

50376  
1976  
68

50376  
1976  
68

Numéro d'ordre :

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

## MÉMOIRE

présenté à l'Université de Lille I  
pour obtenir le titre de  
DOCTEUR DE 3<sup>ème</sup> CYCLE EN BIOCHIMIE  
par

**Daniel KMIECIK**

# CONTRIBUTION A LA DÉTERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> D'ERYTHROCYTE DE POULET

(Etude des Peptides Trypsiques  
de la Protéine native et Maleylee)



Membres du Jury : MM. J. MONTREUIL, Président

G. BISERTE

J. KREMBEL

P. SAUTIERE

M<sup>lle</sup> M. CHAMPAGNE, Rapporteur

Présenté le 8 Juillet 1976

DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

M. R. DEFRETIN, H. LEFEBVRE, M. PARREAU.

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

M. ARNOULT, Mme BEAUJEU, MM. BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DEHEUVELS,  
DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET,  
KOUGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, MM. LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE,  
MAZET, MICHEL, NORMANT, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUBINE, ROUELLE, SAVART, WATERLOT, WIEMAN,  
ZAMANSKI.

PRESIDENTS HONORAIRES DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. R. DEFRETIN, M. PARREAU.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE  
DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M. J. LOMBARD.

PROFESSEURS TITULAIRES

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean-Pierre	Chimie Physique
M. BECART Maurice	Physique Atomique et Moléculaire
M. BILLARD Jean	Physique du Solide
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BONNEMAN Pierre	Chimie Appliquée
M. BONNOT Ernest	Biologie Végétale
M. BONTE Antoine	Géologie Appliquée
M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. CÉLET Paul	Géologie Générale
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. DECUYPER Marcel	Géométrie
M. DELATTRE Charles	Géologie Générale
M. DELHAYE Michel	Chimie Physique
M. DERCOURT Michel	Géologie Générale
M. DURCHON Maurice	Biologie Expérimentale
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. GLACET Charles	Chimie Organique
M. GONTIER Gérard	Mécanique
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HEUBEL Joseph	Chimie Minérale
M. LABLACHE-COMBIER Alain	Chimie Organique
M. LANSRAUX Guy	Physique Atomique et Moléculaire
M. LAVEINE Jean-Pierre	Paléontologie
M. LEBRUN André	Electronique
M. LEHMANN Daniel	Géométrie



Mme	LENOBLE Jacqueline	Physique Atomique et Moléculaire
M.	LINDER Robert	Biologie et Physiologie Végétales
M.	LOMBARD Jacques	Sociologie
M.	LOUCHEUX Claude	Chimie Physique
M.	LUCQUIN Michel	Chimie Physique
M.	MAILLET Pierre	Sciences Economiques
M.	MONTARIOL Frédéric	Chimie Appliquée
M.	MONTREUIL Jean	Biochimie
M.	PARREAU Michel	Analyse
M.	POUZET Pierre	Analyse Numérique
M.	PROUVOST Jean	Minéralogie
M.	SALMER Georges	Electronique
M.	SCHILTZ René	Physique Atomique et Moléculaire
Mme	SCHWARTZ Marie-Hélène	Géométrie
M.	SEGUIER Guy	Electrotechnique
M.	TILLIEU Jacques	Physique Théorique
M.	TRIDOT Gabriel	Chimie Appliquée
M.	VIDAL Pierre	Automatique
M.	VIVIER Emile	Biologie Cellulaire
M.	WERTHEIMER Raymond	Physique Atomique et Moléculaire
M.	ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

M.	BELLET Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BODARD Marcel	Biologie Végétale
M.	BOILLET Pierre	Physique Atomique et Moléculaire
M.	BOILLY Bénoni	Biologie Animale
M.	BRIDOUX Michel	Chimie Physique
M.	CAPURON Alfred	Biologie Animale
M.	CORTOIS Jean	Physique Nucléaire et Corpusculaire
M.	DEBOURSE Jean-Pierre	Gestion des entreprises
M.	DEPREZ Gilbert	Physique Théorique
M.	DEVRAINNE Pierre	Chimie Minérale
M.	GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M.	GUILBAULT Pierre	Physiologie Animale
M.	LACOSTE Louis	Biologie Végétale
Mme	LEHMANN Josiane	Analyse
M.	LENTACKER Firmin	Géographie
M.	LOUAGE Francis	Electronique
Mlle	MARQUET Simone	Probabilités
M.	MIGEON Michel	Chimie Physique
M.	MONTEL Marc	Physique du Solide
M.	PANET Marius	Electrotechnique
M.	RACZY Ladislas	Electronique
M.	ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie Animale
M.	SLIWA Henri	Chimie Organique

MAITRES DE CONFERENCES (et chargés d'Enseignement)

M.	ADAM Michel	Sciences Economiques
M.	ANTOINE Philippe	Analyse
M.	BART André	Biologie Animale
M.	BEGUIN Paul	Mécanique
M.	BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M.	BONNELLE Jean-Pierre	Chimie
M.	BONNEMAIN Jean-Louis	Biologie Végétale
M.	BOSCQ Denis	Probabilités
M.	BREZINSKI Claude	Analyse Numérique
M.	BRUYELLE Pierre	Géographie

M. CARREZ Christian	Informatique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. COQUERY Jean-Marie	Psycho-Physiologie
M <sup>lle</sup> DACHARRY Monique	Géographie
M. DEBENEST Jean	Sciences Economiques
M. DEBRABANT Pierre	Géologie Appliquée
M. DE PARIS Jean-Claude	Mathématiques
M. DHAINAUT André	Biologie Animale
M. DELAUNAY Jean-Claude	Sciences Economiques
M. DERIEUX Jean-Claude	Microbiologie
M. DOUKHAN Jean-Claude	Physique du Solide
M. DUBOIS Henri	Physique
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du Solide
M <sup>e</sup> EVRARD Micheline	Chimie Appliquée
M. FONTAINE Jacques-Marie	Electronique
M. FOURNET Bernard	Biochimie
M. FORELICH Daniel	Chimie Physique
M. GAMBLIN André	Géographie
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M. GUILLAUME Henri	Sciences Economiques
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M. JOURNAL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
M <sup>lle</sup> KOSMAN Yvette	Géométrie
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
M <sup>lle</sup> LEGRAND Denise	Algèbre
M <sup>lle</sup> LEGRAND Solange	Algèbre
M. LEROY Jean-Marie	Chimie Appliquée
M. LEROY Yves	Electronique
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique Théorique
M. LOUCHET Pierre	Sciences de l'Education
M. MACKE Bruno	Physique
M. MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
M <sup>e</sup> N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MALAUSSENA Jean-Louis	Sciences Economiques
M. MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M. MONTUELLE Bernard	Biologie Appliquée
M. NICOLE Jacques	Chimie Appliquée
M. PAQUET Jacques	Géologie Générale
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PECQUE Marcel	Chimie Physique
M. PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M. PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M. POVY Lucien	Automatique
M. RICHARD Alain	Biologie
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psycho-Physiologie
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SOMME Jean	Géographie
M <sup>lle</sup> SPIK Geneviève	Biochimie
M. STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M. STEEN Jean-Pierre	Informatique

M. THERY Pierre  
M. TOULOTTE Jean-Marc  
M. TREANTON Jean-René  
M. VANDORPE Bernard  
M. VILLETTE Michel  
M. WALLART Francis  
M. WERNIER Georges  
M. WATERLOT Michel  
Mme ZINN-JUSTIN Nicole

Electronique  
Automatique  
Sociologie  
Chimie Minérale  
Mécanique  
Chimie  
Informatique  
Géologie Générale  
Algèbre

Ce travail a été réalisé dans l'équipe de recherches de Monsieur Pierre SAUTIERE, sous la direction de Monsieur Pierre SAUTIERE, Maître de Recherches au CNRS, dans les laboratoires de l'Unité de Recherches Ultrastructurales et Biochimiques sur la Cellule Normale et Cancéreuse (U 124 INSERM) et de l'Institut de Recherches sur le Cancer de Lille (Directeur : Professeur Gérard BISERTE).

A mes parents.

Ainsi qu'à tous ceux qui m'ont accordé leur aide et leur amitié ; qu'ils trouvent dans ce travail l'expression de ma reconnaissance.

Ce travail a été effectué dans le cadre de l'A.C.C.  
Interactions moléculaires en Biologie - Interactions HISTONES-DNA.

(contrats DGRST 72.7.05.05 et 75.7.01.87)

Ce travail a fait l'objet des présentations et publications suivantes :

Présentations :

- " Studies of the primary structure of the histone H<sub>5</sub>."  
International Symposium on the Chromatin.  
Strasbourg, 6-7 avril 1974.
- La séquence amino-terminale de l'histone H<sub>5</sub>.  
Société de Chimie Biologique - Forum des Jeunes.  
Montpellier, 5, 6 et 7 septembre 1974.
- Méthodes de détermination de la structure primaire des histones  
(affiches).  
Colloque sur les méthodes physicochimiques appliquées  
à la biologie.  
Paris, 13-14 novembre 1975.
- Séquence of the amino-terminal half of the chicken erythrocyte  
histone H<sub>5</sub>.  
Tenth International Congress of Biochemistry.  
Hambourg, 25-31 july 1976.

Publications :

- Chicken erythrocyte Histone H<sub>5</sub> ; I Amino-terminal sequence  
(70 residues).  
A. GAREL, A. MAZEN and M. CHAMPAGNE  
and  
P. SAUTIERE, D. KMIECIK, O. LOY and G. BISERTE  
Febs Letters (1975), 50, 195-199.

- Chicken erythrocyte histone H<sub>5</sub> ; II Amino acid sequence adjacent to the phenylalanine residue.

P. SAUTIERE, D. KMIECIK, O. LOY, G. BRIAND and  
G. BISERTE

and

A. GAREL and M. CHAMPAGNE

Febs Letters (1975), 50, 200-203.

- Chicken erythrocyte histone H<sub>5</sub>. III Sequence of the amino-terminal half of the molecule (111 residues).

P. SAUTIERE, G. BRIAND, D. KMIECIK, O. LOY and  
G. BISERTE

and

A. GAREL and M. CHAMPAGNE

Febs Letters (1976), 63, 164-166.



CHICKEN ERYTHROCYTE HISTONE H<sub>5</sub>; I AMINO TERMINAL SEQUENCE (70 RESIDUES)

A. GAREL, A. MAZEN and M. CHAMPAGNE

*Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15, rue Descartes 67000-Strasbourg, France*

and

P. SAUTIERE, D. KMIĘCIK, O. LOY and G. BISERTE

*Unité 124 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Boîte postale 3567, 59020-Lille CEDEX France*

Received 4 December 1974

**1. Introduction**

In addition to the five histones common to most vertebrate species, a specific histone (histone H<sub>5</sub>)\* occurs in the nucleated erythrocyte of bird, amphibian, reptile and fish. This histone has been isolated from chicken erythrocytes and described by Neelin et al. [1] and Hnilica [2].

Histone H<sub>5</sub> is thought to be synthesized in place of a certain amount of histone H<sub>1</sub> in mature chicken erythrocyte, since the two histones together equal the usual amount of histone H<sub>1</sub> present in the other tissues [3]. Although related to each other by their solubility in 5% perchloric acid or trichloroacetic acid and by their molecular size, the histones H<sub>1</sub> and H<sub>5</sub> differ markedly by their amino-acid composition and particularly in their arginine content [4,5].

The amino acid sequence of the N-terminal fragment obtained by cyanogen bromide cleavage of the

protein was determined by Greenaway and Murray [6]. Moreover, structural studies on the tryptic and thermolytic peptides of histone H<sub>5</sub> were reported by Greenaway [7].

The amino-terminal sequence of the histone H<sub>5</sub> has now been extended up to the 70<sup>th</sup> residue. This sequence was determined from data provided by tryptic and chymotryptic peptides, by NBS\*\* fragments, and by the automated Edman degradation of the C-terminal fragment obtained by cyanogen bromide cleavage of the histone.

**2. Materials and methods**

Histone H<sub>5</sub> was prepared as described previously [4,5]. The purity of the protein was assessed by electrophoresis in polyacrylamide gel according to Leboy [8]. The amino acid composition was established on 24 hr and 72 hr hydrolysates.

Cyanogen bromide cleavage and the separation of the fragments of the protein were performed as reported previously [9]. A further purification of the C-terminal fragment CN-2 was achieved by preparative electrophoresis in vertical slab gels using the same conditions as for disc electrophoresis. The automated Edman degradation of this fragment was carried out in a SOCOSI model PS 100 Sequencer, with the Quadrol method.

NBS cleavage of histone H<sub>5</sub> was performed at room temperature, using 21 μmol of NBS per μmol of protein [10]. The reaction was monitored spectro-

\* The new histone nomenclature used here was accepted by the participants at the CIBA Foundation Symposium on the Structure and Function of Chromatin, April 3-5, 1974. This new nomenclature which has been proposed to the appropriate international nomenclature committee is as follows for each histone where the previous names are given in brackets: H<sub>1</sub> (F<sub>1</sub>, I, KAP); H<sub>2A</sub> (F<sub>2a2</sub>, II<sub>b1</sub>, ALK); H<sub>2B</sub> (F<sub>2b</sub>, II<sub>b2</sub>, KSA); H<sub>3</sub> (F<sub>3</sub>, III, ARK); H<sub>4</sub> (F<sub>2a1</sub>, IV, GRK) and H<sub>5</sub> (F<sub>2c</sub>, V, KAS).

\*\* Abbreviations: TPCK, L-(1-tosylamido-2-phenyl)-ethyl chloromethyl ketone. NBS, N-bromosuccinimide. PTH, Phenylthiohydantoin.

photometrically at 260 nm. The fragments were separated by chromatography on CM-cellulose (Whatman CM-52), equilibrated in 0.125 M sodium acetate buffer, pH 4.3 and eluted with a linear gradient of NaCl (0–1 M) in the same buffer. The peptides were desalted by gel filtration on Sephadex G-10, equilibrated and eluted in 0.01 N HCl.

The maleylation of histone H<sub>5</sub> was carried out at pH 9.0 and 0°C in 0.1 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> with a ten-fold molar excess of maleic anhydride per mol of free aminogroup. After one hr, the maleylated protein was exhaustively dialyzed against 0.1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> buffer at pH 8.0, and hydrolyzed by TPCK-treated trypsin for 4 hr at pH 8.0 and 37°C using an enzyme/substrate ratio of 1:50. After demaleylation [11] the tryptic peptides were fractionated on Chromobeads P column (Technicon) with pyridine formate and pyridine acetate buffers [12].

Chymotryptic hydrolysis of histone H<sub>5</sub> was carried out at 37°C for 1 hr in 0.1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> buffer, pH 8.0 with an enzyme substrate ratio of 1:50. The chymotryptic hydrolysate was fractionated on Sephadex G-25 F, equilibrated and eluted with 0.01 N HCl. Further purification of tryptic and chymotryptic peptides was achieved either by paper chromatography or paper electrophoresis or both methods, as described previously [13].

The Edman degradation of tryptic and chymotryptic peptides was performed manually using Sequanal grade reagents (Pierce). The Edman degradation was used either with direct identification of the phenylthiohydantoin (PTH) derivative [14], or in association with the dansylation method of Gray and Hartley [15]. In some cases, the removed residue was identified by amino acid analysis of the remaining peptide.

PTH-histidine and PTH-arginine were identified by high voltage electrophoresis (2 200 V, for one hr) on Whatman 3 MM paper at pH 3.6 (pyridine–acetic acid–water, 1:10:289, v/v), followed by specific staining respectively with the Pauly reagent and the phenanthrene quinone reagent [16]. The dansyl-amino acids were separated as described by Stehelin and Duranton [17].

### 3. Results and discussion

The amino acid composition of histone H<sub>5</sub> is shown in table 1. Based on phenylalanine as one residue, the

total number of amino acid residues present in the protein is 197. The data supported by the sequence studies establish without ambiguity the presence of three tyrosines and of three histidines. Moreover, the calculated mol. wt (21 450) is now quite comparable to the values (close to 21 000), obtained with light scattering [4], sedimentation equilibrium [18] and polyacrylamide gel electrophoresis in SDS [19], and unpublished observations of M. Champagne. This result is not in agreement with our previous calculations [9,20] nor with that of Greenaway [7].

The cyanogen bromide cleavage of the protein, which contains only one residue of methionine, released two fragments CN–1 and CN–2, of which the amino acid compositions appear in table 1. The sequence of the fragment CN–1 which constitutes the N-terminal part of the histone molecule has been established by Greenaway and Murray [6]. The fragment CN–2 lacking homoserine is obviously the C-terminal part of histone H<sub>5</sub>. The automated Edman degradation allowed us to carry the sequence determination on that fragment through 21 steps (table 2).

The limited results obtained after the cyanogen bromide cleavage of histone H<sub>5</sub> led us to cleave the three tyrosyl bonds of the protein with *N*-bromosuccinimide. Four peptides were obtained and separated on CM-Cellulose. The peptide in C-terminal position in the protein can easily be identified by its low absorbance at 260 nm, since it does not contain the dienone spiro lactone resulting from the action of the NBS on the tyrosine. The amino acid composition of this peptide (peptide NB–4) is given in table 1. The N-terminal sequence of the NB–4 was determined as Lys–Val–Gly. The automated Edman degradation could not be carried on beyond the glycyl residue. This blocking is likely due to the bromination of the histidyl residue which comes next after the residue Gly, as demonstrated by sequence work on the chymotryptic peptide Ch–7 (table 2). However, by heating the fragment NB–4 at 80°C for 1 hr, a partial cleavage of the histidyl bond occurs. Seven steps of the manual Edman degradation, on that heated fragment allowed us to establish the N-terminal sequence (12 residues) of the peptide NB–4. This sequence was confirmed with sequence work on chymotryptic peptide Ch–7 (see below). In the tryptic hydrolysate of the maleylated histone we have identified five peptides Tm–1, Tm–2, Tm–3,

Table 1  
Amino acid composition of the chicken erythrocyte histone H<sub>5</sub> and of its  
CN- and NB- fragments<sup>a</sup>

	Histone H <sub>5</sub>		Fragments		
	mol/100 mol	Calculated residues <sup>b</sup>	CN-1 <sup>c</sup>	CN-2	NB-4
			Calculated residues <sup>b</sup>		
Asp	1.51	3.02	0	3.13 ( 3)	3.03 ( 3)
Thr	3.02	6.02 ( 6)	2	4.13 ( 4)	4.08 ( 4)
Ser	11.89	23.71 (24)	6	21.23 (21)	16.55 (17)
Glu	3.83	7.65 ( 7)	2-3	5.2 ( 5)	2.54 ( 3)
Pro	7.84	15.64 (15)	4	9.87 (10)	9.89 (10)
Gly	4.95	9.87 (10)	0	9.1 ( 9)	7.22 ( 7)
Ala	15.86	31.62 (31)	4	25.27 (25)	23.65 (23)
Val	4.18	8.18 ( 8)	2	5.68 ( 6)	5.88 ( 6)
Met	0.44	0.87 ( 1)	1	0	0
Ile	3.03	6.05 ( 6)	0	4.98 ( 5)	2.15 ( 2)
Leu	4.30	8.57 ( 8)	2	6.3 ( 6)	5.79 ( 6)
Tyr	1.47	2.93 ( 3)	1	1.93 ( 2)	0
Phe	0.53	1.00 ( 1)	0	1.15 ( 1)	1.00 ( 1)
Lys	24.61	49.06 (49)	3	45.37 (45)	42.05 (42)
His	1.50	2.99 ( 3)	1	1.97 ( 2)	d
Arg	11.03	22.00 (22)	3-2	21.46 (21)	17.25 (17)
	99.99	197	31	165	142
Lys/Arg		2.23			
Basic/acidic		7.4	3.5	8.5	10
N-terminal		Blocked <sup>c</sup>	Blocked	Ile	Lys
C-terminal		Lys	Hse	Lys	Lys

<sup>a</sup> CN- and NB- fragments obtained respectively by cyanogen bromide and *N*-bromosuccinimide cleavage of the protein.

<sup>b</sup> Number in parentheses is the nearest integer.

<sup>c</sup> Data taken from references [6] and [9].

<sup>d</sup> The histidyl residue is chemically modified during the NBS-cleavage and is not recovered in the amino acid analysis.

<sup>e</sup> However 15% of the molecules are found to have threonine as the N-terminal amino acid.

Tm-4 and Tm-5\* (table 2), which occur in the N-terminal part of the fragment CN-2. Tm-3 (16 residues), which contains the methionyl residue, overlaps the fragments CN-1 and CN-2. The placement of the peptides Tm-4 and Tm-5 is consistent with the data provided by the automated Edman degradation of the fragment CN-2.

In the one-hour chymotryptic hydrolysate of the histone H<sub>5</sub> we have identified three peptides Ch-5,

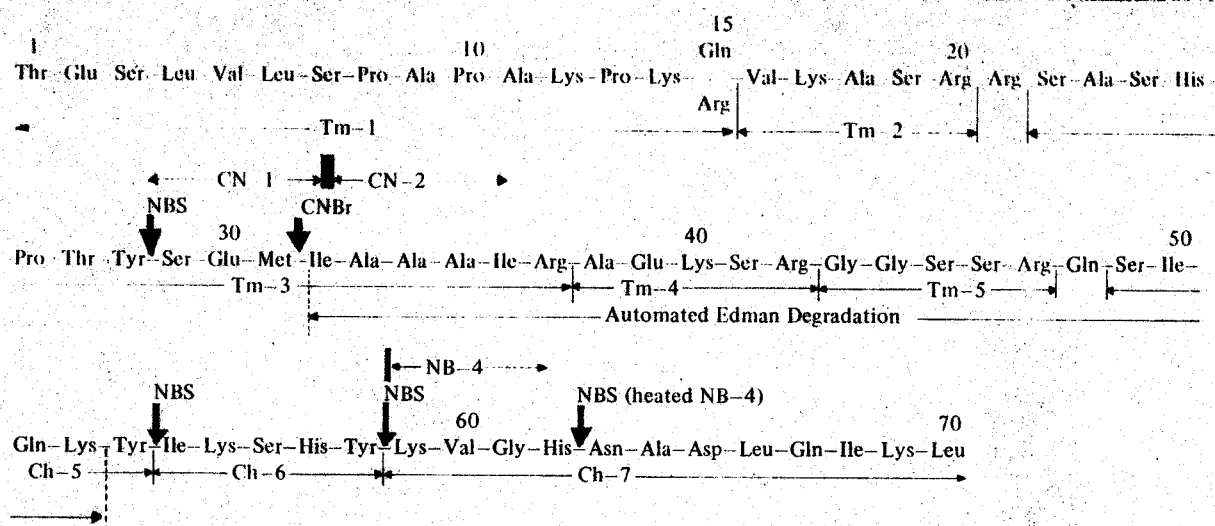
Ch-6 and Ch-7, which allowed us to extend the N-terminal sequence of the protein up to the residue 70 (table 2). Since the peptide Ch-5, Ser-Ile-Gln-Lys-Tyr, overlaps a part of the sequence of the fragment CN-2 established with the automated Edman degradation, it must be placed as written.

The peptide Ch-6, Ile-Lys-Ser-His-Tyr, contains the third tyrosyl residue of the histone molecule. Its position, adjacent to the peptide Ch-5 was deduced from the comparison between the amino acid compositions of fragments CN-2 and NB-4.

The N-terminal sequence of the peptide Ch-7 has

\* These peptides are numbered according to their position in the sequence of the protein.

Table 2  
N-terminal sequence of chicken erythrocyte histone H<sub>5</sub>



been determined as Lys-Val-Gly-His and is identical to that of the fragment NB-4. The position of the peptide Ch-7, next after the tyrosine 58, is therefore obvious. The C-terminal sequence was established with the data provided by the hydrolysis of the peptide Ch-7 with the carboxypeptidases A and B.

The results that we have reported here give a general idea of the whole primary structure of the chicken erythrocyte histone H<sub>5</sub>, in which the basic residues are concentrated in the C-terminal part of the molecule, whereas the N-terminal part of the molecule is rather hydrophobic. A similar distribution of the basic and hydrophobic residues is also found in the histone H<sub>1</sub> from different species [21,22].

#### Acknowledgements

We would like to express our gratitude to Dr K. Han, U 16, INSERM, Lille, France, for the automated Edman degradation and to Mrs D. Belaïche, Mrs D. Buhr, Miss J. Dunand and M. Kunstmann for their skillful technical assistance. This work has been supported by a grant from the Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (n° 72 7 0505).

#### References

- [1] Neelin, J. M., Callahan, P. X., Lamb, D. C. and Murray, K. (1964) *Can. J. Biochem.* 42, 1743-1752.
- [2] Hnilica, L. S. (1964) *Experientia* 20, 13-16.
- [3] Mazen, A. and Champagne, M. (1972) *Biochimie* 54, 1273-1279.
- [4] Champagne, M. and Mazen, A. (1967) *C.R. Acad. Sci. Paris*, 265, 2100-2103.
- [5] Champagne, M., Mazen, A. and Wilhelm, X. (1968) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 50, 1261-1272.
- [6] Greenaway, P. J. and Murray, K. (1971) *Nature New Biology* 229, 233-238.
- [7] Greenaway, P. J. (1971) *Biochem. J.* 124, 319-325.
- [8] Leboy, P. S., Cox, E. C. and Flaks, J. G. (1964) *Proc. Natl. Acad. Sci. Wash.* 52, 1367-1374.
- [9] Garel, A., Burckard, J., Mazen, A. and Champagne, M. (1972) *Biochimie* 54, 451-455.
- [10] Ramachandran, L. K. and Witkop, B. (1967) in: *Methods in Enzymology* (Hirs, C. H. W., ed.) Vol. 11, p. 283, Academic Press, New York.
- [11] De Lange, R. J., Fambrough, D. M., Smith, E. L. and Bonner, J. (1969) *J. Biol. Chem.* 244, 319-334.
- [12] Sautière, P., Tyrou, D., Lainé, B., Mizon, J., Ruffin, P. and Biserte, G. (1974) *Eur. J. Biochem.* 41, 563-576.
- [13] Sautière, P., Moschetto, Y., Dautrevaux, M. and Biserte, G. (1970) *Eur. J. Biochem.* 12, 222-226.
- [14] Han, K., Planchon, B., Dautrevaux, M. and Biserte, G. (1973) *Ann. pharm. franç.* 31, 539-550.



- [15] Gray, W. R. and Hartley, B. S. (1963) *Biochem. J.* 89, 379-380.
- [16] Yamada, S. and Itano, H. A. (1966) *Biochim. Biophys. Acta* 130, 538-540.
- [17] Stehelin, D. and Duranton, H. (1969) *J. Chromatog.* 43, 93-102.
- [18] Diggle, J. H. and Peacocke, A. R. (1971) *FEBS Lett.* 18, 138-140.
- [19] Panyim, S. and Chalkley, R. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 7557-7560.
- [20] Champagne, M., Pouyet, J., Ouellet, L. and Garel, A. (1970) *Bull. Soc. Chim. Biol.* 52, 377-389.
- [21] Rall, S. C. and Cole, R. D. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 7175-7190.
- [22] Jones, G. M. T., Rall, S. C. and Cole, R. D. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 2548-2553.

## CHICKEN ERYTHROCYTE HISTONE H<sub>5</sub>; II AMINO ACID SEQUENCE ADJACENT TO THE PHENYLALANINE RESIDUE

P. SAUTIERE, D. KMIECIK, O. LOY, G. BRIAND and G. BISERTE

*Unité 124 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Boîte postale 3567, 59020-Lille CEDEX, France*

and

A. GAREL and M. CHAMPAGNE

*Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15, rue Descartes, 67000-Strasbourg, France*

Received 4 December 1974

### 1. Introduction

In the first paper of this series we have presented the N-terminal sequence (70 residues) of the chicken erythrocyte histone H<sub>5</sub>\* [1]. We report here the sequence of 25 residues around the only phenylalanyl residue present in the histone H<sub>5</sub>. This region rich in hydrophobic residues, shows a strong analogy with the sequence adjacent to the phenylalanyl residue 106 in the Rabbit thymus lysine-rich histone (RTL-3) [2]. The sequence data were obtained from a tryptic peptide of the maleylated protein, and from peptides obtained by hydrolysis of the unmodified protein with chymotrypsin and a staphylococcal protease.

### 2. Materials and methods

All materials and methods were essentially as reported in the earlier paper with the following addi-

\* The new histone nomenclature used here was accepted by the participants at the CIBA Foundation Symposium on the Structure and Function of Chromatin, April 3-5, 1974. This new nomenclature which has been proposed to the appropriate international nomenclature committee is as follows for each histone where the previous names are given in brackets: H<sub>1</sub> (F<sub>1</sub>, I, KAP); H<sub>2</sub>A (F<sub>2a2</sub>, II<sub>b1</sub>, ALK); H<sub>2</sub>B (F<sub>2b</sub>, II<sub>b2</sub>, KSA); H<sub>3</sub> (F<sub>3</sub>, III, ARK), H<sub>4</sub> (F<sub>2a1</sub>, IV, GRK) and H<sub>5</sub> (F<sub>2c</sub>, V, KAS).

\*\* The staphylococcal protease isolated from *Staphylococcus aureus* strain V8 was a generous gift from Dr G. R. Drapeau.

tion. The histone H<sub>5</sub> was hydrolyzed at 37°C for 18 hr in 0.05 M ammonium bicarbonate, pH 8.0, with a staphylococcal protease\*\* at an enzyme/substrate ratio of 1:30.

The hydrolysate was fractionated on Sephadex G-50 F, equilibrated and eluted with 0.01 N HCl. Further purification of the peptides was achieved either by paper chromatography or paper electrophoresis or both methods as described previously [3].

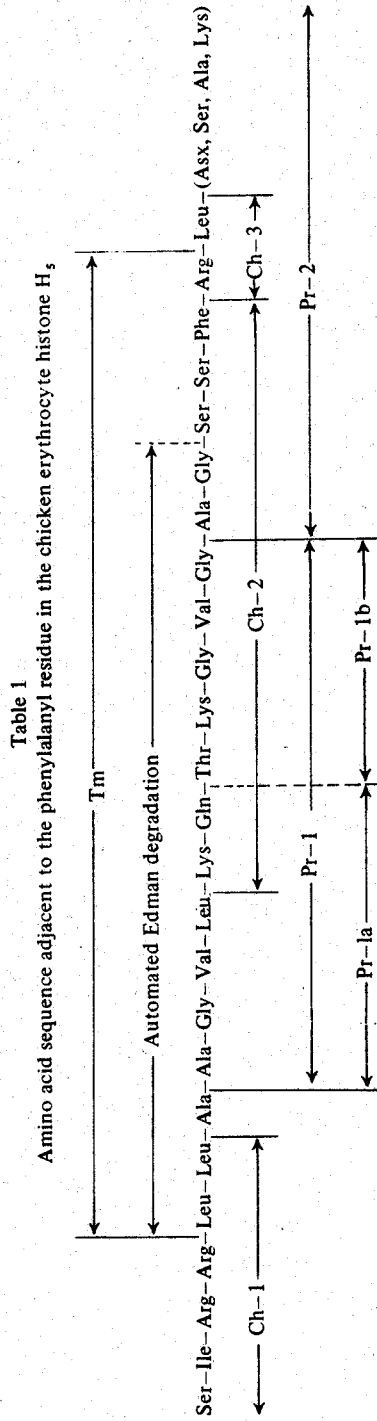
### 3. Results and discussion

In the tryptic hydrolysate of the maleylated histone a peptide containing the only phenylalanyl residue present in the protein was identified. This peptide (20 residues) has the following amino acid composition: Thr, Ser<sub>2</sub>, Glu, Ala<sub>3</sub>, Val<sub>2</sub>, Leu<sub>3</sub>, Phe, Lys<sub>2</sub>, Arg. The sequence of the first sixteen residues was established by the automated Edman degradation (table 1).

The remainder of the sequence was deduced from the data provided by the peptide Pr-2 isolated from the staphylococcal hydrolysate of the protein. This peptide has the following composition: Asp, Ser<sub>3</sub>, Gly, Ala<sub>2</sub>, Leu, Phe, Lys, Arg. The sequence of the first seven residues was as follows:

Ala-Gly-Ser-Ser-Phe-Arg-Leu-(Asx, Ser, Ala, Lys)

*North-Holland Publishing Company - Amsterdam*



Due to a low recovery of this peptide no further sequence work could be carried out. However, this peptide allows us to localise the last of the three residues of aspartic acid present in the histone H<sub>5</sub> close to the phenylalanyl residue.

From the same hydrolysate we have isolated the peptide Pr-1 and its two derived peptides Pr-1a and Pr-1b. The peptide Pr-1 overlaps the median part of the tryptic peptide (table 1). The presence of the peptides Pr-1, Pr-1a, Pr-1b and Pr-2 in the staphylococcal protease hydrolysate led us to question the purity of the enzyme preparation.

Among the three proteases produced by the strain V8 of *Staphylococcus aureus* [4,5], one has been shown to have a specificity limited to glutamyl bonds in ammonium bicarbonate or ammonium acetate buffers [6,7].

The results that we have obtained clearly indicate that the 'Glu-specific protease' was contaminated by a protease which exhibits a thermolysin like activity, since bonds such as Ala-Ala, Gln-Thr, and Gly-Ala present in the peptide Tm were split.

Only three of the chymotryptic peptides called Ch-1, Ch-2, and Ch-3 are critical to the purposes of this report and will be described here.

