: histone riche en alanine, arginine et acide glutamique
GRK-Histone	: histone riche en glycine, arginine et lysine
KAP-Histone	: histone riche en lysine, alanine et proline
KAR-Histone	: histone riche en lysine, alanine et arginine
KSA-Histone	: histone riche en lysine, sérine et alanine

TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>CHAPITRE I :</u>	
<u>PREPARATION ET PURIFICATION DE L'ALK-HISTONE</u> <u>DE CHLOROLEUCEMIE DU RAT</u>	7
A) Préparation des noyaux	7
B) Isolement de la désoxyribonucléoprotéine (DNP)	8
C) Extraction sélective des histones	8
1) Extraction sélective des fractions F_{2a} et F_3	10
2) Préparation de la sous-fraction F_{2a2}	10
3) Préparation des autres fractions	11
4) Remarques	11
D) Purification de l'ALK-histone	11
1) Chromatographie sur Amberlite IRC-50	11
2) Purification de l'ALK-histone par gel-filtration	15
E) Critère de pureté (électrophorèse en gel de polyacrylamide)	17
F) Composition en acides aminés	17
 <u>CHAPITRE II :</u>	
<u>DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE</u> <u>L'ALK-HISTONE DE CHLOROLEUCEMIE DU RAT</u>	21
A) Choix des méthodes	21

1) Choix des méthodes enzymatiques de coupure de la protéine	21
a) Hydrolyse de la protéine maléylée par la trypsine ...	21
b) Hydrolyse de la protéine native par la thermolysine	22
2) Méthodes d'étude des peptides	22
 B - Détermination de l'extrémité COOH-terminale de l'ALK-histone	 23
C - Hydrolyse trypsique de l'ALK-histone maléylée. Séparation et étude des peptides	25
D - Hydrolyse de l'ALK-histone par la thermolysine. Séparation et étude des peptides	52
E - Détermination de la séquence complète de la protéine ...	77
 <u>DISCUSSION</u>	 80
 <u>CONCLUSIONS</u>	 90
 <u>BIBLIOGRAPHIE</u>	 91

INTRODUCTION

L'information génétique contenue dans les acides désoxyribonucléiques (ADN) est transmise par un intermédiaire, l'acide ribonucléique messager (ARN-m) (transcription) à partir duquel est synthétisée une chaîne peptidique (traduction). La régulation de cette information est assurée chez les bactéries par un système relativement simple, selon le schéma de JACOB et MONOD, dans lequel interviennent des répresseurs de nature protéinique qui s'associent spécifiquement à l'ADN. Chez les Eucaryotes et notamment chez les êtres multicellulaires, chaque cellule possède le même ADN, mais a une activité de synthèse spécifique du tissu qui en est constitué ; un mécanisme de régulation coordonnée et sélective est alors nécessaire. Dans le noyau de ces cellules, des protéines basiques, les histones, s'associent à l'ADN et aux protéines acides. Dès 1943, STEDMAN et STEDMAN avaient suggéré pour les histones, un rôle répresseur dans la régulation de l'information génétique. L'apparition des histones dans l'évolution coïncide avec celle du noyau et de la différenciation cellulaire (GEORGIEV, 1969). Les histones constituent un élément essentiel de la chromatine et représentent, comme l'ADN, environ vingt-cinq pour cent du poids sec du noyau.

A partir de 1960, l'intérêt pour les histones s'est accru et on relève depuis une somme considérable de travaux consacrés essentiellement à des études métaboliques et structurales de ces protéines. Ces travaux ont pour objet de préciser le rôle des histones.

En 1962, HUANG et BONNER ont montré que l'association ADN-histones provoque in vitro une diminution de la transcription. Inversement, après déprotéinisation, la chromatine a, in vitro, un pouvoir accru de synthèse de l'ARN-m (ALLFREY et al., 1963). Le pouvoir inhibiteur des histones dans la synthèse de l'ARN-m est ainsi démontré. Mais les histones sont incapables de se lier spécifiquement à l'ADN (BARR et BUTLER, 1963) ; et si toutes les histones participent à cette action inhibitrice, l'action de chacune d'elles reste encore inconnue. Les histones agissent également au niveau de la réplication : ceci a été montré in vitro par BILLEN et al. (1963) et in vivo par SLUYSER et al. (1965). Elles se différencient ainsi des répresseurs chez les bactéries qui n'agissent qu'au niveau de la transcription par blocage spécifique d'un gène.

Actuellement, les recherches s'orientent vers les interactions histones - ADN et histones - histones et vers leurs effets sur la conformation et l'activité de la chromatine.

Pour aborder le problème des interactions, il est nécessaire de connaître la structure primaire des histones. La détermination de la séquence en acides aminés est elle-même liée à des problèmes concernant l'isolement des histones.

Avant 1960, les histones étaient extraites globalement de la chromatine par des solutions acides ou salines (BUTLER et al., 1954) (CRAMPTON et al., 1955) (LUCK et al., 1958). Elles étaient ensuite fractionnées par chromatographie d'échange d'ions sur colonne d'Amberlite IRC-50 (LUCK et al., 1958) (RASMUSSEN et al., 1962) ou de carboxyméthylcellulose (SAUTIERE, 1959) (PHILLIPS et al., 1959) (JOHNS et al., 1960).

Ces méthodes ne permettaient pas d'obtenir des fractions homogènes mais ont eu le mérite de faire la distinction entre deux groupes d'histones : les histones riches en lysine et les histones riches en arginine. En 1960, une méthode de fractionnement chimique des histones fut proposée par JOHNS. Modifiée à plusieurs reprises par son auteur, elle permet de séparer cinq fractions : F_1 ; F_{2b} ; F_{2a1} ; F_{2a2} et F_3 (JOHNS et al., 1962) (JOHNS, 1964) (PHILLIPS et JOHNS, 1965) (JOHNS, 1967).

L'obtention d'histones pures à partir de ces fractions nécessite la mise en oeuvre de techniques chromatographiques (chromatographie de gel-filtration ou d'échange d'ions) (KINKADE et al., 1966) (STARBUCK et al., 1968) (LECLERC et al., 1969) (SENSHU et al., 1970) ou de techniques électrophorétiques (électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide) (FAMBROUGH et al., 1968).

La nomenclature des histones est présentée dans le tableau I.

Les cinq histones sont présentes dans toutes les cellules animales et végétales.

L'isolement d'histones pures devait naturellement déboucher sur la détermination de leur structure primaire.

On connaît actuellement la séquence complète en acides aminés de quatre histones isolées du thymus de Veau : GRK (DE LANGE et al., 1969-a), KSA (IWAI et al., 1970), ARE (DE LANGE et al., 1972), ALK (SAUTIERE et al., 1972) (YEOMAN et al., 1972) (SAUTIERE et al., 1974).

La séquence de la moitié NH₂-terminale de la KAP-histone (212 résidus) a été établie (RALL et COLE, 1971).

Les histones ont une structure relativement simple et leur poids moléculaire varie de 11.000 (GRK-histone) à 21.000 (KAP-histone). Elles sont caractérisées d'une part, par une asymétrie de la molécule dont la moitié NH₂-terminale présente un caractère basique (*) et la moitié COOH-terminale un caractère hydrophobe, et d'autre part, par la présence de "centres" basiques constitués par des multiplets de résidus basiques. Les KAP, ALK et GRK-histones ont un résidu de sérine N-acétylé en position NH₂-terminale. Le groupe ε-aminé de la lysine peut être méthylé ou acétylé (GRK et ARE-histones) et la fonction hydroxyle de la sérine peut être phosphorylée (histones riches en lysine).

Des études comparatives de structure ont été entreprises sur des histones de type GRK isolées de différentes espèces végétales ou animales

(*) Excepté dans la KAP-histone où prévaut la situation inverse.

TABLEAU I

NOMENCLATURE DES HISTONES (*)

	JOHNS	Gordon Research Conference 1972
Histones riches en lysine (**)	F ₁	KAP
	F _{2b}	KSA
Histones riches en arginine	F _{2a2}	ALK
	F ₃	ARE
	F _{2a1}	GRK

(*) Les histones sont désignées par trois lettres qui représentent dans l'ordre décroissant les acides aminés les plus abondants dans la molécule.

Code utilisé : A = Alanine ; R = Arginine ; E = Acide glutamique ; G = Glycine ; L = Leucine ; K = Lysine ; P = Proline ; S = Sérine.

(**) Une histone très riche en lysine, l'histone F_{2c} ou F_V (KAR-histone) est spécifique des érythrocytes d'Oiseaux.

(Pois : DE LANGE et al., 1969-b)(Porc : SAUTIERE et al., 1970-b) et ont montré une remarquable conservation de séquence de cette protéine au cours de l'évolution (*). Des études similaires ont été réalisées sur la GRK-histone isolée de différents tissus cancéreux : cellules leucémiques humaines (DESAI et al., 1970), hépatome de Novikoff (WILSON et al., 1970), chloroleucémie du Rat (SAUTIERE et al., 1971), tumeur au benzopyrène du Rat (MARTINAGE, communication personnelle). Les études sur les histones de tissus cancéreux ont été entreprises pour déterminer si le processus de cancérisation implique des mutations dans la structure primaire des histones, sachant que ces protéines participent au contrôle de l'activité génétique et que lors de la cancérisation, la cellule cancéreuse se multiplie hors de tout contrôle de l'organisme hôte. En fait, la cancérisation ne modifie pas la structure primaire des histones de type GRK puisqu'on a retrouvé pour cette histone une identité complète de structure primaire avec l'histone GRK isolée du thymus de Veau.

Une telle conservation de la séquence qui semble limitée à la GRK-histone et peut-être à l'ARE-histone (Poulet : BRANDT et VON HOLT, 1972) (Carpe : HOOPER et al., 1973) (Pois : PATTHY et al., 1973) (**), doit être liée à une fonction bien particulière qui n'a pas encore été élucidée.

Pour les autres histones, et en particulier pour les histones de type ALK et KSA, peu d'études comparatives de séquence ont été faites avec les histones homologues de différentes espèces. Des études électrophorétiques suggèrent une certaine variabilité dans la structure primaire de ces protéines (PANYIM et al., 1971).

Après avoir participé à la détermination de la structure primaire de l'ALK-histone de thymus de Veau (SAUTIERE et al., 1972) (SAUTIERE et al.,

(*) Deux substitutions de type conservatif interviennent entre la GRK-histone de thymus de Veau et la GRK-histone de l'embryon de Pois (Ile-60 et Lys-77 sont respectivement remplacés par Val et Arg).

(**) Quatre substitutions interviennent entre l'ARE-histone de thymus de Veau et l'ARE-histone d'embryon de Pois : Tyr-41, Arg-53, Met-90 et Cys-96 sont respectivement remplacés par Phe, Lys, Ser et Ser ou Ala ; parmi ces substitutions, seules les deux premières sont conservatives.

1974), nous avons entrepris la détermination de la structure primaire de l'ALK-histone de chloroleucémie du Rat. Ce travail s'inscrit dans le cadre des études comparatives des histones homologues isolées d'espèces différentes, réalisées par le groupe de recherches dirigé par P. SAUTIERE.

Nous étudierons successivement :

- La préparation et la purification de l'ALK-histone de chloroleucémie du Rat.
- La détermination de la structure primaire de l'ALK-histone
 - . Choix des méthodes.
 - . Détermination de l'extrémité COOH-terminale de l'ALK-histone.
 - . Etude des peptides tryptiques de l'ALK-histone maléylée.
 - . Etude des peptides obtenus par hydrolyse de la protéine native par la thermolysine.
 - . Séquence de la protéine.

CHAPITRE I

PREPARATION ET PURIFICATION DE L'ALK-HISTONE

DE CHLOROLEUCEMIE DU RAT

- A - PREPARATION DES NOYAUX
- B - ISOLEMENT DE LA DESOXYRIBONUCLEOPROTEINE (DNP)
- C - EXTRACTION SELECTIVE DES HISTONES
- D - PURIFICATION DE L'ALK-HISTONE
- E - CRITERE DE PURETE
- F - COMPOSITION EN ACIDES AMINES

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

Immédiatement après leur excision, les tumeurs sont congelées dans la neige carbonique et conservées à $- 20^{\circ}\text{C}$ jusqu'au moment de leur emploi.

La préparation des noyaux, l'isolement des DNP et l'extraction sélective des histones sont effectués à $+ 4^{\circ}\text{C}$.

A - PREPARATION DES NOYAUX

Les tumeurs (par lot de 200 grammes) sont émincées et homogénéisées dans deux litres d'une solution de saccharose $0,25 \text{ M}$, CaCl_2 $0,003 \text{ M}$ à l'aide d'un homogénéiseur Waring Blendor. Le tissu conjonctif est éliminé par filtration sur quatre épaisseurs de gaze et les noyaux sont débarrassés des débris cellulaires par centrifugation à 1.100 g pendant 30 minutes. Les noyaux sont lavés deux fois de la même façon avec un litre de la même solution (*)

Ils sont ensuite purifiés selon la méthode de CHAUVEAU (1956). Le sédiment précédemment obtenu est homogénéisé dans 250 ml d'une solution de saccharose $2,2 \text{ M}$, CaCl_2 $0,003 \text{ M}$; dans ce milieu, seuls les noyaux, dont la densité est supérieure à celle de cette solution, sédimentent par centrifugation à 36.000 g pendant 90 minutes.

(*) Ce protocole employé pour la préparation des noyaux dérive de la méthode de MURAMATSU (1963).

B - ISOLEMENT DE LA DESOXYRIBONUCLEOPROTEINE (DNP)

Les noyaux purifiés sont homogénéisés à l'aide d'un homogénéiseur Ultra-Turrax dans 500 ml de solution de NaCl 0,14 M, citrate trisodique 0,01 M de pH 7,1. La DNP insoluble dans ce milieu est recueillie par centrifugation à 1.100 g pendant 15 minutes.

La DNP est lavée deux fois par 500 ml de cette solution saline, puis une fois par 500 ml de tampon TRIS 0,1 M de pH 7,6 (STEELE et al., 1963).

Le dernier sédiment obtenu, constitué par la DNP purifiée, est lavé deux fois avec 500 ml d'éthanol à 80 p.100. Chaque lavage est suivi d'une centrifugation à 1.100 g pendant 15 minutes.

C - EXTRACTION SELECTIVE DES HISTONES

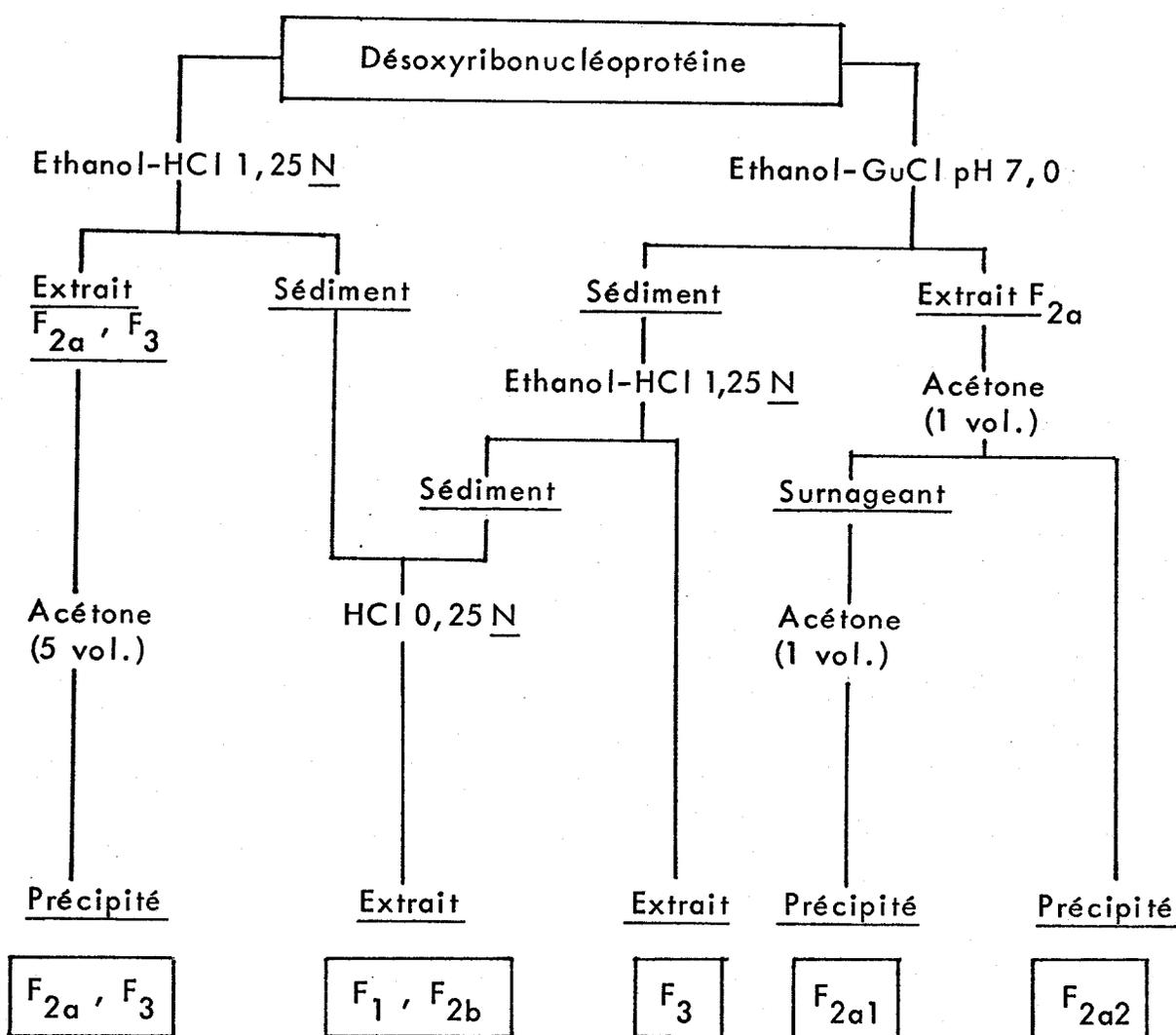
Les méthodes d'extraction sélective des histones à partir de la désoxyribonucléoprotéine ont été essentiellement décrites par JOHNS. Nous n'en retiendrons que la préparation des histones riches en arginine.

Les histones riches en arginine sont extraites de la DNP par le mélange éthanol - HCl (JOHNS, 1962). Par dialyse de l'extrait contre de l'éthanol absolu, la fraction F_3 précipite, tandis que la fraction F_{2a} est recueillie avec le surnageant. La fraction F_{2a} peut être fractionnée en deux sous-fractions F_{2a1} et F_{2a2} par précipitation différentielle à l'acétone ou par chromatographie d'échange d'ions ou de gel-filtration (PHILLIPS et JOHNS, 1965).

Depuis 1967 (JOHNS, 1967), cette fraction F_{2a} peut être extraite directement de la DNP en milieu éthanol - chlorhydrate de guanidine à pH 7,0. Les méthodes de JOHNS que nous avons utilisées sont schématisées dans le tableau II.

TABEAU II

PROCEDES D'EXTRACTION SELECTIVE DES HISTONES UTILISES
DANS LES PREPARATIONS DES FRACTIONS $F_{2a} + F_3$ ET F_{2a2}
 (d'après JOHNS, 1962 et 1967)



GRK + ALK + ARE

ALK

1) Extraction sélective des fractions F_{2a} et F_3

Les fractions F_{2a} et F_3 sont extraites ensemble par homogénéisation de la DNP dans une solution éthanol - HCl 1,25 N (4 : 1 ; v/v) (JOHNS, 1962). Une première extraction par 300 ml pendant une nuit, sous agitation douce, est suivie de deux autres d'une durée de trois heures par 150 ml de la même solution. Les extraits obtenus après centrifugation à 1.100 g pendant 15 minutes après chaque extraction sont rassemblés et clarifiés sur verre fritté n°4.

Les fractions F_{2a} et F_3 sont alors précipitées ensemble avec 5 volumes d'acétone acidifiée par 3 ml d'HCl concentré.

2) Préparation de la sous-fraction F_{2a2}

La fraction F_{2a} (contenant les fractions F_{2a1} et F_{2a2}) est extraite sélectivement de la DNP par le mélange éthanol - chlorhydrate de guanidine à 40 p.100, de pH 7,0 (3 : 1 ; v/v) (JOHNS, 1967).

La DNP est homogénéisée dans 300 ml de la solution éthanolique de GuCl et la fraction F_{2a} est extraite pendant une nuit sous agitation douce. Deux autres extractions, pendant 3 heures, par 150 ml de la même solution, complètent la première. Les extraits sont rassemblés après avoir été débarrassés de la DNP résiduelle par centrifugation à 1.100 g pendant 15 minutes et clarification sur verre fritté n° 4.

La fraction F_{2a} est alors précipitée de l'extrait éthanol - GuCl par 4 volumes d'acétone.

Une autre méthode, que nous préférons à la précédente, consiste à isoler directement à partir de l'extrait éthanol - GuCl les sous-fractions F_{2a2} et F_{2a1} par précipitation différentielle. Un volume d'acétone est ajouté à l'extrait éthanol - GuCl et la sous-fraction F_{2a2} qui précipite est isolée par centrifugation à 1.100 g pendant 30 minutes. La sous-fraction F_{2a1} présente dans le surnageant, est à son tour précipitée par deux volumes supplémentaires d'acétone.

3) Préparation des autres fractions

Après extraction des histones riches en arginine (fractions F_{2a} et F_3), le sédiment désoxyribonucléoprotéique est traité par HCl 0,25 N (*) qui extrait les histones riches en lysine (fractions F_1 et F_{2b}).

Les extraits sont rassemblés et clarifiés sur verre fritté n° 4. La fraction F_1 est isolée par précipitation avec trois volumes d'acétone; ensuite la fraction F_{2b} est précipitée du surnageant avec deux volumes supplémentaires d'acétone.

4) Remarques

Les protéines sont redissoutes dans de l'HCl 0,01 N et la solution protéique est soumise à une dialyse de 24 heures contre de l'eau désionisée avant d'être lyophilisée.

Les rendements des différentes fractions à partir de 200 g de tumeurs sont présentés dans le tableau III.

La fraction F_3 est dénaturée. Après lyophilisation, nous obtenons une poudre jaunâtre insoluble, même en milieu HCl 0,01 N - urée 8 M.

Les rendements sont faibles comparés à ceux des préparations d'histones de thymus de Veau. A partir de 150 g de thymus, ils sont de 995 mg pour la fraction F_{2a2} et 902 mg pour la fraction F_{2a1} (SAUTIERE, 1973).

D - OBTENTION DE L'ALK-HISTONE A PARTIR DE LA SOUS-FRACTION F_{2a2}

1) Chromatographie sur Amberlite IRC-50

La chromatographie d'échange d'ions sur Amberlite IRC-50, selon

(*) Extraction une nuit par 200 ml d'HCl 0,25 N, suivie de deux autres extractions de trois heures chacune par 100 ml d'HCl 0,25 N.

TABLEAU III

RENDEMENTS DES FRACTIONS D'HISTONES
PREPAREES A PARTIR DE 200 g DE TUMEURS

Première méthode (JOHNS, 1962)	$F_{2a} + F_3$		F_1	F_{2b}
	372 mg		75 mg	80 mg
Deuxième méthode (JOHNS <u>et al.</u> , 1967)	F_{2a2}	F_{2a1}		
	110 mg	75 mg	75 mg	80 mg

une méthode adaptée de LUCK et al. (1958), sépare d'une manière satisfaisante l'ALK-histone de la GRK-histone et de l'ARE-histone. Aussi nous avons pensé isoler directement l'ALK-histone à partir du mélange des fractions F_{2a} et F_3 obtenues avec un rendement élevé par l'extraction de la DNP avec l'éthanol chlorhydrique. Cependant, la fraction $F_{2a} - F_3$ se dissout difficilement en milieu HCl 0,01 N - urée 8 M : un gel se forme qui témoigne d'une forte interaction des histones riches en arginine présentes dans ce mélange.

Nous avons donc adopté un protocole semblable à celui utilisé pour l'obtention de l'ALK-histone de thymus de Veau (SAUTIERE, 1973) (SAUTIERE et al., 1974). Dans ce protocole, le matériel de départ est la fraction F_{2a2} facilement soluble en milieu HCl 0,01 N - urée 8 M.

La résine (Amberlite IRC-50, 200 à 400 mesh) est équilibrée dans un tampon phosphate de sodium 0,1 M de pH 6,8 contenant 8 p.100 de chlorhydrate de guanidine (p/v). Un débit constant de 15,6 ml/heure est maintenu à l'aide d'une pompe.

300 mg de la sous-fraction F_{2a2} sont dissous dans 3 ml d'HCl 0,01 N - urée 8 M et laissés à + 4°C pendant 48 heures. La solution protéique est déposée, après avoir été préalablement diluée au demi avec le tampon d'équilibration. La colonne est d'abord éluée avec 100 ml de ce même tampon d'équilibration, puis par un gradient linéaire de 8 à 15 p.100 de concentration en GuCl. Ce gradient est obtenu en introduisant dans une chambre de mélange 320 ml de tampon phosphate de sodium 0,1 M de pH 6,8, contenant 8 p.100 de GuCl et dans un réservoir connecté à la chambre de mélange, 320 ml de tampon phosphate de sodium 0,1 M de pH 6,8 contenant 15 p.100 de GuCl. L'ALK-histone est éluée avec une concentration de GuCl de 10 p.100. Ensuite, la GRK-histone et l'ARE-histone, présentes en faible quantité dans la fraction F_{2a2} , sont éluées ensemble avec une concentration en GuCl de 40 p.100 (Pic III).

La colonne est rééquilibrée dans le tampon de départ pendant 36 heures. L'éluat est collecté par fractions de 5,2 ml. Le diagramme d'élu-tion obtenu par mesure de la densité optique à 277 nm et de la turbidimétrie à 400 nm de chaque fraction de l'éluat, est présenté dans la figure 1.

