

50376  
1976

70 Numéro d'ordre : 603

50376  
1976  
70

UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

M É M O I R E

présenté à l'Université de Lille I  
pour obtenir le titre de

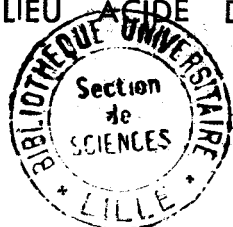
DOCTEUR DE 3<sup>e</sup> CYCLE EN BIOCHIMIE

par

Gilbert BRIAND

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

ÉTUDE DES PEPTIDES OBTENUS PAR HYDROLYSE  
ENZYMATIQUE (PROTÉASE STAPHYLOCOCCIQUE ET THERMOLYSINE)  
ET PAR HYDROLYSE EN MILIEU ACIDE DILUÉ DE LA PROTÉINE



Présenté le 8 Juillet 1976 devant la Commission d'examen

Membres du Jury : M.M. J. MONTREUIL, Président

G. BISERTE

J. KREMBEL

P. SAUTIERE

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

DOYENS HONORAIRES de l'Ancienne Faculté des Sciences

MM. 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

MM. 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.	CELET 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>le</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. JOURNEL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
M <sup>le</sup> KOSMAN Yvette	Géométrie
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
M <sup>le</sup> LEGRAND Denise	Algèbre
M <sup>le</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	Biologique 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>le</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 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) sous la direction de Monsieur Pierre SAUTIERE, Maître de Recherches au CNRS.

A ma femme,

A ma fille,

A mes parents et beaux-parents,

Ce travail a été effectué dans le cadre de l'ACC - Interactions moléculaires en biologie : Interactions histone-DNA (Contrats DGRST 72.7.0505 et 75.7.0187).

Il a fait l'objet des présentations :

- "Studies of the primary structure of 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.
- "Méthode de la détermination de la structure primaire des histones"  
(Posters)  
Colloque méthodes physicochimiques appliquées à la biologie  
Paris 13-14 novembre 1975.
- "Sequence of the amino terminal half of the chicken erythrocyte  
Histone H<sub>5</sub>"  
Tenth International Congress of Biochemistry  
Hambourg 25-31 juillet 1976.

et des publications suivantes :

- "Chicken erythrocyte histone H<sub>5</sub> II Amino acid sequence  
adjacent to the phenylalanine residue"  
SAUTIERE, P., KMIĘCIK, D., LOY, O., BRIAND, G.,  
BISERTE, G., GAREL, A. and CHAMPAGNE, M., (1975)  
FEBS Lett., 50, 200-203.
- "Chicken erythrocyte histone H<sub>5</sub> ; III Sequence of the amino-  
terminal half of the molecule (111 résidus)  
SAUTIERE, P., BRIAND, G., KMIĘCIK, D., LOY, O.,  
BISERTE, G., GAREL, A. and CHAMPAGNE, M., (1976)  
FEBS Lett., 63, 164-166.



## 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-

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:

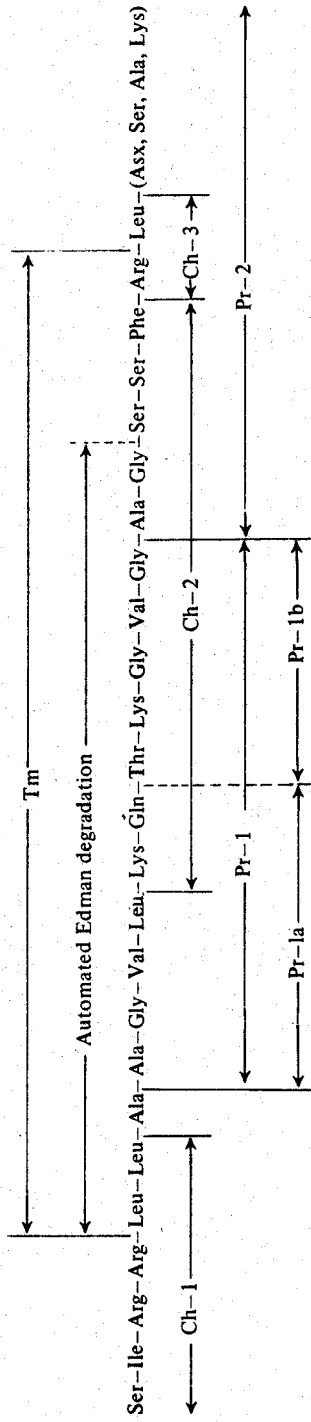
Ala-Gly-Ser-Ser-Phe-Arg-Leu-(Asx, Ser, Ala, Lys)