The sequence of the peptide Ch-1 was found to be:

Ser-Ile-Arg-Arg-Leu-Leu

A derived peptide with only one leucine was also identified in the chymotryptic hydrolysate and its structure is:

Ser-Ile-Arg-Arg-Leu

Since we know from the amino acid analysis that the fragment NB-4 obtained by *N*-bromosuccinimide

cleavage of the histone H<sub>5</sub>, contains six leucine residues already positioned [1], it is obvious that the peptide Ch-1 overlaps the N-terminal part of the tryptic peptide Tm (table 1).

The peptides Ch-2, -Lys-Gln-Thr-Lys-Gly-Val-Gly-Ala-Gly-Ser-Ser-Phe, and Ch-3, -Arg-Leu-, overlap the C-terminal part of this peptide Tm (table 1).

Thus we have determined in the chicken erythrocyte histone H<sub>5</sub> a sequence of 25 residues, which includes the only phenylalanyl residue present in the histone molecule.

This sequence is in excellent agreement with the partial results obtained by Greenaway [8] on tryptic and thermolysin peptides of the histone H<sub>5</sub>.

A striking analogy can be observed (table 2) by comparison of this sequence with the sequence adjacent to the phenylalanine residue 106 in the rabbit thymus/lysine-rich histone (RTL-3) determined by Jones et al. [2].

#### Acknowledgements

We are grateful to Dr Policard, Socosi, 94000, Saint Maur, France, for the automated Edman degradation and to Mrs D. Belaïche-Mayeur and M. J. Dupire-Ceulenaere for their skillful technical assistance.

The work was supported by a grant 72 7 05 05 from the Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique.

#### References

- [1] Preceding paper.
- [2] Jones, C. M. T., Rall, S. C. and Cole, R. D. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 2548-2553.

Table 2  
Sequence analogies in the vicinity of the phenylalanyl residue in histones H<sub>1</sub> and H<sub>5</sub>

H <sub>5</sub> (Chicken erythrocyte)	Val-Leu-Lys-Gln-Thr-Lys-Gly-Val-Gly-Ala-Gly-Ser-Ser-Phe-Arg
H <sub>1</sub> (Rabbit thymus) [2] RTL-3	Val- 96 -Glx-Thr-Lys-Gly-Thr-Gly-Ala-Ser-Gly-Ser-Phe-Lys 100 107



- [3] Sautière, P., Moschetto, Y., Dautrevaux, M. and Biserte, G. (1970) *Eur. J. Biochem.* 12, 222-226.
- [4] Arvidson, S., Holme, T. and Lindholm, B. (1972) *Biochem. Biophys. Acta* 302, 135-148.
- [5] Arvidson, S. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 302, 149-157.
- [6] Drapeau, G. R., Boily, Y. and Houmard, J. (1972) *J. Biol. Chem.* 247, 6720-6726.
- [7] Houmard, J. and Drapeau, G. R. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 3506-3509.
- [8] Greenaway, P. J. (1971) *Biochem. J.* 124, 319-325.

CHICKEN ERYTHROCYTE HISTONE H<sub>5</sub>

## III. SEQUENCE OF THE AMINO-TERMINAL HALF OF THE MOLECULE (III RESIDUES)

P. SAUTIERE, G. BRIAND, D. KMIÉCIK, O. LOY, G. BISERTE

*Unité n° 124 de l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U. 124 INSERM),  
B.P. n° 3567, 59020 Lille Cédex, France*

and

A. GAREL, M. CHAMPAGNE

*Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 15 rue Descartes, 67000 Strasbourg, France*

Received 21 January 1976

**1. Introduction**

In our previous papers [1,2] we have presented the N-terminal sequence (70 residues) of the chicken erythrocyte histone H<sub>5</sub><sup>\*</sup>, and a sequence of 25 residues around the only phenylalanyl residue present in that protein. The amino acid sequence of the histone H<sub>5</sub> has now been extended up to the 111th residue. The sequence was determined from data provided by the peptides obtained by hydrolysis of the protein or of its carboxy-terminal fragment NB-4, with trypsin, thermolysin and dilute acetic acid.

**2. Materials and methods**

All materials and methods were essentially as described previously [1,2] with the following additions. The histone H<sub>5</sub> was hydrolyzed at 105°C for 6 h with 0.25 M acetic acid (10 mg protein/ml

acetic acid). The hydrolysate was fractionated on Sephadex G-50 F equilibrated and eluted with 0.01 N HCl. On the other hand the histone H<sub>5</sub> was hydrolyzed at 37°C for 4 h in 0.1 M ammonium bicarbonate pH 8.0 with trypsin at an enzyme/substrate ratio of 1:100. The hydrolysate was fractionated on Chromobeads P column (Technicon) with pyridine formate and pyridine acetate buffers [3]. Furthermore, the C-terminal fragment NB-4 (142 residues) obtained by NBS\*\* cleavage of the protein [1] was hydrolyzed at 40°C for 2 h in 0.1 M ammonium bicarbonate pH 8.0, with thermolysin at an enzyme/substrate ratio of 1:100. The hydrolysate was fractionated on Sephadex G-25 F equilibrated and eluted with 0.01 N HCl. The fractions containing the small peptides ranging from di- to penta-peptides were further fractionated by ion-exchange chromatography, as described above.

**3. Results and discussion**

Among the peptides obtained by acetic acid cleavage of two aspartyl bonds in the histone H<sub>5</sub>, one is of peculiar interest for the purpose of the present paper.

This peptide designated by Ac-2 contains 34

\*\*Abbreviation: NBS, *N*-bromosuccinimide.

\*The new histone nomenclature used here was accepted by the participants at the CIBA Foundation Symposium on the Structure and Function of Chromatin, April 3-5, 1974. This new nomenclature which has been proposed to the appropriate international nomenclature committee is as follows for each histone where the previous names are given in brackets: H<sub>1</sub> (F<sub>1</sub>, I, KAP); H<sub>2</sub>A (F<sub>2a2</sub>, II<sub>b1</sub>, AIK); H<sub>2</sub>B (F<sub>2b</sub>, II<sub>b2</sub>, KSA); H<sub>3</sub> (F<sub>3</sub>, III, ARK); H<sub>4</sub> (F<sub>2a1</sub>, IV, GRK) and H<sub>5</sub> (F<sub>2c</sub>, V, KAS).

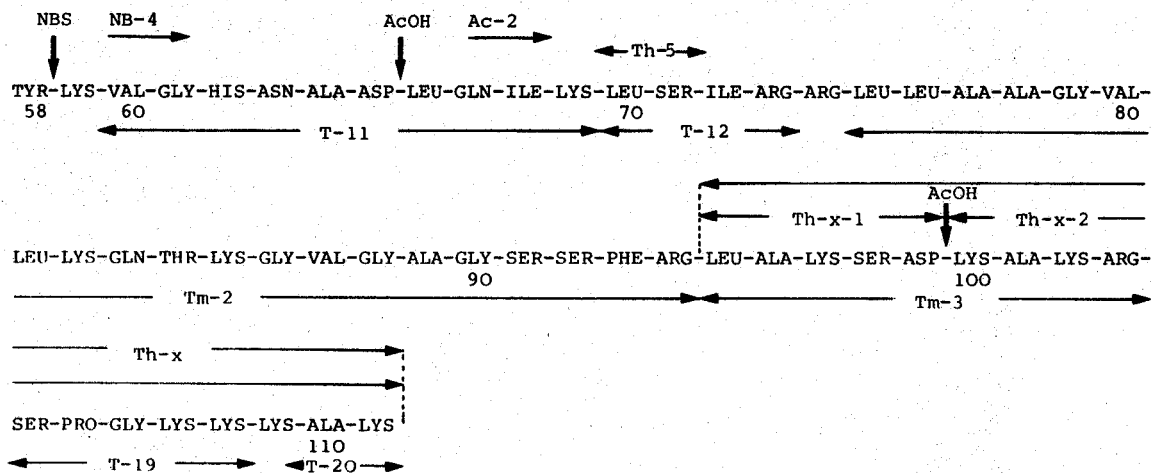


Fig. 1. Ordering of the peptides from residue 58 to residue 111 in the amino acid sequence of chicken erythrocyte histone H<sub>5</sub>. Tryptic peptides are designated by T- and Tm- (from maleylated peptide NB-4), and thermolytic peptides by Th-. Sites of cleavage of the protein by *N*-bromosuccinimide and acetic acid are indicated by NBS and AcOH respectively.

residues determined as follows: Asp, Thr, Ser<sub>4</sub>, Glu<sub>2</sub>, Gly<sub>4</sub>, Ala<sub>4</sub>, Val<sub>2</sub>, Ile<sub>2</sub>, Leu<sub>6</sub>, Phe, Lys<sub>4</sub>, Arg<sub>3</sub>. The presence of aspartic acid in this peptide is related to an incomplete enucleation of the aspartyl residue due to a short time hydrolysis with dilute acetic acid. The amino-terminal sequence of peptide Ac-2 was found to be: Leu-Gln-Ile-Lys-Leu. This sequence

corresponds to the carboxy-terminal sequence of the 70 first residues of the protein [1].

Its carboxy-terminal sequence Leu-Ala-Lys-Ser-Asp was deduced from the kinetic study of the hydrolysis of the peptide with carboxypeptidase C.

These structural studies as well as the amino acid composition of the peptide which contains the only

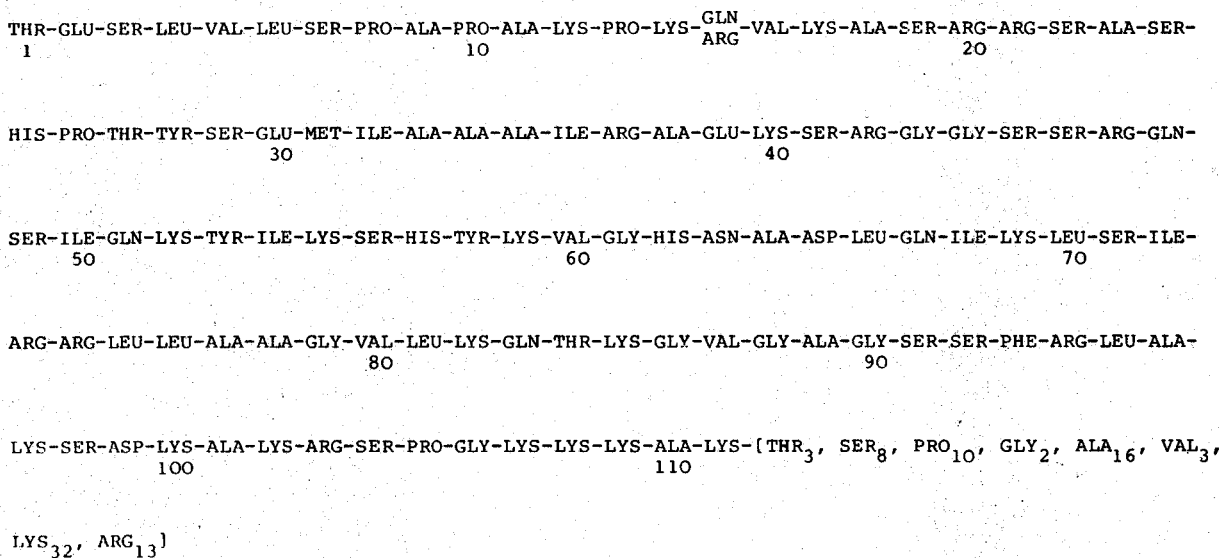


Fig. 2. Sequence of the amino-terminal half of the chicken erythrocyte histone H<sub>5</sub>.

phenylalanyl residue present in the histone H<sub>5</sub> indicate obviously that the sequence adjacent to the phenylalanyl residue established previously [2] comes next to the leucyl residue in position 70 (fig.1).

The identification of peptide T-12 Leu Ser Ile Arg in the tryptic hydrolysate of the protein and of peptide Th-5 Leu Ser in the thermolysin hydrolysate of the peptide NB-4 confirm the above assignment.

From the same thermolysin hydrolysate a highly basic peptide was isolated. This peptide Th-x (17 residues) has the following composition: Asp, Ser<sub>2</sub>, Pro, Gly, Ala<sub>3</sub>, Leu, Lys<sub>7</sub>, Arg.

The peptide Th-x has a leucyl residue in the amino-terminal position. Its carboxy-terminal sequence Lys-Lys-Lys-Ala-Lys was established from the kinetic study of the hydrolysis of the peptide with carboxypeptidases B and A.

Its complete sequence was deduced from the structural data provided by the derived peptides Th-x-Ac-1 and Th-x-Ac-2 obtained by cleavage of the peptide Th-x with 0.25 M acetic acid and by the tryptic peptides Tm-3 and T-19 (fig.1). The peptide Tm-3 was identified in the tryptic hydrolysate of the maleylated peptide NB-4 whereas the peptide T-19 was isolated from the tryptic hydrolysate of the protein.

The amino-terminal sequence of the peptide Th-x overlaps the carboxy-terminal sequence of the peptide Ac-2 (fig.1).

These results led us to present the sequence of the first 111 amino acids of the chicken erythrocyte

histone H<sub>5</sub> (fig.2). This sequence which corresponds to about half of the protein molecule, contains all the aromatic residues and most of the hydrophobic residues but alanine present in the histone H<sub>5</sub>.

On the other hand, the highly basic character of the carboxy-terminal part of the protein appears in the composition (in brackets, fig.2) where half of the amino acids which remain to be sequenced, are basic.

This strongly suggests that all the globular structure of the whole molecule is located in the sequence 1-99.

#### Acknowledgements

We wish to acknowledge with pleasure the skillful technical assistance of Mrs M. J. Dupire and D. Belaiche.

The work was supported by grant 75.7.0187 from the Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique.

#### References

- [1] Garel, A., Mazen, A., Champagne, M., Sautiere, P., Kmiecik, D., Loy, O. and Biserte, G. (1975) FEBS Lett. 50, 195-199.
- [2] Sautiere, P., Kmiecik, D., Loy, O., Briand, G., Biserte, G., Garel, A. and Champagne, M. (1975) FEBS Lett. 50, 200-203.
- [3] Sautiere, P., Moschetto, Y., Dautrevaux, M. and Biserte, G. (1970) Eur. J. Biochem. 12, 222-226.



TABLE DES MATIERES

---

	Pages
<u>INTRODUCTION</u> .....	1
 <u>CHAPITRE PREMIER :</u>	
I - <u>PREPARATION DE L'HISTONE H<sub>5</sub></u> .....	4
A - Préparation de la chromatine à partir des érythrocytes de poulets .....	4
B - Extraction de l'histone H <sub>5</sub> à partir de la chromatine .....	4
C - Purification de l'histone H <sub>5</sub> .....	6
II - <u>COMPOSITION EN ACIDES AMINES</u> .....	7
III - <u>ETAPES DE LA DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE       DE L'HISTONE H<sub>5</sub></u> .....	10
 <u>CHAPITRE SECOND : MATERIEL ET METHODES</u>	
I - <u>PREPARATION DU FRAGMENT COOH-TERMINAL NB-4 DE       L'HISTONE H<sub>5</sub></u> .....	17
A - Principe .....	17
B - Coupure de l'histone H <sub>5</sub> par la N-Bromosuccini- mide (NBS) .....	18
C - Séparation des produits de clivage .....	18
D - Discussion .....	19
II - <u>MATERIEL ET METHODES PROPRES A L'ETUDE DES PEPTIDES       TRYPSIQUES DE LA PROTEINE NATIVE ET MALEYLEE</u> .....	21
A - Choix des méthodes .....	21

B - Maléylation de l'histone H <sub>5</sub> .....	22
1) Principe de la maléylation .....	22
2) Avantages de la maléylation .....	23
3) Maléylation de la protéine et du fragment NB-4 .....	23
C - Hydrolyse tryptique et démaléylation .....	24
1) Hydrolyse tryptique de la protéine maléylée et démaléylation .....	24
2) Hydrolyse tryptique du fragment NB-4 maléylé et démaléylation .....	25
3) Hydrolyse tryptique de la protéine native .....	25
D - Isolement des peptides des hydrolysats tryptiques .....	25
1) Fractionnement des peptides par chromatographie de tamisage moléculaire .....	25
2) Fractionnement des peptides par chromatographie d'échanges ioniques sur AMBERLITE CG-50 II .....	26
3) Fractionnement des peptides par chromatographie d'échanges ioniques sur résine DOWEX 50 x 2 .....	27
E - Contrôle d'homogénéité des peptides et purifications .....	30
1) Chromatographie .....	30
2) Electrophorèse .....	30
3) Repérage des peptides sur la carte ....	31
4) Nomenclature des peptides .....	31
F - Techniques d'études de la séquence des peptides .....	32
1) Composition en acides aminés .....	32
2) Détermination de l'extrémité NH <sub>2</sub> - terminale .....	32
3) Détermination de l'extrémité COOH- terminale .....	33
4) Dégradation des peptides par la méthode de EDMAN .....	33

CHAPITRE TROISIEME : RESULTATS - DISCUSSIONS

I - <u>ETUDE DES PEPTIDES TRYPSIQUES DE LA PROTEINE</u> <u>NATIVE</u> .....	35
II - <u>ETUDE DES PEPTIDES TRYPSIQUES DE LA PROTEINE</u> <u>MALEYLEE</u> .....	75
A - Etude de la fraction S-1 .....	75
B - Etude de la fraction S-2 .....	75
C - Etude de la fraction S-3 .....	77
D - Etude de la fraction S-4 .....	81
E - Etude de la fraction S-5 .....	89
III - <u>ETUDE DES PEPTIDES TRYPSIQUES DU FRAGMENT NB-4</u> <u>MALEYLE</u> .....	100
A - Etude de la fraction A-2 .....	100
B - Etude de la fraction A-3 .....	103
C - Etude de la fraction A-4 .....	106
D - Etude de la fraction A-5 .....	107
E - Etude de la fraction A-6 .....	110
F - Etude de la fraction A-7 .....	111
<u>CONCLUSION</u> .....	113
<u>BIBLIOGRAPHIE</u> .....	121

## INTRODUCTION

---

Dans les cellules des organismes supérieurs, le maintien du matériel génétique et la régulation de l'activité des gènes à l'intérieur des chromosomes, sont assurés par les protéines chromosomales, histones et protéines non histones, associées au DNA au sein d'un complexe appelé chromatine.

Le rapport HISTONES/DNA est généralement voisin de 1, tandis que le rapport PROTEINES NON HISTONES/DNA varie de 0,5 à 1,5 en fonction de l'espèce animale ou végétale et de la nature du tissu.

L'étude de l'organisation de la chromatine se limite à l'étude des interactions DNA - HISTONES et HISTONES - HISTONES, car les connaissances sur les protéines non histones et en particulier sur leur structure primaire sont encore très sommaires.

La chromatine est formée d'unités de répétition composée à la fois de DNA et d'histones appelées "nucleosomes" (A. et D. OLINS, 1973-74) ou nucléosomes (OUDET et al., 1975).

Chaque nucléosome semble constitué d'un fragment de DNA de 200 paires de bases environ et d'un ensemble de 8 molécules d'histones comprenant deux copies de chacune d'elles :  $H_{2A}$ ,  $H_{2B}$ ,  $H_3$  et  $H_4$ . L'histone  $H_1$ , non nécessaire pour reconstituer un nucléosome pourrait servir de lien entre nucléosomes d'une même chaîne ou de chaînes voisines.



D'une manière générale, les histones n'ont aucune spécificité tissulaire ou d'espèce. Toutefois, l'histone H<sub>1</sub> montre une certaine spécificité et une plus grande multiplicité que les autres histones. On trouve, par exemple, une histone H<sub>1</sub><sup>o</sup> dans les tissus à forte activité métabolique tels que le foie et le pancréas.

Afin d'aborder le problème des interactions HISTONES - DNA et HISTONES - HISTONES au sein de la chromatine, il est nécessaire de connaître la structure primaire des histones.

On connaît actuellement la séquence complète en amino-acides des histones H<sub>4</sub> (DE LANGE et al., 1969) ; H<sub>2B</sub> (IWAI et al., 1970) ; H<sub>3</sub> (DE LANGE et al., 1972) ; H<sub>2A</sub> (SAUTIERE et al., 1972) (YEOMAN et al., 1972) (SAUTIERE et al., 1974).

Les séquences d'histones H<sub>1</sub> de truite (DIXON et al., Communication personnelle, 1976) et de lapin RTL-3 (COLE et al., Communication personnelle, 1976) sont également déterminées.

La détermination de la séquence en acides aminés de l'histone H<sub>5</sub> spécifique de l'érythrocyte de poulet, a été entreprise dans notre laboratoire.

L'histone H<sub>5</sub> s'apparente à l'histone H<sub>1</sub> riche en lysine par ses caractères de solubilité, sa composition en amino-acides et sa taille moléculaire.

Cette histone, synthétisée durant la maturation des globules rouges remplace progressivement et partiellement l'histone H<sub>1</sub>. Absente de la moelle et de la rate, l'histone H<sub>5</sub> est localisée uniquement dans les réticulocytes et les érythrocytes matures (MAZEN et al. 1972).

La détermination de la structure primaire de l'histone H<sub>5</sub> spécifique de l'érythrocyte nucléé est doublement motivée, d'une part pour l'étude des interactions HISTONES - DNA et HISTONES - HISTONES, d'autre part pour le rôle particulier qu'elle pourrait avoir dans la condensation de la chromatine.

TABLEAU I

NOMENCLATURE ET MASSES MOLECULAIRES DES HISTONES

RASMUSSEN (1962)	JOHNS (1962-64-67)	CIBA SYMPOSIUM (Londres 1974)		Masse moléculaire
I	F1	H1	Très riche en lysine	21.000
IIb2	F2b	H2B	Riche en lysine	13.774
IIb1	F2a2	H2A		14.005
III	F3	H3	Riches en arginine	15.324
IV	F2a1	H4		11.282
V	F2c	H5	Très riche en lysine Spécifique de l'érythrocyte nucléé.	20.300



## CHAPITRE PREMIER

- I - PREPARATION DE L'HISTONE H<sub>5</sub>
- II - COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DE LA PROTEINE
- III - ETAPES DE LA DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE  
DE LA PROTEINE

## I - PREPARATION DE L'HISTONE H<sub>5</sub>

La préparation et la purification de l'histone H<sub>5</sub> sont réalisées au laboratoire de Mademoiselle CHAMPAGNE (Maître de Recherches au CNRS), à l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire de Strasbourg.

L'histone est extraite de sang de poulets adultes, et sa préparation comporte 3 étapes, schématisées dans la figure 1.

### A - Préparation de la chromatine à partir des érythrocytes de poulets

Après hémolyse des érythrocytes dans une solution de saponine, les noyaux ainsi libérés sont traités par une solution de NaCl 0,15 M, dans laquelle la chromatine est insoluble (CHAMPAGNE et al., 1968).

### B - Extraction de l'histone H<sub>5</sub> à partir de la chromatine

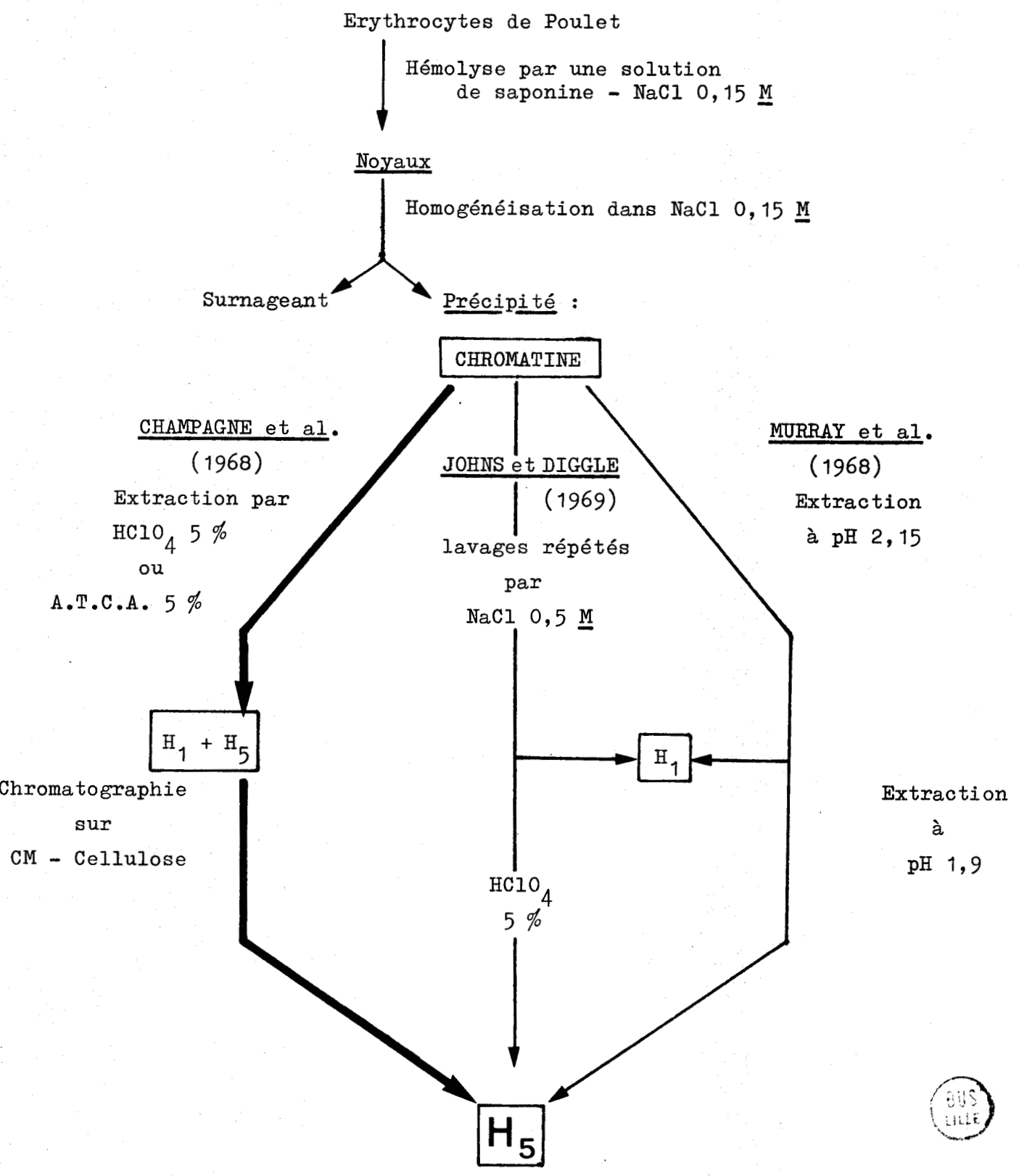
La technique utilisée a été décrite par CHAMPAGNE et al. en 1968. Ces auteurs ont mis au point une méthode de préparation de l'histone H<sub>5</sub>, dont la simplicité et l'excellente résolution constituent une amélioration sensible sur les méthodes déjà décrites (MURRAY et al., 1968), (JOHNS et DIGGLE, 1969).

Les histones H<sub>1</sub> et H<sub>5</sub> sont extraites ensemble, à partir de la chromatine, par l'acide perchlorique ou l'acide trichloracétique à 5 %.

Cependant il faut noter que l'acide trichloracétique n'extrait qu'environ 80 % de l'histone H<sub>5</sub> à partir du noyau d'érythrocyte, tandis que l'acide perchlorique en extrait la totalité.

FIGURE 1

PREPARATION DE L'HISTONE H<sub>5</sub>



C - Purification de l'histone H<sub>5</sub>

L'histone H<sub>5</sub> est obtenue pure à partir du mélange H<sub>1</sub>-H<sub>5</sub>, par chromatographie d'échange d'ions sur carboxyméthyl-cellulose (CMC Serva ; 0,89 milliéquivalents par gramme de poids sec).

L'élution est réalisée selon la méthode préconisée par JOHNS et al. (1960), avec les tampons acétate I et II, puis HCl 0,01 N et HCl 0,02 N.

La fraction éluée par le tampon acétate II correspond à l'histone H<sub>1</sub> très riche en lysine.

La fraction éluée par HCl 0,02 N est la fraction spécifique des érythrocytes de poulets, analogue à la fraction F2c de HNILICA (1964), ou la fraction H<sub>5</sub> de NEELIN et al. (1964), ou encore le composant 5 des  $\alpha$ -histones de BELLAIR et MAURITZEN (1964).

La pureté des préparations d'histone H<sub>5</sub> est contrôlée par électrophorèse en gel de polyacrylamide selon la méthode de PANYIM et CHALKLEY (1969) à pH 2,7 en milieu urée 2,5 M, en utilisant une concentration de 17 % en acrylamide.

## II - COMPOSITION EN ACIDES AMINES

La composition en acides aminés de l'histone H<sub>5</sub>, établie sur des hydrolysats de 24 heures et 72 heures, est présentée dans le tableau II.

L'hydrolyse est réalisée à 110°C en tubes scellés sous vide, en milieu HCl 5,7 N (1 ml par mg de protéine), additionné d'une goutte d'une solution de phénol à 1 % afin d'éviter une dégradation excessive de la tyrosine.

L'analyse des acides aminés est effectuée sur un analyseur BECKMAN, type Multichrom, en utilisant un système monocolonne.

L'élution des acides aminés se fait selon un procédé adopté de MOORE et STEIN, à l'aide de 3 tampons de pH croissant :

- Tampon 1 : citrate de sodium 0,2 N pH 3,22
- Tampon 2 : " " 0,2 N pH 4,25
- Tampon 3 : " " 0,2 N + chlorure de sodium 1 M  
pH 6,28.

Les deux premiers tampons 0,2 N en sodium permettent l'élution des acides aminés acides et neutres. Le troisième 1,2 N en sodium assure l'élution des acides aminés basiques.

L'histone H<sub>5</sub> s'apparente à l'histone H<sub>1</sub> riche en lysine, par ses caractères de solubilité dans l'acide perchlorique ou l'acide trichloracétique à 5 %, et par sa composition en acides aminés. Nous avons fait figurer dans le tableau II la composition en acides aminés de l'histone H<sub>1</sub>, en comparaison avec celle de l'histone H<sub>5</sub>.

Comme l'histone H<sub>1</sub>, l'histone H<sub>5</sub> se caractérise par sa richesse en lysine (42 résidus) et en alanine (29 résidus). Mais elle s'en distingue par sa richesse en arginine (21 résidus) et en sérine (25 résidus), et par la présence d'un résidu de méthionine, de 3 résidus d'histidine et de 3 résidus de tyrosine.

Elle renferme en outre un résidu de phénylalanine et 3 résidus d'acide aspartique.



La protéine ne contient pas de cystéine, et l'absence de tryptophanne est une caractéristique générale de toutes les histones.

Le poids moléculaire, calculé sur la base de 185 résidus, est de 20.300.

Le rapport lysine/arginine est de 2,0.

Un résidu de thréonine partiellement N-acétylé a été identifié à l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale tandis qu'un résidu de lysine est placé à l'extrémité COOH-terminale de la protéine (CHAMPAGNE et al., 1968) et (GREENAWAY et MURRAY, 1971).

TABLEAU II

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DE L'HISTONE H<sub>5</sub>.

Acides aminés	HISTONE H <sub>5</sub>		HISTONE H <sub>1</sub>
	Moles d'acides aminés pour 100 moles	Nombre de résidus	Nombre de résidus
Acide aspartique	1,75	3,23 (3) (*)	4
Thréonine	3,37	6,23 (6)	11
Sérine	13,68	25,30 (25)	13
Acide glutamique	4,01	7,42 (7-8)(**)	7
Proline	7,01	12,97 (13)	20
Glycine	4,87	9,00 (9)	13
Alanine	15,49	28,65 (29)	56
$\frac{1}{2}$ Cystine	-	-	-
Valine	4,23	7,82 (8)	11
Méthionine	0,71	1,32 (1)	-
Isoleucine	3,29	6,08 (6)	2
Leucine	4,38	8,10 (8)	8
Tyrosine	1,58	2,93 (3)	1
Phénylalanine	0,73	1,35 (1)	1
Histidine	1,56	2,88 (3)	-
Lysine	21,38	39,56 (42)(***)	61
Arginine	12,97	23,99(21-20)(***)	4
Nombre de résidus	101,01	185	212
Rapport Lys/Arg		2,0	15,25
N-terminal		Thréonine partiellement acétylée	Acétyl-Sérine
C-terminal		Lysine	Lysine
Poids moléculaire calculé		20.300	21.000

(\*) Les valeurs entre parenthèses indiquent le nombre arrondi de résidus.

(\*\*) Ces valeurs témoignent du polymorphisme de l'histone H<sub>5</sub> (Gln → Arg) en position 15 dans la séquence en acides aminés, mis en évidence par GREENAWAY et MURRAY (1971) et GAREL et al. (1972).

(\*\*\*) Nombre arrondi de résidus déduit de l'étude des peptides obtenus par coupure de l'histone H<sub>5</sub> par l'acide acétique 0,25 N.



### III - ETAPES DE LA DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE L'HISTONE H<sub>5</sub>

L'histone H<sub>5</sub> ne contenant qu'un résidu de méthionine, la première étape de la détermination de la structure primaire a consisté, naturellement, à couper la protéine par le bromure de cyanogène qui libère 2 fragments : CN-1 (fragment NH<sub>2</sub>-terminal) et CN-2 (fragment COOH-terminal).

La séquence en amino-acides du fragment CN-1 a été établie par GREENAWAY et MURRAY (1971) ; elle est présentée dans la figure 2. Ces auteurs, ainsi que GAREL et al. (1972), ont mis en évidence une microhétérogénéité au niveau du résidu 15 qui se traduit par l'obtention de deux peptides dont l'un contient de l'arginine et l'autre de la glutamine en position 15.

Par ailleurs GREENAWAY (1971) a soumis la protéine à l'hydrolyse par la trypsine, la thermolysine et la pepsine. Des résultats très partiels de ces travaux ont été publiés, puis GREENAWAY a cessé toute recherche sur la structure primaire de l'histone H<sub>5</sub>.