CHROMATOGRAPHIE DE LA FRACTION F_{2a2} SUR COLONNE D'AMBERLITE IRC-50

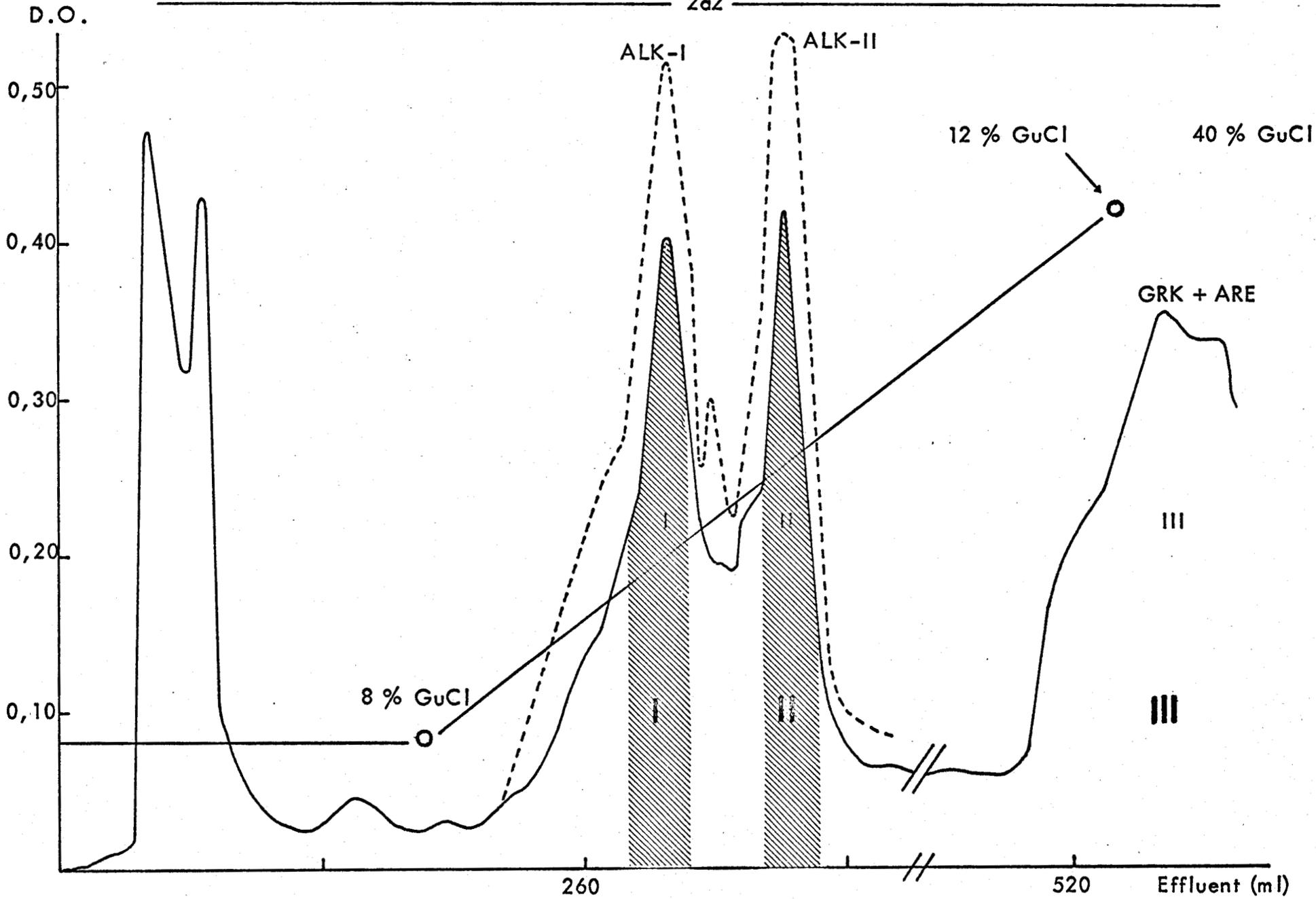


FIGURE 1

Pour la turbidimétrie, une fraction aliquote de 0,1 ml est diluée à 2 ml avec de l'eau distillée et la protéine est précipitée par 1,0 ml d'acide trichloracétique 3 M. La turbidité qui se développe pendant 15 minutes à température ambiante est mesurée à 400 nm.

La concentration du chlorhydrate de guanidine dans l'éluat est mesurée par réfractométrie.

Alors que l'ALK-histone de thymus de Veau est éluée en un seul pic, l'ALK-histone de chloroleucémie est éluée dans deux pics bien individualisés (fractions I et II). Ces fractions correspondent respectivement à ce que nous appellerons ALK-histone I et ALK-histone II.

Après dialyse sous agitation pendant 48 heures contre de l'eau désionisée chaque fraction est lyophilisée.

2) Purification de l'ALK-histone par gel-filtration

L'ALK-histone obtenue après chromatographie d'échange d'ions renferme encore un contaminant de taille moléculaire élevée, qui est éliminé par gel-filtration sur colonne de Sephadex G-100 (SAUTIERE, 1973).

La colonne (195 x 2,5 cm) est équilibrée et éluée avec HCl 0,01 N. Le débit de la colonne est de 18 ml/heure.

120 mg de protéine sont dissous dans 2 ml de HCl 0,01 N - urée 6 M et laissés pendant 48 heures à + 4°C. Avant le dépôt, la solution est diluée au demi par HCl 0,01 N.

L'éluat est collecté par fractions de 4,5 ml. Le diagramme obtenu par mesure de la densité optique de chaque fraction à 230 nm est présenté dans la figure 2.

Les fractions correspondant au pic d'ALK-histone sont rassemblées, dialysées 24 heures contre de l'eau désionisée, puis lyophilisées.

PURIFICATION DE L'ALK-HISTONE
PAR CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION
SUR COLONNE DE SEPHADEX G-100

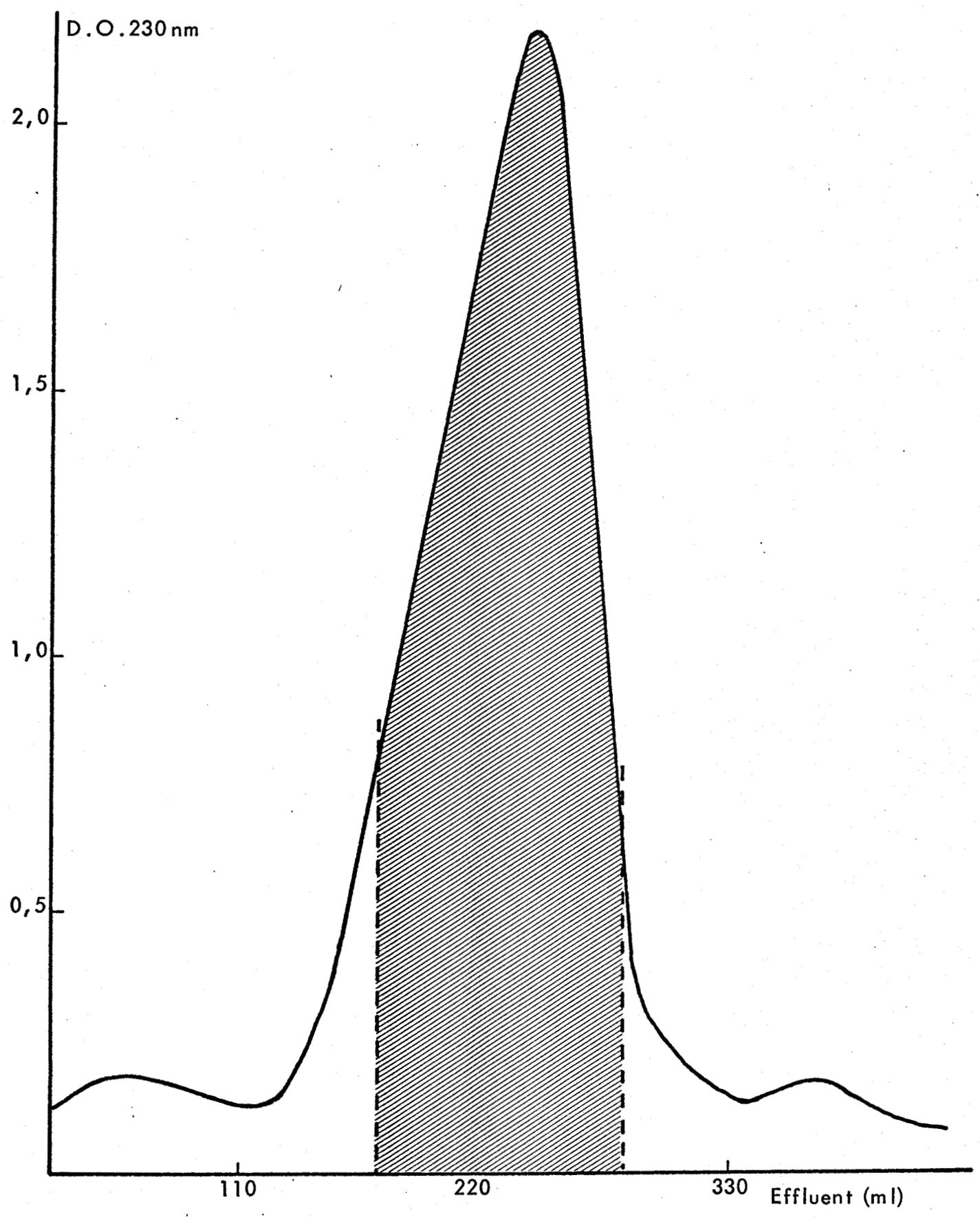


FIGURE 2

E - CRITERE DE PURETE (Electrophorèse en gel de polyacrylamide)

Les étapes de préparation et de purification des histones sont contrôlées par électrophorèse en gel de polyacrylamide. Cette technique sépare les histones suivant leur taille moléculaire et leur charge électrique.

La technique de PANYIM et al.(1969) sépare les histones dans un milieu urée 2,5 M à pH 2,7. La migration est conduite pendant quatre heures sous une intensité de 1,5 mA/tube (120 x 5 mm).

L'électrophorèse, en présence de témoins internes (GRK-histone de thymus de Veau et séralbumine bovine), montre que les histones ALK-I et ALK-II ont la même mobilité électrophorétique (Figure 3).

F - COMPOSITION EN ACIDES AMINES

La composition en acides aminés des ALK-histones I et II de chloro-leucémie du Rat, établie sur des hydrolysats de 24 et 72 heures, est présentée dans le tableau IV, en comparaison avec celle de l'ALK-histone de thymus de Veau.

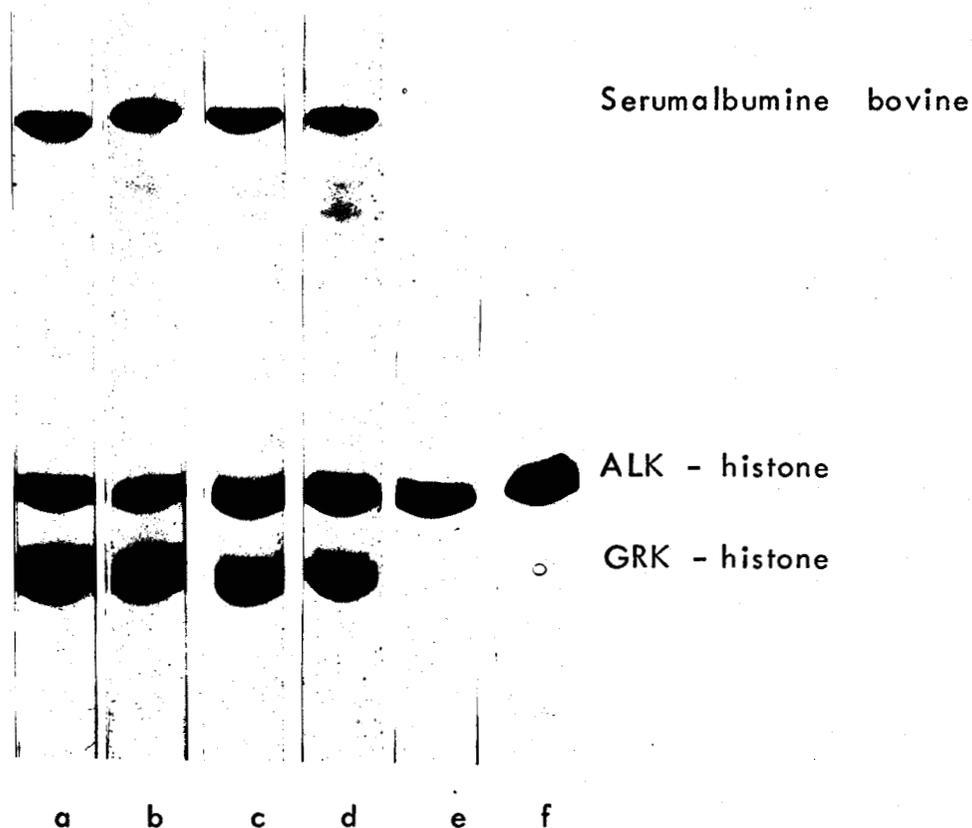
Cette histone est caractérisée par un taux élevé d'alanine, de leucine et de lysine.

L'absence de méthionine, de cystéine et de ϵ -N-méthyllysine constitue un critère de pureté des protéines étudiées puisque la GRK-histone qui renferme de la méthionine et de l' ϵ -N-méthyllysine et l'ARE-histone qui renferme de la cystéine (*) et de l' ϵ -N-méthyllysine sont les deux contaminants possibles de l'ALK-histone.

La composition en acides aminés de chaque protéine est identique

(*) La cystéine a été récemment trouvée dans la GRK-histone isolée d'Invertébrés marins (Oursin) (WOUTERS-TYROU et al., 1974).

CONTROLE DES ETAPES DE PREPARATION
DE L'ALK - HISTONE DE CHLOROLEUCEMIE DU RAT
PAR LA TECHNIQUE DE PANIYM ET CHALKLEY



- a : La fraction F_{2a2} est contaminée par l'ARE-histone et par la GRK-histone
b : ALK-I obtenue par chromatographie sur colonne d'Amberlite IRC-50
c : ALK-II obtenue par chromatographie sur colonne d'Amberlite IRC-50
d : Le mélange ALK-I et ALK-II montre que les deux types d'ALK-histone ont la même mobilité électrophorétique.
e : Histone ALK-I pure.
f : Histone ALK-II pure.

FIGURE 3

TABLEAU IV

COMPOSITION EN ACIDES AMINES

DES ALK-HISTONES I ET II DE CHLOROLEUCEMIE DU RAT

Acides aminés (*)	ALK-histone I(**)	ALK-histone II	ALK-histone de thymus de Veau
Acide aspartique	7,86 (8)	8,11 (8)	8,50 (8)
Thréonine	4,59 (4)	5,30 (5)	5,00 (5)
Sérine	5,18 (5)	4,16 (4)	4,07 (4)
Acide glutamique	12,20 (12)	12,61 (12)	12,18 (12)
Proline	4,90 (5)	5,38 (5)	5,32 (5)
Glycine	14,19 (14)	14,14 (14)	14,02 (14)
Alanine	16,92 (17)	16,43 (17)	16,27 (17)
Valine	7,87 (8)	7,96 (8)	7,99 (8)
Isoleucine	5,39 (6)	5,61 (6)	5,65 (6)
Leucine	15,13 (16)	15,62 (16)	15,75 (16)
Tyrosine	2,99 (3)	3,05 (3)	2,95 (3)
Phénylalanine	1,07 (1)	1,14 (1)	1,16 (1)
Lysine	13,31 (14)	13,05 (13)	13,59 (14)
Histidine	3,81 (4)	3,96 (4)	3,91 (4)
Arginine	11,82 (12)	12,56 (13)	11,98 (12)
Nombre total de résidus	129	129	129
Rapport Lysine/Arginine	<u>1,13</u>	<u>1,04</u>	<u>1,13</u>
Rapport Thréonine/Sérine	<u>0,89</u>	<u>1,27</u>	<u>1,23</u>

(*) Exprimés en nombre de résidus par mole de protéines.

(**) Les valeurs entre parenthèses représentent le nombre arrondi d'acide aminé par mole.

à celle de l'ALK-histone de thymus de Veau à deux différences près. On observe pour l'ALK-histone I de chloroleucémie du Rat, une différence au niveau de la thréonine et de la sérine et pour l'ALK-histone II, une différence au niveau de la lysine et de l'arginine. Ces différences apparaissent notamment au cours de l'établissement des rapports thréonine/sérine et lysine/arginine.

La composition en acides aminés permet de vérifier l'hétérogénéité de l'ALK-histone de chloroleucémie du Rat et met en évidence que chaque type d'ALK-histone diffère de l'ALK-histone de thymus de Veau par un résidu d'acide aminé. Dans l'ALK-histone I, une thréonine est substituée par une sérine et dans l'ALK-histone II, une lysine est substituée par une arginine.

CHAPITRE II

DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE

DE L'ALK-HISTONE DE CHLOROLEUCEMIE DU RAT

- A - CHOIX DES METHODES
- B - DETERMINATION DE L'EXTREMITE COOH-TERMINALE
- C - HYDROLYSE TRYPSIQUE DE L'ALK-HISTONE MALEYLEE.
SEPARATION ET ETUDE DES PEPTIDES
- D - HYDROLYSE DE L'ALK-HISTONE PAR LA THERMOLYSINE.
SEPARATION ET ETUDE DES PEPTIDES.
- E - DETERMINATION DE LA SEQUENCE COMPLETE DE LA PROTEINE

A - CHOIX DES METHODES

La similitude des compositions en acides aminés de l'ALK-histone de chloroleucémie du Rat et de l'ALK-histone de thymus de Veau suggère une similitude de structure primaire de ces deux protéines.

Nous avons donc utilisé, pour la détermination de la séquence en acides aminés de l'ALK-histone de chloroleucémie, les méthodes d'hydrolyse enzymatique et de fractionnement des peptides mises au point pour l'étude de la structure primaire de l'ALK-histone de Veau (SAUTIERE, 1973).

Deux types de coupure enzymatique ont été utilisés : hydrolyse trypsique de la protéine maléylée et hydrolyse de la protéine native par la thermolysine.

1) Choix des méthodes enzymatiques de coupure de la protéine

a) Hydrolyse de la protéine maléylée par la trypsine

La maléylation de la fonction ϵ -aminée de la lysine limite l'action de la trypsine aux liaisons impliquant l'arginine. Les liaisons Lys - Lys et Lys - Arg ainsi préservées peuvent aisément être mises en évidence. L'accroissement du nombre de charges négatives, dues à la fonction carboxylique du radical maléylé $\left[R - NH - \underset{\text{O}}{\underset{||}{C}} - CH = CH - C \begin{matrix} \text{O} \\ \text{O} \end{matrix} \right]$ confère à la protéine

une excellente solubilité en milieu alcalin (hydrolyse à pH 8,0) et provoque un dépliement de la molécule qui facilite à l'enzyme l'accès des sites de coupure.

La maléylation permet d'obtenir un nombre restreint de peptides qui sont obtenus purs et avec un bon rendement après leur fractionnement par chromatographie d'échange d'ions. D'autre part, certains d'entre eux sont longs, ce qui offre un avantage dans la détermination de la séquence de la protéine (SAUTIERE, 1973).

b) Hydrolyse de la protéine native par la thermolysine

L'étude de la séquence de l'ALK-histone de thymus de Veau et l'étude des peptides trypsiques de l'ALK-histone maléylée de chloroleucémie du Rat ont montré que l'hydrolyse trypsique ne permet pas d'accéder à la séquence complète de cette protéine. En effet, un peptide de 29 acides aminés parmi lesquels on compte 8 résidus d'alanine, 3 de valine, 1 d'isoleucine et 5 de leucine précipite au cours de la démaléylation par acidification de l'hydrolysate et une séquence hydrophobe de 18 résidus, située dans la région COOH-terminale de la protéine reste indéterminée.

La détermination de la séquence du peptide insoluble a été réalisée, pour l'ALK-histone de Veau, au moyen de l'hydrolysate chymotrypsique de la protéine maléylée et de l'hydrolysate obtenu par action de la thermolysine sur la protéine native. Mais les peptides chymotrypsiques solubles de l'ALK-histone maléylée ne recouvrent pas la séquence COOH-terminale de la protéine. Seule, l'hydrolyse de la protéine par la thermolysine qui agit spécifiquement au niveau des acides aminés à chaîne latérale hydrophobe, permet de déterminer la séquence des deux régions hydrophobes.

L'action de la thermolysine pendant quatre heures sur l'ALK-histone de Veau libère un nombre élevé de peptides. L'étude partielle de l'hydrolysate de 45 minutes de l'ALK-histone de Veau semble indiquer que le nombre de peptides libérés est réduit. C'est pourquoi nous avons limité à 45 minutes l'hydrolyse de l'ALK-histone de chloroleucémie du Rat.

2) Méthode d'étude des peptides

Les peptides sont fractionnés par chromatographie d'échange d'ions selon la méthode mise au point lors de l'étude des peptides trypsiques de la GRK-histone de thymus de Veau (SAUTIERE et al., 1970-a)(*) . Cette méthode constitue la base des études comparatives réalisées au laboratoire sur les hydrolysats d'histones homologues (SAUTIERE et al., 1970-b)(SAUTIERE et al., 1971). Elle a été utilisée pour toutes les études des hydrolysats de l'ALK-histon

(*) Cette méthode est décrite dans l'Appendice Technique.

TABLEAU V

METHODOLOGIE DE L'ETUDE DES PEPTIDES

1 - FRACTIONNEMENT DES PEPTIDES

- Par chromatographie d'échange d'ions avec un système de solvants volatils utilisés en gradient continu de pH et de molarité.
- Les fractions sont révélées successivement à la ninhydrine et à la réaction de SAKAGUCHI (spécifique de l'arginine).

2 - CONTROLE D'HOMOGENEITE

Par électrochromatographie sur papier. Le mélange acide aspartique, tyrosine, arginine, utilisé comme témoin facilite l'estimation du comportement électrophorétique des peptides. Le rouge de phénol sert de témoin chromatographique. L'électrochromatogramme est révélé avec le réactif ninhydrine-cadmium. Les peptides sont éventuellement purifiés par électrophorèse ou par chromatographie sur papier.

3 - COMPOSITION EN ACIDES AMINES

- Après hydrolyse acide par HCl 5,7 N à 110°C pendant 24 heures en tubes scellés sous vide.
- Après hydrolyse par l'aminopeptidase M à pH 8,0, 40°C, pendant 48 heures.

4 - ETUDE DE L'ACIDE AMINE EN POSITION NH₂-TERMINALE

- Par dansylation suivant le protocole de GRAY et HARTLEY.
- Les dansylamino-acides sont identifiés en chromatographie avec le système solvant de STEHELIN et DURANTON.

5 - ETUDE DE LA SEQUENCE NH₂-TERMINALE

- Par dégradation de EDMAN
utilisée en méthode soustractive ;
" en couplage avec la dansylation : méthode de GRAY et HARTLEY ;
" avec l'identification des PTH acides aminés.

6 - ETUDE DE L'ACIDE AMINE EN POSITION COOH-TERMINALE

- Hydrazinolyse
- Carboxypeptidases A et B

Les acides aminés libérés sont identifiés sur analyseur d'acides aminés.

de thymus de Veau (SAUTIERE, 1973).

La méthodologie employée pour l'étude des peptides est schématisée dans le tableau V.

Nous avons déterminé la séquence complète des peptides tryptiques de la protéine maléylée. Pour les peptides de l'hydrolysate de la protéine par la thermolysine, nous avons limité notre étude à la détermination de la composition en acides aminés et à l'identification du résidu en position NH_2 -terminale.

Chaque peptide a été comparé avec le peptide homologue provenant de l'ALK-histone de thymus de Veau : position dans le diagramme d'élution, localisation sur la carte peptidique, composition en acides aminés, acide aminé en position NH_2 -terminale. Nous avons déduit de cette étude comparative la structure des peptides "thermolysine" de l'ALK-histone de chloroleucémie. Nous pouvons dire en effet que deux peptides ont une structure identique lorsque ces peptides ont le même temps de rétention sur la colonne d'échangeur d'ions, le même comportement en chromatographie et en électrophorèse sur papier, la même composition en acides aminés et le même acide aminé en position NH_2 -terminale.

Toutefois, pour les peptides "thermolysine" correspondant aux régions médiane et COOH -terminale de la protéine, la séquence complète a été déterminée, puisque nous n'avons pas de recouvrements avec les peptides tryptiques correspondant aux mêmes régions.

B - DETERMINATION DE L'EXTREMITE COOH - TERMINALE DE L'ALK - HISTONE

Nous avons déterminé l'extrémité COOH -terminale des deux types I et II de l'ALK-histone de chloroleucémie du Rat.

TABEAU VI

ETUDE DE L'EXTREMITÉ COOH-TERMINALE DE L'ALK-HISTONE

Acides aminés libérés	Carboxypeptidase B 10 minutes	Carboxypeptidase B 10 minutes + Hydrazinolyse	Carboxypeptidase B 30 minutes	
Lysine	58,1	49,3	58,4	ALK-I
Glycine		23,7		
Lysine	65,2	62,5	58,5	ALK-II
Glycine		27,5		

(Les résultats sont exprimés en nanomoles de résidus libérés)

La protéine est hydrolysée à 40°C et à pH 7,9 avec la carboxypeptidase B ; après 10 minutes d'hydrolyse, deux fractions sont prélevées, l'une pour l'analyse directe des acides aminés, l'autre pour l'hydrazinolyse suivie de l'analyse des acides aminés. Une dernière fraction est prélevée après trente minutes d'hydrolyse pour une analyse directe des acides aminés.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau VI.

Ces résultats indiquent que la séquence COOH-terminale des deux types I et II de l'ALK-histone de chloroleucémie du Rat est Gly - Lys.

C - HYDROLYSE TRYPSIQUE DE L'ALK-HISTONE MALEYLÉE. SEPARATION ET ETUDE DES PEPTIDES.