\* 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>, IIb<sub>1</sub>, ALK); H<sub>2</sub>B (F<sub>2b</sub>, IIb<sub>2</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.

Table 1

Amino acid sequence adjacent to the phenylalanyl residue in the chicken erythrocyte histone H<sub>5</sub>



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.

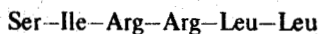
From the same hydrolysate we have isolated the peptide Pr-1 and its two derived peptides Pr-1a and Pr-1b. The peptide Pr-1 overlaps the median part of the tryptic peptide (table 1). The presence of the peptides Pr-1, Pr-1a, Pr-1b and Pr-2 in the staphylococcal protease hydrolysate led us to question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



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



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	-Gln-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. SAUTIÈRE, 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>, H<sub>b1</sub>, ALK); H<sub>2</sub>B (F<sub>2b</sub>, H<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).

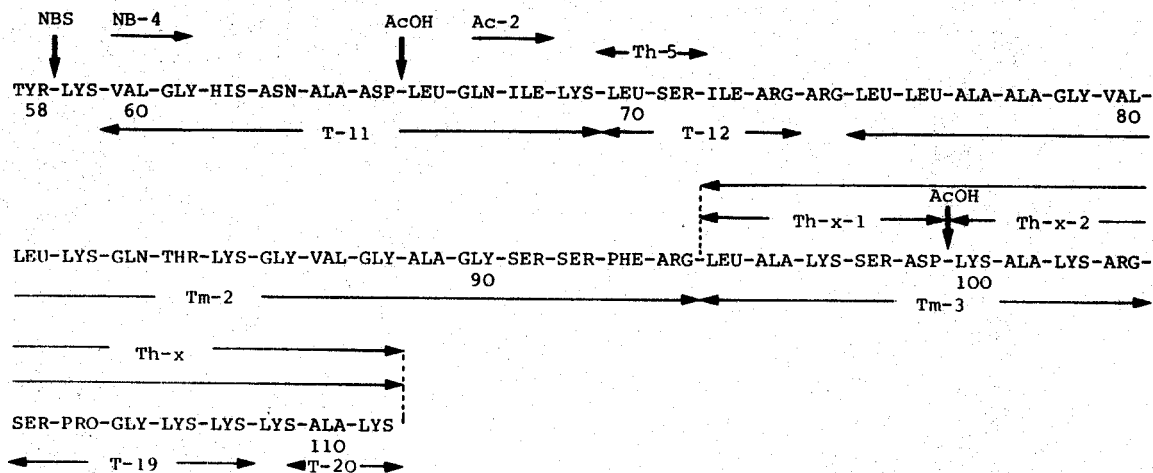


Fig.1. Ordering of the peptides from residue 58 to residue 111 in the amino acid sequence of chicken erythrocyte histone H<sub>5</sub>. Tryptic peptides are designated by T- and Tm- (from maleylated peptide NB-4), and thermolytic peptides by Th-. Sites of cleavage of the protein by *N*-bromosuccinimide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