Nous avons alors repris les travaux de détermination de séquence dans notre laboratoire en collaboration étroite avec l'équipe de Madeleine CHAMPAGNE de STRASBOURG.

Au cours du fractionnement des produits de clivage de l'histone H<sub>5</sub> par le bromure de cyanogène, le fragment CN-2 est obtenu contaminé par la protéine non coupée.

La purification du fragment CN-2 est effectuée par électrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide. Malgré le rendement médiocre de cette purification, le fragment CN-2 a pu être obtenu en quantité suffisante pour en établir la composition en acide aminés et pour être soumis à deux séries de dégradation automatique de EDMAN.

Bien que le tampon "Quadrol" utilisé soit inadapté pour la dégradation d'une protéine riche en lysine, nous avons pu établir la séquence des vingt premiers résidus du fragment CN-2 (figure 3).

Pour tenter de réaliser un plus grand nombre de cycles de dé-

SEQUENCE EN AMINO-ACIDES DU FRAGMENT NH<sub>2</sub>-TERMINAL DE L'HISTONE H<sub>5</sub>  
OBTENU APRES COUPURE DE LA PROTEINE PAR LE BROMURE DE CYANOGENE.

1 THR-GLU-SER-LEU-VAL-LEU-SER-PRO-ALA-PRO-ALA-LYS-PRO-LYS-ARG 15  
20  
31  
GLN-VAL-LYS-ALA-SER-ARG-ARG-SER-ALA-SER-HIS-PRO-THR-TYR-SER-GLU-HSER  
(MET)

(d'après GREENAWAY et al., 1971)

FIGURE 2



SEQUENCE NH<sub>2</sub>-TERMINALE DU FRAGMENT  
COOH-TERMINAL OBTENU PAR COUPURE DE L'HISTONE H<sub>5</sub>  
AVEC LE BROMURE DE CYANOGENE.  
(DEGRADATION AUTOMATIQUE DE EDMAN)

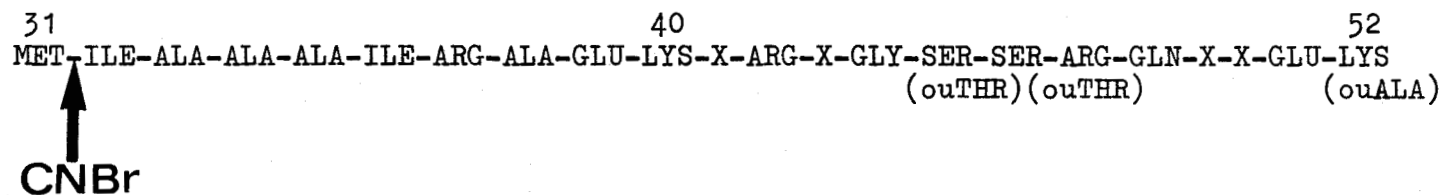


FIGURE 3



gradation, en améliorant en particulier la solubilité du substrat dans le tampon quadrol, et en évitant les pertes de substrat porteur de nombreux groupes  $\epsilon$ -P.T.C. par extraction dans les solvants organiques, la protéine a été succinylée puis coupée par le bromure de cyanogène. Le fragment COOH-terminal, CN-2, seul porteur d'un groupe  $\alpha$ -aminé libre, n'a pas été séparé de la protéine non coupée. Le mélange a été directement soumis à la dégradation automatique de EDMAN.

Malgré les avantages de la succinylation, nous n'avons pu aller au-delà du 20ème cycle.

Les ambiguïtés qui apparaissent aux positions 41, 43, 45, 46, 48, 49, 50 et 52 de la séquence ainsi déterminée (figure 3) ont été levées grâce à l'étude des peptides tryptiques et chymotryptiques de la protéine.

A ces travaux sur le fragment CN-2 ont succédé les études des différents hydrolysats enzymatiques obtenus à partir de la protéine native ou maléylée.

Toutefois l'avantage de la maléylation qui permet d'obtenir un nombre restreint de peptides (théoriquement 22 au lieu de 63) est en partie oblitérée par le fait que certains de ces peptides qui proviennent de la moitié COOH-terminale de la protéine sont fortement basiques et ne peuvent être séparés de façon satisfaisante sur une résine Chromobeads P.

Dans notre recherche de gros fragments de l'histone H<sub>5</sub>, nous avons également envisagé l'utilisation de la chymotrypsine et d'une protéase staphylococcique dont les sites potentiels d'action dans la protéine sont respectivement au nombre de 12 (trois liaisons tyrosyle, une liaison phénylalanyle, huit liaisons leucyle) et de 8 (huit liaisons glutamyle).

Malheureusement l'intérêt de ces deux types d'hydrolyse enzymatique s'est trouvé fortement limité en raison des particularités de la structure de la protéine.

Tous les sites potentiels de clivage par la chymotrypsine ont été identifiés dans la moitié NH<sub>2</sub>-terminale de la protéine. En outre 6 des 8 résidus d'acide glutamique dosés dans l'histone H<sub>5</sub> sont sous forme amide, et la protéase staphylococcique, ne peut hydroly-

ser les liaisons GLN-X.

Pendant ce temps, A. GAREL et M. CHAMPAGNE réalisaient la coupure de la protéine par la N-bromosuccinimide au niveau des trois liaisons tyrosyle et parvenaient ainsi à isoler le fragment COOH-terminal NB-4 (127 résidus) résultant de la coupure de la liaison tyrosyle en position 58.

La détermination de la structure primaire de l'histone H<sub>5</sub> s'est donc poursuivie à l'aide du fragment NB-4 qui a été successivement hydrolysé par la trypsine après maléylation, par la chymotrypsine, la thermolysine, la protéase staphylococcique et plus récemment par la pepsine.

L'étude des peptides des différents hydrolysats (à l'exclusion des peptides pepsiques) nous a permis d'établir la séquence des 111 premiers résidus de l'histone H<sub>5</sub>.

Il nous reste donc à déterminer la séquence de la partie COOH-terminale de la protéine (résidus 112 à 185).

Pour cette détermination, l'hydrolyse pepsique se révèle d'un très grand intérêt, puisqu'elle libère à partir du fragment NB-4 ou de la molécule entière d'histone H<sub>5</sub> un fragment peptidique de 92 résidus en position COOH-terminale dans la protéine. Ce peptide est obtenu avec un excellent rendement (supérieur à 80 %) par coupure de l'unique liaison phénylalanyle présente dans l'histone H<sub>5</sub> (Phe-93).

Nous concluerons l'historique de la détermination de la structure primaire de l'histone H<sub>5</sub> en accordant une place particulière à l'hydrolyse de l'histone avec l'acide acétique 0,25 N, qui coupe la protéine au niveau des résidus d'acide aspartique en positions 65 et 99.

Cette méthode de coupure que nous avons appliquée récemment ne présente pas un intérêt majeur pour nos études de structure primaire. Mais elle procure deux fragments d'un intérêt considérable pour des études conformationnelles : le fragment Ac-1-a (résidus 1 à 99), qui contient la plupart des résidus hydrophobes : Val, Ile et tous les résidus aromatiques de la protéine, le fragment Ac-3 (résidus 100 à 185) où sont accumulés la plupart des résidus basiques de l'histone.



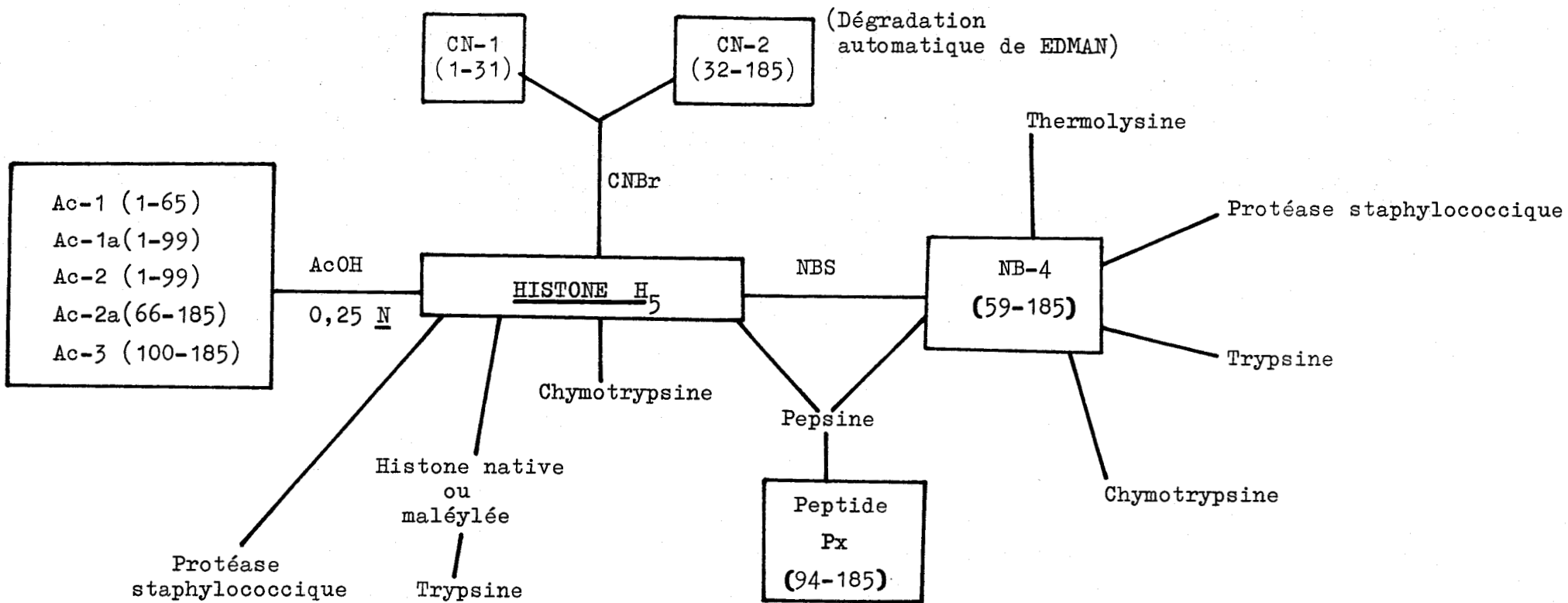


FIGURE 4

SCHEMA DE LA STRATEGIE ADOPTEE POUR LA DETERMINATION  
DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE L'HISTONE H<sub>5</sub>.



Notre travail consiste en l'étude des peptides tryptiques de la protéine native, de la protéine maléylée et de son fragment NB-4 maléylé.

Il s'insère dans un ensemble de travaux sur la détermination de la structure primaire de l'histone H<sub>5</sub> en collaboration avec :

M<sup>elle</sup> Odile LOY : Etude des peptides chymotrypsiques et pepsiques de l'histone H<sub>5</sub>

M<sup>r</sup> Gilbert BRIAND : Etude des peptides obtenus par hydrolyse enzymatique (Protéase staphylococcique et thermolysine) et hydrolyse en milieu acide dilué de l'histone H<sub>5</sub>.

## CHAPITRE SECOND

### MATERIEL ET METHODES

- I - PREPARATION DU FRAGMENT NB-4 DE L'HISTONE H<sub>5</sub>.
- II - MATERIEL ET METHODES PROPRES A L'ETUDE DES PEPTIDES TRYPSIQUES DE LA PROTEINE NATIVE ET MALEYLEE.

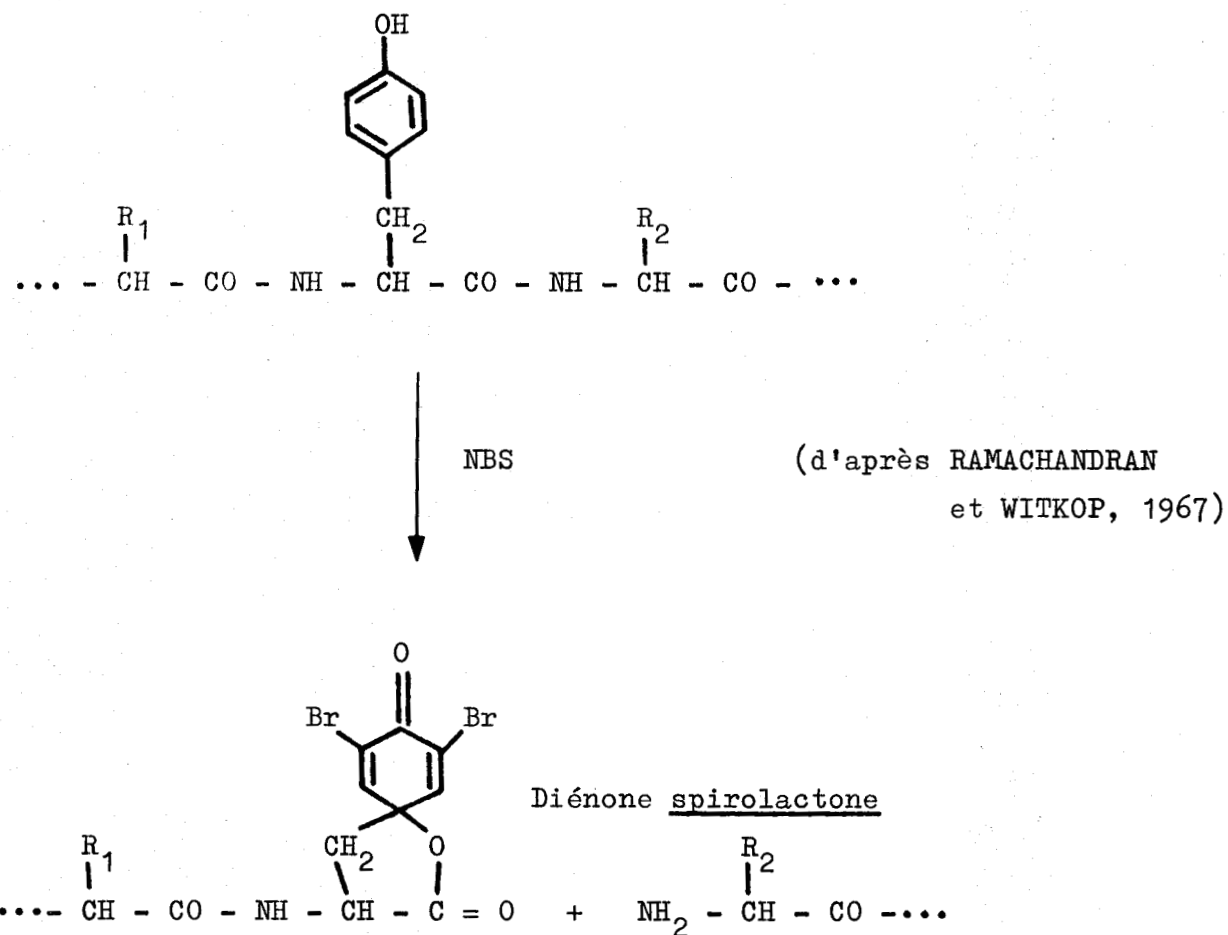
I - PREPARATION DU FRAGMENT COOH-TERMINAL NB-4 DE L'HISTONE H<sub>5</sub>

Elle est réalisée au laboratoire de Mademoiselle CHAMPAGNE à Strasbourg.

Le fragment NB-4 est obtenu par coupure de la protéine par la N-Bromosuccinimide.

A - Principe

L'histone H<sub>5</sub> ne renferme pas de tryptophane. L'action de la N-Bromosuccinimide s'exerce donc sélectivement au niveau des trois liaisons tyrosyle présentes dans la molécule, selon le schéma suivant :



## B - Coupure de l'histone H<sub>5</sub> par la N-Bromosuccinimide (NBS)

La coupure de l'histone H<sub>5</sub> par la N-Bromosuccinimide (NBS) a été réalisée selon la méthode de RAMACHANDRAN et WITKOP (1967).

La réaction est effectuée à température ambiante, en milieu acide acétique à 50 %, en utilisant un large excès de NBS (7 micromoles par micromole de tyrosine). Dans ces conditions, l'action de la NBS est limitée aux seules liaisons tyrosyle.

Cependant, la méthionine est oxydée en méthionine-sulfone, et les résidus d'histidine sont bromés : nous verrons plus loin l'incidence de ces réactions secondaires sur l'étude structurale du fragment COOH-terminal de l'histone H<sub>5</sub>.

La NBS est ajoutée en 5 fois, avec une demi-heure d'agitation lente à l'obscurité entre chaque addition. La réaction est suivie spectrophotométriquement par mesure de la densité optique à 260 nm : à cette longueur d'onde, la diénone spirolactone (tyrosine modifiée) possède une absorption caractéristique.

La solution, diluée dix fois, est ensuite lyophilisée.

## C - Séparation des produits de clivage

La coupure par la NBS des 3 liaisons tyrosyle de l'histone H<sub>5</sub>, produit 4 fragments peptidiques (NB-1 ; NB-2 ; NB-3 et NB-4) qui sont séparés par chromatographie d'échange d'ions sur carboxyméthyl-cellulose (Whatman CM-52) équilibrée en tampon acétate de sodium 0,125 M pH 4,3, et éluée avec un gradient linéaire en NaCl (0 à 1 M) dans le même tampon.

Les peptides sont ensuite dessalés par passage sur une colonne de Sephadex G-10, équilibrée et éluée avec une solution de HCl 0,01 N.

## D - Discussion

Les 3 fragments peptidiques comportant une tyrosine modifiée (diénone spirolactone) absorbent intensément à 260 nm, ce qui permet de les différencier du fragment COOH-terminal ne comportant plus de tyrosine.

La chromatographie d'échange d'ions sur carboxyméthyl-cellulose ne permet pas une séparation satisfaisante de ces 3 fragments, ce qui est sans importance, puisque les 3 peptides correspondent à la partie NH<sub>2</sub>-terminale de la protéine, déjà connue.

Par contre, le fragment COOH-terminal de la protéine (fragment NB-4), élué à force ionique élevée, et repéré par sa faible absorbance à 260 nm, puisqu'il ne contient pas de diénone spirolactone, est bien séparé, probablement en raison de son caractère très basique.

La composition en acides aminés du fragment COOH-terminal NB-4, obtenu par coupure de la protéine avec la NBS, est donnée dans le tableau III. La composition en acides aminés des fragments NB-1, NB-2 et NB-3, donnée par comparaison, a été déduite de la séquence de la partie NH<sub>2</sub>-terminale de la protéine, déjà connue.

Le fragment NB-4 (127 résidus) se caractérise par sa richesse en acides aminés basiques qui constituent 40 % de la totalité des résidus. Il renferme le seul résidu de phénylalanine et les 3 résidus d'acide aspartique présents dans la molécule d'histone H<sub>5</sub>.

Il contient en outre 6 des 8 résidus de leucine présents dans la protéine.

Enfin, le résidu d'histidine, bromé lors de l'action de la NBS, n'apparaît pas dans la composition en acides aminés du fragment NB-4.

L'obtention du fragment NB-4 présente un grand avantage : sa préparation est aisée et il est obtenu avec un rendement de 50 %. Situé en position COOH-terminale de la protéine, il ne renferme plus que les 2/3 des résidus de la molécule.

Son isolement est donc une étape déterminante dans l'étude de la structure primaire de l'histone H<sub>5</sub>, puisqu'il va désormais constituer le

matériel de base pour les différentes hydrolyses enzymatiques nécessaires à la détermination de la séquence COOH-terminale de la protéine.

TABLEAU III

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES FRAGMENTS  
OBTENUS APRES ACTION DE LA N-BROMOSUCCINIMIDE SUR L'HISTONE H<sub>5</sub>

	H <sub>5</sub>	NB-1	NB-2	NB-3	NB-4
ASP	3	-	-	-	3
THR	6	2	-	-	4
SER	25	5	5	1	14
GLU	7-8	1-2	4	-	2
PRO	13	4	-	-	9
GLY	9	0	2	-	7
ALA	29	4	4	-	21
CYS/2	-	-	-	-	-
VAL	8	2	-	-	6
MET	1	-	1	-	-
ILE	6	-	3	1	2
LEU	8	2	-	-	6
TYR	3	1	1	1	-
PHE	1	-	-	-	1
HIS	3	N.D. (*)	-	N.D. (*)	N.D. (*)
LYS	42	3	2	1	36
ARG	21-20	3-2	3	-	15
	185	28	25	5	127

(\*) Non déterminé, par suite de la bromation des résidus d'histidine lors de l'action de la NBS.



II - MATERIEL ET METHODES PROPRES A L'ETUDE DES PEPTIDES TRYPSIQUES  
DE LA PROTEINE NATIVE ET MALEYLEE

A - Choix des méthodes

La composition en acides aminés de l'histone H<sub>5</sub>, caractérisée par la présence de 42 résidus de lysine et de 21 résidus d'arginine, nous a conduit, dans un premier temps, à malétyler les résidus de lysine de la protéine. L'action de la trypsine, limitée aux seules liaisons arginyle, permet en conséquence l'obtention d'un nombre restreint de peptides.

Toutefois, certains peptides, principalement localisés dans la partie COOH-terminale de la molécule, sont en raison de leur caractère très basique adsorbés irréversiblement sur la résine Dowex 50 utilisée pour fractionner l'hydrolysate.

Nous avons donc été amené, dans un second temps, à utiliser un échangeur d'ions faible - type Amberlite CG50 - pour le fractionnement de ces peptides obtenus soit à partir de la protéine malétylée soit à partir de son fragment COOH-terminal NB-4 malétylé.

Parallèlement à ce travail, nous avons soumis la protéine native à l'hydrolyse tryptique. Le fractionnement de cet hydrolysate très complexe (63 peptides tryptiques en théorie), bien que long et délicat a permis l'obtention de peptides courts qui ont donné de précieuses informations sur la séquence de la protéine par leur recoupe-ment avec les peptides obtenus par action de la chymotrypsine et de la thermolysine sur la protéine native.

B - Maléylation de l'histone H<sub>5</sub>

1 - Principe de la maléylation

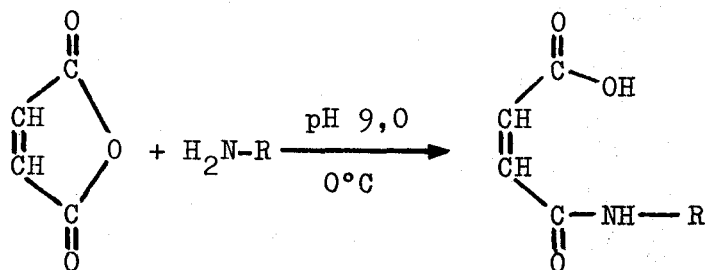
La maléylation est une technique de blocage des groupes ε-aminés des résidus de lysine, elle permet de limiter la spécificité d'action de la trypsine aux liaisons Arginyl-X (X représentant tous les amino-acides sauf la proline).

Nous avons utilisé la technique de BUTLER et al. (1969).

L'anhydride maléique réagit en milieu alcalin et à 0° C avec les groupements aminés libres des protéines. Les groupements hydroxyles, thiols ou imidazoles susceptibles de réagir, donnent des dérivés maléylés instables dans le milieu alcalin de réaction.

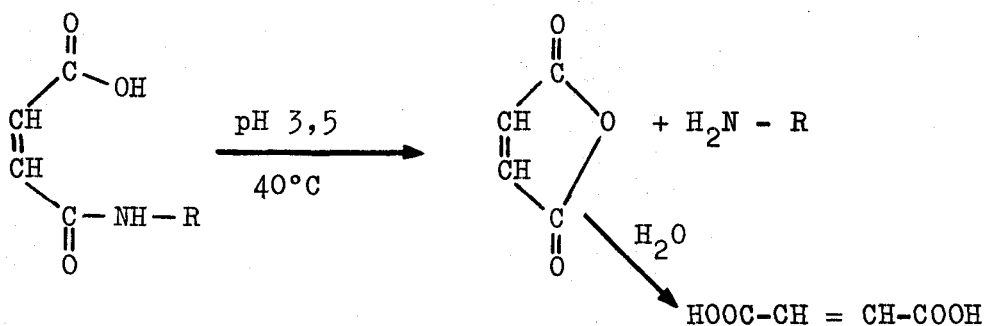
La spécificité de la réaction permet donc l'utilisation d'un gros excès d'anhydride maléique pour obtenir une substitution complète des groupes aminés libres de la protéine.

Le schéma de la réaction est le suivant :



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

Le schéma de la réaction est le suivant :



## 2 - Avantages de la maléylation

La maléylation des groupes  $\epsilon$ -aminés d'une protéine limite l'action de la trypsine aux seules liaisons arginyle. Dans le cas de l'histone H<sub>5</sub> qui contient 42 résidus de lysine et 21 résidus d'arginine, le nombre des peptides tryptiques obtenus est considérablement restreint.

Toutefois cet avantage est tempéré par le fait que les peptides obtenus sont généralement très basiques et que leur séparation nécessite la mise en oeuvre d'une méthodologie complexe.

Par les modifications des charges électriques de la protéine, la maléylation provoque un déroulement de la molécule permettant ainsi une action plus efficace et plus complète de la trypsine.

Un troisième avantage de la maléylation réside dans sa réversibilité.

## 3 - Maléylation de la protéine et du fragment NB-4

### a) Maléylation de l'histone H<sub>5</sub>

210 mg (soit environ 10 micromoles) d'histone H<sub>5</sub> sont dissous dans 30 ml de tampon phosphate dipotassique 0,1 M pH 9,0. La solution est maintenue à 0°C dans un bain thermostaté. On ajoute 480,2 mg d'anhydride maléique (10 micromoles par micromole de lysine) lentement, et sous agitation constante. Le pH est maintenu à 9,0 par addition de soude normale.

Quelques minutes après la dernière addition d'anhydride maléique, le pH du milieu réactionnel se stabilise à 9,0. La maléylation des groupes  $\epsilon$ -aminés est alors achevée.

Après une heure de réaction, la solution de protéine maléylée est dialysée contre de l'eau distillée (2 fois 1 litre) ajustée à pH 8,0 avec quelques gouttes d'ammoniaque, pendant deux heures ; puis contre une solution de bicarbonate d'ammonium 0,1 M pH 8,0 (2 fois 1 litre) pendant deux heures.

### b) Maléylation du fragment NB-4

234,3 mg (soit environ 15 micromoles) du fragment NB-4 sont dissous dans 30 ml de tampon phosphate dipotassique 0,1 M

pH 9,0.

Les conditions de maléylation sont identiques à celles de la protéine totale. 691,3 mg d'anhydride maléique ont été ajoutés ; le pH de la solution est maintenu à 9,0 au pH-stat au moyen de soude 2 N.

Le fragment NB-4 maléylé est ensuite dialysé dans des conditions semblables à celles de la protéine maléylée.

### C - Hydrolyse trypsique et démaléylation

#### 1 - Hydrolyse trypsique de la protéine maléylée et démaléylation

La protéine maléylée est hydrolysée à pH 8,0 et à 37°C pendant quatre heures avec la trypsine traitée par le T.P.C.K. (le T.P.C.K. ou Tosyl-Phénylalananyl-Chlorométhylcétone est un inhibiteur de la chymotrypsine).

La T.P.C.K.-trypsine est ajoutée au temps 0 (2,1 mg) et après 2 heures d'hydrolyse (2,1 mg). Le rapport final enzyme/substrat est de 1/50. Durant l'hydrolyse, le pH de la solution est maintenu à 8,0 au pH-stat par addition de soude normale.

Après 4 heures d'hydrolyse, 0,19 ml de soude N ont été ajoutés au milieu pour neutraliser les fonctions carboxyliques libérées par l'enzyme. Cela correspond à 19 liaisons arginyle hydrolysées en théorie.

L'arrêt de l'hydrolyse est obtenu par ajustement du pH de la solution à 3,5 au moyen d'une solution d'acide formique à 70 % (v : v).

La démaléylation est réalisée selon la technique de DELANGE et al. (1969). L'hydrolysate, auquel on ajoute 2 gouttes de toluène pour éviter le développement de micro-organismes, est laissé à pH 3,5 à 40° C pendant 40 heures puis lyophilisé.

## 2 - Hydrolyse trypsique du fragment NB-4 maléylé et démaléylation

Les conditions de l'hydrolyse du fragment NB-4 maléylé sont identiques à celles décrites précédemment. La T.P.C.K.-trypsine est ajoutée au temps 0 (2,3 mg) et au temps 2 heures (2,3 mg).

Après 4 heures d'hydrolyse, 4,8 ml de soude 0,05 N ont été ajoutés au milieu pour neutraliser les fonctions carboxyliques libérées par l'enzyme. Cela correspond à 16 liaisons arginyle libérées en théorie.

L'arrêt de l'hydrolyse et la démaléylation ont été menés comme précédemment.

## 3 - Hydrolyse trypsique de la protéine native

Nous avons soumis la protéine native à l'hydrolyse par la T.P.C.K.-trypsine. 161 mg d'histone H<sub>5</sub> (soit 7,3 micromoles environ) sont dissous dans 20 ml de tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M pH 8,0.

L'histone native est hydrolysée à pH 8,0 et à 37°C pendant 4 heures avec la trypsine traitée par le T.P.C.K. (rapport final enzyme/substrat : 1/50 en poids).

L'arrêt de l'hydrolyse est obtenu par abaissement du pH à 3,5 avec l'acide formique à 70 % (v/v).

L'hydrolysats est ensuite lyophilisé, la lyophilisation est répétée plusieurs fois après addition d'eau distillée, afin d'éliminer complètement le formiate d'ammonium formé lors de l'arrêt de l'hydrolyse.

## D - Isolement des peptides des hydrolysats trypsiques

### 1 - Fractionnement des peptides par chromatographie de tamisage moléculaire

La chromatographie de tamisage moléculaire sur colonne de Séphadex G25F (colonne de 200 x 2,5 cm équilibrée et éluée avec

HCl 0,01 N) a été utilisée pour le fractionnement des peptides tryptiques de l'histone H<sub>5</sub> maléylée.

L'hydrolysate tryptique de la protéine maléylée est dissous dans 6 ml d'HCl 0,01 N. Après élimination du matériel insoluble par centrifugation, le surnageant est déposé sur la colonne. Une pompe péristaltique assure un débit constant de 25,3 ml/heure. Le volume collecté par fraction est de 5,06 ml.

La détection des peptides s'effectue par lecture des densités optiques à 230 nm et 278 nm de chaque fraction de l'éluat.

## 2 - Fractionnement des peptides par chromatographie d'échanges ioniques sur Amberlite CG50 II

Par opposition aux résines sulfonées échangeuses de cations fortes, l'Amberlite CG50 II (SERVA) est une résine carboxylique échangeuse de cations faible, son utilisation offre beaucoup d'avantages pour le fractionnement des peptides très basiques obtenus par hydrolyse tryptique du fragment COOH-terminal NB-4 maléylé.

### a) Traitement de la résine

Un volume de résine est mis en suspension dans 10 volumes d'eau distillée. Après vingt minutes de décantation, les fines particules surnageantes sont éliminées. Cette opération est répétée une dizaine de fois.

Les différentes étapes du traitement de la résine Amberlite sont les suivantes :

- mise en suspension dans HCl 0,5 N sous agitation constante
- élimination de l'HCl et lavage à l'eau distillée sur filtre de verre fritté n°4 jusqu'à ce que les eaux de lavage soient à pH 6,0
- mise en suspension dans NaOH 0,5 N
- élimination de la soude et lavage à l'eau distillée jusqu'à obtention d'un pH voisin de 6,0
- mise en suspension dans HCl 0,5 N
- élimination de l'acide et lavage à l'eau distillée
- mise en suspension dans un tampon pyridine-acide acétique pH

- 6,0, 2 M en pyridine  
- équilibration dans un tampon pyridine-acide acétique 0,1 M pH 6,0 dans lequel la résine est équilibrée.

b) Séparation des peptides

L'hydrolysats trypsique lyophilisé du fragment NB-4 maléylé est dissous dans 6 ml de tampon pyridine-acide acétique pH 6,0, 0,1 M en pyridine.

L'échantillon est déposé sur une colonne d'Amberlite CG50 II de 50 x 1,2 cm équilibrée dans le même tampon pyridine-acide acétique 0,1 M pH 6,0.

L'élution des peptides est réalisée au débit de 20 ml/heure au moyen d'un gradient discontinu de tampons pyridine-acide acétique pH 6,0 de molarités croissantes en pyridine : 0,1 M ; 0,5 M ; 1 M ; 1,5 M ; 2 M.

Des fractions de 5 ml sont collectées. Les peptides sont repérés dans l'éluat par la réaction à la ninhydrine et la réaction de SAKAGUCHI (repérage des peptides contenant de l'arginine) réalisées à l'analyseur TECHNICON.

3 - Fractionnement des peptides par chromatographie d'échanges ioniques sur résine DOWEX 50 x 2

Nous avons utilisé la résine DOWEX 50 x 2 (résine CHROMO-BEADS P-TECHNICON) pour fractionner les peptides de l'hydrolysats trypsique de l'histone native.

En ce qui concerne l'histone maléylée, les fractions peptidiques hétérogènes obtenues par chromatographie de gel filtration de l'hydrolysats trypsique de la protéine maléylée d'une part et d'autre part les fractions peptidiques de basicité moyenne éluées de la colonne d'Amberlite CG50, de l'hydrolysats trypsique du fragment NB-4 maléylé, ont été purifiées au moyen de la résine DOWEX 50 x 2 CHROMO-BEADS P.

Les différentes fractions sont dissoutes dans 2 à 2,5 ml d'acide formique à 5 % (v : v) et centrifugées afin d'éliminer le matériel insoluble.