Les premières chromatographies de la fraction F_{2a2} de chloroleucémie du Rat sur Amberlite IRC-50 ne nous avaient pas permis de séparer les types I et II d'ALK-histone et nous avons de ce fait réalisé l'hydrolyse trypsique du mélange de ces deux types. La micro-hétérogénéité est alors apparue à l'analyse des peptides trypsiques. Par la suite, nous avons pu en modifiant légèrement le gradient de concentration en chlorhydrate de guanidine, séparer de façon très satisfaisante les deux isohistones sur colonne d'Amberlite IRC-50.

Cette étude comporte les étapes suivantes :

- Maléylation de la protéine
- Hydrolyse
- Démaléylation des peptides
- Séparation et étude des peptides

- Maléylation

57 mg (4 μ moles) d'ALK-histone sont dissous dans 15 ml d'eau distillée. La solution est maintenue à 0°C dans un bain thermostaté. Le pH, initialement ajusté à 9,0 est maintenu entre 8,5 et 9,5 pendant l'addition progressive de 68 mg d'anhydride maléique (10 μ moles d'anhydride maléique/ μ mole de lysine) (Technique de BUTLER et al., 1969).

15 minutes après la dernière addition d'anhydride maléique, le pH du milieu réactionnel se stabilise : la maléylation du groupe ϵ -aminé des résidus de lysine est virtuellement achevée. Après 30 minutes, la solution de protéine maléylée est dialysée sous pression et sous agitation pendant 4 heures à la température du laboratoire contre quatre fois un litre de tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M à pH 8,0.

- Hydrolyse

Transférée dans une fiole thermostatée à 37°C, la protéine maléylée est hydrolysée par la TPCK-trypsine (*) pendant 4 heures en milieu bicarbonate d'ammonium 0,1 M à pH 8,0. Le rapport final enzyme/substrat est de 1/50. La TPCK-trypsine est ajoutée au temps zéro et après 2 heures d'hydrolyse.

L'arrêt de l'hydrolyse est obtenu par abaissement du pH à 3,5 avec de l'acide formique pur. L'acidification du milieu entraîne l'apparition d'une fraction insoluble.

- Démaléylation des peptides

La démaléylation s'effectue à pH 3,5 et à 40°C pendant 40 heures sous agitation douce (technique de DE LANGE et al., 1969-a).

Quelques gouttes de toluène sont ajoutées au milieu réactionnel pour éviter le développement de microorganismes au cours de la démaléylation des peptides.

- Séparation et étude des peptides

L'hydrolysate lyophilisé est repris par 3 ml d'acide formique à 30 p. 100. La présence d'un matériel insoluble, éliminé par centrifugation, rend compte du déficit en acides aminés de la fraction soluble de l'hydrolysate par rapport à la composition en acides aminés de la protéine (Tableau VII).

Les peptides de la fraction soluble de l'hydrolysate sont séparés par

(*) TPCK-trypsine : trypsine (EC 3-4-4-4) (WORTHINGTON) traitée par le TPCK, L-(1-tosylamido-2-phényl)-éthyl-chlorométhyl-kétone.

chromatographie d'échange d'ions sur une colonne de Chromobeads P (*). Les fractions peptidiques sont numérotées dans l'ordre d'éluion de la colonne (Figure 4). Chaque fraction correspond à un peptide pur.

Les 14 peptides tryptiques ainsi obtenus à partir de la protéine maléylée sont désignés par T_m et numérotés suivant leur position dans la séquence de la protéine. La maléylation de la fonction ε-aminée de la lysine limite la spécificité de la trypsine à la liaison arginyl-X (X : tous les acides aminés sauf la proline) ; les peptides libérés ont donc nécessairement l'arginine en position COOH-terminale, à l'exception du peptide tryptique situé à l'extrémité COOH-terminale de la protéine.

La composition et la séquence en acides aminés de ces peptides sont respectivement présentées dans les tableaux VII et VIII.

Le rendement des peptides est calculé par rapport au peptide Leu - Leu - Arg.

Peptide T_m-1 (résidus 1 à 3)

N-Acétyle - Ser - Gly - Arg

Le peptide T_m-1, élué dans la fraction 1, est obtenu avec un rendement de 57 p. 100.

Dans le diagramme d'éluion de la colonne de Chromobeads P, ce peptide n'est révélé qu'à la réaction de Sakaguchi. L'absence de coloration à la ninhydrine indique que la fonction α-aminée en position terminale du peptide est bloquée. Le blocage de cette fonction explique le comportement acide de ce peptide : nous remarquons d'abord son éluion précoce de la colonne échangeuse d'ions, ensuite sa migration anodique en électrophorèse sur papier à pH 3,6.

La carte peptidique a été révélée à la phénanthrène-quinone, réactif spécifique de l'arginine.

(*) Voir Appendice Technique.

DIAGRAMMES D'ELUTION DES PEPTIDES TRYSIQUES SOLUBLES DE L'ALK-HISTONE MALEYLEE
FRACTIONNES SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P

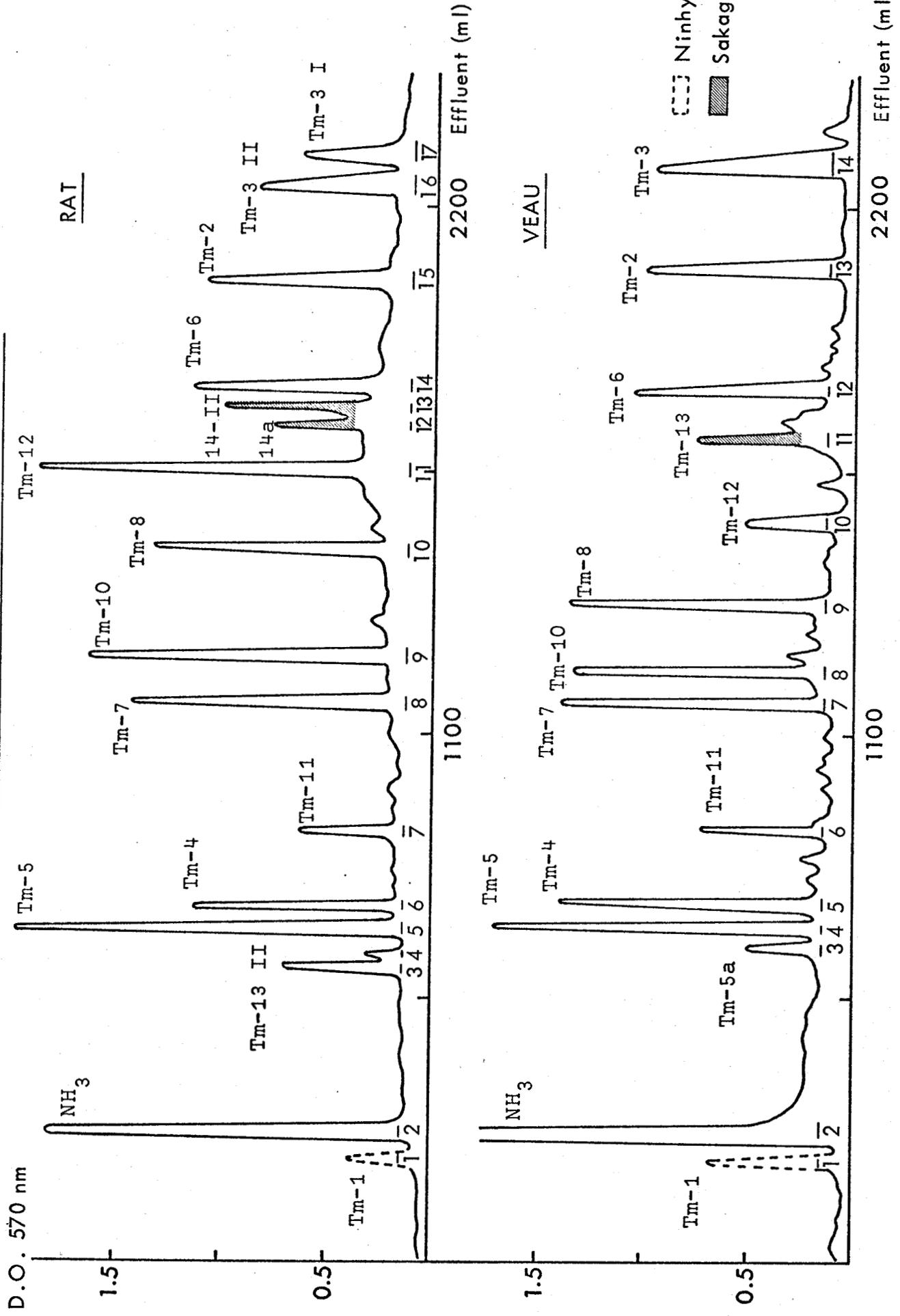


FIGURE 4

TABLEAU VII
COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES DE LA FRACTION SOLUBLE
DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE DE L'ALK-HISTONE MALEYLEE

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

	Tm-1	Tm-2	Tm-3-I	Tm-3-II	Tm-4	Tm-5	Tm-6	Tm-7	Tm-8
Asp									1,01 (1)
Thr				1,04 (1)					
Ser	0,87 (1)		1,09 (1)		1,69 (2)				
Glu		0,87 (1)				1,03 (1)			0,82 (1)
Pro						0,98 (1)			
Gly	1,05 (1)	2,82 (3)				1,90 (2)			1,07 (1)
Ala		1,00 (1)	1,72 (2)	1,75 (2)		1,02 (1)			0,87 (1)
Val						0,96 (1)	0,66 (1)		
Ile									
Leu						1,02 (1)		1,71 (2)	
Tyr									0,89 (1)
Phe						0,94 (1)			
Lys		1,85 (2)	1,79 (2)	1,89 (2)					1,14 (1)
His							0,75 (1)		
Arg	1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)
Nombre de résidus	3	8	6	6	3	9	3	3	7

(*) Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de résidus effectivement présents dans le peptide.

TABLEAU VII (SUITE)

COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES DE LA FRACTION SOLUBLE
DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE DE L'ALK-HISTONE MALEYLEE

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

	Tm-10	Tm-11	Tm-12	Tm-13-11 (**)	Tm-14-11	ALK-I		ALK-II	
						a	b	a	b
Asp	1,66 (2)			3,20 (3)	1,08 (1)	3	8	7	8
Thr	0,83 (1)				1,66 (2)	2	4	3	5
Ser					1,06 (1)	3	5	5	4
Glu			1,23 (1)	1,78 (2)	2,91 (3)	4	12	9	12
Pro		1,01 (1)			2,01 (2)	2	5	4	5
Gly				0,95 (1)	2,92 (3)	7	14	11	14
Ala			1,07 (1)		3,10 (3)	6	17	9	17
Val		(***)			2,69 (3)	2	8	5	8
Ile		1,57 (2)	1,16 (1)		1,79 (2)	3	6	5	6
Leu			2,08 (2)	2,61 (3)	2,98 (3)	5	16	11	16
Tyr						1	3	1	3
Phe						1	1	1	1
Lys	1,96 (2)			0,93 (1)	5,00 (5)	7	14	13	13
His			0,66 (1)		1,89 (2)	2	4	4	4
Arg	1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)		11	12	12	13
Nombre de résidus	6	4	7	11	30	59 (**)	129	100	129

(*) Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de résidus effectivement présents dans le peptide.

(**) Le peptide Tm-13-11 (résidus 89 à 129) de l'ALK-histone I n'a pas été isolé.

(***) La valeur de l'isoleucine est obtenue à partir d'un hydrolysat de 72 heures du peptide Tm-11.

a : Nombre total de résidus dans l'hydrolysat.

b : Composition de la protéine.

Composition :

Ser , Gly , Arg
0,87 1,05 1,00

Toutes ces caractéristiques, ainsi que le comportement en chromatographie sur papier, sont identiques à celles du peptide N-Ac. - Ser - Gly - Arg isolé des hydrolysats tryptiques de l'ALK-histone native et de l'ALK-histone maléylée du thymus de Veau.

La séquence du peptide Tm-1 est : N-Ac. - Ser - Gly - Arg.

Peptide Tm-2 (résidus 4 à 11)

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

Le peptide Tm-2 élué dans la fraction 15 est obtenu avec un rendement de 64 p. 100.

Composition :

Glu , Gly , Ala , Lys , Arg
0,87 2,82 1,00 1,85 1,00

La glutamine a été identifiée par électrochromatographie après hydrolyse totale du peptide Tm-2 par l'aminopeptidase M;

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Gly

Dégradation de Edman :

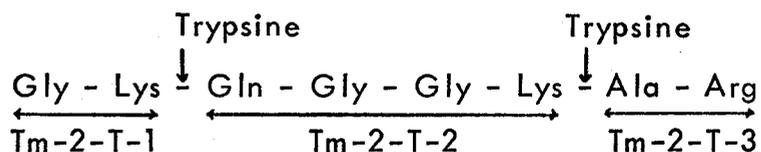
Trois cycles de dégradation de Edman, en couplage avec la méthode de dansylation ont permis d'établir la séquence NH₂-terminale :

Gly - Lys - Gln - Gly.

La séquence, au-delà de la glycine, n'a pas pu être déterminée par cette méthode à cause du faible rendement de la réaction au niveau de la glutamine qui se cyclise en acide pyroglutamique.

Hydrolyse trypsique :

L'hydrolyse de ce peptide par la trypsine pendant 2 heures à 37°C libère trois peptides qui ont été séparés par électrophorèse sur papier à pH 3,6.



Tm-2-T-1 : Gly - Lys

Composition :

Gly , Lys
0,93 1,00

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Gly

Ce peptide correspond à la séquence NH₂-terminale du peptide Tm-2.

Tm-2-T-2 : Glp - Gly - Gly - Lys

Composition :

Glu , Gly , Lys
1,08 2,08 1,00

La composition en acides aminés indique la position médiane de ce peptide dans le peptide Tm-2.

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

Aucun dansylamino-acide n'a été identifié. Ce résultat ainsi que la migration anodique de ce peptide en électrophorèse à pH 3,6 témoignent de la cyclisation de la glutamine en acide pyroglutamique.

La séquence Gln - Gly a été déterminée par la dégradation de Edman sur le peptide Tm-2; la position COOH-terminale de la lysine est déduite de la spécificité de la trypsine et le deuxième résidu de glycine est placé par différence.

Tm-2-T-3 : Ala - Arg

Composition :

Ala , Arg
1,22 1,00

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Ala

La séquence Ala - Arg de ce peptide correspond à la séquence COOH-terminale du peptide Tm-2 dans lequel la position COOH-terminale de l'arginine découle de la spécificité de la trypsine sur la protéine maléylée.

Peptide Tm-3-1 (résidus 12 à 17)

Ala - Lys - Ala - Lys - Ser - Arg

Le peptide Tm-3-1, élué dans la fraction 17, est obtenu avec un rendement de 46 p.100.

Composition :

Ser , Ala , Lys , Arg
1,09 1,72 1,79 1,00

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Ala

Dégradation de Edman :

Trois cycles de dégradation de Edman couplée avec la méthode de dansylation permettent d'établir la séquence NH₂-terminale Ala - Lys - Ala - Lys.

La position COOH-terminale de l'arginine est déduite de la spécificité de la trypsine et le résidu de sérine est placé par différence.

Peptide Tm-3-II (résidus 12 à 17)

Ala - Lys - Ala - Lys - Thr - Arg

Le peptide Tm-3-II, élué dans la fraction 16, est obtenu avec un rendement de 37 p.100.

Composition :

Thr	, Ala	, Lys	, Arg
1,04	1,75	1,89	1,00

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Ala

Dégradation de Edman :

Trois cycles de dégradation de Edman couplée avec la méthode de dansylation permettent d'établir la séquence NH₂-terminale : Ala - Lys - Ala - Lys.

La position COOH-terminale de l'arginine est déduite de la spécificité de la trypsine et le résidu de thréonine est placé par différence.

Peptide Tm-4 (résidus 18 à 20)

Ser - Ser - Arg

Le peptide Tm-4, élué dans la fraction 6, est obtenu avec un rendement de 74 p.100.

Lors de la révélation de la carte peptidique, le réactif à la ninhydrine-cadmium donne une coloration orangée spécifique de la position NH₂-terminale d'un acide aminé hydroxylé dans un peptide.

Composition :

Ser	, Arg
1,69	1,00

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Ser

Dégradation de Edman :

Un cycle de dégradation de Edman couplée avec la dansylation a permis de confirmer la séquence du peptide Tm-4 qui résulte de la spécificité de la trypsine.

Peptide Tm-5 (résidus 21 à 29)

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

Le peptide Tm-5, élué dans la fraction 5, est obtenu avec un rendement de 52 p.100.

Composition :

Glu	Pro	Gly	Ala	Val	Leu	Phe	Arg
1,03	0,98	1,90	1,02	0,96	1,02	0,94	1,00

La glutamine a été identifiée par électrochromatographie après hydrolyse totale du peptide Tm-5 par l'aminopeptidase M.

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Ala

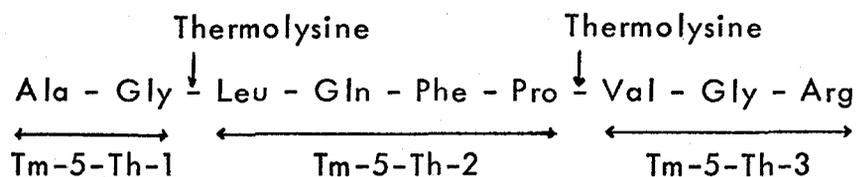
Dégradation de Edman :

La séquence NH₂-terminale Ala - Gly - Leu - Gln a été déterminée par trois cycles de dégradation de Edman couplée avec la méthode de dansylation.

La dégradation de Edman n'a donné aucun résultat au-delà du troisième cycle, en raison de la cyclisation de la glutamine en acide pyroglutamique.

Hydrolyse par la thermolysine :

Une hydrolyse du peptide Tm-5 par la thermolysine pendant 4 heures à 40°C libère trois peptides qui ont été séparés par chromatographie sur papier dans le solvant n-butanol - pyridine - acide acétique - eau.



Tm-5-Th-1 : Ala - Gly

Composition :

Gly , Ala
1,46 1,00
(1)

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Ala

Ce peptide représente la séquence NH₂-terminale du peptide Tm-5.

Tm-5-Th-2 : Leu - Gln - Phe - Pro

Composition :

Glu , Pro , Leu , Phe
1,09 1,01 0,77 1,00

La composition en acides aminés indique la position médiane de ce peptide dans le peptide Tm-5.

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Leu

La séquence Leu - Gln a été déterminée par la dégradation de Edman sur le peptide Tm-5.

Hydrazinolyse :

La proline libérée par hydrazinolyse du peptide Tm-5-Th-2, a été identifiée sur autoanalyseur d'acides aminés. Elle se place à l'extrémité COOH-terminale de ce peptide.

La phénylalanine est placée par différence.

Remarquons que la liaison Gln - Phe n'a pas été hydrolysée par la thermolysine. Ce point sera discuté dans l'étude de l'hydrolysate obtenu par action de la thermolysine sur la protéine.

Tm-5-Th-3 : Val - Gly - Arg

Composition :

Gly , Val , Arg
1,10 0,85 1,00

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Val

Ce peptide correspond à la séquence COOH-terminale du peptide Tm-5 dans lequel l'arginine est en position COOH-terminale. Nous plaçons la glycine par différence. La structure du peptide Tm-5 est ainsi établie.

Un peptide Tm-5-a, élué dans la fraction 4, est obtenu avec un rendement de 14 p.100. Ce peptide a une composition identique à celle du peptide Tm-5. Son comportement légèrement plus acide en chromatographie d'échange d'ions et en électrophorèse sur papier indique qu'il résulte vraisemblablement de la désamidation partielle du résidu de glutamine dans le peptide Tm-5.

Peptide Tm-6 (résidus 30 à 32)

Val - His - Arg

Le peptide Tm-6, élué dans la fraction 14, est obtenu avec un rendement de 90 p.100.

Il donne une faible réaction de Sakaguchi à cause de la présence de l'histidine.

Composition :

Val , His , Arg
0,66 0,75 1,00

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Val

La position COOH-terminale de l'arginine est déduite de la spécificité de la trypsine et l'histidine est placée par différence.

Peptide Tm-7 (résidus 33 à 35)

Leu - Leu - Arg

Le peptide Tm-7 est élué dans la fraction 8.

Composition :

Leu , Arg
1,71 1,00

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Leu

La séquence de ce peptide est évidente, compte-tenu de la spécificité de la trypsine.

Peptide Tm-8 (résidus 36 à 42)

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

Le peptide Tm-8, élué dans la fraction 10, est obtenu avec un rendement de 65 p.100.

Composition :

Asp , Glu , Gly , Ala , Tyr , Lys , Arg
1,01 0,82 1,07 0,87 0,89 1,14 1,00

L'asparagine et l'acide glutamique ont été identifiés par électrochromatographie après hydrolyse totale du peptide Tm-8 par l'aminopeptidase M.

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

di DNS - Lys

Dégradation de Edman :

La séquence NH₂-terminale Lys - Gly - Asn - Tyr - Ala a été déterminée par la méthode de la dégradation de Edman associée avec la dansylation.

La position COOH-terminale de l'arginine est déduite de la spécificité de la trypsine et l'acide glutamique est placé par différence.

Peptide Tm-10 (résidus 72 à 77)

Asp - Asn - Lys - Lys - Thr - Arg

Le peptide Tm-10, élué dans la fraction 9, est obtenu avec un rendement de 67 p.100.

Composition :

Asp	, Thr	, Lys	, Arg
1,66	0,83	1,96	1,00

La présence d'asparagine et d'acide aspartique a été identifiée par électrochromatographie après hydrolyse totale du peptide par l'aminopeptidase M.

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Asp

Dégradation de Edman :

Trois cycles de dégradation de Edman couplée avec la méthode de dansylation, ont permis d'établir la séquence NH₂-terminale Asx - Asx - Lys - Lys.

L'identification du PTH - Asp libéré au cours de la première dégradation de Edman, permet de placer l'acide aspartique à l'extrémité NH₂-terminale du peptide.

La position COOH-terminale de l'arginine découle de la spécificité de la trypsine et la thréonine est placée par différence.

Peptide Tm-11 (résidus 78 à 81)

Ile - Ile - Pro - Arg

Le peptide Tm-11, élué dans la fraction 7, est obtenu avec un rendement de 97 p.100.

Composition :

Le comportement de ce peptide en chromatographie d'échange d'ions et en électrochromatographie sur papier est identique à celui du peptide Ile - Ile - Pro - Arg isolé de l'ALK-histone de thymus de Veau. Ces caractéristiques laissent prévoir pour le peptide Tm-11 une séquence identique dans laquelle la liaison Ile - Ile est résistante à l'hydrolyse de 24 heures. Le peptide Tm-11 a donc été soumis à une hydrolyse acide (HCl 5,7 N à 110°C) pendant 72 heures.

Pro , Ile , Arg
1,01 1,57 1,00

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Ile

Dégradation de Edman :

Une dansylation sur le peptide résiduel après un cycle de dégradation de Edman permet de déterminer la séquence NH₂-terminale Ile - Ile .

La position COOH-terminale de l'arginine est déduite de la spécificité de la trypsine et la proline est placée par différence.

Peptide Tm-12 (résidus 82 à 88)

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

Le peptide Tm-12, élué dans la fraction 11, est obtenu avec un rendement de 47 p.100.

Il donne une faible réaction de Sakaguchi à cause de la présence de l'histidine.

Composition :

Glu , Ala , Ile , Leu , His , Arg
1,23 1,07 1,16 2,08 0,66 1,00

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

di DNS - His

Dégradation de Edman :

Quatre cycles de dégradation de Edman couplée avec la méthode de dansylation permet d'établir la séquence NH₂-terminale His - Leu - Gln - Leu - Ala. La PTH - glutamine, libérée au cours de la troisième dégradation de Edman, a été identifiée en chromatographie sur couche mince.

La position COOH-terminale de l'arginine est déduite de la spécificité de la trypsine et l'isoleucine est placée par différence.

Peptide Tm-13-II (résidus 89 à 99)

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

Le peptide Tm-13-II, élué dans la fraction 3, est obtenu avec un rendement de 43 p.100.

Composition :

Asp , Glu , Gly , Leu , Lys , Arg
3,20 1,78 0,95 2,61 0,93 1,00

L'asparagine, l'acide aspartique et l'acide glutamique ont été identifiés par électrochromatographie après hydrolyse du peptide par l'aminopeptidase M.

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Asp

Dégradation de Edman :

Cinq cycles de dégradation de Edman couplée avec la méthode de

dansylation ont permis de déterminer la séquence NH_2 -terminale :

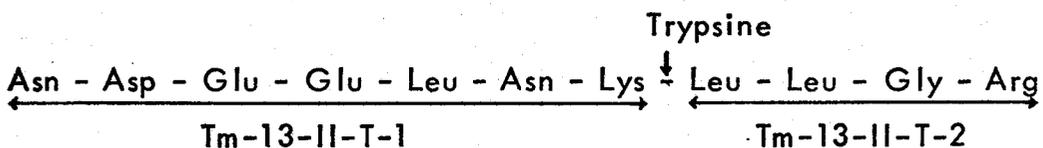
Asx - Asx - Glu - Glu - Leu - Asx.

L'identification des PTH libérés au cours des deux premières dégradations de Edman permet de préciser les positions respectives de l'asparagine 89 et de l'acide aspartique 90 dans la séquence de ce peptide.

Un résidu d'asparagine a été identifié en position 94, lors de l'étude du peptide Th-15-a.

Hydrolyse trypsique :

Le peptide Tm-13-II a été hydrolysé par la TPCK-trypsine à 37°C pendant 4 heures. Les deux peptides libérés ont été séparés par chromatographie sur papier.



Tm-13-II-T-1 : Asn - Asp - Glu - Glu - Leu - Asn - Lys

Composition :

Asp , Glu , Leu , Lys
2,85 2,00 1,18 1,00

Ce peptide qui ne contient pas d'arginine, correspond à la séquence NH_2 -terminale du peptide Tm-13-II.