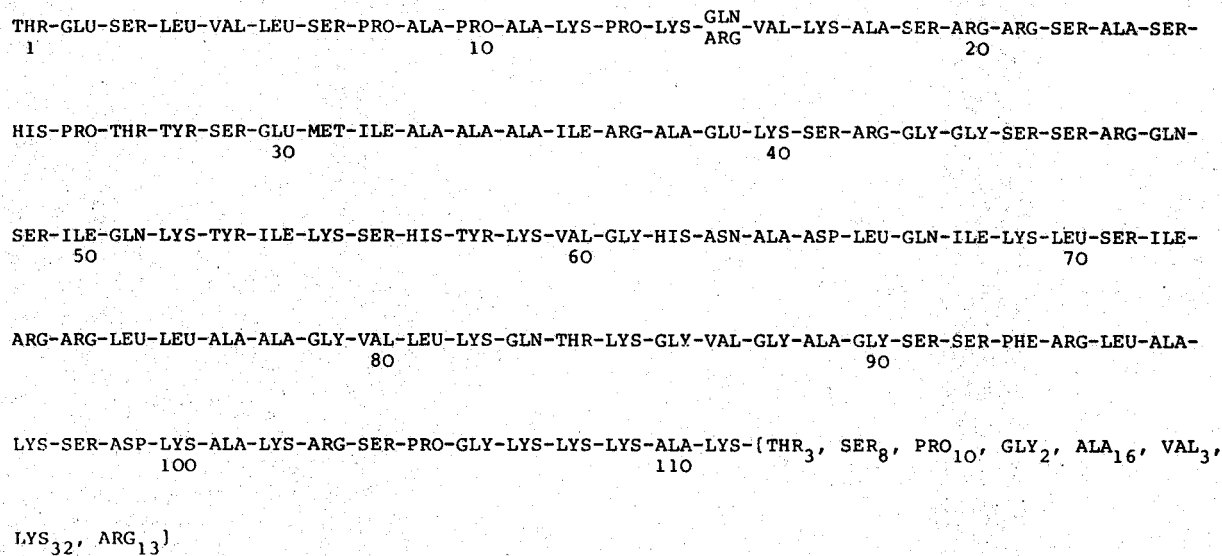


Fig.2. Sequence of the amino-terminal half of the chicken erythrocyte histone H<sub>5</sub>.

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.

## ABREVIATIONS UTILISEES DANS LE TEXTE

DNA	:	acide désoxyribonucléique
AcOH	:	acide acétique
CNBr	:	bromure de cyanogène
DNS	:	dansylamino-acide
NBS	:	N-bromosuccinimide
PTH	:	phénylthiohydantoines d'acides aminés
RMN	:	résonance magnétique nucléaire



## TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
<u>INTRODUCTION</u> .....	1
 <u>CHAPITRE I :</u>	
<u>HISTONE H<sub>5</sub> D'ERYTHROCYTE DE POULET.</u> .....	4
I - Préparation de l'histone H <sub>5</sub> .....	5
1) Préparation de la chromatine à partir des érythrocytes de Poulets .....	5
2) Extraction de l'histone H <sub>5</sub> à partir de la chromatine .....	5
3) Purification de l'histone H <sub>5</sub> .....	5
II - Composition en acides aminés .....	7
III - Etapes de la détermination de la structure primaire de l'histone H <sub>5</sub> .....	10
 <u>CHAPITRE II :</u>	
<u>MATERIEL ET METHODES</u> .....	17
A) Action de la N-bromosuccinimide sur l'histone H <sub>5</sub> : Isolement du fragment COOH-terminal NB-4 .....	18
I - Généralités .....	18
II - Mécanisme d'action de la NBS .....	18
III - Mode opératoire .....	19
IV - Résultats .....	19
B) Méthodes de coupure de l'histone H <sub>5</sub> et de son fragment NB-4	22
I - Coupure de l'histone H <sub>5</sub> ou de son fragment NB-4 par la protéase staphylococcique .....	22
1) Hydrolyse par la protéase staphylococcique ....	22
2) Fractionnement des hydrolysats .....	22
3) Contrôle de pureté .....	23