Le surnageant est ensuite déposé sur une colonne de résine CHROMOBEADS P. de 96 x 0,635 cm équilibrée en tampon pyridine-acide formique 0,1 M pH 2,9. La colonne est thermostatée à 59,5°C. Une pompe MILTON-ROY assure un débit constant de 33 ml/heure.

L'élution des peptides est réalisée dans un premier temps par un gradient continu de pH croissant : 2,9 à 5,0 ; et de molarité croissante en pyridine : 0,1 M à 2 M. La composition de ce gradient est indiquée dans le tableau IV (Pour le fractionnement des peptides tryptiques de l'histone native, nous avons modifié le volume du gradient en remplissant chaque cellule de 250 ml de tampon. Cette légère modification a facilité la séparation de nombreux peptides de cet hydrolysat).

La colonne est ensuite éluée pendant 24 heures avec un tampon pyridine-acide acétique 2 M pH 5,0 pour décrocher de la résine les peptides basiques.

Les peptides sont repérés dans l'éluat par la réaction à la ninhydrine, et la réaction de SAKAGUCHI (peptides contenant de l'arginine) réalisées à l'analyseur TECHNICON.



TABEAU IV

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 (MERCK) est purifiée par distillation sur ninhydrine (1 g/litre) et baryte anhydre (10 g/litre).



## E - Contrôle d'homogénéité des peptides et purifications

Chaque fraction peptidique est lyophilisée et dissoute dans 2 ml d'acide acétique 10 % (v : v).

Le contrôle d'homogénéité et la purification éventuelle des fractions peptidiques sont effectués par électrochromatographie sur papier WHATMAN 3 MM lavé pendant 48 heures avec une solution d'acide acétique à 10 %.

### 1 - Chromatographie

La chromatographie descendante est effectuée pendant 18 heures avec le solvant butanol-pyridine-acide acétique-eau (15/10/3/12) (v : v) que nous appellerons solvant "butanol-pyridine" pour la commodité de l'exposé. L'utilisation de rouge de phénol comme marqueur externe permet de situer le front de migration du solvant.

Pour purifier certains peptides nous avons utilisé la chromatographie descendante de 18 H avec le solvant butanol-acide acétique-eau (200/30/75) (v : v).

### 2 - Electrophorèse

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

Un mélange d'acides aminés témoins - acide aspartique, tyrosine, arginine - permet de déterminer le comportement électrophorétique acide, neutre ou basique des peptides. Les témoins tyrosine et arginine permettent en outre le contrôle des colorations spécifiques utilisées pour identifier les peptides renfermant ces amino-acides.

### 3 - Repérage des peptides sur la carte

Les peptides sont localisés sur l'électrochromatogramme avec le réactif ninhydrine-cadmium. Pour les peptides renfermant de l'arginine, nous avons utilisé la réaction à la phénanthrène-quinone décrite par YAMADA et al. (1966) et EASLEY et al. (1969). Les peptides contenant de l'arginine présentent une fluorescence bleue intense sous un rayonnement UV de 366 nm. Outre la simplicité de mise en oeuvre et la grande sensibilité, cette réaction a l'avantage d'être très stable (contrairement à la réaction de SAKAGUCHI), la fluorescence obtenue persiste plusieurs mois.

### 4 - Nomenclature des peptides

Dans le but de clarifier notre exposé nous avons nommé chaque fraction du diagramme d'élution des peptides de la colonne de Sephadex G25 par la lettre S suivie d'un chiffre indiquant l'ordre d'élution de la colonne.

Quant aux fractions éluées de la colonne de résine Amberlite CG50, elles sont nommées par la lettre A suivie d'un chiffre indiquant leur ordre d'élution de la colonne.

Les peptides tryptiques de l'histone H<sub>5</sub> native sont désignés par la lettre T.

Les peptides tryptiques de l'histone H<sub>5</sub> maléylée ou du fragment COOH-terminal NB-4 sont désignés par la lettre T<sub>m</sub>.

D'une manière générale, un chiffre indique ensuite l'ordre d'élution des peptides de la colonne de Chromobeads P.

Le mode de purification éventuelle est ensuite précisé par une lettre (purification par électrophorèse) ou un chiffre (purification par chromatographie) selon le cas.

#### Exemples :

Peptide T 24-1 : Peptide tryptique de l'histone H<sub>5</sub> native localisé dans la fraction 24 du diagramme d'élution de la colonne de Chromobeads P. Ce peptide a été ensuite purifié par chromatographie préparative.

Peptide Tm 9-A : Peptide tryptique de l'histone H<sub>5</sub> maléylée élué dans la fraction 9 du diagramme d'élu-tion de la colonne de Chromobeads P. Ce pep-tide est ensuite purifié par électrophorèse préparative.

Peptide A-5-Tm-2 : Peptide tryptique de l'histone H<sub>5</sub> maléylée localisé dans la fraction 5 du diagramme d'élu-tion de la colonne d'Amberlite CG50, purifié ensuite par chromatographie sur colon-ne de Chromobeads P. d'où il est élué dans la seconde fraction du diagramme.

## F - Techniques d'études de la séquence des peptides

### 1 - Composition en acides aminés

Les peptides sont hydrolysés, en tubes scellés sous vide, en milieu HCl 6 N à 110°C pendant 24 heures. Lorsque la présence de la tyrosine est soupçonnée, l'addition d'une goutte de phénol à 1 % à l'hydrolysats permet d'éviter une dégradation importante de cet amino-acide.

Le dosage des acides aminés libérés est effectué à l'aide d'un analyseur d'acides aminés BECKMAN type Multichrom équipé d'un intégrateur INFOTRONICS (modèle CRS 210).

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

La dansylation des peptides est réalisée selon le proto-cole de GRAY et HARTLEY (1963). Les dansyl-peptides sont ensuite hy-drolysés en milieu HCl 6 N, pendant 18 heures à 105°C. Pour éviter la dégradation des dansylamino-acides hydroxylés (Sérine et Thréoni-ne), l'hydrolyse est alors effectuée sous vide pendant 16 heures.

Les dansylamino-acides sont identifiés sur couche mince de gel de silice (Silicagel MERCK), soit en chromatographie monodi-mensionnelle selon la technique de STEHELIN et DURANTON (1969) avec

un seul système solvant, soit en chromatographie bidimensionnelle avec les systèmes solvants I et II préconisés par GROS et LABOUESSE (1969).

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

Nous utilisons les carboxypeptidases A et B. Les acides aminés libérés de façon récurrente sont identifiés par dosage à l'analyseur d'acides aminés.

### 4 - Dégradation des peptides par la méthode de EDMAN (1956)

La schématisation des différentes étapes de la dégradation de EDMAN est présentée dans la tableau V.

Après chaque cycle de dégradation, l'acide aminé libéré peut être identifié directement sous forme de son dérivé PTH ou indirectement en déterminant la composition en acides aminés du peptide résiduel (méthode dite soustractive) (HIRS, MOORE et STEIN, 1960).

La dansylation selon le protocole de GRAY et HARTLEY (1963), associée à la dégradation de EDMAN permet l'identification de l'acide aminé en position  $\text{NH}_2$ -terminale dans le peptide qui apparaît après chaque cycle de dégradation.

SCHEMATISATION DES DIFFERENTES  
ETAPES DE LA DEGRADATION DE EDMAN

Réaction de couplage du peptide avec le P.I.T.C. (Phénylisothiocyanate)

↓  
Elimination de l'excès de P.I.T.C.

↓  
Cyclisation et coupure par l'acide trifluoro-acétique

7 mn 50°C

↓  
Formation du dérivé 2-anilinothiazolinone

HCl N 80°C 10 mn

↓  
Phénylthiohydantoïne de l'acide aminé

Extraction par l'acétate d'éthyle

↙  
Phase organique

↘  
Phase aqueuse

Séparation des phénylthiohydantoïne-amino-acides par chromatographie sur couche mince de gel de silice à l'aide des système solvants D et E (EDMAN et al., 1956)

- Solvant E :  
Acétate de butyle/eau/formamide/  
acide propionique (97/3/4/3)(v:v)
- Solvant D :  
La plaque est trempée dans un  
mélange acétone-formamide
- Xylène

Phénylthiohydantoïne-arginine  
Phénylthiohydantoïne histidine

Electrophorèse à pH 3,6

Identification sur papier

- Réaction à la phénanthrène-quinone  
(détection de l'arginine)  
(YAMADA et al., 1966)  
(EASLEY et al., 1969)
- Réaction de PAULY  
(détection de l'histidine)

TABLEAU V

## CHAPITRE TROISIEME

### RESULTATS - DISCUSSIONS

- I - ETUDE DES PEPTIDES TRYPSIQUES DE LA PROTEINE NATIVE.
- II - ETUDE DES PEPTIDES TRYPSIQUES DE LA PROTEINE MALEYLEE.
- III - ETUDE DES PEPTIDES TRYPSIQUES DU FRAGMENT COOH-TERMINAL NB-4 MALEYLE.

I - ETUDE DES PEPTIDES TRYPSIQUES DE L'HISTONE H<sub>5</sub> NATIVE

Le diagramme d'élu-tion des peptides de l'hydrolysate tryptique de l'histone H<sub>5</sub> native est présenté dans la figure 5.

Comme le laissait présager le nombre de sites potentiels d'action de la trypsine (63 environ), le diagramme est complexe et comprend 55 fractions dont beaucoup sont hétérogènes. 17 fractions présentent une réaction de SAKAGUCHI positive et contiennent des peptides contenant de l'arginine.

La composition en amino-acides et la séquence des peptides sont respectivement présentés dans les tableaux VI (a,b,c,d,e,) et VII (a,b,c,).

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

- \* Dansylation — placé au-dessus du résidu d'acide aminé
- \* Dégradation de EDMAN — placé au-dessus du résidu d'acide aminé
- \* Hydrolyse par les carboxypeptidases ← placé au-dessous du résidu d'acide aminé.

Tous les peptides tryptiques que nous avons isolés ont un résidu de lysine ou d'arginine en position COOH-terminale.

Fraction T<sub>5</sub>

Cette fraction est uniquement constituée de lysine libre que nous avons analysée avant et après hydrolyse. La lysine libre est obtenue avec un rendement de 100 % par rapport à la quantité de protéine soumise à l'hydrolyse tryptique.

Peptide T<sub>7-A</sub> (résidus 98 à 100 ; 17)\*

Ser-Asp-Lys

(\* ) Entre parenthèses figure la localisation du peptide 7-A du résidu 98 au résidu 100 de la moitié NH<sub>2</sub>-terminale de la molécule. Le chiffre 17 indique que ce peptide occupe la position 17 dans l'ordre de la séquence en amino-acides de la protéine.



DIAGRAMME D'ELUTION DES PEPTIDES TRYPSIQUES DE L'HISTONE H<sub>5</sub>

NATIVE FRACTIONNES SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P

D.O. 570 nm

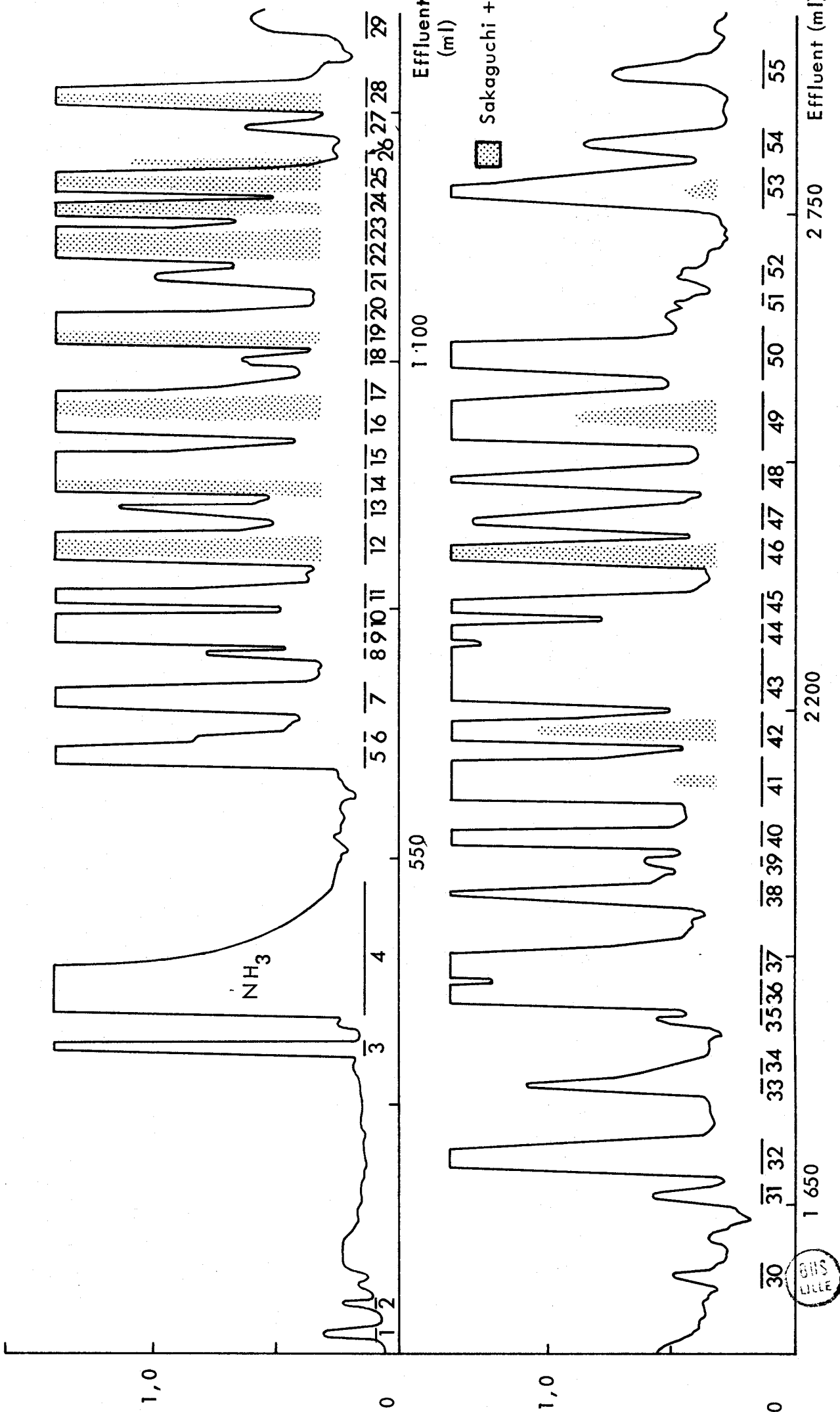


FIGURE 5

TABLEAU VI - a

COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES ISOLES DE L'HYDROLYSAT

TRYPSIQUE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> NATIVE

(exprimés en rapports molaires)\*

Amino-acides	T <sub>7-A</sub>	T <sub>7-B</sub>	T <sub>9</sub>	T <sub>10-A</sub>	T <sub>10-B</sub>	T <sub>11-A</sub>	T <sub>11-B</sub>	T <sub>12-A</sub>	T <sub>13-B</sub>	T <sub>14-A</sub>
Acide Aspartique	1,14(1)									
Thréonine		1,07(1)		0,86(1)						
Sérine	0,83(1)	1,97(2)	0,97(1)	1,84(2)		0,96(1)	1,01(1)	1,87(2)	1,26(1)	
Acide Glutamique				1,21(1)	1,07(1)					
Proline		0,84(1)	1,03(1)	2,87(3)		1,04(1)			0,99(1)	
Glycine								2,07(2)	0,60(1)	1,11(1)
Alanine			1,03(1)	2,10(2)	0,99(1)	0,91(1)	1,03(1)			2,01(1)
Valine				1,06(1)						0,96(1)
Méthionine										
Isoleucine										
Leucine				2,06(2)						2,97(3)
Tyrosine										
Phénylalanine										
Histidine										
Lysine	1,03(1)	1,11(1)	0,97(1)	1,99(2)	0,94(1)	1,08(1)	0,96(1)		0,74(1)	0,95(1)
Arginine								1,06(1)		
Nombre de résidus	3	5	4	14	3	4	3	5	4	8

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

TABLEAU VI - b

COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES ISOLES DE L'HYDROLYSAT

TRYPSIQUE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> NATIVE

(exprimés en rapports molaires)\*

Amino-acides	T <sub>14-B</sub>	T <sub>14-C</sub>	T <sub>14-D</sub>	T <sub>16-1-A</sub>	T <sub>16-2</sub>	T <sub>17-C</sub>	T <sub>18-1</sub>	T <sub>18-4</sub>	T <sub>19-2-A</sub>	T <sub>19-3-A</sub>
Acide Aspartique								1,04(1)		1,99(2)
Thréonine	0,99(1)	1,01(1)								
Sérine				0,90(1)		1,02(1)		1,03(1)		
Acide Glutamique										1,11(1)
Proline										
Glycine				1,08(1)						1,14(1)
Alanine	1,94(2)		1,01(1)	1,03(1)	1,04(1)	0,97(1)	3,15(3)	1,10(1)	1,92(2)	1,05(1)
Valine		0,92(1)								0,92(1)
Méthionine										
Isoleucine							1,85(2)			0,98(1)
Leucine					0,98(1)					1,06(1)
Tyrosine										
Phénylalanine										
Histidine										0,81(1)
Lysine		1,07(1)	0,99(1)		0,98(1)			1,83(2)		0,93(1)
Arginine	1,06(1)			0,98(1)		1,01(1)	1,65(1)		1,07(1)	
Nombre de résidus	4	3	2	4	3	3	6	5	3	10

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



COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES ISOLEES DE L'HYDROLYSAT

TRYPSIQUE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> NATIVE

(exprimés en rapports molaires)\*

Amino-acides	T 19-3-B	T 19-4	T 21-A	T 22-B	T 24-2	T 25-2	T 26	T 28-A	T 32-A	T 33
Acide Aspartique										
Thréonine			1,06(1)							
Séérine		1,83(2)	2,94(3)	1,01(1)				1,03(1)		0,91(1)
Acide Glutamique			1,18(1)							
Proline			1,00(1)				0,97(1)			0,87(1)
Glycine		3,03(3)								0,99(1)
Alanine		1,07(1)	4,26(4)		1,00(1)	1,00(1)				
Valine	0,98(1)	1,05(1)			1,01(1)					
Méthionine			0,87(1)							
Isoleucine			1,97(2)					0,98(1)	1,09(1)	
Leucine								0,99(1)		
Tyrosine			0,74(1)						0,82(1)	
Phénylalanine		1,00(1)								
Histidine			0,97(1)							
Lysine	1,02(1)									
Arginine		1,01(1)	1,01(1)	1,00(1)	0,99(1)	1,00(1)	1,03(1)	1,00(1)	1,07(1)	2,23(2)
Nombre de résidus	2	9	16	2	3	2	2	4	3	5

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

1955  
1111

TABLEAU VI - d

COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES ISOLES DE L'HYDROLYSAT

TRYPSIQUE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> NATIVE

(exprimés en rapports molaires)\*

Amino-acides	T <sub>36</sub>	T <sub>37</sub>	T <sub>38-A</sub>	T <sub>40</sub>	T <sub>41-C</sub>	T <sub>42</sub>	T <sub>44</sub>	T <sub>45</sub>	T <sub>46-A</sub>	T <sub>46-B</sub>
Acide Aspartique										
Thréonine			0,89(1)							
Sérine	0,93(1)	1,05(1)	1,76(2)			1,01(1)				
Acide Glutamique										
Proline		0,94(1)	1,23(1)		1,21(1)	0,82(1)				1,01(1)
Glycine									1,23(1)	
Alanine	1,01(1)			1,05(1)	1,00(1)			1,85(2)	1,93(2)	2,09(2)
Valine							0,98(1)		0,91(1)	
Méthionine										
Isoleucine										
Leucine									2,76(3)	
Tyrosine										
Phénylalanine										
Histidine										
Lysine	2,05(2)	2,00(2)	0,82(1)	1,95(2)	4,00(4)	1,20(1)	2,00(2)	1,18(1)	0,92(1)	
Arginine			1,29(1)			0,97(1)		0,97(1)	1,24(1)	1,90(2)
Nombre de résidus	4	4	6	3	6	4	3	4	9	5

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

BOIS  
LITE

TABLEAU VI - e

COMPOSITION EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES ISOLES DE L'HYDROLYSAT

TRYPSIQUE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> NATIVE

(exprimés en rapports molaires)\*

Amino-acides	T <sub>47-1</sub>	T <sub>47-2</sub>	T <sub>48</sub>	T <sub>49-C</sub>	T <sub>50-1</sub>	T <sub>50-2</sub>	T <sub>53-2</sub>	T <sub>53-3</sub>	T <sub>54</sub>	T <sub>55</sub>
Acide Aspartique										
Thréonine										
Sérine	1,03(1)				0,75(1)	0,85(1)				
Acide Glutamique										
Proline									0,84(1)	
Glycine										
Alanine		0,76(1)	1,00(1)	0,98(1)					1,10(1)	
Valine		1,03(1)						1,03(1)		
Méthionine										
Isoleucine										
Leucine										
Tyrosine						0,95(1)				
Phénylalanine										
Histidine						1,01(1)				
Lysine	0,73(1)	0,91(1)	1,02(1)	0,94(1)	1,16(1)	1,03(1)	1,00(1)	1,00(1)	3,06(3)	1,06(1)
Arginine	1,23(1)	1,29(1)	0,98(1)	1,08(1)	1,09(1)		1,00(1)	0,97(1)		0,94(1)
Nombre de résidus	3	4	3	3	3	4	2	3	5	2

**BUS**  
LILLE

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

TABLEAU VII - a

SEQUENCES EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES TRYPSIQUES DE L'HISTONE H<sub>5</sub> NATIVE

T <sub>7-A</sub>	(résidus 98 à 100)	$\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Asp}}-\text{Lys}$
T <sub>7-B</sub>		$\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Thr}}-\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Pro}}-\text{Lys}$
T <sub>9</sub>		$\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Pro}}-\text{Lys}$
T <sub>10-A</sub>	(résidus 1 à 14)	$\overrightarrow{\text{Thr}}-\overrightarrow{\text{Glu}}-\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Leu}}-\overrightarrow{\text{Val}}-\overrightarrow{\text{Leu}}-\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Pro}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Pro}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Lys}}-\overrightarrow{\text{Pro}}-\text{Lys}$
T <sub>10-B</sub>	(résidus 38 à 40)	$\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Glu}}-\text{Lys}$
T <sub>11-A</sub>		$\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Pro}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\text{Lys}$
T <sub>11-B</sub>		$\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Ser}}-\text{Lys}$
T <sub>12-A</sub>	(résidus 43 à 47)	$\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Arg}}$
T <sub>13-B</sub>	(résidus 104 à 107)	$\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Pro}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\text{Lys}$
T <sub>14-A</sub>	(résidus 75 à 82)	$\overrightarrow{\text{Leu}}-\overrightarrow{\text{Leu}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Val}}-\overrightarrow{\text{Leu}}-\text{Lys}$
T <sub>14-B</sub>		$\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Thr}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Arg}}$
T <sub>14-C</sub>		$\overrightarrow{\text{Thr}}-\overrightarrow{\text{Val}}-\text{Lys}$
T <sub>14-D</sub>	(résidus 101-102 et 110-111)	$\overrightarrow{\text{Ala}}-\text{Lys}$
T <sub>16-1-A</sub>		$\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Arg}}$
T <sub>16-2</sub>	(résidus 95 à 97)	$\overrightarrow{\text{Leu}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\text{Lys}$
T <sub>17-C</sub>	(résidus 18 à 20)	$\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Arg}}$
T <sub>18-1</sub>	(résidus 32 à 37)	$\overrightarrow{\text{Ile}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Ile}}-\overrightarrow{\text{Arg}}$
T <sub>18-4</sub>	(résidus 98 à 102)	$\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Asp}}-\overrightarrow{\text{Lys}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\text{Lys}$



TABLEAU VII - b

SEQUENCES EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES TRYPSIQUES DE L'HISTONE H<sub>5</sub> NATIVE

T 19-2-A		<u>Ala-Ala-Arg</u>
T 19-3-A	(résidus 60 à 69)	<u>Val-Gly-His-Asn-Ala-Asp-Leu-Gln-Ile-Lys</u>
T 19-3-B		<u>Val-Lys</u>
T 19-4	(résidus 86 à 94)	<u>Gly-Val-Gly-Ala-Gly-Ser-Ser-Phe-Arg</u>
T 21-A	(résidus 22 à 37)	<u>Ser-Ala-Ser-His-Pro-Thr-Tyr-Ser-Glu-Met-Ile-Ala-Ala-Ile-Arg</u>
T 22-B	(résidus 41 à 42)	<u>Ser-Arg</u>
T 24-2		<u>Ala-Val-Arg</u>
T 25-2		<u>Ala-Arg</u>
T 26		<u>Pro-Arg</u>
T 28-A	(résidus 70 à 73)	<u>Leu-Ser-Ile-Arg</u>
T 32-A	(résidus 53 à 55)	<u>Tyr-Ile-Lys</u>
T 33	(résidus 104 à 108)	<u>Ser-Pro-Gly-Lys-Lys</u>
T 36		<u>Lys-Ala-Ser-Lys</u>
T 37		<u>Lys-Ser-Pro-Lys</u>
T 38-A		<u>Arg-Ser-Thr-Ser-Pro-Lys</u>
T 40		<u>Ala-Lys-Lys</u>
T 41-C		<u>Lys-Pro-Lys et Lys-Ala-Lys</u>





TABLEAU VII - c

SEQUENCES EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES TRYPSIQUES DE L'HISTONE H<sub>5</sub> NATIVE

T <sub>42</sub>		$\overline{\text{Ser}}-\overline{\text{Lys}}-\overline{\text{Pro}}-\overline{\text{Arg}}$
T <sub>44</sub>		$\overline{\text{Lys}}-\overline{\text{Val}}-\overline{\text{Lys}}$
T <sub>45</sub>		$\overline{\text{Lys}}-\overline{\text{Ala}}-\overline{\text{Ala}}-\overline{\text{Arg}}$
T <sub>46-A</sub>	(résidus 74 à 82)	$\overline{\text{Arg}}-\overline{\text{Leu}}-\overline{\text{Leu}}-\overline{\text{Ala}}-\overline{\text{Ala}}-\overline{\text{Gly}}-\overline{\text{Val}}-\overline{\text{Leu}}-\overline{\text{Lys}}$
T <sub>46-B</sub>		$\overline{\text{Ala}}-\overline{\text{Ala}}-\overline{\text{Arg}}-\overline{\text{Pro}}-\overline{\text{Arg}}$
T <sub>47-1</sub>		$\overline{\text{Lys}}-\overline{\text{Ser}}-\overline{\text{Arg}}$
T <sub>47-2</sub>		$\overline{\text{Lys}}-\overline{\text{Ala}}-\overline{\text{Val}}-\overline{\text{Arg}}$
T <sub>48</sub>	(résidus 101 à 103)	$\overline{\text{Ala}}-\overline{\text{Lys}}-\overline{\text{Arg}}$
T <sub>49-C</sub>		$\overline{\text{Lys}}-\overline{\text{Ala}}-\overline{\text{Arg}}$
T <sub>50-1</sub>		$\overline{\text{Ser}}-\overline{\text{Arg}}-\overline{\text{Lys}}$
T <sub>50-2</sub>	(résidus 56 à 59)	$\overline{\text{Ser}}-\overline{\text{His}}-\overline{\text{Tyr}}-\overline{\text{Lys}}$
T <sub>53-2</sub>		$\overline{\text{Lys}}-\overline{\text{Arg}}$
T <sub>53-3</sub>	(résidus 15 à 17)	$\overline{\text{Arg}}-\overline{\text{Val}}-\overline{\text{Lys}}$
T <sub>54</sub>		$\overline{\text{Ala}}-\overline{\text{Lys}}-\overline{\text{Lys}}-\overline{\text{Pro}}-\overline{\text{Lys}}$
T <sub>55</sub>		$\overline{\text{Arg}}-\overline{\text{Lys}}$

Composition en amino-acides :

Asp	Ser	Lys
1,14	0,83	1,03
(1)	(1)	(1)*

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

DNS-Ser

Dégradation de EDMAN :

Un cycle de dégradation de EDMAN associé à la dansylation du peptide résiduel a permis d'établir la séquence Ser-Asp-Lys.

Ce peptide contient l'un des trois résidus d'acide aspartique de la molécule.

Peptide T<sub>7</sub>-B

Ser (Thr, Ser, Pro) Lys.

Composition en amino-acides :

Thr	Ser	Pro	Lys
1,07	1,97	0,84	1,11
(1)	(2)	(1)	(1)

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

DNS-Ser

La séquence de ce peptide a été déduite des travaux effectués sur le peptide S-5-Tm2-B obtenu à partir de l'hydrolysate trypsique de la protéine maléylée.

Peptide T<sub>9</sub>

Ala-Ser-Pro-Lys.

Composition en amino-acides :

Ser	Pro	Ala	Lys
0,97	1,03	1,03	0,97
(1)	(1)	(1)	(1)

\* Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre entier de résidus.

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

DNS-Ala

Dégradation de EDMAN :

Trois cycles de dégradation de EDMAN utilisée en méthode soustractive ont permis d'établir la séquence du peptide T<sub>9</sub>.

Composition :	Ser	Pro	Ala	Lys
	0,97	1,03	1,03	0,97
1er cycle :	1,01	1,10	<u>0,00</u>	0,90
2ème cycle :	<u>0,01</u>	1,30	-	0,70
3ème cycle :	-	<u>0,01</u>	-	1,00

La séquence du peptide T<sub>9</sub> est donc : Ala-Ser-Pro-Lys

Peptide T<sub>10-A</sub> (résidus 1 à 14 ; 1)

Thr-Glu-Ser-Leu-Val-Leu-Ser-Pro-Ala-Pro-Ala-Lys-Pro-Lys.

Composition en amino-acides :

Thr	Ser	Glu	Pro	Ala	Val	Leu	Lys
0,86	1,84	1,21	2,87	2,10	1,06	2,06	1,99
(1)	(2)	(1)	(3)	(2)	(1)	(2)	(2)

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

DNS-Thr.

La composition en amino-acides de ce peptide, remarquable par la présence de 3 résidus de Proline et de 2 résidus de leucine est caractéristique du peptide NH<sub>2</sub>-terminal de la molécule dont la séquence a été établie par GREENAWAY et al. (1971).

Après dansylation du peptide et détermination du dansylamino-acide par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince, nous avons mis en évidence le DNS-Thr. Bien que toutes les précautions aient été prises pour éviter une destruction importante du DNS-Thr, (Hydrolyse sous vide après purges à l'azote, temps d'hydrolyse limité à 15 h) la faible tache de DNS-Thr retrouvée suggère un blocage partiel de l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale de la protéine, vraisemblablement réalisé par une acétylation du groupe α-aminé de la protéine ainsi que l'ont signalé EDWARDS et HNILICA (1968) et JOHNS et DIGGLE (1969).

Nous pensons en apporter la démonstration en soumettant le peptide T<sub>10-A</sub> à la spectroscopie de RMN.

Peptide T<sub>10-B</sub> (résidus 38 à 40 ; 5)

Ala-Glu-Lys.

Composition en amino-acides :

Glu	Ala	Lys
1,07	0,99	0,94
(1)	(1)	(1)

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

DNS-Ala.

Dégradation de EDMAN :

La dansylation du peptide résiduel après un cycle de dégradation de EDMAN a permis d'identifier le DNS-Glu. La séquence du peptide T<sub>10-B</sub> est donc Ala-Glu-Lys.

Le peptide Ala-Glu-Lys correspond à la partie NH<sub>2</sub>-terminale du peptide Ala-Glu-Lys-Ser-Arg isolé de l'hydrolysat trypsique de la protéine maléylée.

La localisation de ce peptide dans la séquence de la protéine a été déterminée par la dégradation automatique de EDMAN pratiquée sur le fragment CN-2.

Peptide T<sub>11-A</sub>

Ser-Pro-Ala-Lys.

Composition en amino-acides :

Ser	Pro	Ala	Lys
0,96	1,04	0,91	1,08
(1)	(1)	(1)	(1)

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

DNS-Ser.

Dégradation de EDMAN :

Trois cycles de dégradation de EDMAN utilisée en méthode soustractive ont permis d'établir la séquence de ce peptide.

	Ser	Pro	Ala	Lys
Composition :	0,96	1,04	0,91	1,08
1er cycle :	<u>0,00</u>	1,09	0,90	1,01
2ème cycle :		<u>0,00</u>	1,40	0,68
3ème cycle :			<u>0,00</u>	1,00

La position COOH-terminale de la lysine est évidente par la spécificité d'action de la trypsine.

Ce peptide est localisé dans la moitié COOH-terminale de la protéine.

Peptide T<sub>11</sub>-B

Ala-Ser-Lys.

Composition en amino-acides :

Ser	Ala	Lys
1,01	1,03	0,96
(1)	(1)	(1)

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

DNS-Ala.

La position médiane de la Sérine dans la séquence de ce peptide est évidente : la séquence est donc Ala-Ser-Lys.

Ce peptide est localisé dans la moitié COOH-terminale de la molécule.

Peptide T<sub>12</sub>-A (résidus 43 à 47 ; 7)

Gly-Gly-Ser-Ser-Arg.

Composition en amino-acides :

Ser	Gly	Arg
1,87	2,07	1,06
(2)	(2)	(1)

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

DNS-Gly.

Dégradation de EDMAN :

Deux cycles de dégradation de EDMAN associée à la dansylation du peptide résiduel ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale Gly-Gly-Ser. La position du second résidu de Sérine a été vérifiée par l'analyse en acide aminé du peptide résiduel après un troisième cycle de dégradation de EDMAN.