Dansylamino-acide NH_2 -terminal :

DNS - Asp

La séquence Asn - Asp - Glu - Glu - Leu - Asn de ce peptide a été déterminée par la dégradation de Edman sur le peptide Tm-13-II. La position COOH -terminale de la lysine est déduite de la spécificité de la trypsine.

Tm-13-II-T-2 : Leu - Leu - Gly - Arg

Composition :

Gly ,	Leu ,	Arg
1,55	2,11	1,00
(1)	(2)	

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Leu

Dégradation de Edman :

Un cycle de dégradation de Edman couplée avec la méthode de dansylation a permis d'identifier la séquence NH₂-terminale Leu - Leu.

Ce peptide correspond à la séquence COOH-terminale du peptide Tm-13-II dans lequel l'arginine est en position COOH-terminale. La glycine est placée par différence. La structure du peptide Tm-13-II est ainsi établie.

Tm-14-II (résidus 100 à 129)

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

Le peptide Tm-14-II, élué dans la fraction 13, est obtenu avec un rendement de 20 p.100.

Il ne donne pas de réaction de Sakaguchi positive, ce qui traduit l'absence d'arginine.

Composition :

Asp ,	Thr ,	Ser ,	Glu ,	Pro ,	Gly ,	Ala ,	Val ,	Ile ,	Leu ,	Lys ,	His
1,08	1,61	1,06	2,91	2,01	2,92	3,10	2,69	1,79	2,98	5,00	1,89
	(2)						(3)				

La composition en acides aminés confirme l'absence d'arginine. Puisque l'action de la TPCK-trypsine est limitée aux seules liaisons arginyl - X de la protéine maléylée, ce peptide se place nécessairement en position COOH-terminale dans la protéine.

La forme acide ou amide des acides aminés dicarboxyliques a été déterminée au cours de l'étude des peptides obtenus par hydrolyse de la protéine par la thermolysine.

Un peptide Tm-14-II-a, élué dans la fraction 12, est obtenu avec un rendement de 15 p.100. Il a une composition en acides aminés identique à celle du peptide Tm-14-II. Son comportement légèrement plus acide en chromatographie d'échange d'ions indique qu'il provient vraisemblablement de la désamidation partielle des résidus d'asparagine et de glutamine présents dans le peptide Tm-14-II.

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Val

La dansyl-valine a été identifiée par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince de gel de silice dans les solvants de GROS et LABOUESSE (1969).

Dégradation de Edman :

Un cycle de dégradation de Edman couplée avec la dansylation a permis de déterminer la séquence NH₂-terminale Val - Thr.

Hydrolyse trypsique :

Le peptide Tm-14-II a été hydrolysé par la TPCK-trypsine pendant 4 heures à 37°C. Les quatre peptides libérés ont été séparés par chromatographie sur papier.

Tm-14-II-T-1

Val - Thr -(Ile, Ala, Glx, Gly, Gly, Val, Leu, Pro, Asx, Ile, Glx, Ala, Val, Leu, Leu, Pro)- Lys

Composition :

Asp , Thr , Glu , Pro , Gly , Ala , Val , Ile , Leu , Lys
0,78 0,47 1,98 2,15 1,62 1,83 1,87 1,39 3,00 1,00
(1) (2) (3) (2)

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Val

Ce peptide, le seul qui a un résidu de valine en position NH₂-terminale, constitue la séquence NH₂-terminale du peptide Tm-14-II.

Ce peptide dont le caractère hydrophobe ressort de sa composition en acides aminés a un rendement très faible et nous n'avons pas pu étudier sa séquence.

Tm-14-II-T-2

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

Composition :

Thr , Ser , Glu , His , Lys
1,07 1,30 1,31 2,05 2,00

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

di DNS - Lys

Dégradation de Edman :

Trois cycles de dégradation de Edman couplée avec la dansylation ont permis de déterminer la séquence NH₂-terminale : Lys - Thr - Glu - Ser. Le PTH - acide glutamique libéré au cours de la troisième dégradation de Edman a été identifié par chromatographie sur couche mince.

La position COOH-terminale de la lysine est déduite de la spécificité de la trypsine et les deux histidines sont placées par différence.

L'inhibition de l'hydrolyse trypsique de la liaison Lys - Thr est attribuée à l'environnement acide apporté par la fonction γ-carboxylique

(*) La valeur de la valine est anormalement faible. Le nombre de résidus (3) est tiré de la composition en acides aminés du peptide Tm-14-II.

libre de l'acide glutamique. Le peptide homologue avait été libéré au cours de l'hydrolyse trypsique de l'ALK-histone de thymus de Veau. Ce type d'inhibition de l'action de la trypsine a été observé par BRATTIN et SMITH (1971).

Tm-14-II-T-3

Ala - Lys

Composition :

Ala , Lys

1,10 1,00

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Ala

Tm-14-II-T-4

Gly - Lys

Composition :

Gly , Lys

1,06 1,00

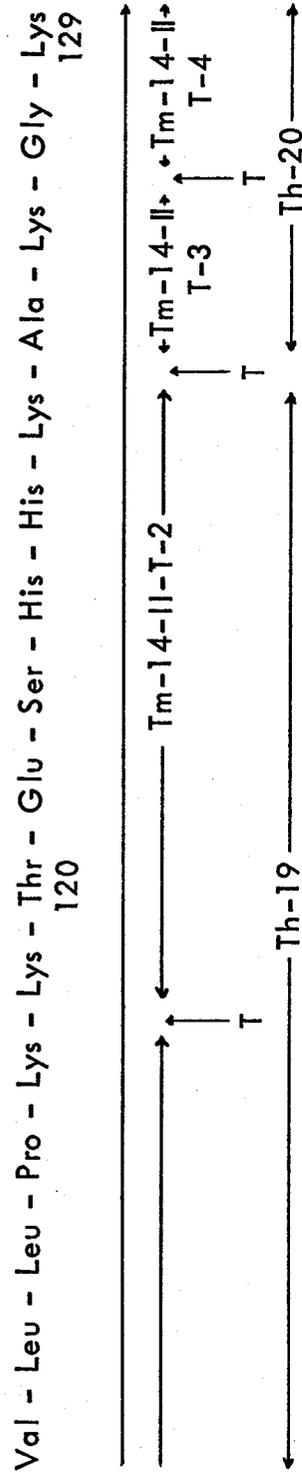
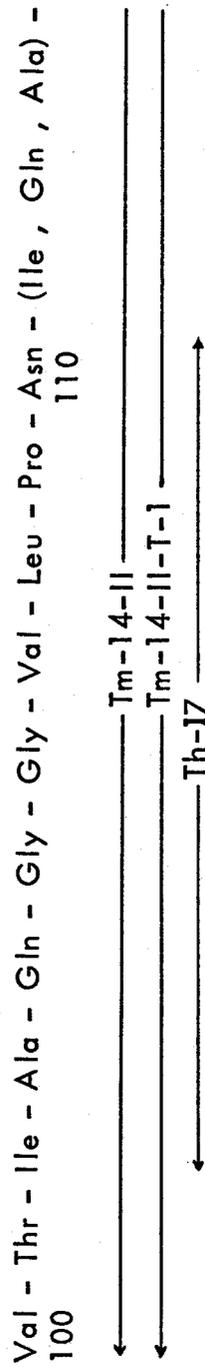
Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Gly

La séquence complète du peptide Tm-14-II, présentée dans le tableau IX, a été établie avec les données fournies par l'étude des peptides "thermolysine" de la protéine. Le peptide Th-20 recouvre les peptides Tm-14-II-T-3 et Tm-14-II-T-4. Le peptide Tm-14-II-T-4 : Gly - Lys, correspond à la séquence COOH-terminale de l'ALK-histone établie par hydrolyse de la protéine avec la carboxypeptidase B, suivie d'une hydrazinolyse. L'ordre des peptides Tm-14-II-T-1 et Tm-14-II-T-2 est déterminé par le peptide Th-19. Le peptide Th-17 permet de déterminer une séquence de

TABLEAU IX

SCHEMA DE LA DETERMINATION DE LA SEQUENCE DU PEPTIDE Tm-14-II



(T = hydrolyse du peptide Tm-14-II par la trypsine)

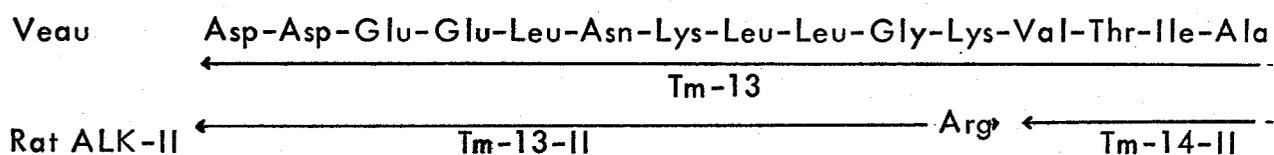
9 résidus qui se place dans la région NH₂-terminale du peptide Tm-14-II-T-1 par comparaison avec la séquence de l'ALK-histone de thymus de Veau. La séquence Ile - Gln - Ala (résidus 111 à 113) a été déduite de la composition en acides aminés de la protéine et surtout de la composition en acides aminés du peptide Tm-14-II et par comparaison avec la séquence en acides aminés de l'ALK-histone de Veau.

DISCUSSION

L'identité complète de structure qui apparaît entre les peptides tryptiques de l'ALK-histone maléylée du Rat et ceux de l'ALK-histone maléylée de Veau se reflète dans la similitude des diagrammes d'élution de ces peptides(*) séparés sur échangeur d'ions. Toutefois, deux fractions supplémentaires apparaissent dans le diagramme d'élution des peptides tryptiques de l'ALK-histone maléylée de Rat.

Le peptide Tm-3-I diffère du peptide Tm-3-II et du peptide Tm-3 (ALK - Veau) par une sérine qui remplace une thréonine. Ce peptide est issu de l'ALK-histone I, dans laquelle la thréonine en position 16 est substituée par une sérine.

Les peptides Tm-13-II et Tm-14-II n'existent pas dans l'hydrolysate tryptique de l'ALK-histone maléylée de Veau. Ensemble, ils correspondent au peptide Tm-13 (résidus 89 à 129) en position COOH-terminale dans l'ALK-histone de Veau. L'obtention des peptides Tm-13-II et Tm-14-II résulte de la substitution du résidu de lysine en position 99 dans l'ALK-histone de Veau, par un résidu d'arginine dans l'ALK-histone II du Rat.



(*) Le décalage des fractions 10 et 11 du diagramme d'élution des peptides tryptiques de l'ALK-histone maléylée de Rat a été provoqué par une panne d'agitation dans le Varigrad.

Le peptide Tm-13-I (résidus 89 à 129), issu de l'ALK-histone I, n'a pas été isolé. Dans l'étude de l'ALK-histone de thymus de Veau, ce peptide de taille moléculaire très élevée (41 résidus) et de caractère hydrophobe (14 résidus à chaîne latérale hydrophobe) avait été obtenu avec un rendement faible.

Les rendements relativement faibles des peptides Tm-3-I (46 p.100), Tm-3-II (37 p.100), Tm-13-II (48 p.100) et Tm-14-II (35 p.100) (en additionnant le rendement des fractions 12 et 13) par rapport aux autres peptides rendent compte de la provenance de ces peptides d'un seul des deux types d'ALK-histone de chloroleucémie du Rat.

En ce qui concerne l'ALK-histone II de chloroleucémie, sachant que la maléylation limite l'action de la TPCK-trypsine aux 13 résidus d'arginine présents dans la protéine, et que le peptide COOH-terminal ne renferme pas d'arginine, nous devrions obtenir 14 peptides. En fait, 13 peptides ont été obtenus. D'autre part, le bilan des acides aminés des peptides tryptiques solubles met en évidence un déficit de 29 acides aminés par rapport à la composition de la protéine (Tableau VII). Un déficit équivalent avait été observé au cours de l'étude des peptides tryptiques de l'ALK-histone maléylée de thymus de Veau. Ces 29 acides aminés correspondent au peptide Tm-9. La richesse de ce peptide en acides aminés hydrophobes (8 alanines, 3 valines et 5 leucines) lui confère son insolubilité en milieu acide formique à 10 p.100.

Dans l'ALK-histone I de chloroleucémie, qui renferme 12 arginines, seulement 11 peptides ont été obtenus sur les 13 peptides escomptés, et au déficit des 41 acides aminés du peptide Tm-13-I s'ajoute celui des 29 acides aminés du peptide Tm-9.

Après cette étude, la séquence du peptide insoluble Tm-9 et la séquence des 18 premiers résidus du peptide Tm-14-II restent indéterminées. Pour étudier la structure primaire de ces régions, qui ont un caractère hydrophobe marqué, nous avons entrepris une hydrolyse de la protéine par la thermolysine qui agit au niveau des acides aminés à chaîne latérale hydrophobe.

D - HYDROLYSE DE L'ALK-HISTONE PAR LA THERMOLYSINE.
SEPARATION ET ETUDE DES PEPTIDES.

L'ALK-histone (65 mg) est dissoute dans 10 ml d'eau distillée ; on ajoute ensuite 10 ml de bicarbonate d'ammonium 0,2 M. Le pH est ajusté à 8,0 et la protéine est hydrolysée à 40°C pendant 45 minutes avec la thermolysine ajoutée en une seule fois. Le rapport enzyme/substrat est de 1 p.100. L'hydrolyse est arrêtée par abaissement du pH à 3,5 avec de l'acide formique pur.

L'hydrolysate, qui est resté limpide, est lyophilisé. Il est repris par 3 ml d'acide formique à 30 p.100. Les peptides sont fractionnés par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Chromobeads P en 24 fractions numérotées suivant leur ordre d'élution (Figure 5). Les 27 peptides isolés sont désignés par Th et numérotés suivant leur position dans la séquence de la protéine.

La composition et la séquence en acides aminés de ces peptides sont respectivement présentées dans les tableaux X et XI.

Peptide Th-1 (résidus 1 à 11)

N-Acétyl - Ser - Gly - Arg - Gly - Lys - Gln - Gly - Gly - Lys - Ala - Arg

Le peptide Th-1, élué dans la fraction 17, a été purifié par chromatographie sur papier.

Composition :

Ser	Glu	Gly	Ala	Lys	Arg
0,97	0,93	4,00	1,19	2,00	2,21

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

Aucun dansylamino-acide n'a été identifié.

Ce résultat indique que la fonction α -aminée de l'acide aminé en position NH₂-terminale est bloquée.

DIAGRAMMES D'ELUTION DES PEPTIDES THERMOLYSINE DE L'ALK-HISTONE
FRACTIONNES SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P

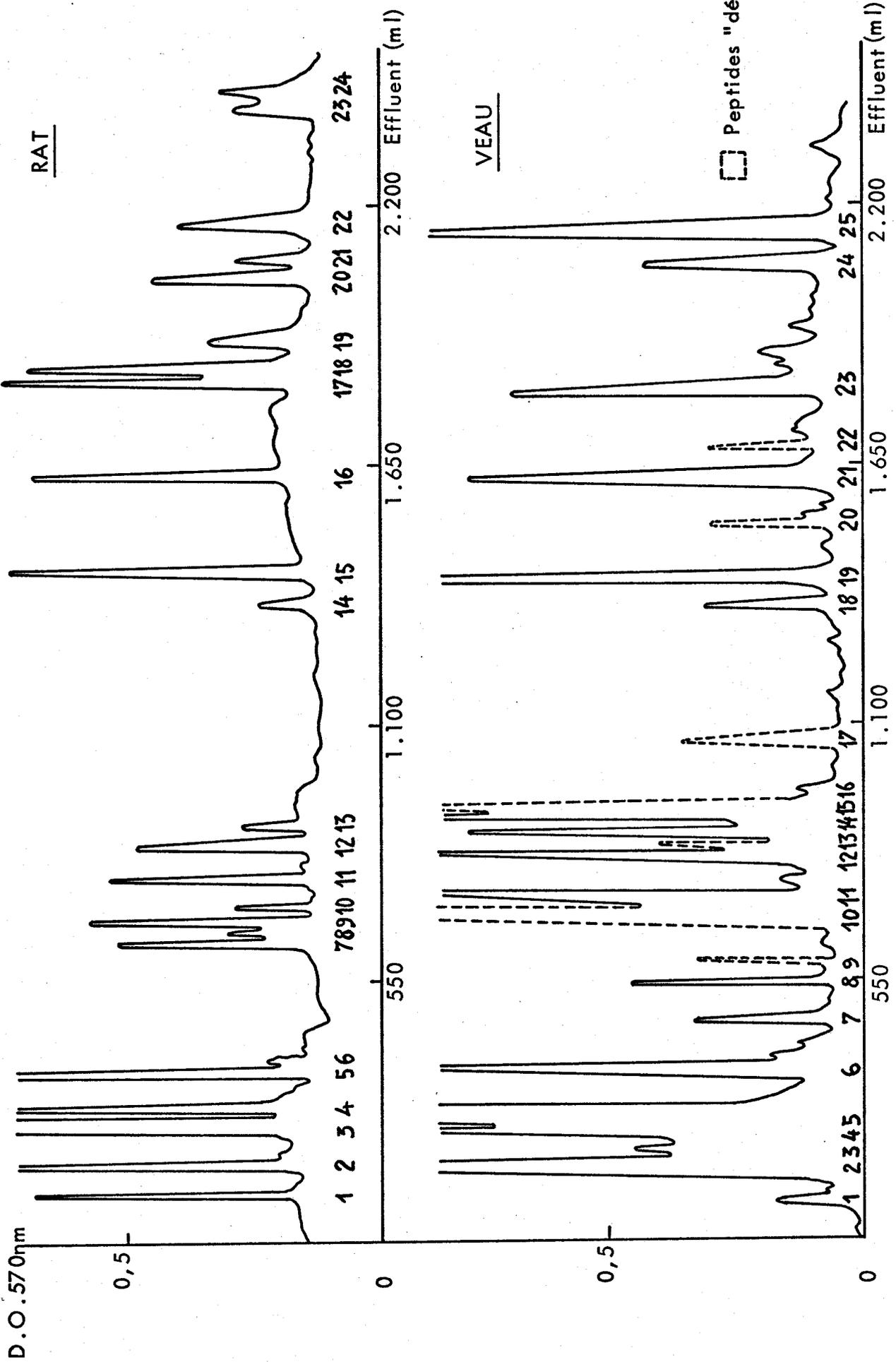


FIGURE 5

TABEAU X

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

(exprimées en rapports molaires par rapport à un acide aminé hydrophobe) (*)

	Th-1	Th-2	Th-3-1	Th-3-11	Th-4	Th-5	Th-6	Th-7	Th-8	Th-9	Th-10
Asp								1,32 (1)			
Thr				1,55 (1)							0,93 (1)
Ser	0,97 (1)		2,90 (3)	1,70 (2)							
Glu	0,93 (1)				1,10 (1)			1,27 (1)		1,12 (1)	2,05 (2)
Pro					0,92 (1)			1,00 (1)			
Gly	4,00 (4)		1,49 (1)	1,13 (1)		1,14 (1)		3,18 (3)			
Ala	1,19 (1)	1,00 (1)	2,00 (2)	2,00 (2)		1,00 (1)		2,56 (3)	1,92 (2)	1,20 (1)	1,06 (1)
Val						1,00 (1)	1,00 (1)	1,96 (2)		0,94 (1)	
Ile											1,00 (1)
Leu					1,00 (1)		1,18 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)	1,98 (2)
Tyr								1,78 (2)		1,10 (1)	
Phe					0,87 (1)						
Lys	2,00 (2)	0,94 (1)	1,15 (1)	1,36 (1)				1,10 (1)			
His							0,87 (1)				
Arg	2,21 (2)		1,98 (2)	1,95 (2)		1,06 (1)	1,15 (1)	2,13 (2)			
Nombre de résidus	11	2	9	9	4	3	4	17	3	5	7

(*) Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de résidus effectivement présents dans le peptide.

TABLEAU X (SUITE)

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

(exprimées en rapports molaires par rapport à un acide aminé hydrophobe) (*)

	Th-11	Th-12	Th-13	Th-14	Th-15	Th-16-I	Th-16-II	Th-17	Th-18 (**)	Th-19	Th-20
Asp	2,96 (3)				3,12 (3)	0,97 (1)	0,75 (1)	1,09 (1)		1,00 (1)	
Thr	0,98 (1)									0,97 (1)	
Ser					2,15 (2)			0,98 (1)		1,07 (1)	
Glu			1,16 (1)					0,91 (1)		0,85 (1)	
Pro		1,00 (1)						2,30 (2)			1,05 (1)
Gly	1,36 (1)					1,34 (1)	1,13 (1)	1,03 (1)			1,00 (1)
Ala	3,00 (3)			1,01 (1)		1,00 (1)	1,00 (1)	0,86 (1)		0,92 (1)	
Val						0,80 (1)	0,78 (1)	0,88 (1)		2,00 (2)	
Ile		1,79 (2)			0,91 (1)						
Leu	0,91 (1)		1,00 (1)	1,00 (1)	2,00 (2)	0,80 (1)	0,78 (1)	1,00 (1)			
Tyr											
Phe											
Lys	2,10 (2)				1,09 (1)	1,09 (1)				2,94 (3)	1,91 (2)
His		0,95 (1)								1,72 (2)	
Arg	2,09 (2)	1,00 (1)			1,09 (1)		0,90 (1)				
Nombre de résidus	13	5	2	2	10	5	5	9	0	12	4

(**) Ce peptide n'a pas été retrouvé dans l'hydrolysat "thermolysine" de l'ALK-histone.

(*) Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de résidus effectivement présents dans le peptide.

TABLEAU XI

SEQUENCES EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES "THERMOLYSINE" DE L'ALK-HISTONE (*)

Th-1	(résidus 1 à 11)	N-Acétyl-Ser-Gly-Arg-Gly-Lys-Gln-Gly-Gly-Lys-Ala-Arg
Th-2	(résidus 12 et 13)	$\overline{\text{Ala-Lys}}$
Th-3-I	(résidus 14 à 22)	$\overline{\text{Ala-Lys-Ser-Arg-Ser-Ser-Arg-Ala-Gly}}$
Th-3-II	(résidus 14 à 22)	$\overline{\text{Ala-Lys-Thr-Arg-Ser-Ser-Arg-Ala-Gly}}$
Th-4	(résidus 23 à 26)	$\overline{\text{Leu-Gln-Phe-Pro}}$
Th-5	(résidus 27 à 29)	$\overline{\text{Val-Gly-Arg}}$
Th-6	(résidus 30 à 33)	$\overline{\text{Val-His-Arg-Leu}}$
Th-7	(résidus 34 à 50)	$\overline{\text{Leu-Arg-Lys-Gly-Asn-Tyr-Ala-Glu-Arg-Val-Gly-Ala-Gly-Ala-Pro-Val-Tyr}}$
Th-8	(résidus 51 à 53)	$\overline{\text{Leu-Ala-Ala}}$
Th-9	(résidus 53 à 57)	$\overrightarrow{\text{Ala-Val-Leu-Glu-Tyr}}$
Th-10	(résidus 58 à 64)	$\overrightarrow{\text{Leu-Thr-Ala-Glu-Ile-Leu-Glu}}$

(*) La signification des signes placés au-dessus ou en-dessous des résidus d'acides aminés est présentée dans le tableau VIII. (p. 32)

TABLEAU XI (SUITE)

SEQUENCES EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES "THERMOLYSINE" DE L'ALK-HISTONE (*)

Th-11	(résidus 65 à 77)	$\overline{\text{Leu}}-\overline{\text{Ala}}-\overline{\text{Gly}}-\overline{\text{Asn}}-\overline{\text{Ala}}-\overline{\text{Ala}}-\overline{\text{Arg}}-\overline{\text{Asp}}-\overline{\text{Asn}}-\overline{\text{Lys}}-\overline{\text{Lys}}-\overline{\text{Thr}}-\overline{\text{Arg}}$ $\xrightarrow{\hspace{1.5cm}} \hspace{1.5cm} \xrightarrow{\hspace{1.5cm}} \hspace{1.5cm} \xrightarrow{\hspace{1.5cm}} \hspace{1.5cm} \xrightarrow{\hspace{1.5cm}} \hspace{1.5cm} \xrightarrow{\hspace{1.5cm}} \hspace{1.5cm} \xrightarrow{\hspace{1.5cm}} \hspace{1.5cm} \xrightarrow{\hspace{1.5cm}} \hspace{1.5cm} \xrightarrow{\hspace{1.5cm}}$ <div style="display: flex; justify-content: space-around; width: 100%;"> Th-11-a Th-11-b </div>
Th-12	(résidus 78 à 82)	$\overline{\text{Ile}}-\overline{\text{Ile}}-\overline{\text{Pro}}-\overline{\text{Arg}}-\overline{\text{His}}$
Th-13	(résidus 83 et 84)	$\overline{\text{Leu}}-\overline{\text{Gln}}$
Th-14	(résidus 85 et 86)	$\overline{\text{Leu}}-\overline{\text{Ala}}$
Th-15	(résidus 87 à 96)	$\overline{\text{Ile}}-\overline{\text{Arg}}-\overline{\text{Asn}}-\overline{\text{Asp}}-\overline{\text{Glu}}-\overline{\text{Glu}}-\overline{\text{Leu}}-\overline{\text{Asn}}-\overline{\text{Lys}}-\overline{\text{Leu}}$
Th-16-I	(résidus 97 à 101)	$\overline{\text{Leu}}-\overline{\text{Gly}}-\overline{\text{Lys}}-\overline{\text{Val}}-\overline{\text{Thr}}$
Th-16-II	(résidus 97 à 101)	$\overline{\text{Leu}}-\overline{\text{Gly}}-\overline{\text{Arg}}-\overline{\text{Val}}-\overline{\text{Thr}}$
Th-17	(résidus 102 à 110)	$\overline{\text{Ile}}-\overline{\text{Ala}}-\overline{\text{Gln}}-\overline{\text{Gly}}-\overline{\text{Gly}}-\overset{\text{Th}}{\downarrow}\overline{\text{Val}}-\overline{\text{Leu}}-\overline{\text{Pro}}-\overline{\text{Asn}}$
Th-18 (**)	(résidus 111 à 114)	(Ile, Gln, Ala, Val)
Th-19	(résidus 114 à 125)	$\overline{\text{Val}}-\overline{\text{Leu}}-\overline{\text{Leu}}-\overline{\text{Pro}}-\overline{\text{Lys}}-\overline{\text{Lys}}-\overline{\text{Thr}}-\overline{\text{Glu}}-\overline{\text{Ser}}-\overline{\text{His}}-\overline{\text{His}}-\overline{\text{Lys}}$
Th-20	(résidus 126 à 129)	$\overline{\text{Ala}}-\overline{\text{Lys}}-\overline{\text{Gly}}-\overline{\text{Lys}}$

(La séquence des peptides Th-7 et Th-11 est déterminée à partir de leurs peptides dérivés qui sont schématisés par un trait placé en-dessous)

(*) La signification des signes placés au-dessus ou en-dessous des résidus d'acides aminés est présentée dans le tableau VIII. (p. 32)

(**) Ce peptide n'a pas été retrouvé dans l'hydrolysat "thermolysine" de l'ALK-histone.