II - Coupure du fragment NB-4 de l'histone H <sub>5</sub> par la thermolysine .....	24
1) Hydrolyse par la thermolysine .....	24
2) Fractionnement de l'hydrolysate thermolysique .....	24
3) Contrôle de pureté .....	25
III - Coupure de l'histone H <sub>5</sub> par l'acide acétique 0,25 N .....	25
1) Hydrolyse par l'acide acétique 0,25 N .....	26
2) Fractionnement des hydrolysats .....	28
3) Contrôle de pureté .....	28
IV - Purification des peptides .....	29
V - Etude des peptides .....	29
1) Composition en acides aminés .....	29
2) Détermination de l'extrémité NH <sub>2</sub> -terminale par dansylation .....	29
3) Détermination de l'extrémité COOH-terminale .....	30
4) Dégradation des peptides par la méthode de EDMAN .....	30
VI - Etude des peptides en résonance magnétique nucléaire .....	32

### CHAPITRE III :

<u>DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE L'HISTONE H<sub>5</sub></u> .....	33
A) Hydrolyse de l'histone H <sub>5</sub> et de son fragment NB-4 par une protéase staphylococcique .....	34
I - Hydrolyse de l'histone H <sub>5</sub> par la protéase staphylococcique .....	35
II - Hydrolyse du fragment NB-4 de l'histone H <sub>5</sub> par la protéase staphylococcique .....	46
III - Discussion .....	53
B) Hydrolyse du fragment NB-4 de l'histone H <sub>5</sub> par la thermolysine .....	54
C) Hydrolyse de l'histone H <sub>5</sub> par l'acide acétique 0,25 N .....	103
I - Hydrolyse de 6 heures de l'histone H <sub>5</sub> par l'acide acétique 0,25 N .....	104
1) Fractionnement sur Sephadex G. 50 F .....	104
2) Fractionnement sur Biogel P. 60 .....	111

II - Hydrolyse de 12 heures de l'histone H <sub>5</sub> par l'acide acétique 0,25 N .....	120
III - Etude en résonance magnétique nucléaire et résultats partiels .....	129
<u>DISCUSSION ET CONCLUSION</u> .....	131
<u>BIBLIOGRAPHIE</u> .....	139

## 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 protéines 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-histone et histone-histone, car nos 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 composées à la fois de DNA et d'histones appelées "nubodies" (A. et DOLINS, 1973-1974) ou nucléosomes (OUDET et al., 1974).

Chaque nucléosome semble constitué d'un fragment de DNA de 200 paires de bases environ et d'un ensemble de 8 molécules d'histones comportant 2 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 histone-DNA et histone-histone au sein de la chromatine, il est nécessaire de connaître la structure primaire des histones.

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

Les séquences d'histone H<sub>1</sub> de Truite (DIXON et al., communication personnelle, 1976) et de Lapin RTL<sub>3</sub> (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 acides aminés 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 moëlle et de la rate, l'histone H<sub>5</sub> est trouvée uniquement dans les réticulocytes et les érythrocytes matures. (MAZEN et CHAMPAGNE, 1972).

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

NOMENCLATURE ET MASSES MOLECULAIRES DES HISTONES

RASMUSSEN (1962)	(1962)	JOHNS (1964)	(1967)	CIBA SYMPOSIUM Londres 1974		Masses moléculaires
I		F <sub>1</sub>		H <sub>1</sub>	Très riche en lysine	21 000
IIb <sub>2</sub>		F <sub>2</sub> <sup>b</sup>		H <sub>2</sub> <sup>B</sup>	Riche en lysine	13 774
IIb <sub>1</sub>		F <sub>2</sub> <sup>a</sup> <sub>2</sub>		H <sub>2</sub> <sup>A</sup>	Riches en arginine	14 005
III		F <sub>3</sub>		H <sub>3</sub>		15 324
IV		F <sub>2</sub> <sup>a</sup> <sub>1</sub>		H <sub>4</sub>		11 282
V		F <sub>2</sub> <sup>c</sup>		H <sub>5</sub>		Très riche en lysine Spécifique des érythrocytes nucléés