La séquence de ce peptide est donc Gly-Gly-Ser-Ser-Arg. Les résultats acquis par la dégradation automatique de EDMAN du fragment CN-2 ont permis de localiser ce peptide du résidu 43 au résidu 47 dans la moitié NH<sub>2</sub>-terminale de la protéine.

Fraction T<sub>12-B</sub>

Cette fraction est uniquement constituée d'arginine libre, dosée à l'analyseur d'acides aminés avant et après hydrolyse chlorhydrique.

L'arginine libre a été obtenue avec un rendement de 175 % par rapport à la quantité de protéine soumise à l'hydrolyse tryptique.

Peptide T<sub>13-B</sub> (résidus 104 à 107 ; 19)

Ser-(Pro,Gly)-Lys.

Composition en amino-acides :

Ser	Pro	Gly	Lys
1,26	0,99	0,60	0,74
(1)	(1)	(1)	(1)

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

DNS-Ser.

La séquence de ce peptide sera discutée lors de la présentation du peptide T<sub>33</sub> qui ne diffère du peptide T<sub>13-B</sub> que par la présence d'un résidu de lysine supplémentaire.

Peptide T<sub>14-A</sub> (résidus 75 à 82 ; 13)

Leu-(Leu,Ala,Ala,Gly,Val,Leu)-Lys

Composition en amino-acides :

Gly	Ala	Val	Leu	Lys
1,11	2,01	0,96	2,97	0,95
(1)	(1)	(1)	(3)	(1)

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

DNS-Leu.

La composition de ce peptide qui renferme trois résidus de Leucine est caractéristique de la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide T<sub>m</sub> isolé de la fraction S-3 et contenant l'unique résidu de phénylalanine présent dans l'histone H<sub>5</sub>.

Leu-Leu-Ala-Ala-Gly-Val-Leu-Lys.

Peptide T<sub>14-B</sub>

Ala-Thr-Ala-Arg.

Composition en amino-acides :

Thr	Ala	Arg
0,99	1,94	1,06
(1)	(2)	(1)

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

DNS-Ala.

Dégradation de EDMAN :

Trois cycles de dégradation de EDMAN avec identification des PTH-amino-acides libérés ont permis d'établir la séquence Ala-Thr-Ala.

La position COOH-terminale de l'arginine découle de la spécificité d'action de la trypsine. La séquence du peptide T<sub>14-B</sub> est donc Ala-Thr-Ala-Arg.

Ce peptide est localisé dans la moitié COOH-terminale de la protéine.

Peptide T<sub>14</sub>-C

Thr-Val-Lys.

Composition en amino-acides :

Thr	Val	Lys
1,01	0,92	1,07
(1)	(1)	(1)

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

DNS-Thr.

La position COOH-terminale de la lysine découle de la spécificité d'action de la trypsine. La séquence de ce peptide est donc Thr-Val-Lys.

Peptide T<sub>14</sub>-D (résidus 101-102 et 110-111 ; 18 et 20)

Ala-Lys.

Composition en amino-acides :

Ala	Lys
1,01	0,99
(1)	(1)

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

DNS-Ala.

La séquence du peptide T<sub>14</sub>-D est donc Ala-Lys.  
Ce peptide a été obtenu avec un rendement de 100 % par rapport à la quantité de protéine hydrolysée par la trypsine.  
Si l'on se réfère au peptide T<sub>12</sub>-A : Gly-Gly-Ser-Ser-Arg, obtenu avec un rendement de 45 % par rapport à la quantité de protéine hydrolysée, il existe au moins quatre séquences Ala-Lys au sein de la protéine dont deux que nous avons pu localiser aux résidus 101-102 et 110-111 dans la moitié NH<sub>2</sub>-terminale de la molécule.



Peptide T<sub>16-1-A</sub>

Ser-(Gly,Ala)-Arg.

Composition en amino-acides :

Ser	Gly	Ala	Arg
0,90	1,08	1,03	0,98
(1)	(1)	(1)	(1)

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

DNS-Ser.

La séquence de ce peptide a été déduite des travaux effectués sur le peptide S-4-Tm4 isolé de l'hydrolysate trypsique de la protéine maléylée.

Ser-Gly-Ala-Arg

Ce peptide contient le dernier résidu de glycine présent dans la moitié COOH-terminale de la molécule (résidus 112 à 185).

Peptide T<sub>16-2</sub> (résidus 95 à 97 ; 16)

Leu-Ala-Lys.

Composition en amino-acides :

Ala	Leu	Lys
1,04	0,98	0,98
(1)	(1)	(1)

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

DNS-Leu.

Dégradation de EDMAN :

Un cycle de dégradation de EDMAN avec dansylation du peptide résiduel a permis de déterminer la séquence Leu-Ala.

La position COOH-terminale de la lysine découle de la spécificité d'action de la trypsine. La séquence est donc Leu-Ala-Lys.

Peptide T<sub>17-C</sub> (résidus 18 à 20 ; 3)

Ala-Ser-Arg.

Composition en amino-acides :

Ser	Ala	Arg
1,02	0,97	1,01
(1)	(1)	(1)

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

DNS-Ala.

La position COOH-terminale de l'arginine découle de la spécificité de la trypsine.

La séquence du peptide est donc Ala-Ser-Arg.

Peptide T<sub>18-1</sub> (résidus 32 à 36)

Ile-Ala-Ala-Ala-Ile-Arg.

Composition en amino-acides :

Ala	Ile	Arg
3,15	1,85	1,65
(3)	(2)	(1)

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

DNS-Ile.

La composition de ce peptide qui renferme trois résidus d'alanine et deux résidus d'isoleucine est caractéristique de la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du fragment CN-2.

L'obtention de ce peptide, isolé avec un très faible rendement, résulte d'une coupure de la liaison Met<sup>31</sup>-Ile<sup>32</sup> qui témoigne ainsi d'une faible activité "chymotrypsine like" de la trypsine pourtant traitée par le T.P.C.K.

Peptide T<sub>18-4</sub> (résidus 98 à 102 ; 17 et 18)

Ser-Asp-Lys-Ala-Lys.

Composition en amino-acides :

Asp	Ser	Ala	Lys
1,04	1,03	1,10	1,83
(1)	(1)	(1)	(2)

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

DNS-Ser.

La séquence en amino-acides de ce peptide a été déduite de la séquence du peptide T<sub>7-A</sub> (résidus 98 à 100) Ser-Asp-Lys.

La dansylation ayant permis d'identifier la Sérine en position NH<sub>2</sub>-terminale, le deuxième résidu de lysine ne peut qu'occuper la position COOH-terminale par la spécificité d'action de la trypsine.

La séquence du peptide T<sub>18-4</sub> est donc : Ser-Asp- Lys-Ala-Lys. L'hydrolyse incomplète de la liaison lysyl-alanine 100-101 est probablement due à la présence d'un résidu d'acide aspartique au voisinage du site d'action de la trypsine.

Peptide T<sub>19-2-A</sub>

Ala-Ala-Arg.

Composition en amino-acides :

Ala	Arg
1,92	1,07
(2)	(1)

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

DNS-Ala.

La séquence du peptide T<sub>19-2-A</sub> ne peut être que Ala-Ala-Arg, l'arginine étant placée en position COOH-terminale par la spécificité d'action de la trypsine.

Peptide T<sub>19-3-A</sub> (résidus 60 à 69 ; 11)

Val-(Gly,His,Asn,Ala,Asp,Leu,Gln,Ile)-Lys.

Composition en amino-acides :

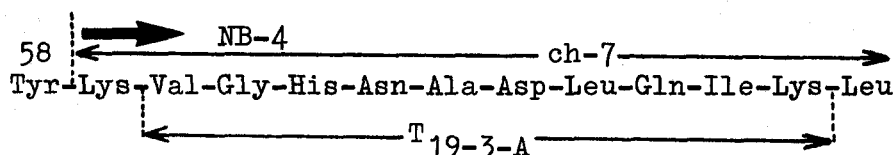
Asp	Glu	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	His	Lys
1,99	1,11	1,14	1,05	0,92	0,98	1,06	0,81	0,93
(2)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)

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

DNS-Val.

Ce peptide caractérisé par la présence de deux résidus d'acide aspartique et d'un résidu d'histidine se place dans la partie NH<sub>2</sub>-terminale du fragment NB-4. Sa séquence a été déduite de celle du peptide Ch 7 : (\*)

Lys-Val-Gly-His-Asn-Ala-Asp-Leu-Gln-Ile-Lys-Leu



Peptide T<sub>19-3-B</sub>

Val-Lys.

Composition en amino-acides :

Val	Lys
0,98	1,02
(1)	(1)

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

DNS-Val.

La séquence de ce peptide est évidente : Val-Lys. La Lysine étant placée en position COOH-terminale par la spécificité d'action de la trypsine.

Ce peptide peut provenir de deux sites différents au sein de la molécule. Il peut être placé au niveau des résidus 16 et 17 dans le cas de l'histone H<sub>5</sub> possédant une arginine en position 15 et il peut provenir de la partie COOH-terminale de la molécule où une séquence Lys-Val-Lys a été déterminée (voir le peptide T<sub>44</sub>).

(\*) Ref : Publication I (GAREL et al., 1975).

Peptide T<sub>19-4</sub> (résidus 86 à 94 ; 15)

Gly-(Val,Gly,Ala,Gly,Ser,Ser,Phe)-Arg.

Composition en amino-acides :

Ser	Gly	Ala	Val	Phe	Arg
1,83	3,03	1,07	1,05	1,00	1,01
(2)	(3)	(1)	(1)	(1)	(1)

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

DNS-Gly.

Ce peptide correspond à la séquence COOH-terminale du peptide T<sub>m</sub> isolé de la fraction S-3 et contenant l'unique résidu de phénylalanine présent dans l'histone H<sub>5</sub>.

Gly-Val-Gly-Ala-Gly-Ser-Ser-Phe-Arg.

Peptide T<sub>21-A</sub> (résidus 22 à 37 ; 4)

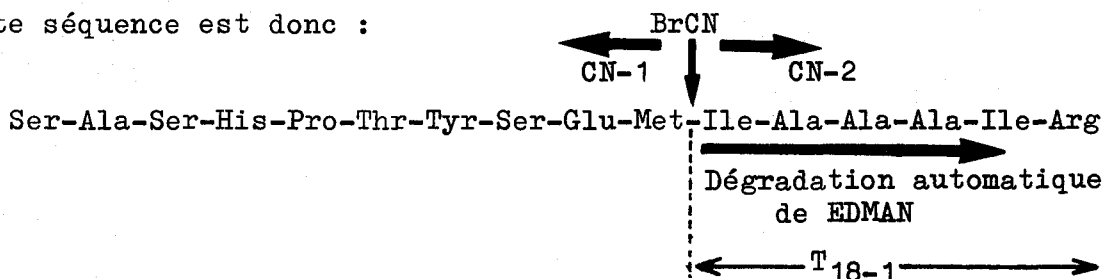
Composition en amino-acides :

Thr	Ser	Glu	Pro	Ala	Met	Ile	Tyr	His	Arg
1,06	2,94	1,18	1,00	4,26	0,87	1,97	0,74	0,97	1,01
(1)	(3)	(1)	(1)	(4)	(1)	(2)	(1)	(1)	(1)

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

DNS-Ser.

Ce peptide caractérisé par la présence de l'unique résidu de méthionine présent dans l'histone H<sub>5</sub>, recouvre donc la partie COOH-terminale du fragment CN-1 et la partie NH<sub>2</sub>-terminale du fragment CN-2. La séquence a été déduite des travaux de GREENAWAY et MURRAY (1971) sur le fragment CN-1 et des résultats que nous avons acquis en soumettant le fragment CN-2 à la dégradation automatique de EDMAN. Cette séquence est donc :



Peptide T<sub>22</sub>-B (résidus 41 et 42 ; 6)

Ser-Arg.

Composition en amino-acides :

Ser	Arg
1,01	1,00
(1)	(1)

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

DNS-Ser.

La séquence de ce peptide est donc : Ser-Arg.

Peptide T<sub>24</sub>-2

Ala-Val-Arg.

Composition en amino-acides :

Ala	Val	Arg
1,00	1,01	0,99
(1)	(1)	(1)

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

DNS-Ala.

Dégradation de EDMAN :

Un cycle de dégradation de EDMAN associée à la dansylation du peptide résiduel a permis l'identification de la DNS-Val.

La position COOH-terminale de l'arginine découle de la spécificité d'action de la trypsine.

La séquence de ce peptide est donc : Ala-Val-Arg.

Peptide T<sub>25</sub>-2

Ala-Arg.

Composition en amino-acides :

Ala	Arg
1,00	1,00
(1)	(1)

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

DNS-Ala.

La séquence de ce peptide est donc : Ala-Arg.

Peptide T26

Le repérage de ce peptide dans l'éluat de la colonne de CHROMOBEADS P. n'a pu être effectué que par la réaction de SAKAGUCHI Pro-Arg.

Composition en amino-acides :

Pro	Arg
0,97	1,03
(1)	(1)

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

DNS-Pro.

Dégradation de EDMAN :

Un cycle de dégradation de EDMAN utilisée en méthode soustractive a permis de confirmer sans ambiguïté la position NH<sub>2</sub>-terminale de la proline.

La séquence du peptide T-26 est donc Pro-Arg.

S'il était encore besoin d'une confirmation sur la position NH<sub>2</sub>-terminale de la proline, la coloration spécifique à l'isatine (isatine à 0,2 % dans l'acétone) nous l'a donnée après électrophorèse sur papier Whatman 3 MM à pH 3,6 en présence d'un témoin proline, témoignant ainsi de la position NH<sub>2</sub>-terminale de la proline.

Ce peptide a été obtenu avec un rendement de 100 % par rapport au peptide Gly-Gly-Ser-Ser-Arg.

Ce résultat est assez étonnant, quand on sait que les liaisons Lys-Pro ou Arg-Pro ne sont pas hydrolysées par la trypsine. Il est permis de penser qu'une conformation spatiale particulière existe dans l'environnement de cette séquence, rendant possible la coupure par l'enzyme d'une liaison Arg-Pro ou Lys-Pro.

Le peptide T-26 pourrait provenir de l'hydrolyse partielle de la séquence Ala-Ala-Arg-Pro-Arg qui correspond au peptide T-46B isolé dans le même hydrolysats tryptique.

Peptide T<sub>28-A</sub> (résidus 70 à 73 ; 12)

Leu-Ser-Ile-Arg.

Composition en amino-acides :

Ser	Ile	Leu	Arg
1,03	0,98	0,99	1,00
(1)	(1)	(1)	(1)

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

DNS-Leu.

Dégradation de EDMAN :

Deux cycles de dégradation de EDMAN avec identification des PTH-amino-acides libérés ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale Leu-Ser.

La composition en amino-acides du peptide résiduel a permis de confirmer cette séquence.

Le résidu d'arginine a été placé à l'extrémité COOH-terminale en raison de la spécificité de la trypsine. Le résidu d'isoleucine a été placé par différence.

La séquence du peptide T<sub>28-A</sub> est donc Leu-Ser-Ile-Arg.

Peptide T<sub>32-A</sub> (résidus 53 à 55 ; 9)

Tyr-Ile-Lys.

Composition en amino-acides :

Ile	Tyr	Lys
1,09	0,82	1,07
(1)	(1)	(1)

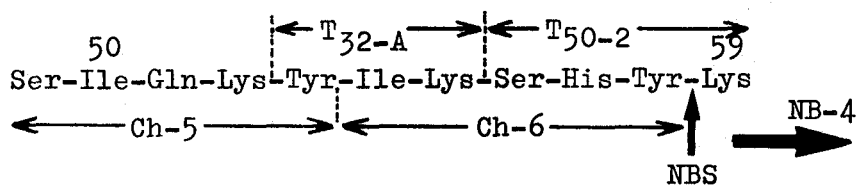
Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal :

DNS-Tyr.

La position COOH-terminale de la lysine découle de la spécificité d'action de la trypsine. Le résidu d'isoleucine a été placé par différence. Ce peptide recouvre partiellement les séquences des peptides Ch-5 et Ch-6 (\*).

(\*) Ref : Publication I (GAREL et al., 1975).





Peptide T-33 (résidus 104 à 108)

Ser-Pro-Gly-Lys-Lys.

Composition en amino-acides :

Ser	Pro	Gly	Lys
0,91	0,87	0,99	2,23
(1)	(1)	(1)	(2)

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

DNS-Ser.

Dégradation de EDMAN :

Trois cycles de dégradation de EDMAN utilisée en méthode soustractive ont permis d'établir la séquence Ser-Pro-Gly.

	Ser	Pro	Gly	Lys
Composition :	0,91	0,87	0,99	2,23
1er cycle :	<u>0,45</u>	0,94	1,14	1,92
2ème cycle :	-	<u>0,10</u>	1,38	1,61
3ème cycle :	-	-	<u>0,30</u>	1,50

Le second résidu de lysine est placé par différence et la séquence du peptide T-33 est donc Ser-Pro-Gly-Lys-Lys.

L'hydrolyse partielle de la liaison Lys-Lys par la trypsine libère de la lysine et le peptide T-13-B : Ser-Pro-Gly-Lys que nous avons isolé dans ce même hydrolysat.

Fraction T<sub>35</sub>

Cette fraction est uniquement constituée de lysine.

La présence de lysine dans cette fraction alors que les peptides isolés des fractions voisines T<sub>33</sub> et T<sub>36</sub> ont tous deux résidus de lysine dans leur séquence, permet de penser qu'il s'agirait du dipeptide Lys-Lys.

Nous pensons pouvoir le démontrer dans un proche avenir en soumettant cette fraction à la dinitrophénylation suivie de la détermination quantitative à l'analyseur d'acides aminés de l'ε-Mono-dinitrophényl-lysine formée.

Peptide T-36

Lys-Ala-Ser-Lys.

Composition en amino-acides :

Ser	Ala	Lys
0,93	1,01	2,05
(1)	(1)	(2)

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

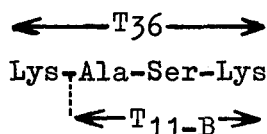
di-DNS-Lys.

Dégradation de EDMAN :

Trois cycles de dégradation de EDMAN avec identification des PTH-amino-acides ont permis d'établir la séquence Lys-Ala-Ser.

Le second résidu de lysine présent dans le peptide est placé en position COOH-terminale en raison de la spécificité de la trypsine.

La séquence est donc :



L'hydrolyse partielle de la liaison Lys-Ala par la trypsine libère de la lysine et le peptide T<sub>11</sub>-B : Ala-Ser-Lys que nous avons isolé de ce même hydrolysats.

Peptide T-37

Lys-Ser-Pro-Lys.

Composition en amino-acides :

Ser	Pro	Lys
1,05	0,94	2,00
(1)	(1)	(2)

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

di-DNS-Lys.

Dégradation de EDMAN :

Trois cycles de dégradation de EDMAN avec identification des PTH-amino-acides ont permis d'établir la séquence Lys-Ser-Pro.

Le second résidu de lysine présent dans le peptide est placé en position COOH-terminale en raison de la spécificité de la trypsine.

La séquence du peptide T-37 est donc : Lys-Ser-Pro-Lys.

Peptide T-38-A

Arg-Ser-Thr-Ser-Pro-Lys.

Composition en amino-acides :

Thr	Ser	Pro	Lys	Arg
0,89	1,76	1,23	0,82	1,29
(1)	(2)	(1)	(1)	(1)

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

DNS-Arg.

La composition en acides aminés de ce peptide, caractérisée par la présence d'un résidu de thréonine doit être rapprochée de celle du peptide T<sub>7B</sub> : Ser-Thr-Ser-Pro-Lys dont elle ne diffère que par la présence d'un résidu d'arginine.

Nous en avons déduit que la séquence du peptide T<sub>38-A</sub> ne peut être que Arg-Ser-Thr-Ser-Pro-Lys.

Peptide T-40

Ala-Lys-Lys.

Composition en amino-acides :

Ala	Lys
1,05	1,95
(1)	(2)

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

DNS-Ala.

Dégradation de EDMAN :

Deux cycles de dégradation de EDMAN utilisée en méthode soustractive ont permis d'établir la séquence : Ala-Lys-Lys.

Fraction T-41-C

Lys-Ala-Lys et Lys-Pro-Lys.

Composition en amino-acides :

Pro	Ala	Lys
1,21	1,00	4,00
(1)	(1)	(4)

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

di-DNS-Lys.

L'élution de cette fraction contenant quatre résidus de lysine au voisinage du peptide T-40 : Ala-Lys-Lys qui n'en contient que deux, nous a amené à suspecter la présence de deux peptides de structure analogue dans la fraction T-41-C.

Ces deux peptides ont un résidu de lysine en position NH<sub>2</sub>-terminale puisque seule la di-DNS-Lys a été identifiée par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince.

Un cycle de dégradation de EDMAN utilisée avec la dansylation des peptides résiduels nous a permis d'identifier deux dansylamino-acides DNS-Pro et DNS-Ala avec une prédominance très nette de DNS-Pro.

Après action de la carboxypeptidase B pendant deux heures sur la fraction T-41-C, un seul résidu de lysine est libéré.

Nous avons pu déduire de ces résultats que les deux peptides présents dans la fraction T-41-C ont pour séquence :

Lys-Pro-Lys

et Lys-Ala-Lys.

Nous avons pu calculer en outre, que le peptide Lys-Pro-Lys constitue 64 % de cette fraction alors que le peptide Lys-Ala-Lys n'en représente que 36 %.

Peptide T-42

Ser-Lys-Pro-Arg.

Composition en amino-acides :

Ser	Pro	Lys	Arg
1,01	0,82	1,20	0,97
(1)	(1)	(1)	(1)

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

DNS-Ser.

La séquence de ce peptide a été déduite des résultats obtenus sur un peptide tryptique de la protéine maléylée : S5-Tm14-B dont la séquence a été déterminée par trois cycles de dégradation de EDMAN associée à la dansylation du peptide résiduel : Ser-Lys-Pro-Arg.

Les peptides T-42 et S5-Tm14-B ont en effet une position identique dans l'éluat de la colonne, un comportement identique en électrochromatographie, une composition en acides aminés identique et le même résidu NH<sub>2</sub>-terminal.

Remarque :

L'obtention du peptide T-26 : Pro-Arg pourrait éventuellement s'expliquer par une hydrolyse de la liaison Lys-Pro du peptide T-42. Cependant nous n'avons jamais isolé de ce fractionnement, le peptide Ser-Lys. Ceci nous amène à penser que le peptide T-26 ne peut pas provenir d'une hydrolyse partielle du peptide T-42 par la trypsine.

Fraction T-43-C

Cette fraction est uniquement constituée de lysine. La dinitrophénylation de cette fraction suivie du dosage de l'ε-mono-dinitrophényllysine formée, à l'analyseur d'acides aminés, pourra nous permettre de préciser s'il s'agit d'un dipeptide Lys-Lys ou tripeptide Lys-Lys-Lys.

Peptide T-44

Lys-Val-Lys.

Composition en amino-acides :

Val	Lys
0,98	2,00
(1)	(2)

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

di-DNS-Lys

Dégradation de EDMAN :

Une dégradation de EDMAN en méthode soustractive a permis d'établir sans ambiguïté la séquence Lys-Val-Lys.

Peptide T-45

Lys-Ala-Ala-Arg.

Composition en acides aminés :

Ala	Lys	Arg
1,85	1,18	0,97
(2)	(1)	(1)

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

di-DNS-Lys.

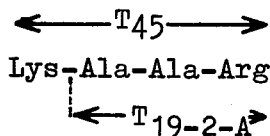
Dégradation de EDMAN :

Une dégradation de EDMAN en méthode soustractive a permis d'établir sans ambiguïté la position NH<sub>2</sub>-terminale de la lysine.

La position COOH-terminale de l'arginine découle de la spécificité de la trypsine.

La séquence du peptide T-45 est donc Lys-Ala-Ala-Arg.

L'hydrolyse partielle de la liaison Lys-Ala du peptide T-45 libère de la lysine et le peptide T<sub>19-2-A</sub> que nous avons isolé de ce même fractionnement.



Peptide T<sub>46</sub>-A (résidus 74 à 82)

Arg-Leu-Leu-Ala-Ala-Gly-Val-Leu-Lys.

Composition en amino-acides :

Gly	Ala	Val	Leu	Lys	Arg
1,23	1,93	0,91	2,76	0,92	1,24
(1)	(2)	(1)	(3)	(1)	(1)

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

DNS-Arg.

La composition de ce peptide qui renferme trois résidus de leucine est caractéristique de la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide T<sub>m</sub> isolé de la fraction S-3 et contenant l'unique résidu de phénylalanine présent dans l'histone H<sub>5</sub>.

L'hydrolyse partielle de la liaison Arg-Leu du peptide T<sub>46</sub>-A libère de l'arginine ainsi que le peptide T<sub>14</sub>-A : Leu-Leu-Ala-Ala-Gly-Val-Leu-Lys que nous avons isolé de ce même fractionnement.

Peptide T<sub>46</sub>-B

Ala-Ala-Arg-Pro-Arg.

Composition en amino-acides :

Pro	Ala	Arg
1,01	2,09	1,90
(1)	(2)	(2)

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

DNS-Ala.

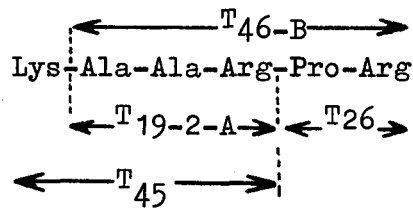
Dégradation de EDMAN :

Deux cycles de dégradation de EDMAN, associée à la dansylation du peptide résiduel nous ont permis d'établir la séquence Ala-Ala-Arg. La position COOH-terminale du second résidu d'arginine découle de la spécificité de la trypsine.

Quatre cycles de dégradation de EDMAN utilisée en méthode soustractive ont permis de confirmer les résultats précédents et de placer la proline en quatrième position.

	:	Pro	Ala	Arg
Composition :		1,01	2,09	1,90
2ème cycle :		1,01	<u>0,00</u>	1,98
3ème cycle :		0,88	-	<u>1,13</u>
4ème cycle :		<u>0,00</u>	-	1,00

La séquence du peptide T-46-B est donc : Ala-Ala-Arg-Pro-Arg.  
 Cette séquence recouvre celle des peptides T<sub>19-2-A</sub>, T<sub>26</sub> et T<sub>45</sub> selon le schéma présenté ci-après.



Peptide T-47-1

Lys-Ser-Arg.

Composition en amino-acides :

Ser	Lys	Arg
1,03	0,73	1,23
(1)	(1)	(1)

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

di-DNS-Lys.

La position COOH-terminale du résidu d'arginine découle de la spécificité d'action de la trypsine. Le résidu de sérine est placé par différence.

La séquence est donc : Lys-Ser-Arg.

Peptide T-47-2

Lys-Ala-Val-Arg.

Composition en amino-acides :

Ala	Val	Lys	Arg
0,76	1,03	0,91	1,29
(1)	(1)	(1)	(1)



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

di-DNS-Lys.

La séquence de ce peptide a été déduite de celle du peptide  
T<sub>24-2</sub> Ala-Val-Arg.

Peptide T-48 (résidus 101-103 ; 18)

Ala-Lys-Arg.

Composition en amino-acides :

Ala	Lys	Arg
1,00	1,02	0,98
(1)	(1)	(1)

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

DNS-Ala.

Dégradation de EDMAN :

Deux cycles de dégradation de EDMAN avec identification des  
PTH-amino-acides ont permis d'établir la séquence :

Ala-Lys-Arg,

le résidu d'arginine étant placé par différence.

Peptide T-49-C

Lys-Ala-Arg

Composition en amino-acides :

Ala	Lys	Arg
0,98	0,94	1,08
(1)	(1)	(1)

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

di-DNS-Lys.

Dégradation de EDMAN :

Deux cycles de dégradation de EDMAN utilisée en méthode sous-  
tractive ont permis d'établir la séquence Lys-Ala-Arg.

Le résidu d'arginine étant placé par différence.

Peptide T-50-1

Ser-Arg-Lys.

Composition en amino-acides :

Ser	Lys	Arg
0,75	1,16	1,09
(1)	(1)	(1)

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

DNS-Ser.

Dégradation de EDMAN :

Un cycle de dégradation de EDMAN associée à la dansylation du peptide résiduel a permis d'établir la séquence Ser-Arg-Lys. (le DNS-Arg identifié par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince a donné une réaction de SAKAGUCHI positive après pulvérisation du chromatogramme :

- 1°) par une solution de 8-hydroxyquinoléine à 0,1 % dans l'acétone ;
- 2°) après séchage, par une solution d'hypobromite de sodium préparée extemporanément en dissolvant 0,2 ml de brome dans 100 ml de soude 0,5 N. La tâche de DNS-Arg a viré au rouge orangé).

Peptide T-50-2 (résidus 56 à 59 ; 10)

Ser-His-Tyr-Lys.

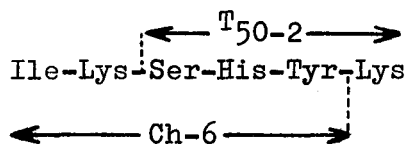
Composition en amino-acides :

Ser	Tyr	His	Lys
0,85	0,95	1,01	1,03
(1)	(1)	(1)	(1)

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

DNS-Ser.

La séquence de ce peptide a été déduite de la séquence du peptide chymotrypsogique Ch-6 (\*).



Peptide T-53-2

Lys-Arg.

Composition en amino-acides :

Lys	Arg
1,00	1,00
(1)	(1)

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

di-DNS-Lys.

Dégradation de EDMAN :

Un cycle de dégradation de EDMAN a permis de mettre en évidence la PTH-Lysine formée tandis que l'arginine a été identifiée dans l'hydrolysat total du résidu obtenu après un cycle de dégradation.

La séquence du peptide T-53-2 est donc Lys-Arg.

Peptide T-53-3 (résidus 15 à 17 ; 2)

Arg-Val-Lys.

Composition an acides aminés :

Val	Lys	Arg
1,03	1,00	0,97
(1)	(1)	(1)

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

DNS-Arg.

(\*) Ref : Publication I (GAREL et al., 1975).

Dégradation de EDMAN :

La position NH<sub>2</sub>-terminale de l'arginine a été confirmée par un cycle de dégradation de EDMAN suivi de l'analyse des acides aminés du peptide résiduel.

La lysine a été placée en position COOH-terminale en raison de la spécificité de la trypsine. Le résidu de Valine a été placé par différence.

La présence d'une microhétérogénéité au niveau du résidu 15 de la molécule qui peut être Arginine ou glutamine entraîne l'obtention de deux peptides : Arg-Val-Lys et Gln-Val-Lys (résidus 15 à 17). Le peptide Gln-Val-Lys n'a pu être repéré sur le diagramme d'élution, vraisemblablement à cause de la transformation de la glutamine en acide pyroglutamique qui ne réagit pas avec la ninhydrine.

Peptide T-54

Ala-Lys-Lys-Pro-Lys.

Composition en amino-acides :

Pro	Ala	Lys
0,84	1,10	3,06
(1)	(1)	(3)

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

DNS-Ala.

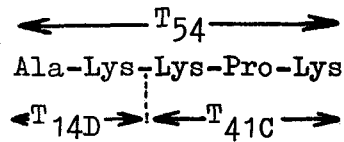
Dégradation de EDMAN :

Trois cycles de dégradation de EDMAN utilisée en méthode soustractive ont permis d'établir la séquence Ala-Lys-Lys.

	Pro	Ala	Lys
Composition :	0,84	1,10	3,06
1er cycle :	1,24	<u>0,19</u>	2,76
2ème cycle :	1,29	-	<u>1,71</u>
3ème cycle :	1,19	-	0,81

Le troisième résidu de lysine doit être placé en position COOH-terminale en raison de la spécificité de la trypsine. Le résidu de proline est placé par différence.

La séquence du peptide T-54 est donc : Ala-Lys-Lys-Pro-Lys.  
Ce peptide recouvre les peptides T-14-D et T-41-C suivant le schéma  
indiqué dans la figure ci-après.



Peptide T-55

Arg-Lys.

Composition en amino-acides :

Lys	Arg
1,06	0,94
(1)	(1)

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

DNS-Arg.

La séquence du peptide T-55 est donc Arg-Lys.

Discussion à propos de l'étude des peptides tryptiques de l'histone H<sub>5</sub>

Nous avons pu isoler tous les peptides de la moitié NH<sub>2</sub>-terminale de la molécule (résidus 1 à 111) (SAUTIERE et al., 1976) (Publication III) à l'exception de trois d'entre eux :

- Gln-Val-Lys (résidus 15 à 17)
- Gln-Ser-Ile-Gln-Lys (résidus 48 à 52)
- Gln-Thr-Lys (résidus 83 à 85).

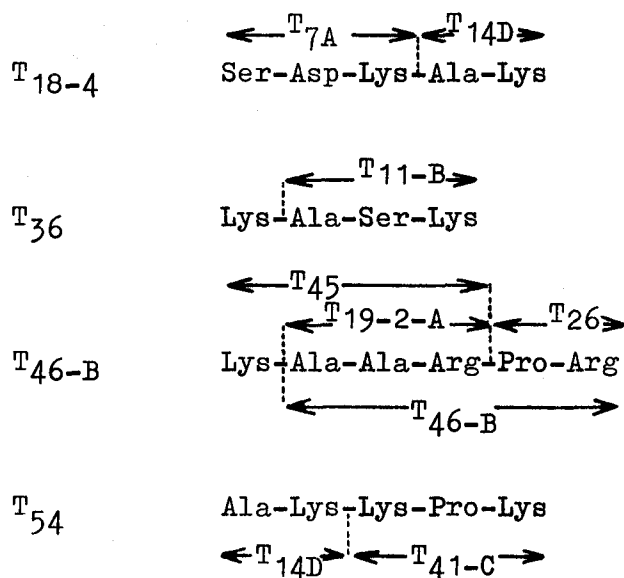
Tous ces peptides, dont la glutamine occupe la position NH<sub>2</sub>-terminale, n'ont pu être repérés sur le diagramme d'élu-tion après réaction avec la ninhydrine vraisemblablement à cause de la cyclisa-tion de la glutamine en acide pyroglutamique. En outre la composition de ces peptides est telle qu'il n'est pas possible de les repérer à l'aide d'une réaction spécifique.