Ce peptide présente les mêmes caractéristiques que le peptide Th-1 de l'ALK-histone de thymus de Veau : il possède la même séquence. Il recouvre les peptides Tm-1 et Tm-2 et permet de déterminer la séquence des 11 premiers résidus de l'ALK-histone de chloroleucémie du Rat.

Peptide Th-2 (résidus 12 et 13)

Ala - Lys

Le peptide Th-2, élué dans la fraction 9, est purifié par chromatographie sur papier.

Composition :

Ala , Lys
1,00 0,94

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Ala

Le peptide Ala - Lys correspond à la séquence NH₂-terminale du peptide Tm-3.

Peptide Th-3-I (résidus 14 à 22)

Ala - Lys - Ser - Arg - Ser - Ser - Arg - Ala - Gly

Le peptide Th-3-I, élué dans la fraction 24, est purifié par électrophorèse sur papier à pH 3,6.

Composition :

Ser , Gly (*), Ala , Lys , Arg
2,90 1,49 2,00 1,15 1,98
(1)

(*) Le rapport de la glycine est anormalement élevé.

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Ala

Par analogie avec le peptide Ala - Lys - Thr - Arg - Ser - Ser - Arg - Ala - Gly, obtenu après hydrolyse par la thermolysine de l'ALK-histone de thymus de Veau, pendant 45 minutes, le peptide Th-3-I permet d'aligner les peptides Tm-3-I, Tm-4 et Tm-5 dans la séquence de l'ALK-histone I.

Peptide Th-3-II (résidus 14 à 22)

Ala - Lys - Thr - Arg - Ser - Ser - Arg - Ala - Gly

Le peptide Th-3-II, élué dans la fraction 23, est purifié par électrophorèse sur papier à pH 3,6.

Composition :

Thr	, Ser (*)	, Gly	, Ala	, Lys	, Arg
1,55	1,70	1,13	2,00	1,36	1,95
(1)	(2)			(1)	

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Ala

Le peptide homologue au peptide Th-3-II avait été obtenu après hydrolyse par la thermolysine de l'ALK-histone de thymus de Veau, pendant 45 minutes.

Le peptide Th-3-II recouvre les peptides Tm-3-II, Tm-4 et Tm-5 et permet de les placer dans l'ordre : Tm-3-II, Tm-4 et Tm-5, dans la séquence de l'ALK-histone-II.

(*) Une mauvaise séparation de la thréonine et de la sérine explique ce résultat.

Peptide Th-4 (résidus 23 à 26)

Leu - Gln - Phe - Pro

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

Composition :

Glu	, Pro	, Leu	, Phe
1,10	0,92	1,00	0,87

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Leu

Le peptide Th-4 est identique au peptide Tm-5-Th-2 obtenu après hydrolyse du peptide Tm-5 par la thermolysine. Il correspond à la séquence médiane du peptide Tm-5.

Peptide Th-5 (résidus 27 à 29)

Val - Gly - Arg

Le peptide Th-5 est élué dans la fraction 12 avec le peptide Th-16-II. Il en est séparé par chromatographie sur papier.

Composition :

Gly	, Val	, Arg
1,14	1,00	1,06

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Val

Le peptide Th-5 est identique au peptide Tm-5-Th-3 obtenu après hydrolyse du peptide Tm-5 par la thermolysine. Il correspond à la séquence COOH-terminale du peptide Tm-5.

Peptide Th-6 (résidus 30 à 33)

Val - His - Arg - Leu

Le peptide Th-6, élué dans la fraction 20, est purifié par chromatographie sur papier.

Composition :

Val	, Leu	, His	, Arg
1,00	1,18	0,87	1,15

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Val

Le peptide Th-6 permet d'établir la séquence Tm-6 - Tm-7 puisque le peptide Tm-7 est le seul peptide tryptique de la protéine maléylée qui possède la leucine en position NH₂-terminale.

Peptide Th-7 (résidus 34 à 50)

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

Le peptide Th-7, élué dans la fraction 19, est purifié par électrophorèse sur papier à pH 3,6.

Composition :

Asp	, Glu	, Pro	, Gly	, Ala	, Val	, Leu	, Tyr	, Lys	, Arg
1,32	1,27	1,00	3,18	2,56	1,96	1,00	1,78	1,10	2,13
				(3)					

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Leu

Détermination de la séquence COOH-terminale :

L'action de la carboxypeptidase A sur le peptide Th-7 pendant

6 heures libère seulement un résidu de tyrosine. Ce résultat suggère la présence d'un résidu de proline en position antépénultième puisque la proline bloque l'action récurrente de la carboxypeptidase A au niveau de la liaison peptidique où sa fonction carboxylique est engagée.

L'hydrazinolyse sur le peptide résiduel libère un résidu de valine.

La séquence COOH-terminale Val - Tyr du peptide Th-7 est ainsi établie.

L'étude des peptides Th-7-a et Th-7-b qui résultent de l'hydrolyse partielle de la liaison Tyr - Ala a permis de déterminer la séquence du peptide Th-7.

39 40

Peptide Th-7-a (résidus 34 à 39)

Leu - Arg - Lys - Gly - Asn - Tyr

Le peptide Th-7-a est obtenu pur dans la fraction 21.

Composition :

Asp	Gly	Leu	Tyr	Lys	Arg
0,92	1,10	1,00	0,67	1,37	1,40

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Leu

Le peptide Th-7-a correspond à la séquence NH₂-terminale du peptide Th-7. Il recouvre les peptides Tm-7 et Tm-8.

Peptide Th-7-b (résidus 40 à 50)

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

Le peptide Th-7-b, élué dans la fraction 8, est purifié par électrophorèse sur papier à pH 3,6.

Composition :

Glu (*)	, Pro	, Gly (*)	, Ala	, Val	, Tyr	, Arg
1,59	1,00	2,78	3,00	1,77	0,96	1,04
(1)		(2)				

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Ala

Dégradation de Edman :

Sept cycles de dégradation de Edman couplée avec la méthode de dansylation ont permis d'établir la séquence NH₂-terminale Ala - Glu - Arg - Val - Gly - Ala - Gly - Ala.

Ce peptide recouvre la séquence COOH-terminale du peptide Th-7. La séquence COOH-terminale : Val - Tyr du peptide Th-7-b a été déterminée sur le peptide Th-7. La proline est placée par différence.

La séquence NH₂-terminale du peptide Th-7-b correspond à la séquence COOH-terminale Ala - Glu - Arg du peptide Tm-8. Le reste de la séquence du peptide Th-7-b permet de déterminer la séquence NH₂-terminale de la région médiane hydrophobe de la protéine.

Le peptide Th-7 et son dérivé Th-7-b représentent le maillon entre la séquence NH₂-terminale et la séquence médiane hydrophobe de la protéine.

Peptide Th-8 (résidus 51 à 53)

Leu - Ala - Ala

Le peptide Th-8 est élué avec le peptide Th-13 dans la fraction 3. Ils sont séparés par chromatographie sur papier dans le système solvant n-butanol - acide acétique - eau (200 : 30 : 75 ; v/v).

(*) Les rapports molaires de l'acide glutamique et de la glycine sont anormalement élevés. Pour admettre leurs rapports respectifs de 1 et de 2, nous nous sommes référés à la composition du peptide Th-7.

Composition :

Ala , Leu
1,92 1,00

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Leu

La séquence du peptide Th-8 est Leu - Ala - Ala. Le peptide Th-8 se situe au niveau de la région médiane hydrophobe.

Peptide Th-8-a (résidus 51 et 52) ; Peptide Th-14 (résidus 85 et 86)

Leu - Ala

Le peptide Leu - Ala est obtenu pur dans la fraction 4.

Composition :

Ala , Leu
1,01 1,00

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Leu

Le peptide Leu - Ala est obtenu avec un rendement très élevé par rapport au peptide "thermolysine" COOH-terminal Th-20 : Ala - Lys - Gly - Lys. Ce qui indique la présence d'au moins deux séquences Leu - Ala dans la molécule d'ALK-histone. Ces deux séquences ont pu être identifiées dans les positions 51 - 52 et 85 - 86.

Peptide Th-9 (résidus 53 à 57)

Ala - Val - Leu - Glu - Tyr

Le peptide Th-9, élué dans la fraction 6, est purifié par chromatographie sur papier.

Composition :

Glu , Ala , Val , Leu , Tyr
1,12 1,20 0,94 1,00 1,10

L'acide glutamique a été identifié par électrochromatographie sur papier après hydrolyse du peptide Th-9 par l'aminopeptidase M.

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Ala

Dégradation de Edman :

Trois cycles de dégradation de Edman utilisée en couplage avec la méthode de dansylation ont permis d'établir la séquence NH₂-terminale Ala - Val - Leu - Glu de ce peptide. La tyrosine est placée par différence.

Ce peptide qui renferme le troisième résidu de tyrosine, s'insère dans la région médiane hydrophobe.

Peptide Th-10 (résidus 58 à 64)

Leu - Thr - Ala - Glu - Ile - Leu - Glu

Le peptide Th-10, élué dans la fraction 2, est purifié par chromatographie sur papier.

Composition :

Thr , Glu , Ala , Ile , Leu
0,93 2,05 1,06 1,00 1,98

L'acide glutamique a été identifié par électrochromatographie sur papier après hydrolyse du peptide par l'aminopeptidase M.

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Leu

Dégradation de Edman :

Cinq cycles de dégradation de Edman couplée avec la dansylation,

ont permis de déterminer la séquence NH₂-terminale Leu - Thr - Ala - Glu - Ile - Leu de ce peptide. Le second résidu d'acide glutamique est placé par différence.

Ce peptide est localisé dans la région médiane hydrophobe de la protéine.

Peptide Th-11 (résidus 65 à 77)

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

Le peptide Th-11, élué dans la fraction 18, est purifié par électrophorèse sur papier à pH 3,6.

Composition :

Asp	Thr	Gly	Ala	Leu	Lys	Arg
2,96	0,98	1,36	3,00	0,91	2,10	2,09
		(1)				

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Leu

L'étude des peptides Th-11-a et Th-11-b qui résultent de l'hydrolyse partielle de la liaison Lys - Thr a permis de déterminer la séquence du peptide Th-11.

	75	76
--	----	----

Peptide Th-11-a (résidus 65 à 75)

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

Le peptide Th-11-a est obtenu pur dans la fraction 14.

Composition :

Asp	Gly	Ala	Leu	Lys	Arg
2,76	1,41	3,06	1,00	2,25	1,24
	(1)				

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Thr

Le dansyl-thréonine a été identifié après hydrolyse acide du dansyl-peptide pendant 12 heures.

Le peptide Th-11-b représente la séquence COOH-terminale du peptide Th-11.

Peptide Th-12 (résidus 78 à 82)

Ile - Ile - Pro - Arg - His

Le peptide Th-12 est obtenu pur dans la fraction 16.

Composition (après 72 heures d'hydrolyse) :

Pro	Ile	His	Arg
1,00	1,79	0,95	1,00

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Ile

Le dansyl-isoleucine a été identifié après hydrolyse acide du dansyl-peptide pendant 36 heures.

Le peptide Th-12 recouvre le peptide Tm-11 et le peptide Tm-12 qui est le seul peptide trypsique de la protéine maléylée à posséder l'histidine en position NH₂-terminale.

Peptide Th-13 (résidus 83 et 84)

Leu - Gln

Le peptide Th-13 est élué dans la fraction 3 avec le peptide Th-8. Ils ont été séparés par chromatographie sur papier.

Composition :

Glu	Leu
1,16	1,00

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Leu

Le peptide Th-13 recouvre une partie de la séquence du peptide Tm-12.

Peptide Th-15 (résidus 87 à 96)

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

Le peptide Th-15 est obtenu pur dans la fraction 11.

Composition :

Asp	Glu	Ile	Leu	Lys	Arg
3,12	2,15	0,91	2,00	1,09	1,09

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Ile

Peptide Th-15-a (résidus 87 à 95)

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

Le peptide Th-15-a, élué dans la fraction 10, est purifié par électrophorèse sur papier à pH 3,6.

Composition :

Asp	Glu	Ile	Leu	Lys	Arg
2,73	1,77	1,00	0,72	0,94	0,78
(3)	(2)		(1)		(1)

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Ile

Ce peptide résulte de l'hydrolyse partielle de la liaison Lys - Leu .
De ce fait, nous pouvons déduire la position COOH-terminale de la ⁹⁵ leucine ⁹⁶
dans le peptide Th-15.

Les peptides Th-15 et Th-15-a recouvrent les peptides Tm-12 et Tm-13-II.

La présence d'un résidu d'asparagine dans la partie COOH-terminale du peptide Th-15-a a été établie après hydrolyse par l'aminopeptidase M du peptide Leu - Asn - Lys obtenu par une hydrolyse du peptide Th-15-a avec la thermolysine à pH 8,0 et à 40°C pendant 4 heures.

Peptide Th-16-I (résidus 97 à 101)

Leu - Gly - Lys - Val - Thr

Le peptide Th-16-I, élué dans la fraction 7, est purifié par chromatographie sur papier.

Composition :

Thr	, Gly	, Val	, Leu	, Lys
0,97	1,34	1,00	0,80	1,09
(1)				

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Leu

Dégradation de Edman :

Trois cycles de dégradation de Edman couplée avec la dansylation permettent d'établir la séquence NH₂-terminale Leu - Gly - Lys - Val de ce peptide. La thréonine est placée par différence.

Un peptide identique au peptide Th-16-I a été obtenu après hydrolyse de l'ALK-histone de thymus de Veau pendant 45 minutes.

Peptide Th-16-II (résidus 97 à 101)

Leu - Gly - Arg - Val - Thr

Le peptide Th-16-II est élué dans la fraction 12 avec le peptide Th-5. Ils sont séparés par chromatographie sur papier.

Composition :

Thr , Gly , Val , Leu , Arg
0,75 1,13 1,00 0,78 0,90

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Leu

La séquence du peptide Th-16-II a été déduite par analogie avec la séquence du peptide Th-16-I.

Le peptide Th-16-II recouvre la séquence COOH-terminale du peptide Tm-13-II et la séquence NH₂-terminale du peptide Tm-14-II. Il permet de déterminer la séquence Tm-13-II - Tm-14-II qui constitue la séquence des 41 résidus de la partie COOH-terminale de l'ALK-histone-II.

Peptide Th-17 (résidus 102 à 110)

Ile - Ala - Gln - Gly - Gly - Val - Leu - Pro - Asn

Le peptide Th-17, élué dans la fraction 1, est purifié par chromatographie sur papier.

Composition :

Asp , Glu , Pro , Gly , Ala , Val , Ile , Leu
1,09 0,98 0,91 2,30 1,03 0,86 0,88 1,00

L'asparagine et la glutamine ont été identifiées par électrochromatographie sur papier après hydrolyse du peptide Th-17 par l'aminopeptidase M.

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Ile

Dégradation de Edman :

Trois cycles de dégradation de Edman, couplée avec la dansylation, ont permis d'identifier la séquence NH₂-terminale Ile - Ala - Gln - Gly.

Hydrolyse par la thermolysine :

Le peptide Th-17 (2 µmoles) a été hydrolysé par la thermolysine pen-

Le peptide Th-17 permet de déterminer une partie de la séquence de la région hydrophobe qui correspond au peptide Tm-14-II-T-1 (*).

Peptide Th-19 (résidus 114 à 125)

Val - Leu - Leu - Pro - Lys - Lys - Thr - Glu - Ser - His - His - Lys

Le peptide Th-19, élué dans la fraction 22, a été purifié par électrophorèse sur papier à pH 3,6.

Composition :

Thr	Ser	Glu	Pro	Val	Leu	His	Lys
1,00	0,97	1,07	0,85	0,92	2,00	1,72	2,94

Dansylamino-acide NH₂-terminal :

DNS - Val

Dégradation de Edman :

La séquence NH₂-terminale Val - Leu - Leu du peptide Th-19 a été déterminée par trois cycles de dégradation de Edman utilisée en méthode soustractive.

La présence des deux résidus d'histidine est caractéristique du peptide Tm-14-II-T-2 qui recouvre le peptide Th-19 et permet de déduire la séquence COOH-terminale Lys - Thr - Glu - Ser - His - His - Lys.
119 125

Compte-tenu de la spécificité d'action de la TPCK-trypsine sur le peptide Tm-14-II, l'acide aminé qui précède la lysine 119 est nécessairement une lysine. La proline est placée par différence en position 117.

La détermination de la séquence du peptide Th-19 est schématisée ci-après :

(*) En fait, les peptides Th-17 à Th-20 sont issus de l'ALK-histone-I et de l'ALK-histone-II et recouvrent les peptides Tm-13-I (non isolé) et Tm-14-II.

DISCUSSION

Les 48 acides aminés à chaîne latérale hydrophobe que renferme l'ALK-histone (17 alanines, 8 valines, 6 isoleucines, 16 leucines, 1 phénylalanine) constituent autant de sites potentiels de coupure par la thermolysine : 49 peptides devraient donc théoriquement être obtenus. Une courte hydrolyse (45 minutes) de la protéine par la thermolysine nous a permis de limiter l'action de l'enzyme et de restreindre le nombre de peptides. Nous avons obtenu 27 peptides, alors que l'hydrolyse par la thermolysine de l'ALK-histone de Veau pendant 4 heures a libéré 35 peptides (SAUTIERE et al., 1974) et des acides aminés libres (alanine, valine et leucine).

Il existe une similitude entre les deux hydrolysats et sur les 27 peptides que nous avons obtenus, 15 sont identiques aux peptides de l'ALK-histone de thymus de Veau.

Parmi les 11 peptides "thermolysine" de l'ALK-histone de Rat qui n'ont pas leur équivalent dans l'hydrolysat "thermolysine" de 4 heures de l'ALK-histone de Veau, trois peptides résultent du choix d'un temps court d'hydrolyse : les peptides Th-2, Th-3-II et Th-16-I.

Quatre peptides (peptides Th-7, Th-9, Th-11 et Th-15-a) résultent de l'hydrolyse partielle par la thermolysine des liaisons :

Tyr - Ala , Ala - Ala , Lys - Thr et Lys - Leu
 39 40 52 53 75 76 95 96

L'absence de coupure des liaisons $\text{Pro}_{48} - \text{Val}_{49}$ et $\text{Leu}_{85} - \text{Ala}_{86}$ conduit respectivement à l'obtention des peptides Th-7-b et Th-14.

Enfin, deux nouveaux peptides rendent compte des substitutions qui interviennent dans l'ALK-histone de chloroleucémie. Le peptide Th-3-I diffère du peptide Th-3-II par une sérine en position 16. Il est issu, comme le peptide Tm-3-I qu'il recouvre, de l'ALK-histone-I dans laquelle une thréonine est substituée par une sérine. Le peptide Th-16-II diffère du peptide Th-16-I par une arginine. Il est issu, comme les peptides Tm-13-II et Tm-14-II qu'il recouvre, de l'ALK-histone-II dans laquelle la lysine 99 est substituée par une arginine.

Une dernière différence est due au fait que nous n'avons pas réussi à isoler le peptide Th-18 Ile - Gln - Ala - Val qui réagit faiblement à la ninhydrine à cause de la présence d'un résidu d'isoleucine en position NH₂-terminale.

Les différences observées montrent que la spécificité de la thermolysine est relativement large, ce qui rend la comparaison des hydrolysats obtenus par action de la thermolysine plus complexe que celle des hydrolysats trypsiques.

Une hydrolyse courte semble préférable à une hydrolyse de 4 heures pour deux raisons. La première est que nous réduisons de 12 à 5 le nombre des peptides "dérivés". La seconde apparaît dans l'obtention des peptides Th-3 (résidus 14 à 22), Th-16 (résidus 97 à 101), Th-7 (résidus 34 à 50) et Th-11 (résidus 65 à 77). Les peptides Th-3 et Th-16 ont permis à SAUTIERE et al. (1974) de déterminer respectivement une séquence de 18 résidus (résidus 12 à 29) et de trouver le maillon entre le peptide T -19 et la région COOH-terminale hydrophobe de l'ALK-histone de thymus de Veau. Les peptides Th-7 et Th-11 recouvrent respectivement une séquence de 17 et de 13 résidus.

Nos résultats confirment l'inhibition de l'action de la thermolysine par les cinq résidus de proline qui, dans l'ALK-histone, sont engagés dans une liaison peptidique avec la fonction carboxylique d'un acide aminé à chaîne latérale hydrophobe (Phe - Pro , Ala - Pro , Ile - Pro , Leu - Pro ,
Leu - Pro) (SAUTIERE, 1973).
25 26 47 48 79 80 108 109
116 117

Les peptides Th-7, Th-8, Th-9, Th-10 et Th-11 permettent de déterminer la séquence de la région médiane hydrophobe qui correspond au peptide trypsique Tm-9 (non isolé).

Les peptides Th-16, Th-17, Th-19 et Th-20 sont indispensables pour déterminer la séquence du peptide Tm-14-11 qui renferme la seconde région hydrophobe de la protéine.

E - DETERMINATION DE LA SEQUENCE COMPLETE DE LA PROTEINE

Pour déterminer la séquence de l'ALK-histone de chloroleucémie du Rat, les peptides tryptiques de la protéine maléylée sont alignés par comparaison avec la séquence de l'ALK-histone de thymus de Veau. Le tableau XII présente la séquence complète en acides aminés de l'ALK-histone de chloroleucémie du Rat et montre comment les peptides "thermolysine" permettent de vérifier cette séquence par leur recouvrement des peptides tryptiques.

Le peptide Th-1 recouvre les peptides Tm-1 et Tm-2.

Aucun recouvrement de la liaison $\text{Arg} - \text{Ala}$ n'est obtenu puisque celle-ci est hydrolysée par la trypsine et par la thermolysine.

Le peptide Th-3 recouvre les peptides Tm-3, Tm-4 et Tm-5 et permet d'en vérifier la séquence.

La trypsine et la thermolysine hydrolysent la liaison $\text{Arg} - \text{Val}$. Dans l'ALK-histone de Veau, l'ordre des peptides Tm-5 - Tm-6 avait été établi grâce au recouvrement de ces peptides par le peptide chymotrypsique Chm-3 : $\text{Gln} - \text{Phe} - \text{Pro} - \text{Val} - \text{Gly} - \text{Arg} - \text{Val} - \text{His}$.

La séquence Tm-6 - Tm-7 est déterminée par le peptide Th-6 puisque le peptide Tm-7 est le seul peptide tryptique de la protéine maléylée qui possède la leucine en position NH_2 -terminale.

Le peptide Th-7 recouvre les peptides Tm-7, Tm-8 et Tm-9 (non isolé).

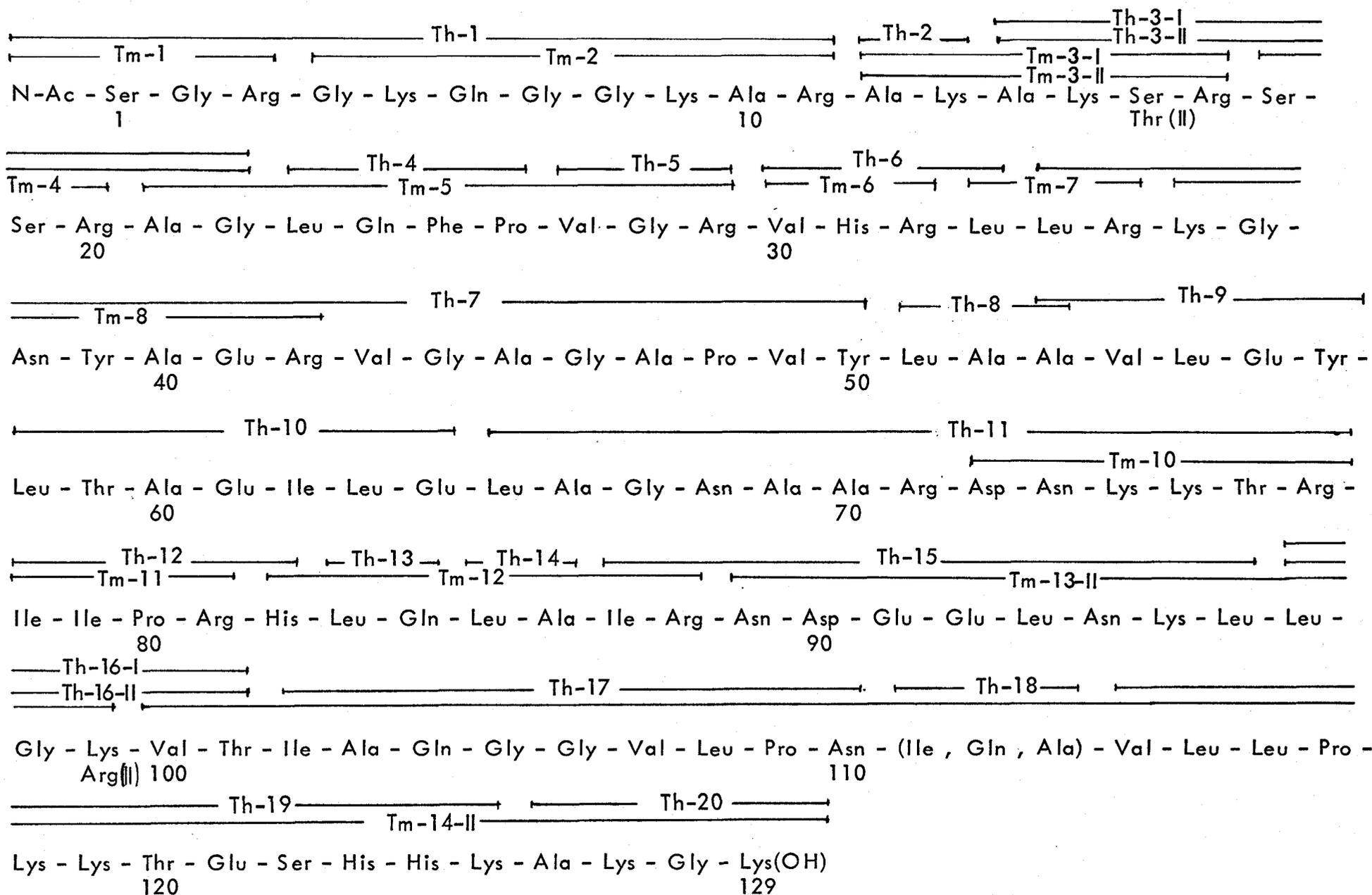
Les peptides Th-7, Th-8, Th-9, Th-10 et Th-11 recouvrent la séquence de la région médiane hydrophobe (résidus 43 à 71). Ces peptides sont alignés par comparaison avec la séquence de l'ALK-histone de thymus de Veau.