TABLEAU I

CHAPITRE I

---

L'HISTONE H<sub>5</sub> D'ERYTHROCYTE DE POULET

---

## 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 le tableau II.

### 1 - PREPARATION DE LA CHROMATINE A PARTIR DES ERYTHROCYTES 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).

### 2 - EXTRACTION DE L'HISTONE H<sub>5</sub> A 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.

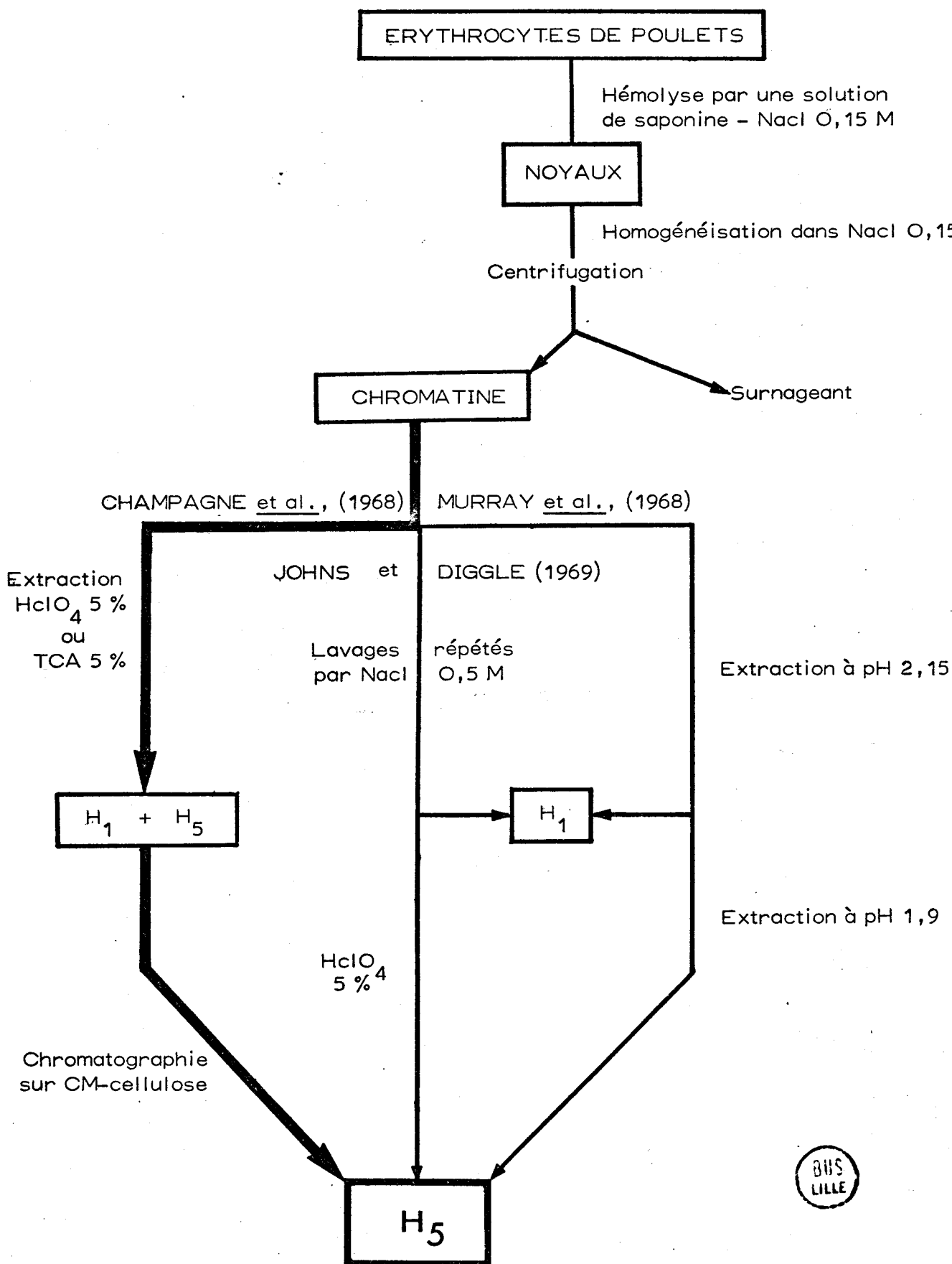
### 3 - PURIFICATION DE L'HISTONE H<sub>5</sub>