L'action de la trypsine sur la moitié NH<sub>2</sub>-terminale de la mo-lécule libère de longs peptides : cette partie de la protéine renfer-me, en effet, peu de lysine et d'arginine. Par contre l'hydrolyse tryptique de la moitié COOH-terminale de l'histone H-5 libère de nom-breux peptides courts : la séquence Ala-Lys (Peptide T14-D) en parti-culier est obtenue avec un tel rendement (500 % par rapport au pepti-de Gly-Gly-Ser-Ser-Arg, obtenu avec le meilleur rendement d'hydrolyse) que l'on peut suggérer l'existence d'au moins quatre séquences Ala-Lys dans cette partie de la molécule.

La présence de nombreuses liaisons Lys-Lys et Arg-Arg permet difficilement d'établir un bilan précis du nombre de sites de coupu-res par la trypsine. Nous obtenons par exemple, de la lysine libre et de l'arginine libre (respectivement dans les fractions T-5 et T12-B), or si nous nous référons aux rendements par rapport au peptide Gly-Gly-Ser-Ser-Arg, nous pouvons avoir au moins 5 séquences Lys-Lys ou Arg-Lys car la lysine libre est obtenue avec un rendement de 500 %. Quant à l'Arginine libre, le rendement d'obtention est de 600 % soit 6 séquences Arg-Arg ou Lys-Arg (2 séquences Arg-Arg sont localisées dans la moitié NH<sub>2</sub>-terminale de la molécule : 20-21 et 73-74).

Il faut noter aussi l'obtention de lysine dans les fractions T<sub>35</sub> et T<sub>43-C</sub> dont la situation au sein de l'éluat de la colonne de CHROMOBEADS P. et dont le comportement en électrochromatographie est très basique, conduit à penser qu'il s'agirait de dipeptide Lys-Lys (T<sub>35</sub>) et de tripeptide Lys-Lys-Lys (T<sub>43-C</sub>). Ceci traduit l'existence de centres basiques importants dans la région COOH-terminale de la protéine.

Le troisième point de notre discussion concerne les peptides T<sub>18-4</sub>, T<sub>36</sub>, T<sub>46-B</sub> et T<sub>54</sub> provenant de l'hydrolyse partielle par la trypsine de liaisons lysyle ou arginyle.



L'obtention du peptide T<sub>46-B</sub> s'est avérée très précieuse pour la détermination de la séquence du peptide A-5-Tm5-A isolé de l'hydrolysat trypsique du fragment NB-4 maléylé.

## II - ETUDE DES PEPTIDES TRYPSIQUES DE L'HISTONE H<sub>5</sub> MALEYLEE

Le diagramme d'élution des peptides de l'hydrolysate tryptique de l'histone maléylée, fractionné sur colonne de Sephadex G25 est présenté dans la figure 6.

Les peptides sont élués en six fractions hétérogènes dont la sixième correspond en fait à du formiate d'ammonium.

Les fractions ont été nommées par la lettre S suivie d'un chiffre indiquant leur ordre d'élution de la colonne de Sephadex G25.

### A - Etude de la fraction S-1

Cette fraction contient plusieurs peptides très riches en acides aminés basiques : lysine et arginine.

Les différents systèmes de purification (Sephadex G50 - électrochromatographie - électrophorèse en veine liquide) que nous avons utilisés ne nous ont pas permis de séparer ces peptides.

Toutefois, cet échec partiel nous a obligé à utiliser une méthodologie nouvelle, en particulier le fractionnement sur résine amberlite CG50 des peptides tryptiques du fragment COOH-terminal NB-4 maléylé.

### B - Etude de la fraction S-2

Un peptide a été isolé de cette fraction par électrophorèse et chromatographie préparatives.



DIAGRAMME D'ELUTION DES PEPTIDES TRYPSIQUES DE L'HISTONE H<sub>5</sub> MALEYLEE  
FRACTIONNES SUR COLONNE DE SEPHADEX G 25 F

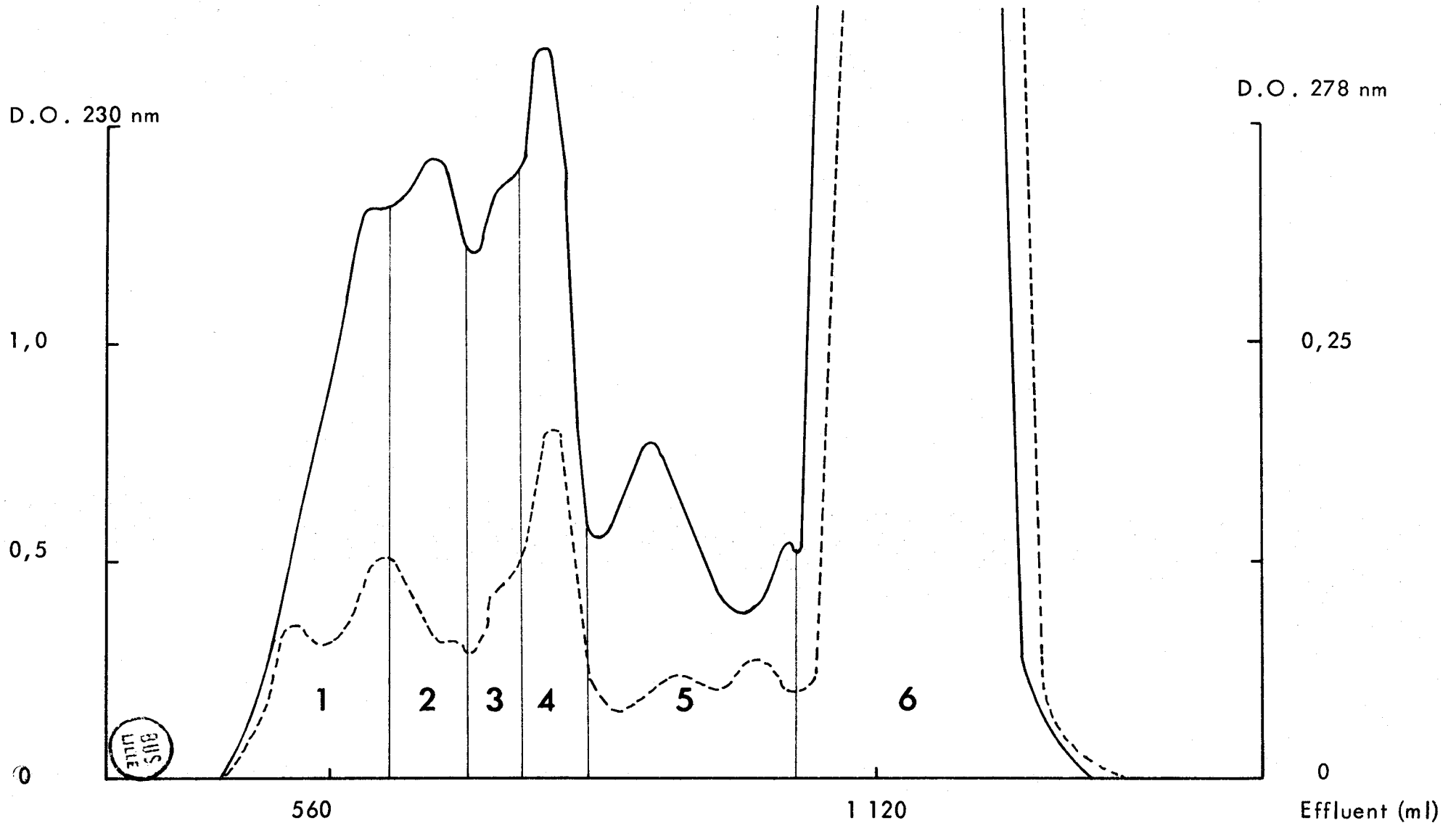


FIGURE 6

Peptide S-2-Tm

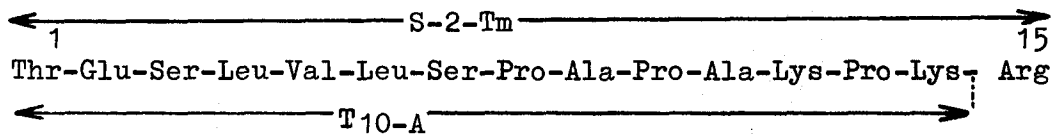
Thr-Glu-Ser-Leu-(Val,Leu,Ser,Pro,Ala,Pro,Ala,Lys,Pro,Lys)-Arg.

Composition en amino-acides :

Thr	Ser	Glu	Pro	Ala	Val	Leu	Lys	Arg
0,86	1,96	1,25	2,93	2,09	1,07	2,02	1,91	0,95
(1)	(2)	(1)	(3)	(2)	(1)	(2)	(2)	(1)

La présence de trois résidus de proline et de deux résidus de leucine est caractéristique du peptide NH<sub>2</sub>-terminal de la protéine dont la séquence a été établie par GREENAWAY et MURRAY (1971).

Quatre cycles de dégradation de Edman avec identification des PTH-amino-acides, ont permis de confirmer la localisation de ce peptide :



La maléylation du résidu de lysine 14 permet l'obtention de ce peptide à partir de l'histone H<sub>5</sub> dont le résidu 15 est de l'arginine.

Nous n'avons pas pu isoler le peptide provenant de l'histone H<sub>5</sub> dont le résidu 15 est de la glutamine, dans ce cas, la séquence du peptide tryptique de l'histone maléylée devrait comprendre les résidus 1 à 20.

C - Etude de la fraction S-3

Le peptide contenant l'unique résidu de phénylalanine présent dans l'histone H<sub>5</sub> a été isolé dans cette fraction.

Composition en amino-acides :

Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Leu	Phe	Lys	Arg
1,08	1,67	1,37	3,61	3,00	1,95	3,08	0,74	2,02	1,46
(1)	(2)	(1)	(4)	(3)	(2)	(3)	(1)	(2)	(1)

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

DNS-Leu.

La séquence du peptide S-3-Tm a été déterminée à l'aide d'un séquenceur S.O.C.O.S.I. La dégradation automatique de EDMAN a été réalisée en phase liquide sur 400 nanomoles de ce peptide avec la diméthylallylamine comme tampon de couplage.

Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 7.

Les ambiguïtés qui restaient à résoudre au niveau des résidus de sérine et de glycine dans la partie COOH-terminale du peptide ont été levées par l'isolement des peptides obtenus par action de la chymotrypsine et de la protéase staphylococcique sur la protéine.

La séquence du peptide S-3-Tm est présentée dans la figure 8.

Nous avons isolé du fractionnement des peptides tryptiques de la protéine native, les peptides T-14-A et T-19-4 qui recouvrent respectivement les parties NH<sub>2</sub>- et COOH-terminales du peptide S-3-Tm. Nous avons déjà discuté dans notre étude des peptides tryptiques de la protéine native des raisons pour lesquelles nous n'avons pu obtenir le peptide tryptique médian : Gln-Thr-Lys.

SEQUENCE AMINO-TERMINALE DU PEPTIDE S-3-Tm  
DETERMINEE PAR LA DEGRADATION AUTOMATIQUE DE EDMAN

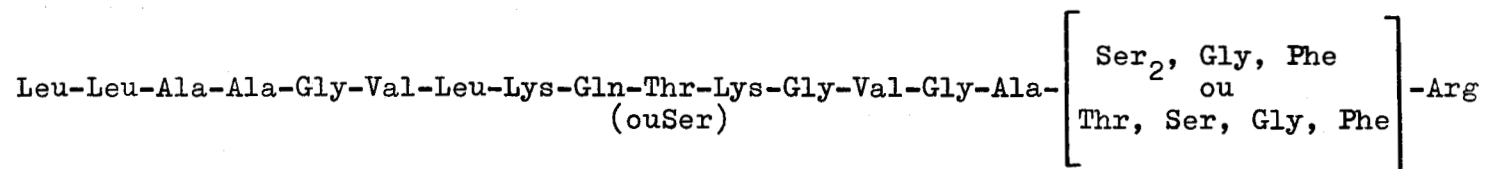


FIGURE 7



SEQUENCE EN AMINO-ACIDES DU PEPTIDE S-3-Tm

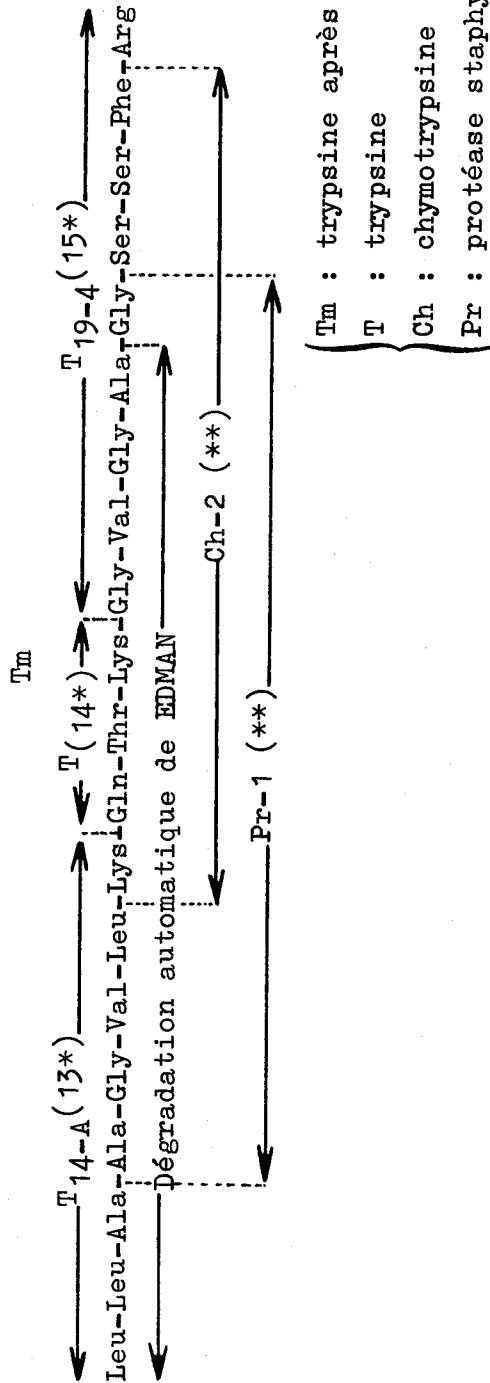


FIGURE 8

- (\*) Les chiffres entre parenthèses indiquent l'ordre des peptides dans la séquence de la protéine.
- (\*\*) Les nomenclatures indiquées sont celles de la Publication II (SAUTIERE et al., 1975).



D - Etude de la fraction S-4

La fraction S-4 comprend des peptides de tailles moléculaires moyennes que nous avons à nouveau fractionnés par chromatographie d'échanges ioniques sur colonne de résine CHROMOBEADS P.

Le diagramme d'éluion des peptides est présenté dans la figure 9. Cinq peptides ont été obtenus ; leur composition et leur séquence figurent respectivement dans les tableaux VIII et IX.

Peptide S-4 Tm-3 (résidus 22 à 37 ; 3)\*

Ser-Ala-Ser-His-Pro-Thr-Tyr-Ser-Glu-Met-Ile-Ala-Ala-Ala-Ile-Arg.

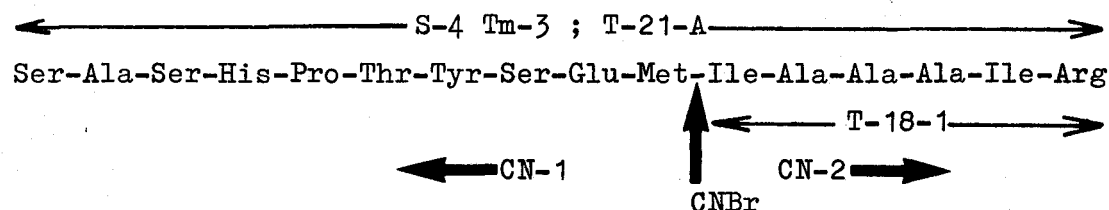
Composition en amino-acides :

Thr	Ser	Glu	Pro	Ala	Met	Ile	Tyr	His	Arg
0,97	2,83	1,07	1,01	4,28	0,84	1,97	0,98	0,99	1,06
(1)	(3)	(1)	(1)	(4)	(1)	(2)	(1)	(1)	(1)

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

DNS-Ser.

La séquence de ce peptide qui contient le seul résidu de méthionine présent dans la molécule a été déduite des travaux de GREENAWAY et MURRAY (1971) et de nos résultats acquis par la dégradation automatique de EDMAN sur le fragment CN-2.



Le peptide T-21-1 isolé du fractionnement tryptique de la protéine native est identique au peptide S-4 Tm-3.

(\*) Entre parenthèses figurent la localisation et l'ordre du peptide dans la séquence de la protéine.

DIAGRAMME D'ELUTION DES PEPTIDES TRYPSIQUES S-4 DE L'HISTONE H<sub>5</sub> MALEYLEE  
FRACTIONNES SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P

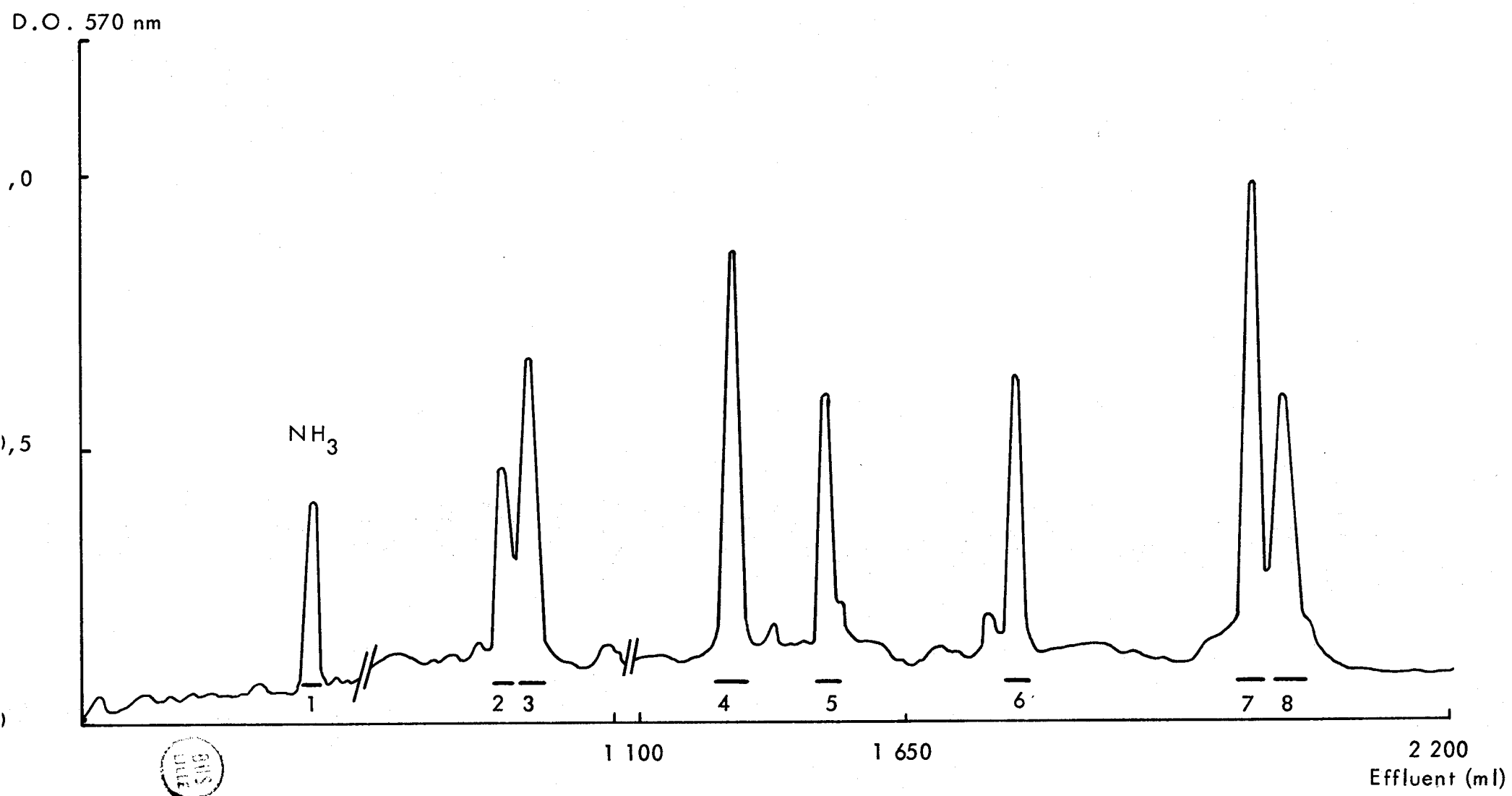


FIGURE 9

TABLEAU VIII

COMPOSITIONS EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES ISOLES DE LA FRACTION  
SEPHADEX-4 DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE DE LA PROTEINE MALEYLÉE

(exprimés en rapports molaires)\*

Amino-acides	Tm-3	Tm-4	Tm-5	Tm-6	Tm-8-A
Acide Aspartique					1,10 (1)
Thréonine	0,97 (1)				
Sérine	2,83 (3)	0,87 (1)	0,91 (1)	0,65 (1)	0,96 (1)
Acide Glutamique	1,07 (1)				
Proline	1,01 (1)			1,07 (1)	
Glycine		0,96 (1)			
Alanine	4,28 (4)	1,92 (2)	1,05 (1)	0,93 (1)	2,12 (2)
Valine			0,89 (1)		
Méthionine	0,84 (1)				
Isoleucine	1,97 (2)				
Leucine					0,85 (1)
Tyrosine	0,98 (1)				
Phénylalanine					
Histidine	0,99 (1)				
Lysine		1,22 (1)	1,10 (1)	2,35 (2)	2,97 (3)
Arginine	1,06 (1)	1,03 (1)	1,04 (1)		1,00 (1)
Nombre de résidus	16	6	5	5	9

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





TABLEAU IX

SEQUENCES EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES TRYPSIQUES ISOLES  
DE LA FRACTION SEPHADEX-4 DE LA PROTEINE MALEYLEE

Tm 3 : (résidus 22 à 37 ; 3) Ser-Ala-Ser-His-Pro-Thr-Tyr-Ser-Glu-Met-Ile-Ala-Ala-Ile-Arg

Tm 4 : Ala-Lys-Ser-Ser-Gly-Ala-Arg

Tm 5 : (résidus 16 à 20 ; 2) Val-Lys-Ala-Ser-Arg

Tm 6 : Ser-Pro-Ala-Lys-Lys

Tm 8-A : (résidus 95 à 103 ; 8) Leu-Ala-(Lys, Ser, Asp)-Lys-Ala-Lys-Arg



Peptide S-4 Tm-4

Ala-Lys-Ser-Gly-Ala-Arg

Composition en amino-acides :

Ser	Gly	Ala	Lys	Arg
0,87	0,96	1,92	1,22	1,03
(1)	(1)	(2)	(1)	(1)

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

DNS-Ala.

Dégradation de EDMAN :

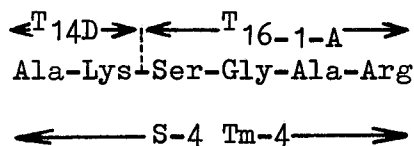
Cinq cycles de dégradation de EDMAN avec identification des PTH-amino-acides ont permis d'établir la séquence :

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

La position COOH-terminale de l'arginine découle de la spécificité de la trypsine.

Ce peptide contient le dernier résidu de glycine présent dans la partie COOH-terminale de la molécule (résidus 112 à 185).

Les peptides T<sub>14D</sub> et T<sub>16-1-A</sub> isolés du fractionnement des peptides tryptiques de la protéine native recouvrent la séquence du peptide S-4 Tm-4 comme l'indique la figure suivante :



Peptide S-4 Tm-5 (résidus 16 à 20 ; 2)

Val-Lys-Ala-Ser-Arg.

Composition en amino-acides :

Ser	Ala	Val	Lys	Arg
0,91	1,05	0,89	1,10	1,04
(1)	(1)	(1)	(1)	(1)

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

DNS-Val.

Dégradation de EDMAN :

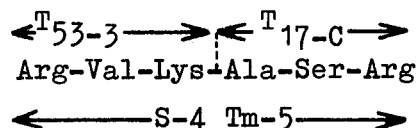
Trois cycles de dégradation de EDMAN avec identification des PTH-amino-acides ont permis d'établir la séquence Val-Lys-Ala.

L'arginine occupe la position COOH-terminale en raison de la spécificité de la trypsine, la sérine est placée par différence.

La séquence du peptide S-4 Tm-5 est donc :

Val-Lys-Ala-Ser-Arg.

Les peptides tryptiques T<sub>53-3</sub> et T<sub>17-C</sub> recouvrent respectivement les parties NH<sub>2</sub>- et COOH-terminales du peptide S-4 Tm-5 comme l'indique la figure suivante :



Peptide S-4 Tm-6

Ser-Pro-Ala-Lys-Lys.

Composition en amino-acides :

Ser	Pro	Ala	Lys
0,65	1,07	0,93	2,35
(1)	(1)	(1)	(2)

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

DNS-Ser.

Dégradation de EDMAN :

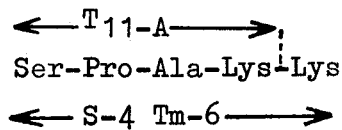
Quatre cycles de dégradation de EDMAN avec identification des PTH-amino-acides ont permis d'établir la séquence :

Ser-Pro-Ala-Lys-Lys.

Le second résidu de lysine étant placé par différence et selon la spécificité d'action de la trypsine.

La présence d'un résidu de lysine en position COOH-terminale ne peut s'expliquer que par une maléylation incomplète à ce niveau.

Nous avons isolé du fractionnement tryptique de la protéine native le peptide T<sub>11-A</sub> qui ne diffère du peptide S-4 Tm-6 que par l'absence d'un résidu de lysine.



Peptide S-4 Tm-8-A (résidus 95 à 103 ; 8)

Leu-Ala-Lys-Ser-Asp-Lys-Ala-Lys-Arg.

Composition en amino-acides :

Asp	Ser	Ala	Leu	Lys	Arg
1,10	0,96	2,12	0,85	2,97	1,00
(1)	(1)	(2)	(1)	(3)	(1)

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

DNS-Leu.

Dégradation de EDMAN :

Deux cycles de dégradation de EDMAN utilisée en méthode soustractive ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale Leu-Ala.

	Asp	Ser	Ala	Leu	Lys	Arg
Composition :	1,10	0,96	2,12	0,85	2,93	1,00
1er cycle :	0,96	0,98	1,81	<u>0,01</u>	2,31	1,00
2ème cycle :	1,00	1,00	<u>1,20</u>	-	N.D. (*)	1,00

Hydrolyse par les carboxypeptidases A et B :

Après deux heures d'hydrolyse par la carboxypeptidase B, le peptide est soumis à l'action de la carboxypeptidase A pendant quatre

heures. Les acides aminés COOH-terminaux sont libérés de façon récurrente aux temps 2, 4 et 6 heures de l'hydrolyse et dosés à l'analyseur d'acides aminés.

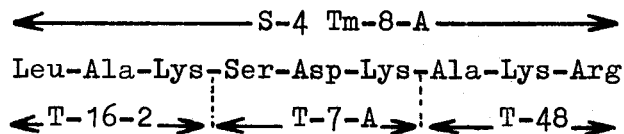
Les résultats sont indiqués dans le tableau suivant.

Amino-acides libérés (**)	CpB 2 <sup>H</sup>	CpB 4 <sup>H</sup> + CpA 2 <sup>H</sup>	CpB 6 <sup>H</sup> + CpA 4 <sup>H</sup>
Acide Aspartique	1,64	2,24	3,52
Sérine	1,93	5,48	5,88
Alanine	1,14	16,27(0,85)	21,39(0,89)
Leucine	-	1,32	2,86
Lysine	18,62(1,01)	22,36(1,17)	29,88(1,24)
Arginine	17,94(0,98)	18,58(0,97)	21,04(0,87)

La séquence COOH-terminale du peptide S-4 Tm-8-A est donc :  
Lys-Ala-Lys-Arg.

La séquence partielle du peptide s'énonce :  
Leu-Ala (Lys, Ser, Asp) Lys-Ala-Lys-Arg.

Le reste de la séquence du peptide Tm-8-A a été déduit de l'étude des peptides T-16-2 et T-7-A qui recouvrent la partie NH<sub>2</sub>-terminale selon le schéma suivant.



(\*) N.D. : Non déterminée.

(\*\*) Exprimés en nanomoles d'acides aminés libérés ;  
entre parenthèses figure le nombre de mole d'acide aminé par mole de peptide.

E - Etude de la fraction S-5

Nous avons isolé de cette fraction très hétérogène onze peptides par chromatographie d'échanges d'ions sur résine CHROMO-BEADS P.

Le diagramme d'éluion des peptides de la colonne est présenté dans la figure 10. Les compositions en amino-acides et les séquences des peptides sont présentées dans les tableaux X et XI.

Peptide S-5 Tm-2-B

Ser-Thr-Ser-Pro-Lys.

Composition en amino-acides :

Thr	Ser	Pro	Lys
1,01	1,84	1,09	1,06
(1)	(2)	(1)	(1)

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

DNS-Ser.

Dégradation de EDMAN :

Quatre cycles de dégradation de EDMAN utilisée en méthode soustractive ont permis de déterminer la séquence de ce peptide. La lysine étant placée par différence et selon la spécificité de la trypsine.

	Thr	Ser	Pro	Lys
Composition :	1,01	1,84	1,09	1,06
1er cycle :	0,89	<u>1,16</u>	1,00	0,81
2ème cycle :	<u>0,38</u>	1,13	1,00	0,80
3ème cycle :	-	<u>0,65</u>	0,98	1,00
4ème cycle :	-	-	0,00	N.D. (*)

La présence d'un résidu de lysine en position COOH-terminale de ce peptide peut s'expliquer par une maléylation incomplète de ce résidu.

(\*) N.D. : Non déterminée.