Les peptides Th-7 et Th-11 qui recouvrent respectivement les peptides Tm-8 et Tm-10, permettent d'"encaster" cette région dans la séquence de la protéine.

Aucun recouvrement de la liaison $\text{Arg} - \text{Ile}$ n'est obtenu puisque cette liaison est hydrolysée à la fois par la trypsine et par la thermolysine.

TABLEAU XII

SEQUENCE COMPLETE EN ACIDES AMINES DE L'ALK-HISTONE DE CHLOROLEUCEMIE DU RAT



La séquence Tm-11 - Tm-12 est déterminée par le peptide Th-12 puisque le peptide Tm-12 est le seul peptide tryptique de la protéine maléylée qui possède un résidu d'histidine en position NH₂-terminale.

Les peptides Th-15 et Th-16 permettent d'aligner les peptides Tm-12, Tm-13-II et Tm-14-II.

DISCUSSION

Les deux types d'ALK-histone de chloroleucémie du Rat que la chromatographie sur Amberlite IRC-50 nous a permis de séparer, diffèrent de l'histone homologue de thymus de Veau. Dans le type I, un résidu de sérine remplace le résidu de thréonine en position 16 et dans le type II, un résidu d'arginine remplace le résidu de lysine en position 99.

La localisation de ces substitutions a pu être réalisée facilement par simple comparaison des diagrammes d'éluion des peptides tryptiques de l'ALK-histone maléylée de Rat et de Veau, fractionnés par chromatographie d'échange d'ions.

Les deux types d'ALK-histone de chloroleucémie existent approximativement en quantité équivalente.

Des microhétérogénéités limitées ont été également observées dans d'autres types d'histones. Dans l'érythrocyte de Poulet, GREENAWAY et MURRAY (1971) ont identifié deux formes de KAR-histone (*), l'une possédant la glutamine en position 15, l'autre l'arginine en cette même position. Récemment, dans l'embryon de Pois, PATTHY et al. (1973) ont mis en évidence deux formes d'ARE-histone, l'une avec une sérine en position 96, l'autre avec une alanine en cette même position. Des microhétérogénéités importantes apparaissent dans la KAP-histone de thymus de Veau, dont KINKADE et COLE (1966) ont pu séparer quatre formes par chromatographie sur Amberlite IRC-50.

(*) KAR-histone : histone riche en lysine, alanine et arginine ou histone F V.

Des études comparatives, réalisées en électrophorèse en gel de polyacrylamide sur les histones de Vertébrés, ont permis à PANYIM et al. (1971) de mettre en évidence des variations importantes de mobilité électrophorétique des histones très riches en lysine (KAP-histones). La mobilité électrophorétique des histones de type ALK et KSA varie légèrement, tandis que celles de la GRK-histone et de l'ARE-histone ne varient pas, quelle que soit l'espèce. Cette dernière observation traduit la conservation de la structure primaire des histones de type GRK et ARE au cours de l'évolution. Cette conservation a été largement démontrée par l'étude de la structure primaire de ces histones dans plusieurs espèces animales et végétales : GRK-histone de Veau (DE LANGE et al., 1969-a), de Pois (DE LANGE et al., 1969-b), de Porc (SAUTIERE et al., 1970-b), ARE-histone de Veau (DE LANGE et al., 1972), d'érythrocyte de Poulet (BRANDT et al., 1972), de Carpe (HOOPER et al., 1973), de Pois (PATTHY et al., 1973).

A l'opposé, les variations importantes dans la structure primaire des histones de type KAP déterminées par RALL et COLE (1971), se reflètent dans les variations de migration électrophorétique.

En ce qui concerne les histones de type ALK et KSA, la variabilité de séquence suggérée par CHALKLEY se trouve confirmée par nos travaux et par ceux de DIXON. Par comparaison avec la séquence de l'histone homologue de thymus de Veau, la séquence en acides aminés de l'ALK-histone de testicule de Truite déterminée par BAILEY et DIXON (1973) montre quatre substitutions et trois sites de délétion. Les substitutions sont localisées dans la position 6 où une thréonine remplace une glutamine, dans la position 87 où une valine remplace une isoleucine, dans la position 99 où une glycine remplace une lysine et dans la position 128 où une alanine remplace une glycine. Les trois délétions observées sont celle de la tyrosine en position 57, celle de l'isoleucine en position 78 et celle de la séquence Ser - His - His en position 122 à 124. Enfin, il apparaît un résidu de valine supplémentaire en position 125. Dans les 22 premiers résidus de la KSA-histone de Truite, CANDIDO et al. (1972-b) observent une délétion des résidus 9 et 10 et trois substitutions par rapport à la KSA-histone de Veau.

Les substitutions qui interviennent dans la structure primaire de l'ALK-

histone de chloroleucémie du Rat résultent de mutations simples des bases de l'ARN. Le remplacement d'un résidu de thréonine par un résidu de sérine relève d'une mutation sur la première base, $ACU \rightarrow UCU$, ou sur la seconde base $ACU \rightarrow AGU$. D'un autre côté, une mutation du codon AAA en AGA conduit à la substitution d'une lysine par une arginine. Par contre, la substitution d'une thréonine $AC (A/G)$ en glutamine $CA (A/G)$ dans l'ALK-histone de Truite ne résulte pas de la mutation d'une seule base de l'ARN ; elle peut relever, soit d'une inversion $AC (A/G)$ en $CA (A/G)$, soit d'une double mutation $AC (A/G) \rightarrow AA (A/G) \rightarrow CA (A/G)$ ou $AC (A/G) \rightarrow CC (A/G) \rightarrow CA (A/G)$.

Il nous reste à déterminer si les substitutions que nous avons observées dans l'ALK-histone de chloroleucémie sont liées à l'espèce animale ou à la nature cancéreuse du tissu. L'étude de l'ALK-histone de foie de Rat devrait nous fixer sur ce point. Il faut souligner que la GRK-histone isolée de tissus cancéreux : hépatome de Novikoff (WILSON et al., 1970), cellules leucémiques humaines (DESAI et al., 1970), chloroleucémie du Rat (SAUTIERE et al., 1971), ne montre aucune variation de structure primaire par rapport à la GRK-histone de thymus de Veau.

Dans l'ensemble, les histones sont des protéines très peu évolutives par comparaison avec les globines et les cytochromes.

Selon DICKERSON (1969), l'évolution des protéines obéit à des contraintes qui dépendent de la fonction qui leur est assignée. Par exemple, les acides aminés indispensables au fonctionnement des globines et des cytochromes ne varient pas au cours de l'évolution. Il semble que la remarquable conservation de la séquence des histones soit imposée parce que la structure primaire entière est impliquée dans leur fonction biologique : cette fonction doit être essentielle. En effet, comme l'a fait remarquer HNILICA (1972), il n'y a pas de raison pour que les histones aient moins de chance que les autres protéines d'évoluer, mais le seuil de tolérance au delà duquel une inhibition devient létale est ici très étroit.

L'absence de spécificité d'espèce et de tissu, la structure simple et l'incapacité des histones à interagir sélectivement avec l'ADN indique selon HNILICA la nécessité de la présence d'autres facteurs qui modulent l'action

répressive des histones (HNILICA, 1972). Parmi ces facteurs, on compte les protéines non histones de la chromatine et l'ARN chromosomal (ARN-c)(*) . Ces deux facteurs, spécifiques des espèces et des tissus, seraient responsables d'une action spécifique dans le contrôle de l'information génétique (BONNER et al., 1967) (WANG, 1971).

Tous les éléments de la chromatine de nature chimique très différente interagissent et déterminent sa conformation. C'est de ces interactions et de la conformation de la chromatine qui en résulte que dépend la régulation de l'information génétique. Une variation de force ionique, par exemple, affecte les interactions entre les macromolécules nucléaires et modifie à la fois la structure et l'activité de la chromatine (BRASCH et al., 1971) (CHEVALLIER, 1971). D'autre part, le rôle de la conformation est illustré par la différence d'activité de transcription entre l'hétérochromatine et l'euchromatine. Ces deux formes de la chromatine qui renferment le même taux d'histones (FRENSTER et al., 1963) ont des conformations différentes : l'hétérochromatine transcriptionnellement inactive ou réprimée, apparaît sous une forme condensée, tandis que l'euchromatine transcriptionnellement active apparaît sous une forme étendue.

TUAN et BONNER (1969) ont montré que, mise à part l'histone F₁, les histones sont, dans la chromatine, partiellement en configuration d'hélice α . L'ADN qui neutralise les charges de la surface des histones, favorise cette conformation (JIRGENSONS et al., 1965) (WAGNER, 1970).

La confrontation des résultats obtenus par les méthodes physico-chimiques avec les connaissances de la structure primaire des histones sont d'un grand intérêt pour la compréhension des modèles possibles de la conformation de la chromatine. La structure primaire des histones est caractérisée par une asymétrie de la répartition des acides aminés basiques et hydrophobes (Figure 6). Dans les histones riches en arginine et dans la KSA-histone, les

(*) L'ARN-c découvert par HUANG et BONNER (1965) est relativement petit. Il est constitué de 40 à 60 nucléotides (4 S) et est caractérisé par la présence de 5 à 10 p.100 de dihydropyrimidine.

ASYMETRIE DE LA REPARTITION DES ACIDES AMINES DANS LES HISTONES

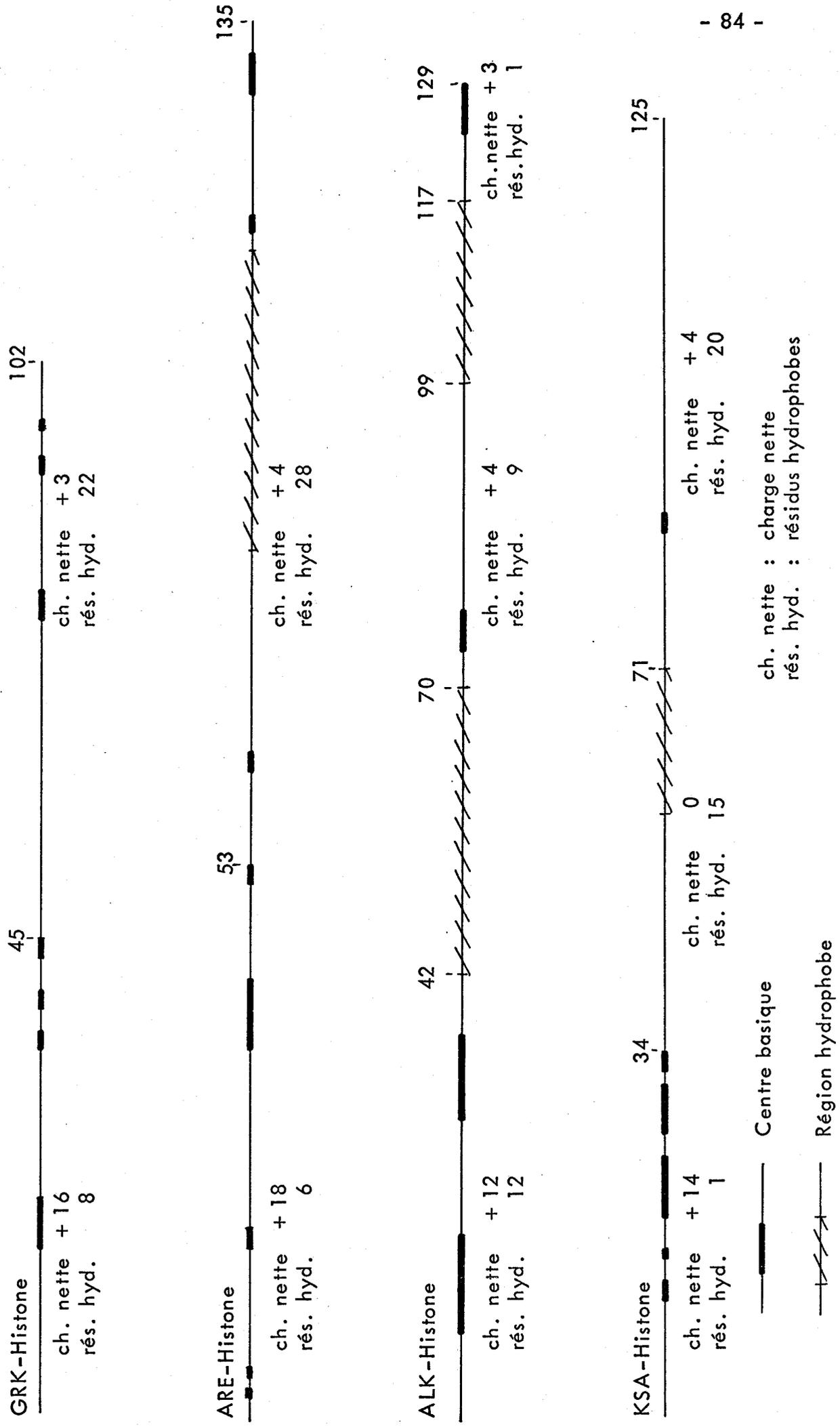


FIGURE 6

centres basiques, localisés surtout dans la région NH_2 -terminale de la chaîne polypeptidique, doivent permettre la fixation de ces protéines sur les groupements phosphate de l'ADN. Les régions riches en résidus hydrophobes favorisent la formation de l'hélice α qui, par des liaisons de type London et Van Der Walls sont le siège d'interactions entre protéines (BOUBLICK et al., 1971).

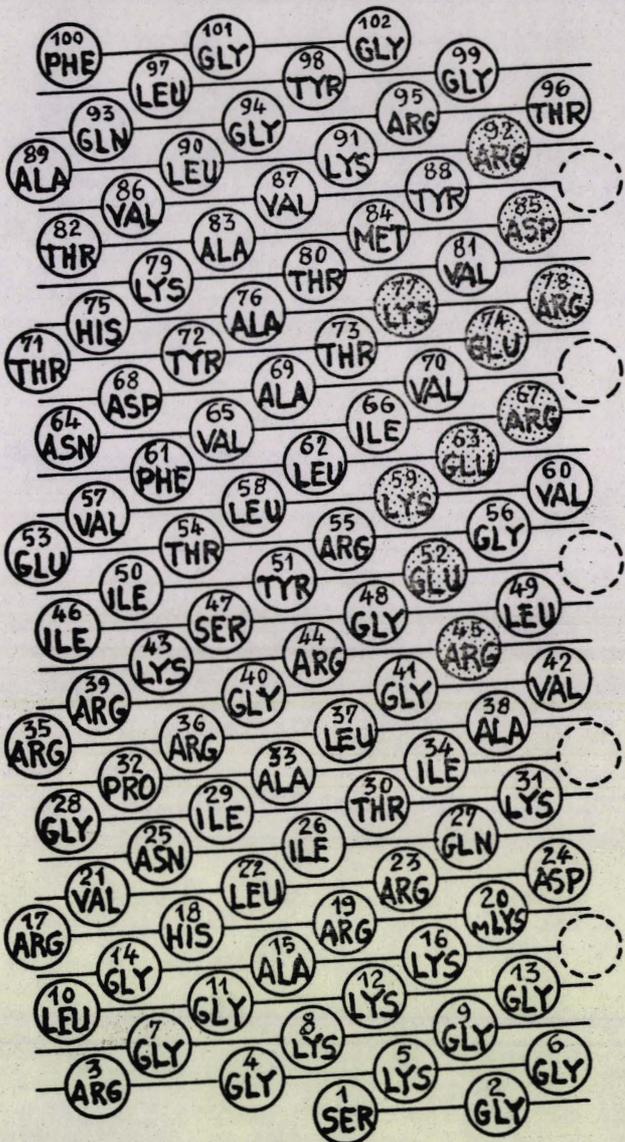
En représentant la molécule de GRK-histone en configuration d'hélice α et en appliquant la règle de PROTHERO (*), BRADBURY et CRANE-ROBINSON (1971) ont pu observer que les séquences 49 à 53, 56 à 65 et 85 à 90 peuvent être effectivement sous la forme hélicoïdale. Dans cette hypothèse de structure secondaire BRADBURY et CRANE-ROBINSON soulignent aussi la présence d'une séquence où alternent des acides aminés acides et basiques : Arg 45, Glu 52, Lys 59, Glu 63, Arg 67, Glu 74, Arg 78, Asp 85, Arg 92. BRADBURY et CRANE-ROBINSON ont réalisé la même étude pour la KSA-histone.

Ces considérations théoriques déduites de la séquence en acides aminés des histones GRK et KSA ont été confirmées par l'étude des spectres de RMN de ces protéines effectuée par BOUBLICK et al. (1970-a) et BOUBLICK et al. (1970-b).

Nous inspirant du travail de BRADBURY, nous avons représenté la molécule d'ALK-histone en configuration d'hélice α (Figure 7). Quatre régions de la séquence de l'ALK-histone présentent une probabilité de structure en hélice α . Il s'agit des séquences 40 à 45, 50 à 70, 91 à 107 et 111 à 115. Ces séquences sont particulièrement riches en résidus hydrophobes (Ala, Val, Leu). La proline en position 48 provoque la rupture d'une hélice qui existerait du résidu 40 au résidu 70 ; il en est de même de la proline en position 109 dans un éventuel segment hélicoïdal du résidu 91 à 115.

Il faut noter que les substitutions qui interviennent dans l'ALK-histone de chloroleucémie du Rat sont de type conservatif et ne modifient

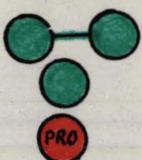
(*) Un segment de cinq résidus dans une chaîne polypeptidique peut prendre la conformation hélicoïdale si trois de ces résidus sont l'alanine, la valine, la leucine ou l'acide glutamique (PROTHERO, 1966).



Surface de la GRK-histone
en configuration hélice α
(BRADBURY)



Surface de l'ALK-histone
en configuration hélice α



Région susceptible de prendre la configuration hélicoïdale.
Acide aminé qui favorise la formation de l'hélice α .
Résidu de proline qui provoque la rupture de l'hélice α .

FIGURE 7

pas la conformation et les propriétés de la molécule.

D'autre part, les histones riches en arginine présentent entre elles des similitudes de séquence (DE LANGE et al., 1971). Il est remarquable que, mise à part la délétion de la glutamine en position 6 dans l'ALK-histone, il existe une identité parfaite de la séquence des neuf premiers résidus de l'ALK-histone et de la GRK-histone. OLSON et al. (1972) observent que cette similitude s'étend jusqu'au résidu de lysine 16 mise à part la substitution de l'arginine 11 par une leucine et la délétion des résidus de glycine 13 et 14. Or, cette séquence correspondrait à un site de fixation de ces histones sur l'ADN (DE LANGE et al., 1969-a) (SUNG et DIXON, 1970). L'importance de ce site ressort des travaux sur l'acétylation des histones.

L'acétylation de la fonction ϵ -aminée des résidus de lysine a été observée pour la première fois par ALLFREY et son groupe (GERSHEY et al., 1968) (VIDALI et al., 1968) et par DE LANGE et al. (1968) dans les histones de thymus de Veau. Ayant observé que l'acétylation des histones réduit leur capacité à inhiber la synthèse de l'ARN in vitro, ALLFREY et al. (1964) ont suggéré que l'acétylation des histones est une condition préalable à l'activation des gènes. Mais, bien que l'acétylation des histones ait été observée dans différents systèmes où les gènes sont activés : dans les lymphocytes après stimulation de la mitose par la phytohémagglutinine (POGO et al., 1966), pendant la régénération du foie de Rat (POGO et al., 1969) et dans les testicules de Truite en spermatogénèse (SUNG et DIXON, 1970), la corrélation entre l'acétylation des histones et la synthèse de l'ARN reste à démontrer. Le blocage par acétylation de la fonction ϵ -aminée des résidus de lysine modifie les interactions histones - ADN : ceci semble confirmé par la condensation de la chromatine des érythrocytes en maturation chez l'Oiseau, tandis que diminuent simultanément l'acétylation des histones et l'activité de transcription (ALLFREY, 1970). De plus, selon CANDIDO et DIXON (1971), la modification des interactions histones - ADN jouerait peut-être un rôle dans l'initiation de la réplication ou de la transcription qui peuvent nécessiter un "démasquage" de portions de l'ADN. Ces auteurs observent que l'acétylation porte sur des acides aminés qui se trouvent dans

la région NH_2 -terminale très basique (résidus 1 à 16 de la GRK-histone) qui correspondrait à un site de fixation de ces protéines sur l'ADN (Tableau XIII).

On peut remarquer que l'acétylation a été observée surtout dans les histones les moins évolutives (GRK et ARE-histones) auxquelles on attribue un rôle essentiel. Toutefois, CANDIDO et al. (1972-a) ont noté une acétylation du résidu de lysine en position 5 de l'ALK-histone de testicule de Truite et des résidus de lysine 5, 10, 13 et 18 de la KSA-histone du même tissu (CANDIDO et al., 1972-b).

Par contre, la substitution de la thréonine en sérine dans l'ALK-histone I de chloroleucémie du Rat introduit un site potentiel de phosphorylation, phosphorylation dont BALHORN et al. (1972) ont montré le rôle dans l'activation de la mitose et l'augmentation de la vitesse de développement des tumeurs.

TABLEAU XIII

ACÉTYLATION DES HISTONES

	GRK	ARE	ALK
Thymus de Veau	Lys 16 (50 %)	Lys 14 et 23	nulle
Embryon de Pois	Lys 16 et 8 (6 %)	nulle	-
Thymus de Porc	Lys 16	-	-
Testicule de Truite	Lys 5, 8, 12 et 16	Lys 14 et 23 + Lys 9 et 18 à un degré plus faible	Lys 5
Testicule de Carpe	-	nulle (*)	-
Erythrocyte de Poulet	-	probablement Lys 14 et 23	-
Chloroleucémie du Rat	Lys 16 (40 %)	-	nulle

(*) L'absence d'acétylation peut être due à l'époque de la pêche, plutôt qu'à une différence d'espèce. (HOOPER et al., 1973)

CONCLUSIONS

Les travaux que nous avons réalisés sur l'ALK-histone de chloroleucémie du Rat ont permis de mettre en évidence les points suivants :

- L'existence de deux types d'ALK-histone dans la chloroleucémie du Rat.
- Une substitution intervient dans chacune des ALK-histones de chloroleucémie du Rat.
- Les substitutions sont de type conservatif (Thr → Ser et Lys → Arg) et ne modifient pas les propriétés physico-chimiques de la protéine. Par conséquent, il ne semble pas que ces substitutions puissent en modifier la fonction.
- L'ALK-histone apparaît plus évolutive que la GRK-histone.
- Comme l'ALK-histone de thymus de Veau, l'ALK-histone de chloroleucémie du Rat n'est pas acétylée.

BIBLIOGRAPHIE

	<u>Pages</u>
ALLFREY, V.G., LITTAU, V.C., et MIRSKY, A.E., (1963) On the role of histones in regulating ribonucleic acid synthesis in the cell nucleus. <u>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.</u> , <u>49</u> , 414-421.	2
ALLFREY, V.G., FAULKNER, R., et MIRSKY, A.E., (1964) Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. <u>Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.</u> , <u>51</u> , 786-794.	87
ALLFREY, V.G., (1970) Changes in chromosomal proteins at times of gene activation. <u>Fed. Proc.</u> , <u>29</u> , 1447-1460.	87
BAILEY, G.S. and DIXON, G.H., (1973) Histone IIb, from rainbow trout. Comparison in aminoacid sequence with calf thymus IIb1. <u>J. Biol. Chem.</u> , <u>248</u> , 5463-5472.	81
BALHORN, R., BALHORN, M., MORRIS, N.P., and CHALKLEY, R., (1972) Comparative high resolution electrophoresis of tumor histones : variation in phosphorylation as a fonction of cell replication rate. <u>Cancer Research</u> , <u>32</u> , 1775-1784.	88
BARR, G.C., and BUTLER, J.A.V., (1963) Histones and gene function. <u>Nature</u> , <u>199</u> , 1170-1172.	2
BILLEN, D., and HNILICA, L.S., (1964) Inhibition of DNA synthesis by histones. in "The Nucleohistones" (J. Bonner and P. Ts'o, eds), Holden Day, San Francisco, California, USA, p. 289-297.	2
BONNER, J., and WIDHOLM, J., (1967) Molecular complementarity between nuclear DNA and organ- specific chromosomal RNA. <u>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</u> , <u>57</u> , 1379-1385.	83

- BOUBLIK, M., BRADBURY, E.M., et CRANE-ROBINSON, C., 85
 (1970-a)
 An investigation of the conformational changes of histones F₁
 and F_{2a} by proton magnetic resonance spectroscopy.
Eur. J. Biochem., 14, 486-497.
- BOUBLIK, M., BRADBURY, E.M., CRANE-ROBINSON, C., 85
 et JOHNS, E.W., (1970-b)
 An investigation of the conformational changes of histone F_{2b}
 by high resolution nuclear magnetic resonance.
Eur. J. Biochem., 17, 151-159.
- BOUBLIK, M., BRADBURY, E.M., CRANE-ROBINSON, C., 85
 and RATTLE, H.W.E., (1971)
 Proton magnetic resonance studies of the interactions of histones
 F₁ and F_{2b} with DNA.
Nature New Biol., 229, 149-150.
- BRADBURY, E.M., et CRANE-ROBINSON, C., (1971) 85
 Physical and conformational studies of histones and nucleohistones,
 in The Histones and Nucleohistones, PHILLIPS, D.M.P., Ed.,
 Plenum Press, London, p. 85-134.
- BRANDT, W.F., et VON HOLT, C., (1972) 5, 81
 The complete amino acid sequence of histone F₃ from chicken
 erythrocytes.
FEBS Letters, 23, 357-360.
- BRASCH, K., SELIGY, V.L., et SETTERFIELD, G., (1971) 83
 Effects of low salt concentrations on structural organisation and
 template activity of chromatin in chicken erythrocyte nuclei.
Exp. Cell Res., 65, 61-72.
- BRATTIN, W.J.Jr., et SMITH, E.L. (1971) 48
 Sequence of bovine liver glutamate dehydrogenase. III - Tryptic
 peptides from the maleylated protein.
J. Biol. Chem., 246, 2400-2418.
- BUTLER, J.A.V., DAVISON, P.F., JAMES, D.W.F., et 2, 25
 SHOOTER, K.V., (1954)
 The histones of calf thymus deoxyribonucleoprotein. I. Prepara-
 tion and homogeneity.
Biochim. Biophys. Acta, 13, 224-232.
- CANDIDO, E.P.M., et DIXON, G.H., (1971) 87
 Sites of in vivo acetylation in trout testis histone IV.
J. Biol. Chem., 246, 3182-3188.

- CANDIDO, E.P.M., et DIXON, G.H., (1972-a) 88
 Acetylation of trout testis histones in vivo. Site of the modification in histone II b 1.
J. Biol. Chem., 247, 3868-3873.
- CANDIDO, E.P.M., et DIXON, G.H., (1972-b) 81, 88
 Amino-terminal sequences and sites of in vivo acetylation of trout testis histones III and IIb₂.
Proc. Natl. Acad. Sci. US., 69, 2015-2019.
- CHAUVEAU, J., MOULE, Y., et ROUILLER, Ch., (1956) 7
 Isolation of pure and unaltered liver nuclei morphology and biochemical composition.
Exp. Cell Research, 11, 317-321.
- CHEVAILLIER, P., (1971) 83
 Problèmes morphologiques liés à l'étude biochimique des différentes fractions de chromatine extraites du noyau du foie de Souris.
Exp. Cell. Res., 67, 466-471.
- CRAMPTON, C.F., MOORE, S., et STEIN, W.H., (1955) 2
 Chromatographic fractionation of calf thymus histone.
J. Biol. Chem., 215, 787-801.
- DE LANGE, R.J., FAMBROUGH, D.M., SMITH, E.L., et BONNER, J., (1968) 87
 Amino acid sequence of histone IV. Presence of ϵ -N-acetyllysine.
Proc. Natl. Acad. Sci. US., 61, 1145-1146.
- DE LANGE, R.J., FAMBROUGH, D.M., SMITH, E.L., and BONNER, J., (1969-a) 3, 27
 81, 87
 Calf and pea histone IV. II. The complete amino acid sequence of calf thymus histone IV : presence of ϵ -N-acetyllysine.
J. Biol. Chem., 244, 319-334.
- DE LANGE, R.J., FAMBROUGH, D.M., SMITH, E.L., et BONNER, J., (1969-b) 5, 81
 Calf and pea histone IV. III. Complete amino acid sequence of pea seedling histone. IV. Comparison with the homologous calf thymus histone.
J. Biol. Chem., 244, 5669-5679.
- DE LANGE, R.J., and SMITH, E.L., (1971) 87
 Histones : Structure and function.
Ann. Rev. Biochem., 40, 279-314.
- DE LANGE, R.J., HOOPER, J.A., et SMITH, E.L., (1972) 3, 81
 Complete amino acid sequence of calf thymus histone III.
Proc. Natl. Acad. Sci. US., 69, 882-884.

- DESAI, L.S., et FOLEY, G.E., (1970) 5, 82
 Homologies of amino acid composition and structure of histone F2a1 isolated from human leukaemic cells.
Biochem. J., 119, 165-170.
- DIKERSON, R.E., et GEIS, I., (1969) 82
 The structure and action of proteins. Harper and Row, New-York.
- FAMBROUGH, D.M., et BONNER, J., (1968) 3
 Sequence homology and role of cysteine in plant and animal arginine-rich histones.
J. Biol. Chem., 243, 4434-4439.
- FRENSTER, J.H., ALLFREY, V.G., et MIRSKY, A.E., (1963) 83
 Repressed and active chromatin isolated from interphase lymphocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 50, 1026-1032.
- GEORGIEV, G.P., (1969) 1
 Histones and the control of gene action.
Ann. Rev. of Genetics, 3, 155-180.
- GERSHEY, E.L., VIDALI, G., et ALLFREY, V.G., (1968) 87
 Chemical studies of histone acetylation. The occurrence of ϵ -N-acetyllysine in the F_{2a1} histone.
J. Biol. Chem., 243, 5018-5022.
- GREENAWAY, R.J., et MURRAY, K., (1971) 80
 Heterogeneity and polymorphism in chicken erythrocyte histone fraction V.
Nature New Biology, 229, 233-238.
- GROS, C., et LABOUESSE, B., (1969) 49
 Study of the dansylation reaction of amino acids, peptides and proteins.
European J. Biochem., 7, 463-470.
- HNILICA, L.S., (1972) 82, 83
 The structure and biological functions of histones.
 C. R. C. Press, 3-168.
- HOOPER, J.A., et SMITH, E.L.; SOMMER, K.R., et CHALKLEY, R., (1973) 5, 81, 89
 Histone III. IV. Amino acid sequence of histone III of the testes of the carp *Letiolus bubalus*.
J. Biol. Chem., 248, 3275-3279.
- HUANG, R.C.C., and BONNER, J., (1962) 2
 Histone, a suppressor of chromosomal RNA synthesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 8, 1216-1222.

- HUANG, R.C.C., and BONNER, J., (1965) 83
 Histone-bound RNA, a component of native nucleohistone.
Proc. Natl. Acad. Sci. US., 54, 960-967.
- IWAI, K., ISHIKAWA, K., and HAYASHI, H., (1970) 3
 Amino acid sequence of slightly lysine-rich histone.
Nature, 226, 1056-1058.
- JIRGENSONS, B., et HNILICA, L.S., (1965) 83
 The conformational changes of calf thymus histone fractions as
 determined by the optical rotatory dispersion.
Biochim. Biophys. Acta, 109, 241-249.
- JOHNS, E.W., PHILLIPS, D.M.P., SIMSON, P., et 2
 BUTLER, J.A.V., (1960)
 Improved fractionation of arginine-rich histones from calf thymus.
Biochem. J., 77, 631-636.
- JOHNS, E.W., et BUTLER, J.A.V., (1962) 2, 8, 9,
 Further fractionations of histones from calf thymus. 10, 12
Biochem. J., 82, 15-18.
- JOHNS, E.W., (1964) 2
 Preparative methods for histone fractions from calf thymus.
Biochem. J., 92, 55-59.
- JOHNS, E.W., (1967) 2, 8, 9,
 A method for the selective extraction of histone fractions 10, 12
 F_{2a1} and F_{2a2} from calf thymus deoxyribonucleoprotein at pH 7.
Biochem. J., 105, 611-614.
- KINKADE, J.M., et COLE, R.R.D., (1966) 3, 80
 The resolution of four lysine-rich histones derived from calf
 thymus.
J. Biol. Chem., 241, 5790-5797.
- LECLERC, J., MARTINAGE, A., MOSCHETTO, Y., et 3
 BISERTE, G., (1969)
 A comparative study of histone fractions F_{2a1} and F_{2a2} .
Eur. J. Biochem., 11, 261-266.
- LUCK, J.M., RASMUSSEN, P.S., SATAKE, K. et 2, 13
 TSVETIKOV, A.N. (1958)
 Further studies on the fractionation of calf thymus histones.
J. Biol. Chem., 233, 1407-1414.
- MURAMATSU, M., SMETANA, K., et BUSCH, H., (1963) 7
 Quantitative aspects of isolation of nucleoli of the Walker
 carcinosarcoma and liver of the rat.
Cancer Research, 23, 510-518.

- OLSON, M.O.J., SUGANO, N.B., YEOMAN, L.C., JOHNSON, B.R., JORDAN, J., TAYLOR, C.W., STARBUCK, W.C., et BUSCH, H., (1972) 87
 Homology of the amino terminal sequences of the AL and GAR calf thymus histones.
Physiol. Chem. and Physics, 4, 10-16.
- PANYIM, S., et CHALKLEY, R., (1969) 17
 High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones.
Arch. Biochem. Biophys., 130, 337-346.
- PANYIM, S., BILEK, D., et CHALKLEY, R., (1971) 5, 81
 An electrophoretic comparison of vertebrate histones.
J. Biol. Chem., 246, 4206-4215.
- PATTHY, L., SMITH, E.L., et JOHNSON, J., (1973) 5, 80, 81
 Histone III. V. The amino acid sequence of pea embryo histone III.
J. Biol. Chem., 248, 6834-6840.
- PHILLIPS, D.M.P., et JOHNS, E.W., (1959) 2
 The chromatography of thymus histones and the demonstration of proteinase activity in the unfractionated preparations.
Biochem. J., 71, 17p.
- PHILLIPS, D.M.P., et JOHNS, E.W., (1965) 2, 8
 A fractionation of the histones of group F_{2a} from calf thymus.
Biochem. J., 94, 127-130.
- POGO, B.G.T., ALLFREY, V.G., et MIRSKY, A.E., (1966) 87
 RNA synthesis and histone acetylation during the course of gene activation in lymphocytes.
Proc. Natl. Acad. Sci. US., 55, 805-812.
- POGO, B.G.T., POGO, A.O., et ALLFREY, V.G., (1969) 87
 Histone acetylation and RNA synthesis in rat liver regeneration.
Genetics, 61, suppl. 1, 373-379.
- PROTHERO, J.W., (1966) 85
 Correlation between the distribution of amino acids and alpha helices.
Biophys. J., 6, 367-370.
- RALL, S.C., et COLE, R.D., (1971) 3, 81
 Amino acid sequence and sequence variability of the amino-terminal regions of lysine-rich histones.
J. Biol. Chem., 246, 7175-7190.
- RASMUSSEN, P.S., MURRAY, K., et LUCK, J.M., (1962) 2
 On the complexity of calf thymus histone.
Biochemistry, 1, 79-89.

- SAUTIERE, P., (1959) 2
Contribution à l'étude des histones des tissus normaux et néoplasiques. Fractionnement chromatographique et électrophorétique, composition en acides aminés.
Thèse Doctorat d'Etat Pharmacie, Lille.
- SAUTIERE, P., MOSCHETTO, Y., DAUTREVAUX, M., et 5, 22
BISETE, G.,
Structural analysis of the glycine-rich, arginine-rich histone from calf thymus : the tryptic peptides.
Eur. J. Biochem., 12, 222-226.
- SAUTIERE, P., BREYNAERT, M.D., MOSCHETTO, Y., 5, 22,
et BISETE, G., (1970-b) 81
Séquence complète des acides aminés de l'histone riche en arginine du thymus de Porc.
C. R. Acad. Sci. Paris, 271, 364-365.
- SAUTIERE, P., TYROU, D., MOSCHETTO, Y., et 5, 22,
BISETE, G., (1971) 82
Structure primaire de l'histone riche en glycine et en arginine isolée de la tumeur de chloroleucémie du Rat.
Biochimie, 53, 479-483.
- SAUTIERE, P., TYROU, D., LAINE, B., MIZON, J., 3, 5
LAMBELIN-BREYNAERT, M.D., RUFFIN, P., et
BISETE, G., (1972)
Structure primaire de l'histone riche en arginine et en lysine du thymus de Veau.
C. R. Acad. Sci. Paris, 274, 1422-1425.
- SAUTIERE, P., (1973) 11, 13,
Détermination de la structure primaire d'histones riches en 15, 21,
arginine. 23, 76.
Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences, Lille.
- SAUTIERE, P., TYROU, D., LAINE, B., MIZON, J., 3, 5, 13,
RUFFIN, P., et BISETE, G., (1974) 75, 76
Covalent structure of the calf thymus ALK-histone.
Eur. J. Biochem. (sous presse).
- SENSHU, T., et IWAI, K., (1970) 3
Fractionation of calf thymus histone by a new method of CM-cellulose chromatography.
The Journal of Biochem., 67, 473-485.
- SLUYSER, M., THUNG, P.J., and EMMELOT, P., (1965) 2
Inhibition of deoxyribonucleic acid synthesis in regenerating rat liver by the administration of histone in vivo.
Biochim. Biophys. Acta, 108, 249-258.

- STARBUCK, W.C., MAURITZEN, C.M., TAYLOR, C.W., SAROJA, I.S., et BUSCH, H., (1968) 3
A large scale procedure for isolation of the glycine-rich, arginine-rich histone and the arginine-rich, lysine-rich histone in a highly purified form.
The J. Biol. Chem., 243, 2038-2047.
- STEDMAN, E., et STEDMAN, E., (1943) 1
Probable function of histone as a regulator of mitosis.
Nature, 152, 556
- STEELE, W.J., et BUSCH, H., (1963) 8
Studies on acidic nuclear proteins of the Walker tumor and liver.
Cancer Research, 23, 1153-1163.
- SUNG, M., et DIXON, G.H., (1970) 87
Modification of histones during spermiogenesis in trout : a molecular mechanism for altering histone binding to DNA.
Proc. Natl. Acad. Sci. US., 67, 1616-1623.
- TUAN, D.Y.H., and BONNER, J., (1969) 83
Optical absorbance and optical rotatory dispersion studies on calf thymus nucleohistone.
J. Mol. Biol., 45, 59-76.
- VIDALI, G., GERSHEY, E.L., et ALLFREY, V.G., (1968) 87
Chemical studies of histone acetylation. The distribution of ϵ -N-acetyllysine in calf thymus histones.
J. Biol. Chem., 243, 6361-6366.
- WAGNER, T.E., (1970) 83
Circular dichroism study of the F_{2a1} histone in the presence of polyvinylphosphate and DNA.
Nature, 227, 65-67.
- WANG, T.Y., (1971) 83
Tissue specificity of nonhistone chromosomal proteins.
Exp. Cell. Res., 69, 217-219.
- WILSON, R.K., STARBUCK, W.C., TAYLOR, C.W., JORDAN, J., and BUSCH, H., (1970) 5, 82
Structure of the glycine-rich, arginine-rich histone of the Novikoff hepatoma.
Cancer Res., 30, 2942-2951.
- WOUTERS-TYROU, D., SAUTIERE, P., et BISERTE, G., (1974) 17
Isolation and characterization of glycine, arginine, and lysine-rich histone and of alanine, leucine and glycine-rich histone from sea-urchin gonad.
Biochim. Biophys. Acta, (in press).

YEOMAN, L.C., OLSON, M.O.J., SUGANO, N.,
JORDAN, J.J., TAYLOR, C.W., STARBUCK, W.C., et
BUSCH, H., (1972)

3

Amino acid sequence of the center of arginine-lysine-rich
histone from calf thymus.

J. Biol. Chem., 247, 6018-6023.



APPENDICE TECHNIQUE

TABLE DES MATIERES DE L'APPENDICE TECHNIQUE

	<u>Pages</u>
I - <u>CONTROLE DE PURETE DES PREPARATIONS D'HISTONES.</u>	
<u>ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE</u>	
<u>A pH 2,7</u>	T 1
A) Préparation des solutions	T 1
B) Préparation des gels	T 1
C) Pré-électrophorèse	T 2
D) Préparation et dépôt des échantillons d'histones	T 2
E) Electrophorèse	T 2
F) Coloration. Décoloration des gels	T 2
II - <u>HYDROLYSE DE L'ALK-HISTONE PAR LA CARBOXY-</u>	
<u>PEPTIDASE B</u>	T 3
III - <u>FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS ENZYMATIQUES</u>	
<u>PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS</u>	T 3
A) Séparation des peptides	T 3
B) Repérage des peptides dans l'éluat	T 4
1) Réaction à la ninhydrine	T 7
a) Réactif concentré à la ninhydrine	T 7
b) Mode opératoire	T 7
2) Réaction de Sakaguchi	T 8
a) Réactifs	T 8
b) Mode opératoire	T 8
C) Evaporation des fractions peptidiques	T 8

IV - ANALYSE ET PURIFICATION DES FRACTIONS

<u>PEPTIDIQUES</u>	T 9
A) Solvants de chromatographie	T 9
1) Solvant butanol-pyridine	T 9
2) Solvant butanol-acide acétique	T 9
B) Tampon d'électrophorèse	T 9
C) Colorations des cartes peptidiques	T 10
1) Coloration à la ninhydrine	T 10
a) Réactif à la ninhydrine-cadmium	T 10
b) Mode opératoire	T 10
2) Coloration à la phénanthrène-quinone	T 10
a) Réactif	T 10
b) Mode opératoire	T 10

V - TECHNIQUES D'ETUDE DE LA SEQUENCE EN ACIDES

<u>AMINES DES PEPTIDES</u>	T 11
A) Composition en acides aminés des peptides	T 11
1) Hydrolyse acide	T 11
2) Hydrolyse par l'aminopeptidase M	T 11
B) Détermination de l'acide aminé en position NH ₂ -terminale	T 12
1) Dansylation d'un peptide	T 12
2) Identification du dansylamino-acide	T 13
C) Dégradation de EDMAN	T 14
D) Détermination de l'acide aminé en position COOH-terminale	T 16
1) Hydrolyse par la carboxypeptidase B	T 16
2) Hydrazinolyse	T 17
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	T 18

I - CONTROLE DE PURETE DES PREPARATIONS D'HISTONES.
ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE A pH 2,7

L'électrophorèse des histones en gel de polyacrylamide est réalisée à pH 2,7 selon la technique de PANYIM et CHALKLEY (1969).

A) Préparation des solutions

<u>Solution A :</u>	Acrylamide	60 g
	Méthylène bisacrylamide	0,4 g
	Eau distillée q.s.p.	100 ml
<u>Solution B :</u>	Acide acétique glacial	43,2 ml
	Temed (*)	4 g
	Eau distillée q.s.p.	100 ml

Ces solutions sont conservées en flacons bruns à + 4°C.

Solution C : préparée extemporanément

Persulfate d'ammonium	0,2 g
Urée 4 <u>M</u>	24 g
Eau distillée q.s.p.	100 ml

B) Préparation des gels (15 p.100 d'acrylamide - urée 2,5 M).

Les gels sont préparés dans des tubes de verre (longueur : 120 mm ; diamètre intérieur : 5 mm), soigneusement dégraissés par un lavage au détergent (Teepol), suivi d'un lavage à l'acide sulfurique chaud.

(*) Temed : Tétraméthyléthylènediamine.

Le mélange suivant est préparé à 0°C et à l'abri de la lumière :

Solution A	2 volumes	6 ml (*)
Solution B	1 volume	3 ml
Solution C	5 volumes	15 ml

1,9 ml de ce mélange est introduit dans chaque tube en évitant la formation de bulles d'air. Une goutte d'eau distillée est déposée dans chaque tube à la surface du mélange. La polymérisation du mélange s'effectue en 60 minutes à la température ambiante. La pellicule d'eau est alors éliminée de la surface du gel à l'aide d'un papier filtre.

C) Pré-électrophorèse

Une pré-électrophorèse est effectuée pendant une nuit dans un appareil Büchler dont la cuve est maintenue à + 10°C. Un courant de 1,5 mA/tube est fourni par une alimentation Shandon type Vokam. L'électrolyte est un tampon acide acétique 0,9 M de pH 2,7.

D) Préparation et dépôt des échantillons d'histones

1 mg d'histone est dissous dans 1 ml d'acide acétique 0,9 M - urée 8 M. La solution est conservée à + 4°C et utilisée 48 heures après pour la migration. 5 à 20 µg de protéine sont déposés.

E) Electrophorèse

La migration électrophorétique est effectuée dans un appareil Büchler dont la cuve est maintenue à + 10°C, sous une intensité de 1,5 mA/tube. La durée de l'électrophorèse est de 4 heures. L'électrolyte est un tampon acide acétique 0,9 M de pH 2,7.

F) Coloration . Décoloration des gels

Les gels sont colorés pendant 30 minutes dans une solution d'Amidoschwarz 10 B à 1 p.100, dans le mélange acide acétique - éthanol - eau (1 : 2 : 7 ; v/v) et décolorés par lavages répétés sous agitation douce

(*) Les quantités sont indiquées pour 12 gels.

avec le mélange acide acétique - éthanol - eau (1 : 2 : 7 ; v/v).

II - HYDROLYSE DE L'ALK-HISTONE PAR LA CARBOXYPEPTIDASE B

7 mg (0,5 μ mole) d'ALK-histone sont dissous dans 0,9 ml de tampon Tris 0,01 M pH 7,8 et hydrolysés à 37°C, sous agitation constante avec 0,01 ml de solution de carboxypeptidase B (rapport enzyme/substrat = 1/20). Des fractions de 0,3 ml sont prélevées après 10 minutes et 30 minutes d'hydrolyse.

Un témoin enzyme (0,9 ml de tampon Tris 0,01 M pH 7,8 et 0,01 ml de solution de carboxypeptidase B) est maintenu à 37°C, sous agitation constante.

Les prélèvements sont recueillis dans 2,5 ml de tampon citrate trisodique 0,2 M pH 2,2 et congelés dans un mélange de neige carbonique et d'acétone pour être ensuite analysés avec l'Analyseur d'acides aminés.

Un second prélèvement de 0,3 ml effectué après 10 minutes d'hydrolyse est acidifié avec 0,1 ml d' HCl N pour être ensuite soumis à l'hydrazinolyse.

III - FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS ENZYMATIQUES PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS (SAUTIERE et al., 1970)

A) Séparation des peptides

Après lyophilisation, l'hydrolysats enzymatique est dissous dans 3 ml d'acide formique à 30 p.100. Le matériel insoluble est éliminé par

centrifugation. Le surnageant est déposé sur une colonne de Chromobeads P (*) (130 x 0,635 cm) thermostatée à 59°C et équilibrée dans un tampon pyridine 0,1 M - acide formique pH 2,9. Un débit constant de 33 ml/heure est obtenu à l'aide d'une pompe Milton-Roy et des fractions de 5,5 ml sont collectées automatiquement. L'éluion des peptides est réalisée dans un premier temps avec un gradient continu de pH croissant - pH 2,9 à pH 5,0 -, et de molarité croissante en pyridine - 0,1 M à 2 M -.

Ce gradient est obtenu avec un appareil Varigrad à 9 cellules cylindriques contenant chacune 200 ml de tampon (Tableau I).

Après le passage du gradient, l'éluion des peptides de caractère basique est poursuivie pendant 24 heures avec un tampon pyridine 2 M - acide acétique pH 5,0.

En modifiant le gonflement des grains de résine, l'accroissement de la molarité en pyridine (de 0,1 M à 2 M) entraîne une augmentation de la pression du tampon sur la colonne de résine et le tassement de cette colonne. Avant de régénérer la résine par la soude 0,2 N, il est donc nécessaire de la replacer en tampon pyridine 0,1 M pH 2,9, pour éviter les fortes pressions dommageables pour la colonne. Il est même recommandé d'enlever la résine de la colonne et de refaire la colonne après chaque fractionnement.

B) Repérage des peptides dans l'éluat

Le repérage des peptides dans l'éluat s'effectue successivement par la réaction à la ninhydrine et la réaction de SAKAGUCHI (arginine) sur des aliquotes de 0,32 ml prélevées automatiquement dans chaque fraction. Une chaîne d'analyse Technicon équipée du manifold approprié à chaque réaction est utilisée pour ce repérage (Figures 1 et 2). Le montage permet l'analyse de 40 échantillons à l'heure. Le temps de prélèvement de chaque échantillon est de 1 minute. Chaque prélèvement d'échantillon est suivi d'un prélèvement d'eau distillée pendant 30 secondes pour le rinçage du

(*) La résine Chromobeads P (Technicon) est une résine cationique type Dowex 50 X 2.

TABLEAU I

Numéro de la cellule	Tampon pyridine - (*) acide formique 0,1 M, pH 2,9	Tampons pyridine - acide formique pH 5,0		Tampon pyridine - acide acétique 2 M, pH 5,0
		0,5 M	1 M	
1	200 ml			
2	150 ml	50 ml		
3	100 ml	100 ml		
4	50 ml	150 ml		
5		200 ml		
6		200 ml		
7		100 ml	100 ml	
8			200 ml	
9				200 ml

(*) La pyridine (RP Prolabo) est purifiée par distillation sur ninhydrine (1 g/litre) et baryte anhydre (10 g/litre).