DIAGRAMME D'ELUTION DES PEPTIDES TRYPSIQUES S-5 DE L'HISTONE H<sub>5</sub> MALEYLEE,  
FRACTIONNES SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P

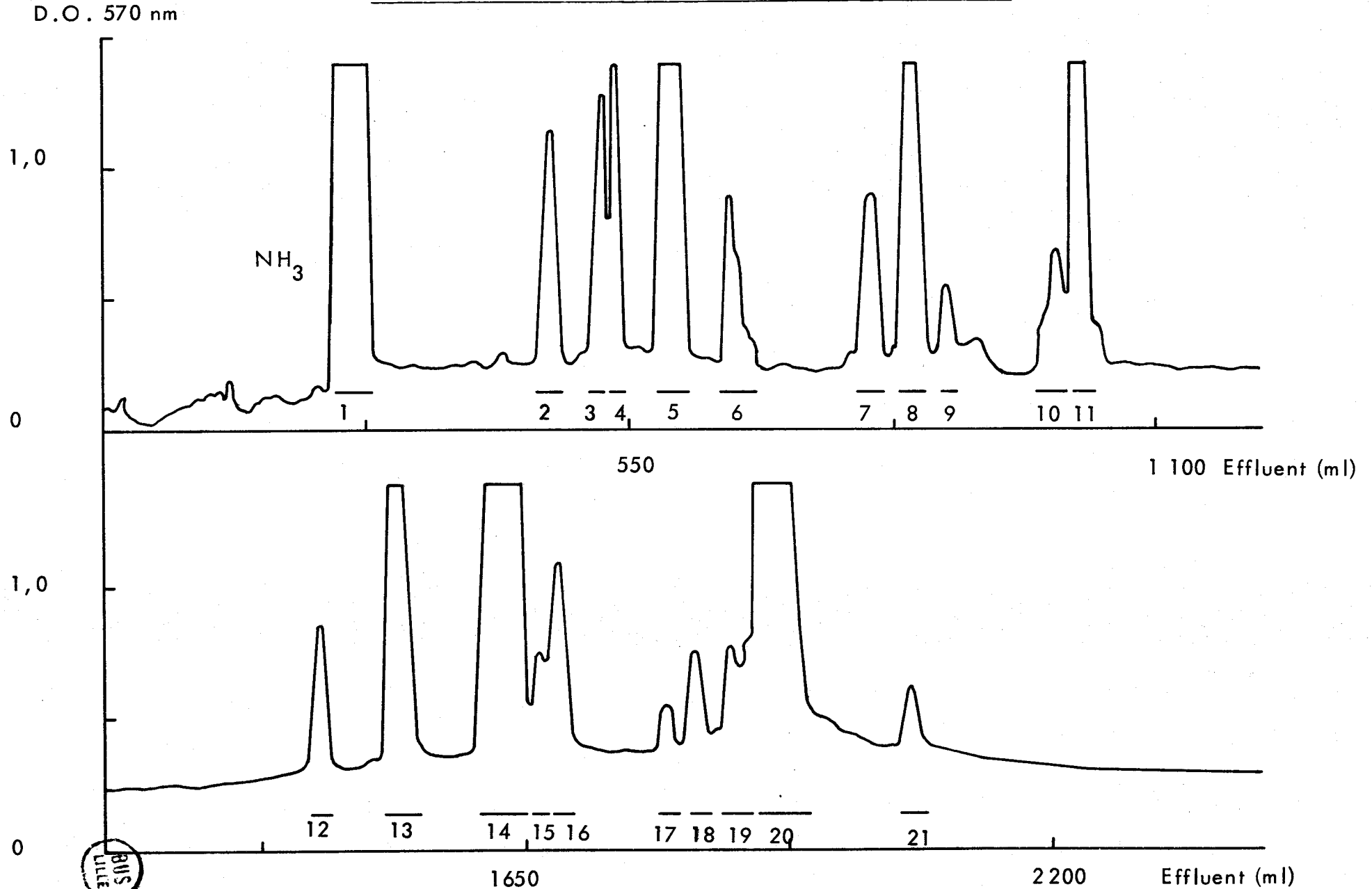


TABLEAU X

COMPOSITIONS EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES TRYPSIQUES ISOLEES

DE LA FRACTION SEPHADEX-5 DE LA PROTEINE MALEYLEE

(exprimés en rapports molaires)\*

Amino-acides	Tm2-B	Tm3	Tm5-A	Tm6-A	Tm7	Tm8	Tm10-3	Tm11	Tm13-1	Tm14-A	Tm14-B	Tm20-2
Acide Aspartique												
Thréonine	1,01(1)			0,90(1)								
Sérine	1,84(2)	1,04(1)	1,97(2)		2,03(2)	0,91(1)	0,87(1)	0,94(1)	0,88(1)	1,07(1)	0,95(1)	
Acide Glutamique								0,96(1)				
Proline	1,09(1)	0,88(1)									1,10(1)	
Glycine			2,04(2)		2,95(3)				1,06(1)			
Alanine		1,01(1)		1,90(2)	1,15(1)			1,02(1)	1,95(2)	0,99(1)		1,01(1)
Valine					0,90(1)					0,90(1)		
Méthionine												
Isoleucine							1,10(1)					
Leucine												
Tyrosine												
Phénylalanine					0,86(1)							
Histidine												
Lysine	1,06(1)	1,07(1)						1,05(1)	1,03(1)	0,92(1)	1,03(1)	0,94(1)
Arginine			0,99(1)	0,99(1)	1,12(1)	1,09(1)	1,03(1)	1,04(1)	1,07(1)	1,12(1)	0,92(1)	1,05(1)
Nombre de résidus	5	4	5	4	9	2	3	4	6	5	4	3

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





TABLEAU XI

SEQUENCES EN AMINO-ACIDES DES PEPTIDES TRYPSIQUES ISOLES  
DE LA FRACTION SEPHADEX-5 DE LA PROTEINE MALEYLEE

Tm2-B	$\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Thr}}-\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Pro}}-\text{Lys}$
Tm3	$\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Pro}}-\text{Lys}$
Tm5-A (résidus 43 à 47; 5)	$\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Ser}}-\text{Arg}$
Tm6-A	$\overline{\text{Ala}}-\text{Thr}-\text{Ala}-\text{Arg}$
Tm7 (résidus 86 à 94)	$\overline{\text{Gly}}-\text{Val}-\text{Gly}-\text{Ala}-\text{Gly}-\text{Ser}-\text{Ser}-\text{Phe}-\text{Arg}$
Tm8	$\overline{\text{Ser}}-\text{Arg}$
Tm10-3(résidus 71 à 73)	$\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Ile}}-\text{Arg}$
Tm11 (résidus 38 à 42; 4)	$\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Glu}}-\overrightarrow{\text{Lys}}-\overrightarrow{\text{Ser}}-\text{Arg}$
Tm13-1	$\overrightarrow{\text{Ala}}-\overrightarrow{\text{Lys}}-\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Gly}}-\text{Ala}-\text{Arg}$
Tm14-A(résidus 16 à 20; 2)	$\overline{\text{Val}}-\text{Lys}-\text{Ala}-\text{Ser}-\text{Arg}$
Tm14-B	$\overrightarrow{\text{Ser}}-\overrightarrow{\text{Lys}}-\overrightarrow{\text{Pro}}-\overline{\text{Arg}}$
Tm20-2	$\overrightarrow{\text{Lys}}-\overrightarrow{\text{Ala}}-\overline{\text{Arg}}$



Peptide S-5 Tm-3

Ala (Ser,Pro) Lys.

Composition en amino-acides :

Ser	Pro	Ala	Lys
1,04	0,88	1,01	1,07
(1)	(1)	(1)	(1)

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

DNS-Ala.

Le comportement électrochromatographique de ce peptide, la composition en amino-acides et le dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal sont identiques à ceux du peptide tryptique T-9.

La séquence du peptide S-5 Tm-3 est donc :

Ala-Ser-Pro-Lys.

Peptide S-5 Tm-5-A (résidus 43 à 47 ; 5)

Gly-Gly-Ser-Ser-Arg.

Composition en amino-acides :

Ser	Gly	Arg
1,97	2,04	0,99
(2)	(2)	(1)

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

DNS-Gly.

Dégradation de EDMAN :

Trois cycles de dégradation de EDMAN avec identification des PTH-amino-acides ont permis de déterminer la séquence Gly-Gly-Ser.

L'arginine est placée en position COOH-terminale du peptide selon la spécificité de la trypsine. La sérine est placée par différence

La séquence du peptide S-5 Tm-5-A identique à celle du peptide T-12-A est donc Gly-Gly-Ser-Ser-Arg.

Fraction S-5 Tm-5-B

Cette fraction est uniquement constituée d'arginine libre dosée avant et après hydrolyse chlorhydrique à l'analyseur d'acides aminés.

L'arginine libre a été obtenue avec un rendement de 200 % par rapport au peptide S-5 Tm-5-A : Gly-Gly-Ser-Ser-Arg.

Peptide S-5 Tm-6-A

Ala (Thr,Ala) Arg.

Composition en amino-acides :

Thr	Ala	Arg
0,90	1,90	0,99
(1)	(2)	(1)

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

DNS-Ala.

La séquence du peptide S-5 Tm-6-A a été déduite de la séquence du peptide T-14-B et s'énonce :

Ala-Thr-Ala-Arg.

Ce peptide a été obtenu en très faible rendement.

Peptide S-5 Tm-7 (résidus 86 à 94)

Gly-Val-Gly-Ala-Gly-Ser-Ser-Phe-Arg.

Composition en amino-acides :

Ser	Gly	Ala	Val	Phe	Arg
2,03	2,95	1,15	0,90	0,86	1,12
(2)	(3)	(1)	(1)	(1)	(1)

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

DNS-Gly.

La séquence de ce peptide qui contient l'unique résidu de phénylalanine de l'histone H<sub>5</sub> est identique à celle du peptide T-19-4, elle a été déduite de la séquence du peptide isolé de la fraction S-3 de l'hydrolysate tryptique de la protéine maléylée.

Peptide S-5 Tm-8

Ser-Arg.

Composition en amino-acides :

Ser	Arg
0,91	1,09
(1)	(1)

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

DNS-Ser

La séquence de ce peptide est évidente : Ser-Arg.

Peptide S-5 Tm-10-3 (résidus 71 à 73)

Ser-Ile-Arg.

Composition en amino-acides :

Ser	Ile	Arg
0,87	1,10	1,03
(1)	(1)	(1)

Dégradation de EDMAN :

Deux cycles de dégradation de EDMAN avec identification des PTH-amino-acides ont permis de déterminer la séquence Ser-Ile-Arg.

L'arginine étant placée en position COOH-terminale selon la spécificité de la trypsine.

Ce peptide ne peut provenir que de l'hydrolyse de la liaison Leu-Ser (70-71) et permet de déceler une légère activité "chymotrypsine like" de la trypsine pourtant traitée au T.P.C.K.

Peptide S-5 Tm-11 (résidus 38 à 42 ; 4)

Ala-Glu-Lys-Ser-Arg.

Composition en amino-acides :

Ser	Glu	Ala	Lys	Arg
0,94	0,96	1,02	1,05	1,04
(1)	(1)	(1)	(1)	(1)

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

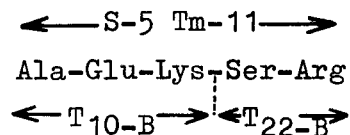
DNS-Ala.

Quatre cycles de dégradation de EDMAN avec identification des PTH-amino-acides ont permis de déterminer la séquence :

Ala-Glu-Lys-Ser-Arg.

l'arginine étant placée en position COOH-terminale par différence et selon la spécificité de la trypsine.

Les peptides tryptiques T-10-B et T-22-B recouvrent respectivement les séquences NH<sub>2</sub>-et COOH-terminales du peptide S-5 Tm-11 selon le schéma suivant :



Peptide S-5 Tm-13-1

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

Composition en amino-acides :

Ser	Gly	Ala	Lys	Arg
0,88	1,06	1,95	1,03	1,07
(1)	(1)	(2)	(1)	(1)

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

DNS-Ala.

La séquence de ce peptide est identique au peptide S-4 Tm-4. Les deux peptides ont la même localisation au sein du diagramme d'élu-tion de la colonne de CHROMOBEADS P., la même composition en acides aminés et les dansylamino-acides NH<sub>2</sub>-terminaux identiques.

Peptide S-5 Tm-14-A (résidus 16 à 20 ; 2)

Val-Lys-Ala-Ser-Arg.

Composition en amino-acides :

Ser	Ala	Val	Lys	Arg
1,07	0,99	0,90	0,92	1,12
(1)	(1)	(1)	(1)	(1)

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

DNS-Val.

Ce peptide est identique au peptide S-4 Tm-5, les deux pepti-des ont en effet des comportements électrochromatographiques sembla-bles, le même dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal et des compositions en amino-acides identiques.

Peptide S-5 Tm-14-B

Ser-Lys-Pro-Arg.

Composition en amino-acides :

Ser	Pro	Lys	Arg
0,95	1,10	1,03	0,92
(1)	(1)	(1)	(1)

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

DNS-Ser.

Dégradation de EDMAN :

Trois cycles de dégradation de EDMAN associée à la dansylation du peptide résiduel ont permis d'établir la séquence du peptide Tm-14-B : Ser-Lys-Pro-Arg.

Le même peptide a été isolé de l'hydrolysate tryptique de la protéine native (T-42).

Peptide S-5 Tm-20-2

Lys-Ala-Arg.

Composition en amino-acides :

Ala	Lys	Arg
1,01	0,94	1,05
(1)	(1)	(1)

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

di-DNS-Lys.

Dégradation de EDMAN :

Un cycle de dégradation de EDMAN utilisée avec la dansylation et l'analyse des amino-acides du peptide résiduel ont permis de confirmer la séquence du peptide Tm-20-2 :

Lys-Ala-Arg.

Une confirmation supplémentaire est apportée, s'il en est besoin, par l'action de la carboxypeptidase B qui, après 2 heures d'hydrolyse, libère un résidu d'arginine.

Discussion à propos de l'étude des peptides tryptiques  
de la protéine maléylée

La plupart des peptides que nous avons isolés sont localisés dans la moitié  $\text{NH}_2$ -terminale de la protéine. Leur caractère général hydrophobe a permis de les séparer de façon plus aisée.

Très peu de peptides appartiennent à la moitié  $\text{COOH}$ -terminale de la molécule, plus basique. Il semble donc que l'intérêt principal de la maléylation - obtention de peptides plus longs de la moitié  $\text{COOH}$ -terminale inconnue de la protéine - soit oblitéré par le fait que la basicité trop élevée de ces peptides rend leur isolement très délicat.

C'est pour cette raison que nous avons modifié notre méthodologie en utilisant pour le fractionnement de ces peptides très basiques un échangeur de cations faible - en l'occurrence l'Amberlite CG50 - à la place de l'échangeur de cation fort - type DOWEX 50 x 2 utilisé jusqu'à présent.

Cependant, la moitié  $\text{NH}_2$ -terminale de l'histone  $\text{H}_5$  étant établie au moment où nous avons connu ces difficultés, il s'est avéré plus judicieux de malétyler le fragment  $\text{COOH}$ -terminal NB-4 plutôt que la protéine entière et de le soumettre à l'hydrolyse tryptique.

Le deuxième point de notre discussion concerne l'obtention de certains peptides (Tm-2-B, Tm-3, Tm-7) qui ne peut s'expliquer que par une maléylation incomplète des résidus de lysine  $\text{COOH}$ -terminaux de ces peptides. Il semble donc, que malgré l'excès d'anhydride maléique employé (plus de 10 micromoles par micromole de lysine), certaines régions de la molécule sont réfractaires à la maléylation.

Toutes les séquences peptidiques déterminées sont en bon accord avec les séquences des peptides tryptiques de la protéine native étudiées dans le paragraphe précédent.





### III - ETUDE DES PEPTIDES TRYPSIQUES DU FRAGMENT NB-4 MALEYLE

Le fragment NB-4 possède 58 résidus d'acides-amino de moins que la protéine entière, son obtention permet un accès plus direct à la partie COOH-terminale de la protéine qui reste à déterminer.

La présence de 36 résidus de lysine et de 15 résidus d'arginine nous a incité à malétyler les résidus de lysine dans le but d'obtenir de longs peptides en limitant l'action de la trypsine aux seules liaisons arginyle.

L'hydrolysate trypsinique du fragment NB-4 malétylé a donc été fractionné sur résine AMBERLITE CG 50 en tampons pyridine-acide acétique. Le diagramme d'élution des peptides de la colonne d'AMBERLITE CG 50 est présenté dans la figure 11.

Les fractions sont désignées par la lettre A suivie d'un chiffre qui indique leur ordre d'élution de la colonne.

Chacune des 7 fractions obtenues est analysée par électrochromatographie sur papier. La fraction 1 ne contient que des sels. Les fractions 2, 3 et 4 correspondant à des peptides de caractère légèrement basique ont été soumises à la chromatographie d'échanges d'ions sur résine CHROMOBEADS P. Les fractions 5, 6 et 7 correspondant à des peptides de caractère très basique ont été à nouveau purifiées par chromatographie d'échanges d'ions sur résine AMBERLITE CG 50.

#### A - Etude de la fraction A-2

La fraction A-2 a été soumise à la chromatographie d'échanges d'ions sur résine CHROMOBEADS P.

Deux peptides ainsi que de l'arginine libre ont été isolés de cette fraction.

DIAGRAMME D'ELUTION DES PEPTIDES TRYPSIQUES DU FRAGMENT NB-4 MALEYLE DE L'HISTONE H<sub>5</sub>'

FRACTIONNES SUR COLONNE D'AMBERLITE CG 50

D.O. 570 nm

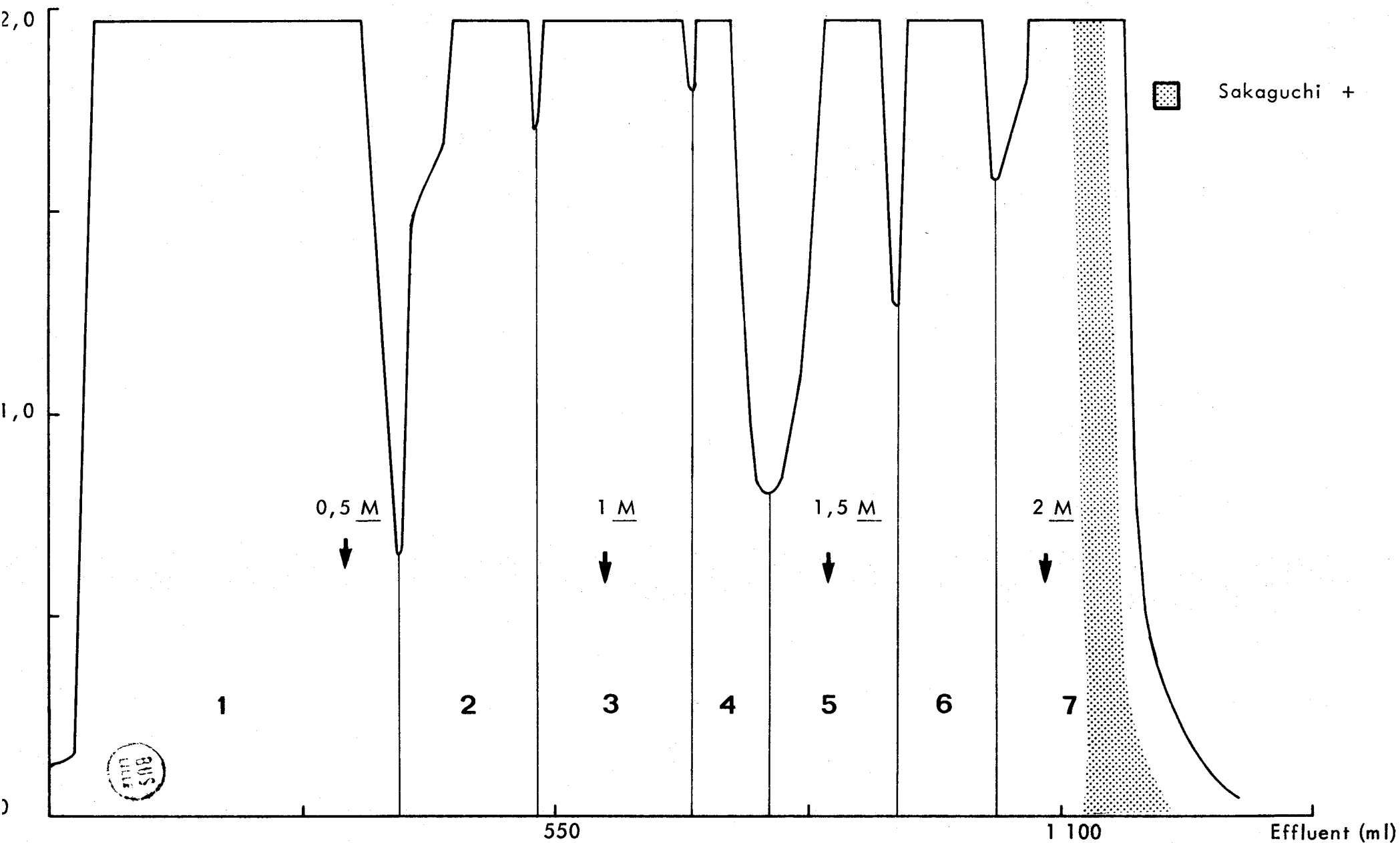


FIGURE 11

Fraction A-2 Tm-2

Cette fraction est uniquement constituée d'arginine libre dosée avant et après hydrolyse chlorhydrique à l'analyseur d'acides aminés.

Peptide A-2 Tm-5 (résidus 70 à 73)

Leu-Ser-Ile-Arg.

Composition en amino-acides :

Ser	Ile	Leu	Arg
1,13	0,80	0,76	1,31
(1)	(1)	(1)	(1)

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

DNS-Leu.

La séquence de ce peptide qui possède les mêmes caractéristiques que le peptide T-28-A est donc Leu-Ser-Ile-Arg.

L'obtention de ce peptide implique l'hydrolyse par la trypsine de la liaison Lys-Leu (69-70). Cette hydrolyse traduit une maléylation incomplète du résidu de lysine en position 69.

Peptide A-2 Tm-8

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

Composition en amino-acides :

Ser	Gly	Ala	Arg
0,93	1,05	1,98	1,08
(1)	(1)	(2)	(1)

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

DNS-Ala.

La séquence de ce peptide, caractérisée par la présence du dernier résidu de glycine présent dans la partie COOH-terminale de

la molécule est identique à celle du peptide S-4 Tm-4 :

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

B - Etude de la fraction A-3

Après purification sur résine CHROMOBEADS P., quatre peptides ont été isolés de cette fraction. Le diagramme d'élu-tion des peptides de la colonne de Chromobeads P. est présenté dans la figure 12.

Peptide A-3 Tm-7-C

Ser-Lys-Pro-Arg.

Composition en amino-acides :

Ser	Pro	Lys	Arg
0,83	1,06	1,02	1,09
(1)	(1)	(1)	(1)

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

DNS-Ser.

Ce peptide est identique aux peptides T-42 et S-5 Tm-14-B.  
La séquence est donc : Ser-Lys-Pro-Arg.

Peptide A-3 Tm-8 (résidus 75 à 84 ; 7)

Composition en amino-acides :

Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Leu	Phe	Lys	Arg
1,04	2,08	1,09	3,72	3,40	1,80	2,74	0,96	2,57	1,58
(1)	(2)	(1)	(4)	(3)	(2)	(3)	(1)	(2)	(1)

La composition en amino-acides de ce peptide caractérisée par l'unique résidu de phénylalanine présent dans l'histone H<sub>5</sub> est identique à celle du peptide S-3 Tm isolé du fractionnement tryptique de la protéine maléylée.

DIAGRAMME D'ELUTION DES PEPTIDES TRYPSIQUES A-3 DU FRAGMENT NB-4 MALEYLE

DE L'HISTONE H<sub>5</sub> FRACTIONNES SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P

O. 570 nm

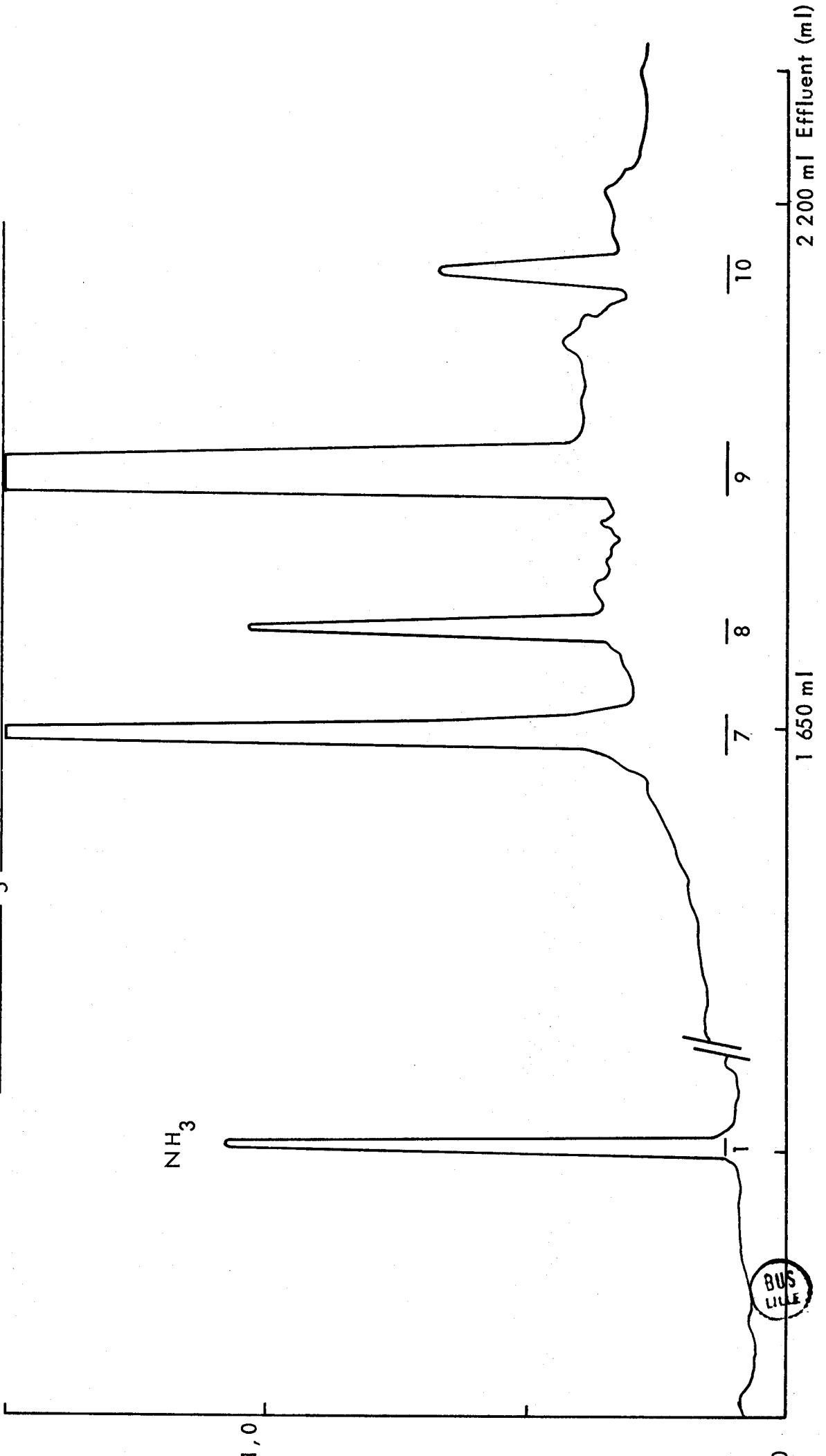


FIGURE 12

Peptide A-3 Tm-9

Lys-Ala-Arg.

Composition en amino-acides :

Ala	Lys	Arg
1,04	1,05	0,91
(1)	(1)	(1)

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

di-DNS-Lys.

Dégradation de EDMAN :

Un cycle de dégradation de EDMAN associée à la dansylation et à l'analyse de la composition en amino-acides du peptide résiduel a permis de déterminer la séquence :

Lys-Ala-Arg.

L'arginine est libérée après deux heures d'action de la carboxypeptidase B.

Nous avons obtenu le même peptide S-5 Tm-20-2 de l'hydrolysat trypsique de la protéine maléylée.

Peptide A-3 Tm-10 (résidus 95 à 103 ; 8)

Leu-Ala-Lys-Ser-Asp-Lys-Ala-Lys-Arg.

Composition en amino-acides :

Asp	Ser	Ala	Leu	Lys	Arg
0,64	1,14	2,11	0,71	2,82	1,57
(1)	(1)	(2)	(1)	(3)	(1)

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

DNS-Leu.

La composition en amino-acides ainsi que le dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal sont identiques à ceux du peptide S-4 Tm-8-A isolé du fractionnement des peptides tryptiques de la protéine maléylée.

C - Etude de la fraction A-4

Un seul peptide très basique a été isolé de cette fraction par chromatographie d'échanges d'ions sur résine chromobeads P.

Peptide A-4 Tm-4

Ser-Pro-Ala-Lys-Lys-Pro-Lys-Ala-Thr-Ala-Arg.

Composition en amino-acides :

Thr	Ser	Pro	Ala	Lys	Arg
0,92	0,97	1,99	2,82	3,09	1,21
(1)	(1)	(2)	(3)	(3)	(1)

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

DNS-Ser.

Dégradation de EDMAN :

Neuf cycles de dégradation de EDMAN utilisée en méthode soustractive ont permis d'établir la séquence :

Ser-Pro-Ala-Lys-Lys-Pro-Lys-Ala-Thr.

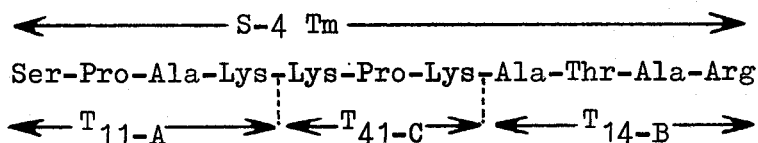
	Thr	Ser	Pro	Ala	Lys	Arg
Composition :	0,92	0,97	1,99	2,82	3,09	1,21
1er cycle :	0,95	<u>0,23</u>	1,94	3,00	2,87	1,23
2ème cycle :	0,89	-	<u>1,07</u>	3,00	2,41	1,05
3ème cycle :	0,77	-	0,95	<u>1,78</u>	2,07	1,00
4ème cycle :	0,87	-	0,91	1,97	<u>1,58</u>	1,00
5ème cycle :	0,98	-	1,09	2,10	<u>1,05</u>	1,00
6ème cycle :	0,88	-	<u>0,27</u>	1,98	0,83	1,00
7ème cycle :	0,86	-	-	1,89	<u>0,35</u>	1,00
8ème cycle :	0,79	-	-	<u>1,27</u>	-	0,93
9ème cycle :	<u>0,10</u>	-	-	1,15	-	0,85

L'arginine occupe la position COOH-terminale selon la spécificité de la trypsine, le dernier résidu d'alanine est placé par différence.

La séquence du peptide A-4 Tm est donc :

Ser-Pro-Ala-Lys-Lys-Pro-Lys-Ala-Thr-Ala-Arg.

Cette séquence est en bon accord avec les séquences des peptides tryptiques de l'histone native : T<sub>11-A</sub>, T<sub>41-C</sub> et T<sub>14-B</sub> qui recouvrent totalement le peptide A-4 Tm selon le schéma suivant.



L'obtention de ces peptides démontre de façon évidente l'intérêt de l'étude simultanée des peptides tryptiques de la protéine native d'une part et de la protéine maléylée d'autre part.

Remarque :

L'isolement à partir de l'hydrolysate tryptique de la protéine native, du peptide T<sub>54</sub> : Ala-Lys-Lys-Pro-Lys qui ne peut pas provenir du peptide S-4 Tm, permet de mettre en évidence l'existence de deux séquences Ala-Lys-Lys-Pro-Lys au sein de la molécule.

D - Etude de la fraction A-5

L'analyse de cette fraction par électrochromatographie a permis de mettre en évidence plusieurs peptides de comportement très basique.

Nous avons donc soumis cette fraction à une seconde chromatographie sur AMBERLITE CG 50. Un gradient continu de tampons pyridine-acide acétique pH 6,0 et 1 M à 1,5 M en pyridine permet d'éluer deux fractions majeures de la colonne (figure 13).

Les trois peptides que nous présentons ont été isolés de ces fractions par électrophorèse ou chromatographie préparative.



DIAGRAMME D'ELUTION DES PEPTIDES TRYPSIQUES A-5 DU FRAGMENT NB-4  
MALEYLE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> FRACTIONNES SUR COLONNE D'AMBERLITE CG 50

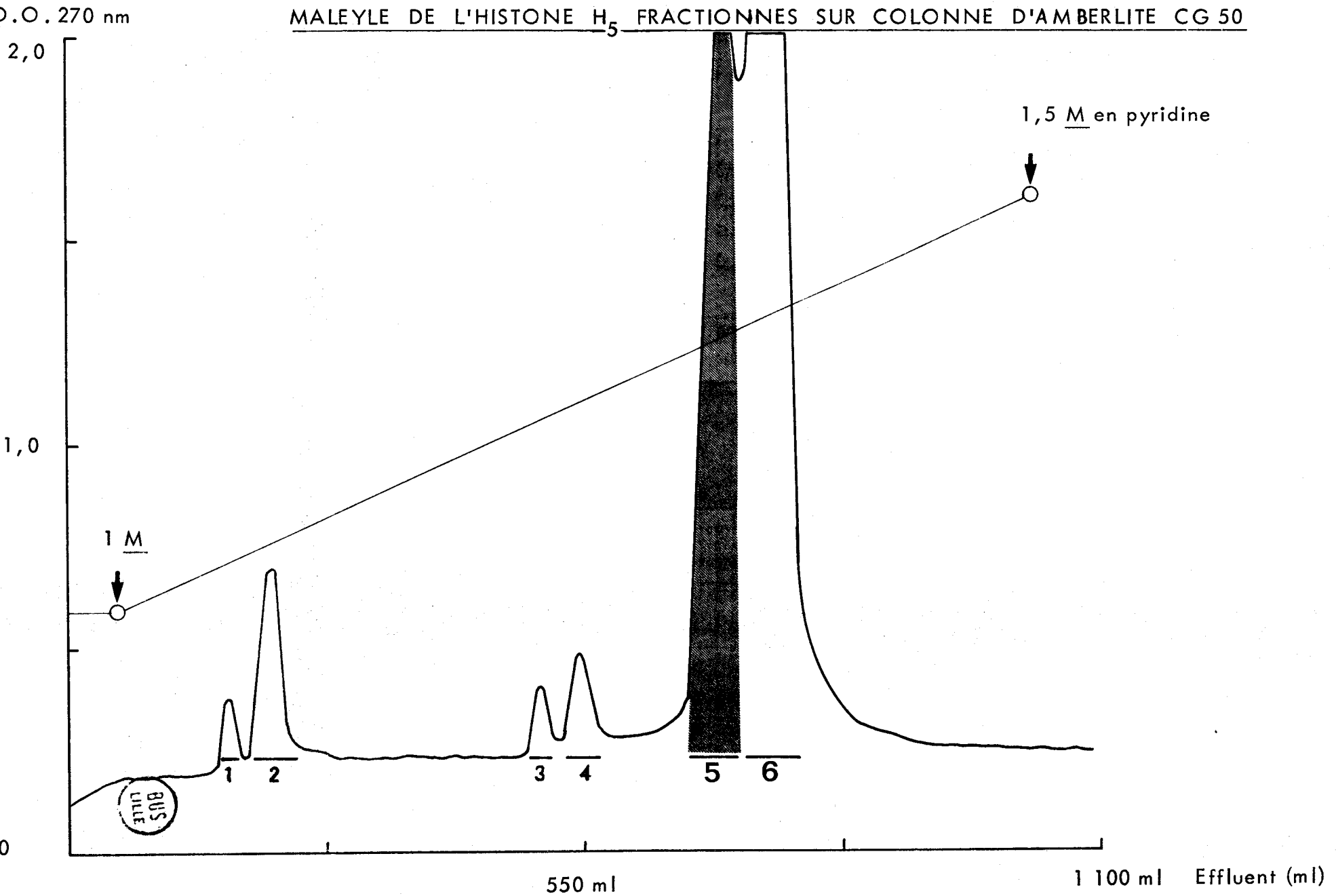


FIGURE 13

Peptide A-5 Tm-5-A

Ser-Thr-Ser-Pro-Lys-Lys-Ala-Ala-Arg-Pro-Arg.