MANIFOLD NINHYDRINE CONCENTREE

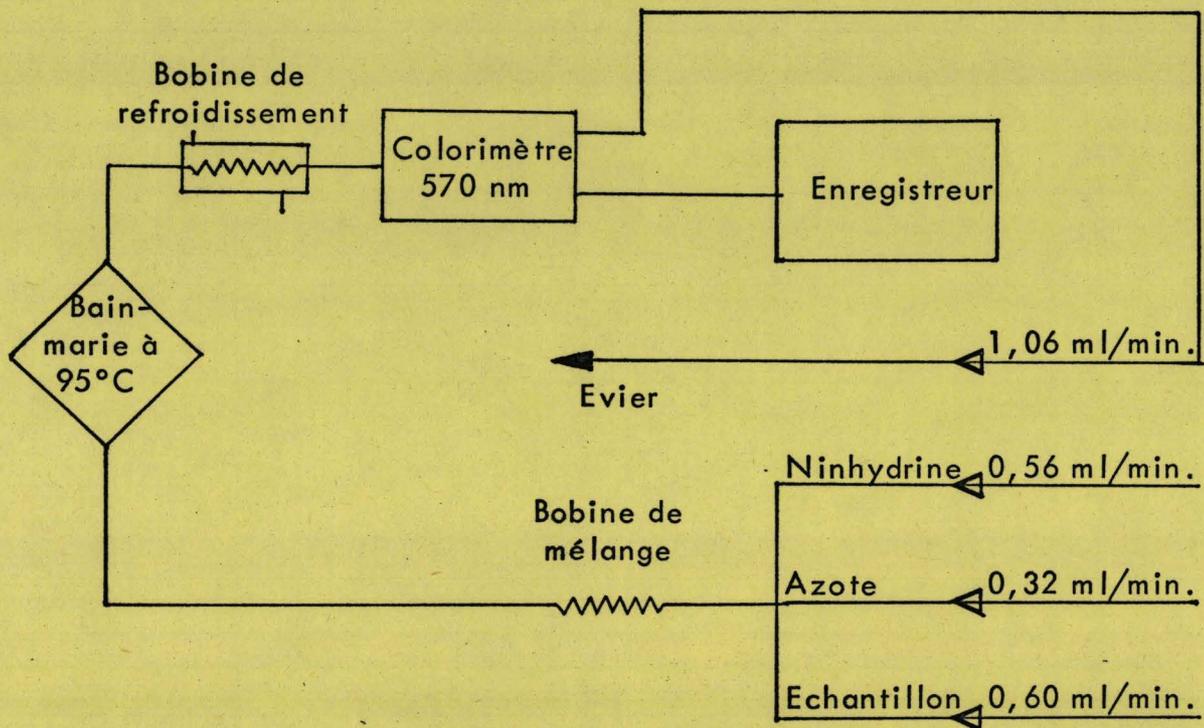


FIGURE 1

MANIFOLD SAKAGUCHI

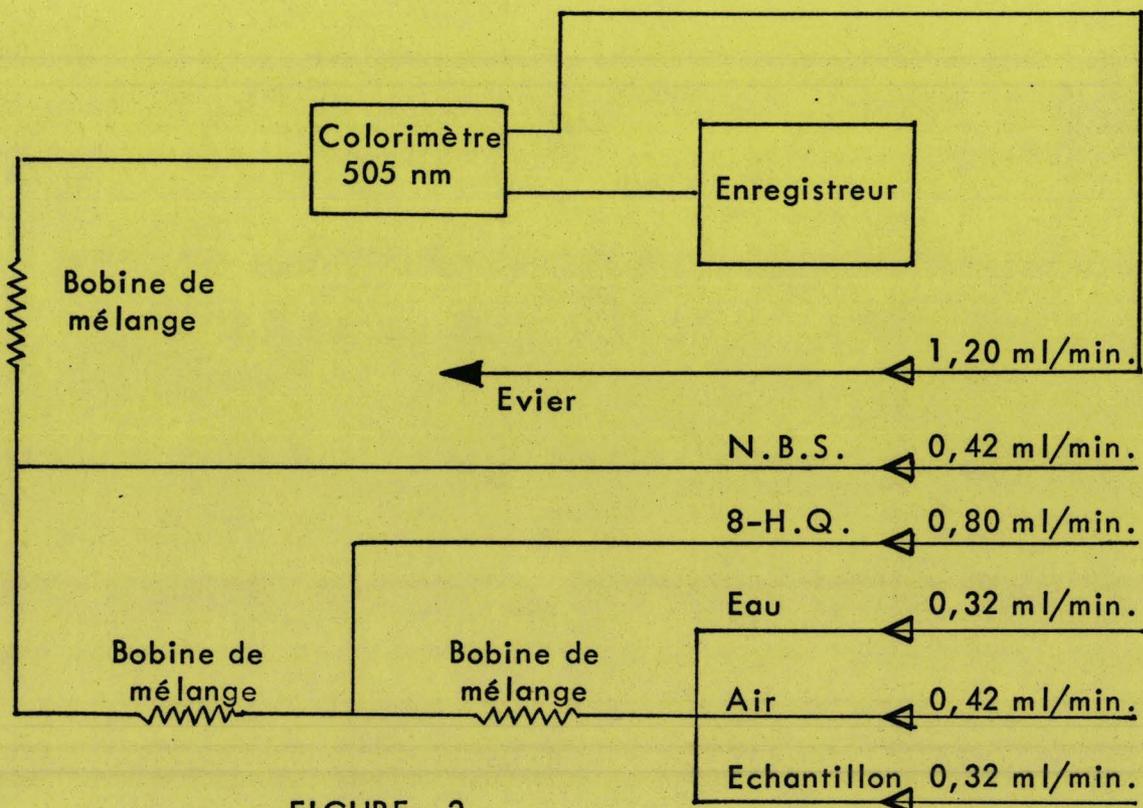


FIGURE 2

circuit d'analyse et pour éviter l'introduction de bulles d'air dans le circuit d'analyse.

1) Réaction à la ninhydrine

a) Réactif concentré à la ninhydrine

Nous avons hydrolysé une quantité de protéine relativement faible (4 μ moles), aussi avons-nous utilisé un réactif concentré à la ninhydrine.

Solution concentrée de ninhydrine	750 ml
Solution diluée de méthylcellosolve	1.000 ml

Le réactif est maintenu sous atmosphère d'azote, dans un flacon opaque.

- 1 - Solution concentrée de ninhydrine

Méthylcellosolve	500 ml
Ninhydrine	15 g
Hydrindantine	1,125 g
Tampon acétate Na 4 M pH 5,51	262,5 ml

Cette solution est préparée et conservée sous atmosphère d'azote dans un flacon opaque.

- 2 - Solution diluée de méthylcellosolve

Méthylcellosolve	1.500 ml
Eau distillée	1.500 ml

Cette solution est préparée et conservée sous atmosphère d'azote, en flacon brun.

b) Mode opératoire

L'échantillon prélevé est mélangé au réactif à la ninhydrine dans une bobine de délai. Le flux liquidien est fractionné par bulles d'azote. La progression du flux est assurée par une pompe péristaltique. Après passage au bain-marie à 95°C et refroidissement, le mélange réactionnel passe dans un colorimètre où sa densité optique est mesurée à 570 nm.

2) Réaction de SAKAGUCHI

La réaction de SAKAGUCHI adaptée à l'Auto-Analyseur Technicon est utilisée pour le repérage des peptides contenant de l'arginine.

a) Réactifs

- 1 - Solution de N-bromosuccinimide (NBS)

N-bromosuccinimide	3 g
Eau distillée q.s.p.	1.000 ml

Cette solution doit être préparée extemporanément et maintenue dans un flacon opaque.

- 2 - Solution de 8-hydroxy-quinoléine (8 H Q)

Solution de 8-hydroxy-quinoléine à 1 p.100 dans le méthanol	20 ml
NaOH 8 N	375 ml
Eau distillée q.s.p.	1.000 ml

b) Mode opératoire

L'échantillon prélevé est dilué au demi avec de l'eau distillée et fractionné par bulles d'air. Il passe dans une bobine de délai, puis il est mélangé avec la solution de 8-hydroxy-quinoléine. Il passe dans une seconde bobine de délai à la sortie de laquelle il est mélangé avec la solution de N-bromosuccinimide. Après passage dans une troisième bobine de délai, le mélange réactionnel passe dans un colorimètre où sa densité optique est mesurée à 505 nm.

c) Evaporation des peptides

Les fractions correspondant à un pic d'éluion sont rassemblées et évaporées à sec à l'aide d'un Rotary Evapomix Buchler équipé d'un piège à neige carbonique. Chaque fraction peptidique est ensuite dissoute dans 2 ml d'acide acétique à 10 p.100 et conservée à - 20°C.

IV - ANALYSE ET PURIFICATION DES FRACTIONS PEPTIDIQUES

L'analyse des fractions peptidiques est effectuée par chromatographie sur papier Whatman 3 MM suivie d'une électrophorèse. Les peptides sont éventuellement purifiés par l'une ou l'autre de ces méthodes en utilisant un papier Whatman 3 MM lavé pendant 48 heures avec de l'acide acétique à 10 p.100.

A) Solvants de chromatographie

1) Solvant butanol - pyridine (chromatographie descendante de 18 heures)

Butanol-1	750 ml
Pyridine	500 ml
Acide acétique	150 ml
Eau désionisée	600 ml

2) Solvant butanol - acide acétique (chromatographie descendante de 24 heures)

Butanol-1	200 ml
Acide acétique	30 ml
Eau désionisée	75 ml

B) Tampon d'électrophorèse

La séparation électrophorétique des peptides est effectuée dans un tampon pyridine - acide acétique de pH 3,6, sous une tension de 2.200 volts, pendant 90 minutes. L'appareil utilisé est un Electrophorator Gilson (modèle D 5.000 volts).

Tampon pH 3,6

Pyridine	10 ml
Acide acétique	100 ml
Eau désionisée	2.890 ml

C) Colorations des cartes peptidiques1) Coloration à la ninhydrinea) Réactif à la ninhydrine-cadmium (LIU et al., 1965)

Ninhydrine	10 g
Acétone	1.000 ml
Acétate de cadmium	1 g
Acide acétique glacial	50 ml
Eau distillée	100 ml

b) Mode opératoire

Après séchage, par simple ventilation sous la hotte, les cartes peptidiques sont placées pendant 1 heure dans une étuve à 100°C. Elles sont ensuite trempées dans le réactif à la ninhydrine - cadmium et placées dans une étuve dont la température est progressivement élevée jusqu'à 60°C. Ce chauffage progressif permet d'obtenir un fond bland.

2) Coloration à la phénanthrène-quinone

Cette coloration est utilisée pour la révélation spécifique sur papier des peptides contenant de l'arginine (YAMADA et al., 1966) (EASLEY et al., 1969) et a l'avantage d'être très stable.

a) Réactif- Solution A

Phénanthrène-quinone	0,02 g
Ethanol	100 ml

- Solution B

NaOH pastilles	10 g
Ethanol à 60 p. 100 q.s.p.	100 ml

Cette solution doit être préparée extemporanément.

Le réactif à la phénanthrène-quinone est préparé en mélangeant des volumes égaux de solutions A et B.

b) Mode opératoire

Après séchage par simple ventilation sous la hotte, les cartes peptidiques sont placées pendant 1 heure dans une étuve à 100°C. Elles sont ensuite trempées dans le réactif à la phénanthrène-quinone et séchées sous la hotte. Après 20 minutes, l'examen des cartes peptidiques sous la lumière ultraviolette à 366 nm fait apparaître les peptides contenant de l'arginine sous forme de taches de fluorescence bleutée sur un fond bleu foncé.

V - TECHNIQUES D'ETUDE DE LA SEQUENCE EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES

A) Composition en acides aminés des peptides

La composition en acides aminés d'un peptide est étudiée après une hydrolyse acide (HCl 5,7 N) et éventuellement après une hydrolyse enzymatique par l'aminopeptidase M pour la détermination de l'asparagine et de la glutamine.

1) Hydrolyse acide

Le peptide (0,2 à 0,5 μ mole) est hydrolysé par 1 ml d'HCl 5,7 N en présence d'une goutte de phénol à 1 p. 100 afin d'éviter la dégradation de la tyrosine. Le tube est purgé à l'azote avant d'être scellé sous vide. L'hydrolyse est effectuée à 110°C pendant 24 ou 72 heures. La composition en acides aminés est déterminée sur un Autoanalyseur d'acides aminés.

2) Hydrolyse par l'aminopeptidase M

Le peptide (0,2 à 0,5 μ mole) est repris dans 0,5 ml de tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M à pH 8,0. Il est hydrolysé par l'aminopeptidase M (*) (0,5 mg par μ mole de peptide) pendant 48 heures à 40°C

(*) Aminopeptidase M (EC 3.4.1.-)(ROHM et HAAS).

en présence d'une goutte de toluène.

L'hydrolyse est arrêtée par 0,1 ml d'acide formique. L'hydrolysat est évaporé, repris par 1 ml d'eau distillée et évaporé de nouveau.

Les acides aminés sont identifiés par électrochromatographie sur papier Whatman 3MM en présence de témoins Asp, Asn, Glu et Gln. En première dimension, une électrophorèse à 2.200 volts pendant 90 minutes dans le tampon pH 1,9 (acide formique 98 p.100 - acide acétique - eau distillée ; 25 : 87 : q.s.p. 1 litre) permet d'étaler la zone de migration des acides aminés neutres et acides. En deuxième dimension, on effectue une chromatographie descendante pendant 24 heures dans le solvant butanol - acide acétique.

L'électrochromatogramme est révélé avec le réactif à la ninhydrine-cadmium.

B) Détermination de l'acide aminé en position NH₂-terminale.

1) Dansylation d'un peptide (HARTLEY, 1970)

a) Réactif :

DNS-Cl (1-diméthylamino-naphtalène-5-sulfonyl) en solution dans l'acétone anhydre (2,5 mg/ml). Cette solution est préparée chaque mois et conservée à - 20°C et à l'abri de la lumière.

b) Protocole :

Le peptide (10 - 20 nmoles) est prélevé et placé dans un tube (75 x 5 mm). Après évaporation à sec sous vide, en présence de soude en pastilles et d'anhydride phosphorique, le pH est amené à 8,5, pH nécessaire à la réaction de dansylation. Ceci est réalisé par les opérations suivantes : addition de 10 µl de bicarbonate de sodium 0,2 M ; évaporation à sec ; reprise par 10 µl d'eau distillée. Au besoin, ces opérations sont répétées jusqu'à l'obtention du pH désiré (vérification avec le papier indicateur Merck)

10 µl de la solution de DNS-Cl sont ajoutés et le tube est alors bouché, recouvert d'une feuille d'aluminium et laissé une heure à 37°C ou 3 heures à température ambiante. Le mélange réactionnel est évaporé à sec

sous vide. Le peptide est hydrolysé avec 0,05 ml d'HCl 5,7 N pendant 18 heures à 105°C. L'hydrolysate est évaporé à sec sous vide dans un dessiccateur en présence de soude en pastilles.

2) Identification du dansylamino-acide

L'hydrolysate évaporé à sec est repris par 10 µl de solution aqueuse de pyridine à 50 p. 100 (v/v). Nous utilisons des DNS-amino-acides témoins en solution aqueuse de pyridine à 50 p. 100 (v/v).

a) Plaques de couche mince de gel de silice

28 g de gel de silice (Kieselguhr G Merck) sont mis en suspension dans 60 ml d'un mélange eau distillée - éthanol absolu (55 : 5 ; v/v). La suspension est étalée sur 5 plaques de verre (20 x 20 cm) en une couche uniforme de 0,25 mm d'épaisseur. Les plaques sont séchées à température ambiante. Avant le dépôt des DNS-amino-acides, les plaques sont tracées et activées à 110°C pendant 1 heure.

b) Chromatographie mono-dimensionnelle

Les échantillons à étudier et les témoins dansylamino-acides sont déposés dans des couloirs de 1 cm de large tracés perpendiculairement au sens d'étalement du gel (STEHÉLIN et al., 1969). Cette méthode permet l'analyse simultanée de plusieurs échantillons sur une même plaque. Elle permet aussi une identification précise des échantillons grâce à l'utilisation de témoins latéraux.

Après 30 minutes de saturation, une chromatographie ascendante est réalisée dans le système solvant benzène - pyridine - acide acétique (16 : 4 : 1 ; v/v) pendant 90 minutes (DEYL et al., 1965).

S'il est nécessaire de séparer Val, Leu et Ile, la plaque est réactivée 10 minutes à 110°C, tournée de 180°, mise en saturation 30 minutes et soumise à une seconde migration dans le système solvant chloroforme - tertio-butanol - acide acétique (60 : 40 : 0,2 ; v/v) qui sépare ces dérivés dans l'ordre : Ile, Val, Leu, en 45 minutes.

L'arginine qui reste au point de dépôt dans le système benzène - pyridine - acide acétique, migre dans le système toluène - 2-chloroéthanol - ammoniacque - eau (30 : 50 : 2 : 2 ; v/v) utilisé dans la même direction.

c) Chromatographie bidimensionnelle

Les systèmes solvants préconisés par GROS et LABOUESSE (1969) ont été utilisés.

Première dimension : saturation 30 minutes, migration 90 minutes.
Solvant : benzène - pyridine - acide acétique (16 : 4 : 1 ; v/v).

Deuxième dimension : saturation 30 minutes, migration 120 minutes.
La plaque est préalablement réactivée à 100°C, pendant 10 minutes.
Solvant : toluène - monochloroéthanol - ammoniacque concentrée (6 : 10 : 4 ; v/v). Le sens de migration est perpendiculaire à celui de la première migration.

C) Dégradation de EDMAN (protocole de HARTLEY, 1970)

La dégradation récurrente de Edman libère l'acide aminé en position NH_2 -terminale d'un peptide sous forme de anilino-thiazolinone qui est ensuite cyclisée en phényl-thio-hydantoïne (PTH) et un peptide résiduel. L'analyse de l'un ou l'autre des produits libérés permet trois utilisations différentes de cette technique.

= Etude du peptide résiduel :

- Identification de l'acide aminé en position NH_2 -terminale par dansylation.

- Détermination de la composition en acides aminés : c'est la méthode soustractive.

= Identification des PTH amino-acides :

afin de déterminer les positions respectives de l'acide aspartique et de l'asparagine dans un peptide qui contient les deux à la fois.

a) Réactifs

Phénylthiocyanate (PITC) (Fluka purissimum p. a.) .

Pyridine (Prolabo RP) distillée sur ninhydrine (1 g/l) et sur baryte anhydre (10 g/l).

Acide trifluoroacétique (TFA) (Fluka purissimum p. a.).

Acétate de n-butyle (Merck p. a.).

b) Mode opératoire

100 à 500 nanomoles de peptide en solution dans l'acide acétique à 10 p. 100 sont placées dans un tube Kimax et évaporées à sec à l'aide d'un Rotary EvapoMix Buchler. Le résidu sec est dissous dans 150 μ l d'eau distillée. On ajoute 150 μ l d'une solution de PITC (*) à 5 p. 100 (p/v) dans la pyridine. La réaction de couplage est effectuée sous atmosphère d'azote à 45°C pendant 90 minutes. Le mélange est évaporé à sec à 60°C pendant 30 minutes, sous vide poussé (1 mm Hg) en présence d'acide sulfurique, de soude en pastilles et d'anhydride phosphorique. Le résidu sec est dissous dans 200 μ l de TFA et la cyclisation et la coupure sont réalisées sous atmosphère d'azote à 45°C pendant 30 minutes. Le TFA est ensuite chassé sous un jet d'azote. Le tube est alors placé à 60°C pendant 10 minutes sous vide poussé (1 mm Hg), en présence de soude en pastilles. Le résidu sec est dissous dans 200 μ l d'eau distillée. La thiazolinone est extraite avec deux fois 1,5 ml d'acétate de butyle saturé d'eau. La phase aqueuse est évaporée, reprise par de l'eau distillée et avant d'effectuer un nouveau cycle de dégradation, une fraction est prélevée en vue de l'étude du peptide résiduel.

c) Identification des PTH-amino-acides

L'extrait acétate de butyle est évaporé à sec. Le résidu sec est repris par 200 μ l d'HCl 1 N et porté à 80°C pendant 10 minutes : la thiazolinone est convertie en PTH-amino-acides par ce traitement. Après évaporation de l'HCl, le PTH-amino-acides est dissous dans du méthylcellosolve pour

(*) Cette solution est préparée extemporanément en mélangeant 50 μ l de PITC et 1 ml de pyridine.

être identifié par chromatographie ascendante sur couche mince de gel de silice dans le système solvant E de EDMAN et SJÖQUIST (1956). Le PTH-amino-acide est déposé entre des témoins.

Système solvant E

Acétate de butyle	97 ml
Eau distillée	3 ml

Laisser sous agitation une nuit ; laisser décanter et filtrer la phase supérieure sur un papier filtre.

Ajouter : 4 ml de formamide (Fluka)

3 ml d'acide propionique (redistillé à reflux pendant

Mélanger pendant 2 heures. Ne pas saturer la plaque avant la chromatographie. Migration : 45 minutes.

Les PTH-amino-acides apparaissent en bleu foncé sur la fluorescence verte de la plaque imprégnée d'un indicateur de fluorescence (plaques Kieselgel F 254 - Merck).

D) Détermination de l'acide aminé en position COOH-terminale

1) Hydrolyse par les carboxypeptidases A et B (*)

a) Préparation de la solution carboxypeptidase A

La solution de carboxypeptidase A est préparée en lavant 0,1 ml de la suspension d'enzyme cristallisé 4 fois avec 2 ml d'eau distillée glacée. L'enzyme est alors dissous dans 1 ml d'une solution de LiCl à 10 p. 100 dans le tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M pH 8,0 : la concentration d'enzyme est approximativement 2,5 mg/ml.

b) Hydrolyse et identification des acides aminés libérés

0,25 à 1. μ mole de peptide est dissoute dans 0,5 ml de tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M pH 8,0 et hydrolysée à 40°C par les carboxypeptidases A ou B ou par le mélange des deux enzymes, pendant des temps généralement compris entre 0 et 6 heures.

 (*) Rapport Enzyme/Substrat = 0,25 mg/ μ mole.

L'arrêt de l'hydrolyse est obtenu par acidification de l'hydrolysate avec 0,1 ml d'acide formique. L'hydrolysate est alors lyophilisé. Les acides aminés libérés sont identifiés avec l'Analyseur d'acides aminés.

2) Hydrazinolyse

L'hydrazinolyse a été utilisée soit seule, soit après hydrolyse des peptides ou de l'ALK-histone par la carboxypeptidase B.

Réactifs :

Hydrazine anhydre (97 p.100, Matheson)

Benzaldéhyde

Ether privé de peroxyde et saturé d'eau

Mode opératoire :

200 à 500 nanomoles de peptide sont prélevées dans un tube Kimax (100 x 10 mm) et sont lyophilisées. Le peptide est repris cinq fois par 0,5 ml d'HCl 0,1 N pour éliminer toute trace d'acide acétique. On évapore de nouveau et le résidu sec est placé 48 heures dans un dessiccateur sous vide en présence d'anhydride phosphorique et de soude en pastilles. 0,5 ml d'hydrazine anhydre sont ajoutés et le tube de réaction est introduit dans un tube de verre pyrex qui est ensuite scellé. L'hydrazinolyse est effectuée pendant 16 heures à 80°C.

Le mélange réactionnel est évaporé sous vide en présence d'acide sulfurique concentré et d'anhydride phosphorique. Le résidu sec est repris par 1 ml d'eau distillée, évaporé à sec et repris de nouveau par 1 ml d'eau distillée. La solution est extraite trois fois avec 1 ml de benzaldéhyde et deux fois avec 1 ml d'éther. (méthode de NIU et FRAENKEL-CONRAT, 1955). La phase aqueuse est séparée de la phase organique par centrifugation. Après la dernière extraction, la phase aqueuse est évaporée à sec.

L'acide aminé libéré est identifié sur Autoanalyseur d'acides aminés.

BIBLIOGRAPHIEDE L'APPENDICE TECHNIQUE

	<u>Pages</u>
EASLEY C.W., ZEGERS B.J.M. et DE VIJLDER M. (1969) Application of specialized techniques for specific staining of peptide maps on various media. <u>Biochim. Biophys. Acta</u> , <u>175</u> , 211-213.	T-10
EDMAN P. et SJÖQUIST J. (1956) Identification and semi-quantitative determination of phenyl thiohydantoins. <u>Acta Chem. Scand.</u> , <u>10</u> , 1507-1509.	T-16
DEYL Z. et ROSMUS J. (1965) Thin layer chromatography of dansyl amino acid derivatives. <u>J. Chromatog.</u> , <u>20</u> , 514-520.	T-13
GROS C. et LABOUESSE B. (1969) Study of the dansylation reaction of amino acids, peptides and proteins. <u>Eur. J. Biochem.</u> , <u>7</u> , 463-470.	T-14
HARTLEY B.S. (1970) Strategy and tactics in protein chemistry. <u>Biochem. J.</u> , <u>119</u> , 805-822.	T-12 et T-14
LIU T.Y., STEIN W.H., MOORE S. et ELLIOTT S.D. (1965) The sequence of amino acid residues around the sulfhydryl group at the active site of streptococcal proteinase. <u>J. Biol. Chem.</u> , <u>240</u> , 1143-1149.	T-10
NIU C.I. et FRAENKEL-CONRAT H. (1955) Determination of C-terminal amino acids and peptides by hydrazinolysis. <u>J. Am. Chem. Soc.</u> , <u>77</u> , 5882-5885.	T-17

- PANYIM S. et CHALKLEY R. (1969) T-1
High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones.
Arch. Biochem. Biophys., 130, 337-346.
- SAUTIERE P., BREYNAERT M.D., MOSCHETTO Y. et T-3
BISERTE G. (1970)
Séquence complète des acides aminés de l'histone riche en
glycine et en arginine du thymus de Porc.
C. R. Acad. Sci. Paris, 271, 364-365.
- STEHÉLIN D. et DURANTON H. (1969) T-13
Dérivés dansylés des acides aminés. Chromatographie mono-
dimensionnelle et simultanée de plusieurs échantillons sur
une même couche mince.
J. Chromatog., 43, 93-102.
- YAMADA S. et ITANO H.A. (1966) T-10
Phenanthrene quinone as an analytical reagent for arginine
and other monosubstituted guanidines.
Biochim. Biophys. Acta, 130, 538-540.