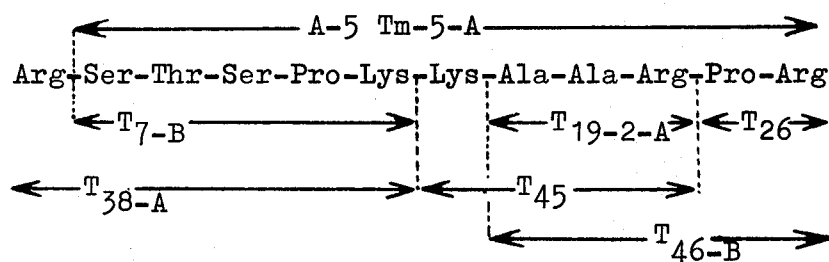
Composition en amino-acides :

Thr	Ser	Pro	Ala	Lys	Arg
0,92	1,73	1,92	2,14	2,29	2,00
(1)	(2)	(2)	(2)	(2)	(2)

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

DNS-Ser.

La séquence de ce peptide peut être déduite des séquences des peptides tryptiques T<sub>7-B</sub>, T<sub>19-2-A</sub>, T<sub>26</sub>, T<sub>38-A</sub>, T<sub>45</sub> et T<sub>46-B</sub> selon le schéma suivant :



Peptide A-5 Tm-6-A

Lys-Lys-Ser-Arg.

Composition en amino-acides :

Ser	Lys	Arg
0,98	1,99	1,00
(1)	(2)	(1)

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

di-DNS-Lys.

Dégradation de EDMAN :

Trois cycles de dégradation de EDMAN associée à la dansyla-

tion ont permis de déterminer la séquence du peptide A-5 Tm-6-A :  
Lys-Lys-Ser-Arg.

Peptide A-5 Tm-6-B

Lys-Ser-Pro-Lys-Lys-Lys.

Composition en amino-acides :

Ser	Pro	Lys
0,98	0,99	4,03
(1)	(1)	(4)

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

di-DNS-Lys.

Dégradation de EDMAN :

Trois cycles de dégradation de EDMAN associée à la dansylation du peptide résiduel ont permis de déterminer la séquence NH<sub>2</sub>-terminale : Lys-Ser-Pro-Lys.

Les deux résidus de lysine qu'il reste à placer ne peuvent l'être qu'au niveau de l'extrémité COOH-terminale du peptide A-5 Tm-6-B.

Lys-Ser-Pro-Lys-Lys-Lys.

L'obtention de ce peptide ne peut s'expliquer que par une maléylation incomplète de résidu de lysine COOH-terminal.

E - Etude de la fraction A-6

Cette fraction, après chromatographie de purification sur Amberlite CG 50 en tampons pyridine-acide acétique de pH 6,0 utilisés en gradient continu de molarité croissante en pyridine, 1 M à 2 M, n'a pu être étudiée de façon satisfaisante.

F - Etude de la fraction A-7

Cette fraction a été soumise à la chromatographie d'échanges d'ions sur AMBERLITE CG 50 en tampons pyridine-acide acétique pH 6,0.

Une fraction majeure est éluée par un gradient continu de molarité croissante en pyridine de 1 M à 3 M.

La composition en acides aminés de cette fraction est la suivante :

Asp	Thr	Ser	Pro	Gly	Ala	Val	Leu	Lys	Arg
0,97	1,04	4,75	3,35	1,71	7,22	2,91	1,01	15,76	5,07
(1)	(1)	(5)	(3)	(2)	(7)	(3)	(1)	(16)	(5)

Cette fraction s'est révélée très hétérogène ; après dansylation, quatre dansylamino-acides  $\text{NH}_2$ -terminaux ont été identifiés par chromatographie bidimensionnelle sur couche mince.

- DNS-Ala
- DNS-Ser
- DNS-Leu
- di-DNS-Lys

Dans l'état actuel de nos travaux, il ne nous est pas possible de séparer ces peptides très basiques (les plus basiques de l'ensemble du fractionnement des peptides tryptiques sur Amberlite CG 50) dont les tailles moléculaires sont identiques (ces peptides n'ont pu être séparés de façon satisfaisante par chromatographie de gel-filtration sur SEPHADEX G 25 F et G 50 F) et dont la répartition des charges électriques est telle que l'Amberlite CG 50 ne permet pas de les séparer de façon satisfaisante.

Discussion à propos du fractionnement des peptides tryptiques  
du fragment NB-4 maléylé

L'utilisation de la résine Amberlite CG 50 pour fractionner les peptides basiques de l'hydrolysate tryptique du fragment NB-4 maléylé a permis d'obtenir des zones basiques de la molécule, tels les peptides A-4 Tm, A-5 Tm-5-A, A-5 Tm-6-A, A-5 Tm-6-B contenant jusque quatre résidus d'acides aminés basiques, ainsi que des peptides de basicité moyenne, fractionnés ensuite sur résine CHROMOBEADS P. et semblables aux peptides obtenus à partir de l'hydrolysate tryptique de la protéine totale maléylée.

Pour la séparation des peptides très basiques, c'est-à-dire contenant plus de quatre résidus basiques, l'utilisation de l'Amberlite CG 50 a été un échec, dû probablement au faible pouvoir séparateur de la résine.

## CONCLUSION

---

L'ensemble des résultats obtenus par hydrolyse de l'histone H<sub>5</sub> ou de son fragment NB-4 par la chymotrypsine, la trypsine, la thermolysine, la protéase staphylococcique et la pepsine nous permet d'une part de recouvrir la partie NH<sub>2</sub>-terminale (résidus 1 à 111) de la protéine (figure 14) (SAUTIERE et al., 1976) et d'autre part de déterminer la séquence de l'ensemble des peptides constituant la partie COOH-terminale (résidus 112 à 185) de la molécule (figure 15, a et b).

Les 70 premiers résidus ont été déterminés par les études structurales réalisées sur les peptides tryptiques et chymotryptiques, ainsi que sur les peptides obtenus par hydrolyse de la protéine avec la protéase staphylococcique. En outre, la séquence NH<sub>2</sub>-terminale (21 résidus) du fragment CN-2 obtenu par coupure de l'histone H<sub>5</sub> par le bromure de cyanogène, a été établie par la dégradation automatique de EDMAN en phase liquide à l'aide d'un séquenceur S.O.C.O.S.I.

Les peptides tryptiques S-2 Tm, S-4 Tm-14-A, S-4 Tm-3, S-5 Tm-11, S-5 Tm-5-A, le peptide chymotryptique Ch 10-A-2, et la dégradation automatique de EDMAN permettent de porter la connaissance de la séquence au résidu 53. La séquence NH<sub>2</sub>-terminale de 12 résidus du fragment NB-4 a été déterminée par la dégradation de EDMAN. Le peptide Ch 1S-2-3 recouvre parfaitement cette séquence.

SEQUENCE DE LA PARTIE NH<sub>2</sub>-TERMINALE (résidus 1 à 111) DE L'HISTONE H<sub>5</sub>

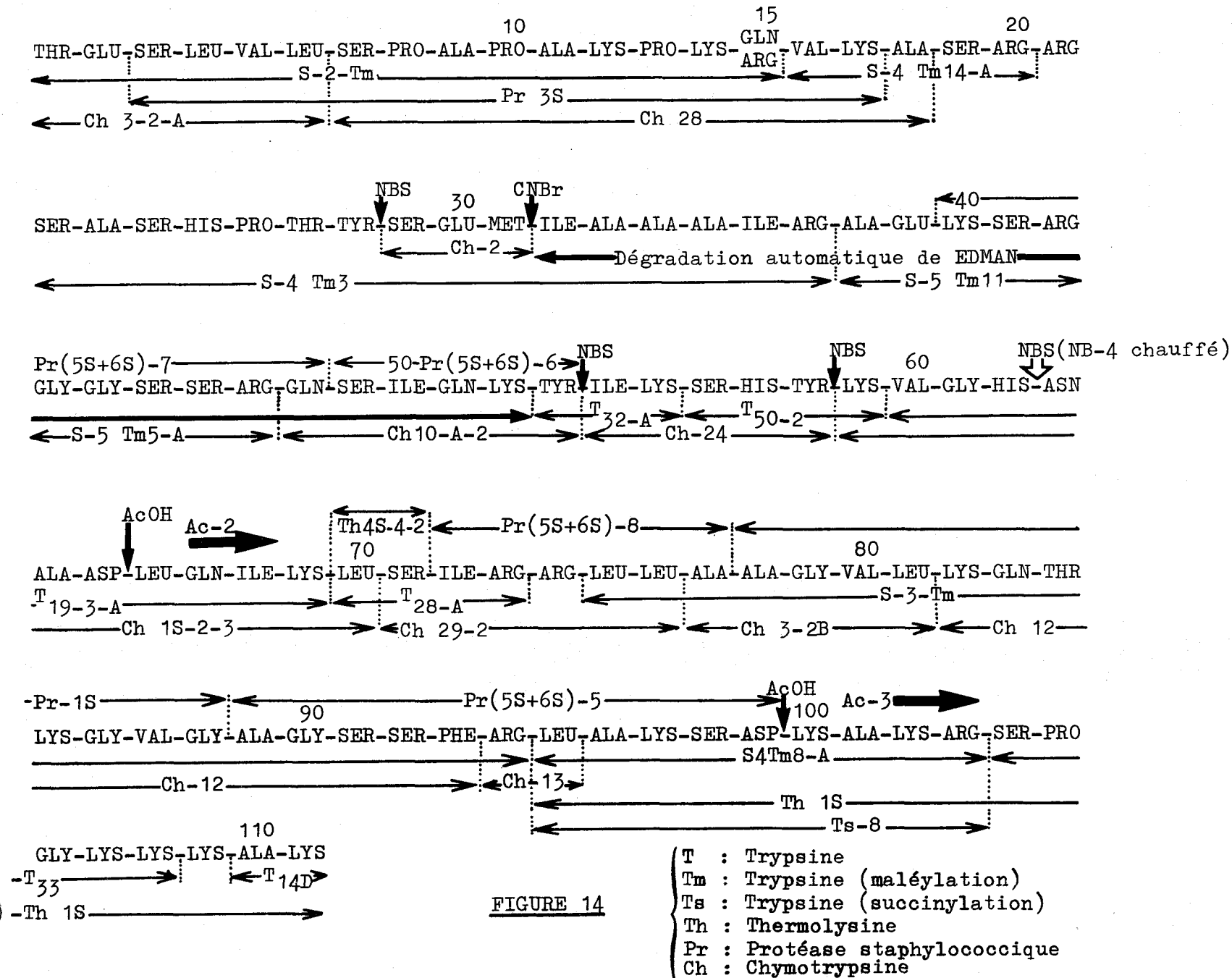
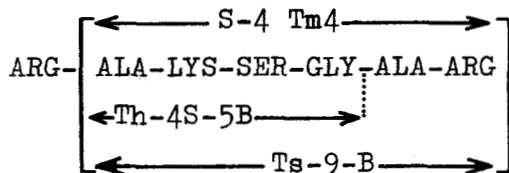
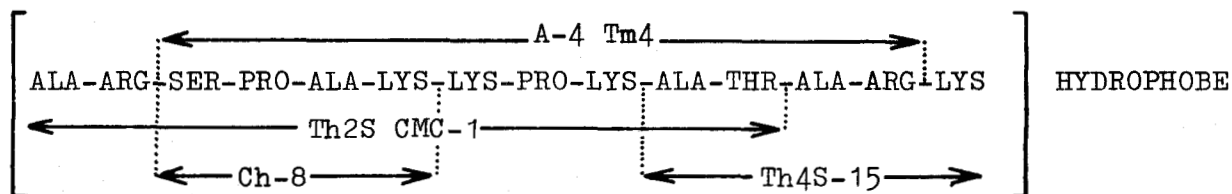
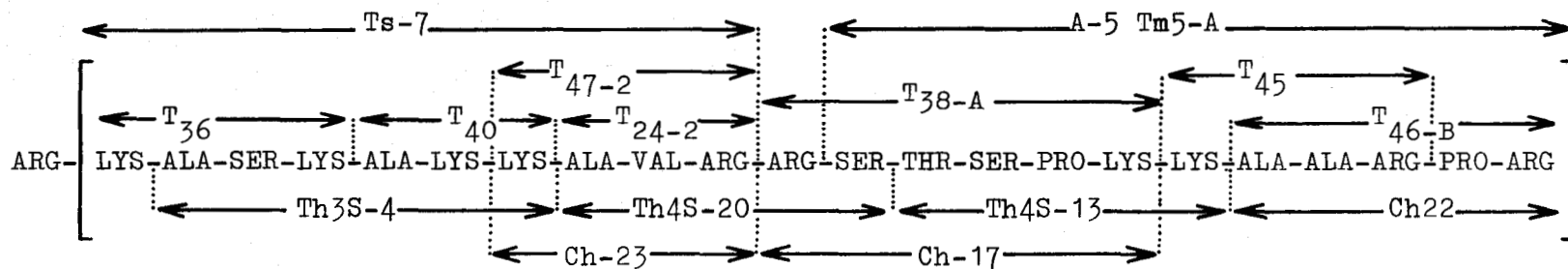


FIGURE 14

T : Trypsine  
 Tm : Trypsine (maléylation)  
 Ts : Trypsine (succinylation)  
 Th : Thermolysine  
 Pr : Protéase staphylococcique  
 Ch : Chymotrypsine

BUS  
FILE

SEQUENCES PEPTIDIQUES DE L'HISTONE H<sub>5</sub>  
LOCALISEES DANS LA PARTIE COOH-TERMINALE DE LA MOLECULE



- T : Trypsine
- Tm : Trypsine (maléylation)
- Ts : Trypsine (succinylation)
- Th : Thermolysine
- Ch : Chymotrypsine

FIGURE 15 - a





SEQUENCES PEPTIDIQUES DE L'HISTONE H<sub>5</sub> LOCALISEES  
DANS LA PARTIE COOH-TERMINALE DE LA MOLECULE

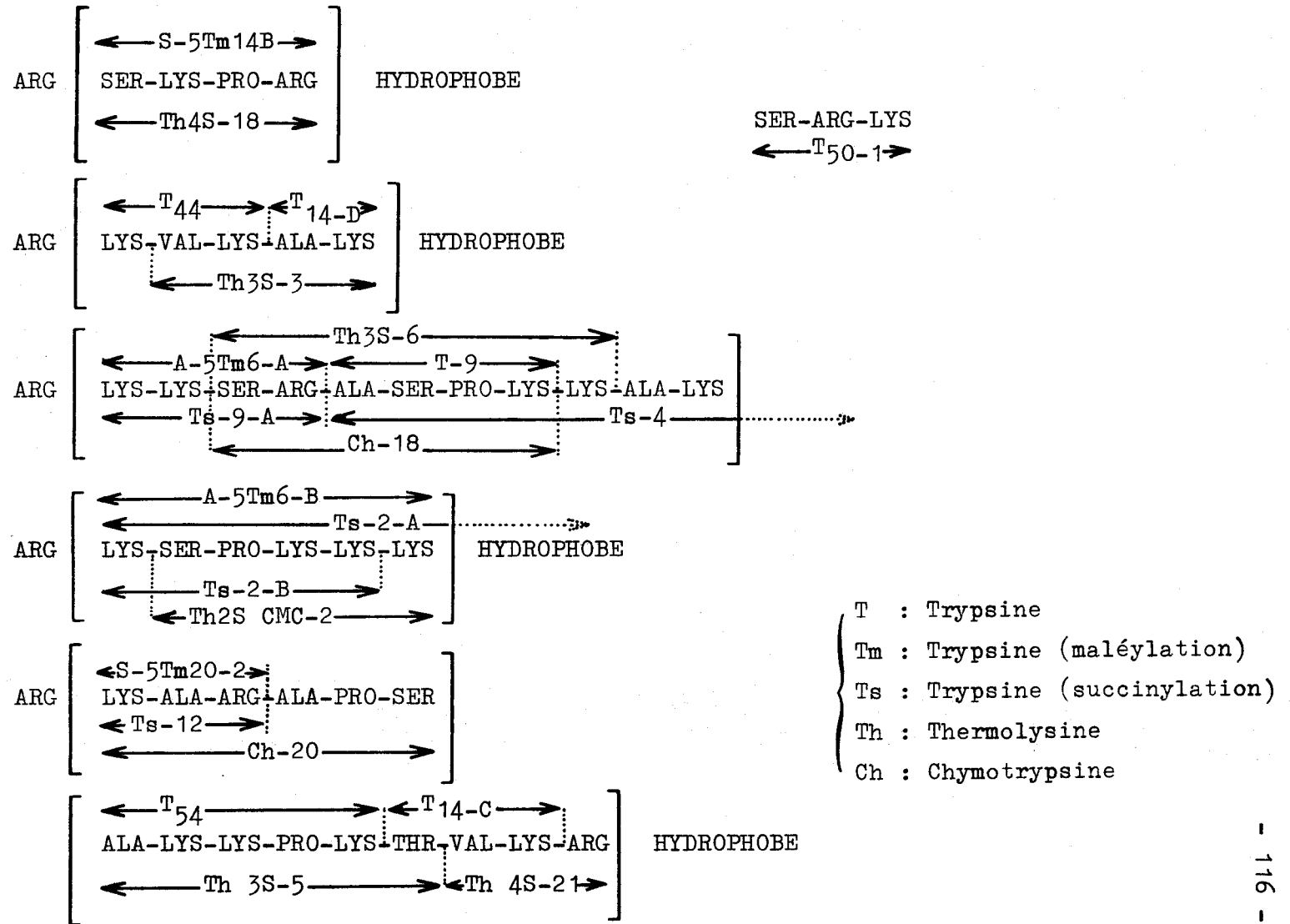


FIGURE 15 - b



Le peptide Ch-24, Ile-Lys-Ser-His-Tyr, contient le 3ème résidu de tyrosine de la molécule d'histone. Sa position adjacente au peptide Ch-10-A-2 est déduite par comparaison entre la composition en acides aminés des fragments CN-2 et NB-4, et des données structurales fournies par les peptides tryptiques T<sub>32-A</sub> et T<sub>50-2</sub>.

Les peptides Ac-2, T<sub>12</sub>, Th 4S-4-2 et Ch 29-2 ont permis de faire la jonction entre le fragment peptidique correspondant aux 70 premiers résidus et la séquence contenant l'unique résidu de phénylalanine et le dernier résidu d'acide aspartique de la protéine.

Enfin la séquence de la protéine a été prolongée jusqu'au résidu 111 par le peptide Th 1-S dont la séquence est parfaitement recouverte par les peptides Ch-13, S-4 Tm-8-A, T<sub>33</sub>, T<sub>14-D</sub>.

Outre la séquence des 111 premiers résidus nous avons déterminé des séquences peptidiques importantes appartenant à la partie COOH-terminale (résidus 112 à 185) (figure 15, a et b) parmi lesquelles deux séquences de 6 résidus, deux séquences de 9 résidus, une séquence de 14 résidus et enfin une séquence de 21 résidus.

La partie NH<sub>2</sub>-terminale de la molécule (résidus 1 à 99) est de caractère hydrophobe alors que la partie COOH-terminale a un caractère basique très marqué lié à la présence de 43 résidus basiques sur un total de 86 résidus d'acides-amino.

Les peptides acétiques Ac-1-a (résidus 1 à 99) et Ac-3 (résidus 100 à 185) obtenus par hydrolyse de la protéine par l'acide acétique 0,25 N correspondent respectivement à la partie hydrophobe et à la partie basique de l'histone H<sub>5</sub>.

Les études en R.M.N. réalisées sur ces peptides montrent que la partie NH<sub>2</sub>-terminale hydrophobe a une structure globulaire alors que la partie COOH-terminale a une structure en "random coil".

La séquence partielle de l'histone H<sub>5</sub> (figure 16) fait ressortir la présence de nombreux doublets : Lys-Lys, Arg-Arg, Arg-Lys et

SEQUENCE PARTIELLE DE L'HISTONE H<sub>5</sub>

THR-GLU-SER-LEU-VAL-LEU-SER-PRO-ALA-PRO-ALA-LYS-PRO-LYS-<sup>GLN</sup>  
1 10 ARG VAL-LYS-ALA-SER-ARG-ARG-SER-ALA-SER-HIS-PRO-  
20

THR-TYR-SER-GLU-MET-ILE-ALA-ALA-ALA-ILE-ARG-ALA-GLU-LYS-SER-ARG-GLY-GLY-SER-SER-ARG-GLN-SER-ILE-GLN-LYS-  
30 40 50

TYR-ILE-LYS-SER-HIS-TYR-LYS-VAL-GLY-HIS-ASN-ALA-ASP-LEU-GLN-ILE-LYS-LEU-SER-ILE-ARG-ARG-LEU-LEU-ALA-ALA-  
60 70

GLY-VAL-LEU-LYS-GLN-THR-LYS-GLY-VAL-GLY-ALA-GLY-SER-SER-PHE-ARG-LEU-ALA-LYS-SER-ASP-LYS-ALA-LYS-ARG-SER-  
80 90 93 99 100

PRO-GLY-LYS-LYS-LYS-ALA-LYS-(ALA-LYS-LYS-PRO)-LYS-THR-VAL-LYS-ARG) (ALA-LYS-SER-GLY-ALA-ARG) (ALA-ARG-SER-  
110

PRO-ALA-LYS-LYS-PRO-LYS-ALA-THR-ALA-ARG-LYS) (ALA-SER-LYS-ALA-LYS-LYS-ALA-VAL-ARG-ARG-SER-THR-SER-PRO-

LYS-LYS-ALA-ALA-ARG-PRO-ARG) (LYS-SER-PRO-LYS-LYS-LYS) (VAL-LYS-ALA-LYS) (SER-ARG-LYS) (LYS-LYS-SER-ARG-

ALA-SER-PRO-LYS-LYS) (SER-LYS-PRO-ARG) [PRO, SER, LYS, ALA]-ARG-LYS-LYS(OH)

FIGURE 16



Lys-Arg et des triplets Lys-Lys-Lys- et Arg-Lys-Lys sites potentiels d'interactions électrostatiques avec le D.N.A.

L'analogie observée entre les histones H<sub>1</sub> et H<sub>5</sub> sur le plan de leur solubilité dans l'acide perchlorique ou trichloracétique à 5 %, de leur composition en acides aminés - richesses en lysine, alanine, sérine et proline - et de la répartition des résidus basiques et hydrophobes dans la chaîne peptidique, se précise au niveau de la région COOH-terminale de ces protéines. On y trouve en effet des homologies nombreuses de séquence telles que celles situées au voisinage du résidu de phénylalanine respectivement en position 106 dans l'histone H<sub>1</sub> RTL-3 (JONES et al., 1974) et 93 dans l'histone H<sub>5</sub> (SAUTIERE et al., 1975) - (figure 17) et celles situées dans la partie basique où apparaissent des séquences répétitives de type Ser-Pro-Lys-Lys et Ala-Lys-Lys-Pro.

Ceci suggère un rôle particulier de l'histone H<sub>5</sub> dans la condensation de la chromatine et de son maintien dans cet état condensé.

En ce qui concerne notre travail, le peptide Px (résidus 94 à 185) constituera désormais notre matériel de base pour la détermination de la séquence complète de la molécule.

Si la trypsine et la thermolysine possèdent souvent le même site de coupure, l'hydrolyse en temps limité du peptide Px par la thermolysine devrait permettre l'obtention de longs peptides.

Enfin l'utilisation de la thrombine qui pourrait couper les liaisons Lys-Pro ainsi que l'ont signalé CHAPMAN et al. (1976) et de l'élastase spécifique des liaisons hydrophobes devrait nous donner les peptides nécessaires au recouvrement des séquences partielles déjà connues.

SEQUENCES HOMOLOGUES AU VOISINAGE DES RESIDUS AROMATIQUES (★)  
DES HISTONES H<sub>1</sub> (RTL-3) ET H<sub>5</sub> (ERYTHROCYTE DE POULET)

H <sub>1</sub>	★	TYR-ASP-VAL-GLY-LYS-ASN-ASN-	80	--SER-ARG-ILE-LYS-LEU-GLY-LEU-LYS-SER-LEU-VAL-SER-LYS-	90
H <sub>5</sub>	★	TYR-LYS-VAL-GLY-HIS-ASN-ALA-ASP-LEU-GLN-ILE-LYS-LEU-SER-ILE-ARG-ARG-LEU-LEU-ALA-ALA-	58      60	70	
H <sub>1</sub>		GLY-THR-LEU-VAL-	100	-GLU-THR-LYS-GLY-THR-GLY-ALA-SER-GLY-SER-★PHE-LYS-LEU-	109 110
H <sub>5</sub>		GLY-	80	-VAL-LEU-LYS-GLN-THR-LYS-GLY-VAL-GLY-ALA-GLY-SER-SER-★PHE-ARG-LEU-ALA-LYS-SER-	90      93
H <sub>1</sub>		ASP-LYS-LYS-ALA			
H <sub>5</sub>		ASP-LYS-	100	-ALA	

FIGURE 17



BIBLIOGRAPHIE

---

- |  | <u>Pages</u> |
|--|--------------|
| BELLAIR J.T., MAURITZEN C.M. (1964)<br>The fractionation of $\alpha$ -histones from chicken erythrocyte nuclei.<br>II - Fractions obtained by exclusion chromatography.<br><u>Austral. J. Biol. Sci.</u> , <u>17</u> , 1001-1015.  | 6            |
| BUTLER P.J.G., HARRIS J.I., HARTLEY B.S. and LEBERMAN R. (1969)<br>The use of maleic anhydride for the reversible blocking of amino groups in polypeptide chains.<br><u>Biochem. J.</u> , <u>112</u> , 679-689.  | 22           |
| CHAMPAGNE M., MAZEN A. et WILHELM X. (1968)<br>Histones d'érythrocytes de poulets.<br>I - Fractionnement des histones totales et isolement d'une histone spécifique.<br><u>Bull. Soc. Chim. Biol.</u> , <u>50</u> , 1261-1272.   | 4,5,8,9      |
| CHAPMAN G.E., HARTMAN P.G. et BRADBURY E.M. (1976)<br>Studies on the role and mode of operation of the very-lysine-rich histone H <sub>1</sub> in eukaryote chromatin.<br>The isolation of the globular and non-globular regions of the histone H <sub>1</sub> molecule.<br><u>Eur. J. Biochem.</u> , <u>61</u> , 69-75. | 119          |

- DE LANGE R.J., FAMBROUGH D.M., SMITH E.L. and BONNER J. 2,24  
(1969)  
Calf and Pea histone IV. II. The complete aminoacid  
sequence of calf thymus histone IV : présence of  $\epsilon$ -N-  
acetyllysine.  
J. Biol. Chem., 244, 319-334.
- DE LANGE R.J., HOOPER J.A. and SMITH E.L. (1972) 2  
Complete aminoacid sequence of calf thymus histone III.  
Pro. Natl. Acad. Sci. US., 69, 882-884.
- EASLEY C.W., ZEGERS B.J.M. and DE VIJLDER M. (1969) 31,34  
Application of specialized techniques for specific  
staining of peptide maps on various media.  
Biochim. Biophys. Acta, 175, 211-213.
- EDMAN P. (1956) 33  
On the mechanism of the Phenylisothiocyanate degrada-  
tion of peptides.  
Acta Chem. Scand., 10, 761-768.
- EDMAN P. et SJÖQUIST J. (1956) 34  
Identification and semi-quantative determination of  
phenylthiohydantoins.  
Acta Chem. Scand., 10, 1507-1509.
- EDWARDS L.J. and HNILICA L.S. (1968) 46  
The specificity of histones in Nucleated Erythrocytes.  
Experientia, 24, 228-229.
- GAREL A., BURCKARD J., MAZEN A. and CHAMPAGNE M. (1972) 9,10  
Histones d'érythrocytes de poulets.  
III - Mise en évidence de l'hétérogénéité du fragment  
N-terminal de l'histone spécifique.  
Biochimie, 54, 451-455.

- GAREL A., MAZEN A. and CHAMPAGNE M. 55,59,70  
SAUTIERE P., KMIECIK D., LOY O. and BISERTE G. (1975)  
Chicken erythrocyte histone H<sub>5</sub>.  
I - Aminoterminal sequence (70 residues).  
Febs Lett., 50, 195-199.
- GRAY W.R. and HARTLEY B.S. (1963) 32,33  
A fluorescent end-group reagent for proteins and  
peptides.  
Biochem. J., 89, 59 P. - 60 P.
- GREENAWAY P.J. (1971) 10  
Studies of the primary structure of chicken Erythrocyte  
Histone Fraction V.  
Biochem. J., 124, 319-325.
- GREENAWAY P.J. and MURRAY K. (1971) 8,9,10,11,  
46,56,77,  
81  
Nature New Biol., 229, 233-238.
- GROS C. and LABOUESSE B. (1969) 33  
Study of the dansylation reaction of amino-acids,  
peptides and proteins.  
Eur. J. Biochem., 7, 463-470.
- HIRS C.H.W., MOORE S. and STEIN W.H. (1960) 33  
The sequence of the amino acid residues in performic  
acid-oxidized Ribonuclease.  
J. Biol. Chem., 235, 633-647.
- HNILICA L.S. (1964) 6  
The specificity of histones in chicken erythrocytes.  
Experientia, 20, 13-14.



- IWAI K., ISHIKAWA K. and HAYASHI H. (1970) 2  
Amino acid sequence of slightly lysine-rich histone.  
Nature, 226, 1056-1058.
- JOHNS E.W., PHILLIPS D.M.P., SIMSON P. and BUTLER J.A.V. 6  
(1960)  
Improved fractionation of arginine-rich histones from calf  
thymus.  
Biochem. J., 77, 631-636.
- JOHNS E.W. and BUTLER J.A.V. (1962) 3  
Further fractionations of histones from calf thymus.  
Biochem. J., 82, 15-18.
- JOHNS E.W. (1964) 3  
Preparative methods for histone fractions from calf thymus.  
Biochem. J., 92, 55-59.
- JOHNS E.W. (1967) 3  
A method for the selective extraction of histone frac-  
tions F2a<sub>1</sub> and F2a<sub>2</sub> from calf thymus desoxyribonucleoprote  
tein at pH 7.0.  
Biochem. J., 105, 611-614.
- JOHNS E.W. and DIGGLE J.H. (1969) 4,5,46  
A method for the large scale preparation of the Avian  
Erythrocyte Specific Histone F<sub>2-C</sub>.  
Eur. J. Biochem., 11, 495-498.
- JONES G.M.T., RALL S.C. and COLE R.D. (1974) 119  
Extension of the amino acid sequence of a lysine-rich  
histone.  
J. Biol. Chem., 249, 2548-2553.

- MAZEN A. and CHAMPAGNE M. (1972) 2  
Histones d'érythrocytes de poulets.  
IV - Etude quantitative des histones au cours de la  
maturation de l'érythrocyte.  
Biochimie, 54, 1273-1279.
- MURRAY K., VIDALI G. and NEELIN J.M. (1968) 4,5  
The stepwise removal of histones from chicken erythro-  
cyte nucleoprotein.  
Biochem. J., 107, 207-215.
- NEELIN J.M., CALLAHAN P.X., LAMB D.C. and MURRAY K. (1964) 6  
Histones of chicken erythrocyte nuclei.  
Can. J. Biochem., 42, 1743-1752.
- OUDET P., GROSS-BELLARD M. and CHAMBON P. (1974) 1  
Electron Microscopic and Biochemical Evidence that Chro-  
matin Structure is a repeating Unit.  
Cell., 4, 281-300.
- OLINS A.L. and OLINS D.E. (1973) 1  
Spheroid chromatin units ( $\nu$ bodies).  
J. Cell. Biol., 59, 252-a.
- OLINS A.L. and OLINS D.E. (1974) 1  
Spheroid chromatin units ( $\nu$ bodies).  
Science (Wash. D.C.), 183, 330-332.
- PANYIM S. and CHALKLEY R. (1969) 6  
High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones.  
Arch. Biochem. Biophys., 130, 337-346.
- RAMACHANDRAN L.K. and WITKOP B. (1967) 17,18  
N-Bromosuccinimide cleavage of peptides.  
Methods in Enzymology (HIRS. C.H.W. Ed.) Academic Press,  
New-York, 11, 283-299.

- RASMUSSEN P.S., MURRAY K. et LUCK J.M. (1962) 3  
On the complexity of calf thymus histone.  
Biochemistry, 1, 79-89.
- SAUTIERE P., TYROU D., LAINE B., MIZON J., LAMBELIN-  
BREYNAERT M.D., RUFFIN P. et BISERTE G. (1972) 2  
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., TYROU D., LAINE B., MIZON J., RUFFIN P. et  
BISERTE G. (1974) 2  
Covalent structure of calf thymus ALK-Histone.  
Eur. J. Biochem., 41, 563-576.
- SAUTIERE P., KMIECIK D., LOY O., BRIAND G. and BISERTE G. 80,119  
GAREL A. and CHAMPAGNE M. (1975)  
Chicken erythrocyte histone H<sub>5</sub>.  
II - Amino acid sequence adjacent to the phenylalanine.  
residue.  
Febs Lett., 50, 200-203.
- SAUTIERE P., BRIAND G., KMIECIK D., LOY O. and BISERTE G. 113  
GAREL A. and CHAMPAGNE M. (1976)  
Chicken erythrocyte histone H<sub>5</sub>.  
III - Sequence of the amino-terminal half of the mole-  
cule (111 residues).  
Febs Lett., 63, 164-166.
- STEHELIN D. et DURANTON H. (1969) 32  
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. and ITANO H.A. (1966)

31,34

Phenanthrene quinone as an analytical reagent for arginine and other monosubstituted guanidines.

Biochim. Biophys. Acta, 130, 538-540.

YEOMAN L.C., OLSON M.O.J., SUGANO N., JORDAN J.J.,

2

TAYLOR C.W., STARBUCK W.C. and BUSCH H. (1972)

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

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