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 ;



TABLEAU II

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



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

La fraction éluee par HCl 0,02 N est la fraction spécifique des érythrocytes de poulets, analogue à la fraction F<sub>2c</sub> de HNILICA (1964), ou la fraction F<sub>5</sub> de NÉELIN 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 III.

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

TABLEAU III  
COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS 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) <sup>(*)</sup>	4
Thréonine	3,37	6,23 (6)	11
Sérine	13,68	25,30 (25)	13
Acide glutamique	4,01	7,42 (7-8) <sup>(**)</sup>	7
Proline	7,01	12,97 (13)	20
Glycine	4,87	9,00 (9)	13
Alanine	15,49	28,65 (29)	56
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) <sup>(***)</sup>	61
Arginine	12,97	22,99 (21-20) <sup>(***)</sup> (**)	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 de résidus arrondi à l'unité

(\*\*) 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.



Les deux premiers tampons 0,2 M en sodium permettent l'éluion des acides aminés acides et neutres. Le troisième 1,2 M en sodium assure l'éluion 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 III 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 tryptophane 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 2,00.

Un résidu de thréonine partiellement N-acétylé (EDWARDS et al., 1968) 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) (GREENAWAY et MURRAY, 1971).

### 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 acides aminés du fragment CN-1 a été établie par GREENAWAY et MURRAY (1971) ; elle est présentée dans le tableau IV . Ces auteurs ainsi que GAREL et al., (1972) ont mis en évidence une micro-hétérogénéité 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 acides 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 (tableau V ).

TABLEAU IV

SEQUENCE EN ACIDES AMINES DU FRAGMENT NH<sub>2</sub>-TERMINAL DE L'HISTONE H<sub>5</sub>

OBTENU APRES COUPEURE DE LA PROTEINE PAR LE BROMURE DE CYANOGENE

THR-GLU-SER-LEU-VAL-LEU-SER-PRO-ALA-PRO-ALA-LYS-PRO-LYS-<sup>10</sup> ARG<sup>15</sup>-VAL-LYS-ALA-SER-ARG-SER-ALA-SER-<sup>20</sup>

HIS-PRO-THR-TYR-SER-GLU-HSER  
(MET)  
31

[ d'après GREENAWAY et al. (1971) ]



TABLEAU V

SEQUENCE NH<sub>2</sub>-TERMINALE DU FRAGMENT COOH-TERMINAL OBTENU PAR COUPEURE

DE L'HISTONE H<sub>5</sub> AVEC LE BROMURE DE CYANOGENE

(DEGRADATION AUTOMATIQUE DE EDMAN)

CNBr

31 ↓

40

52

MET-ILE-ALA-ALA-ILE-ARG-ALA-GLU-LYS-X-ARG-X-GLY-SER-SER-ARG-GLN-X-X-GLU-LYS  
ou  
(THR)(THR) ou  
(ALA)



Pour tenter de réaliser un plus grand nombre de cycles de dégradation, en améliorant en particulier la solubilité du substrat dans le tampon Quadrol, et en évitant les pertes de substrat porteur de nombreux groupes  $\epsilon$ -PTC 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 (tableau V) ont été levées grâce à l'étude de des peptides trypsiques et chymotrypsiques 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 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 hydrolyser 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 protéase staphylococcique, par la thermolysine, 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).

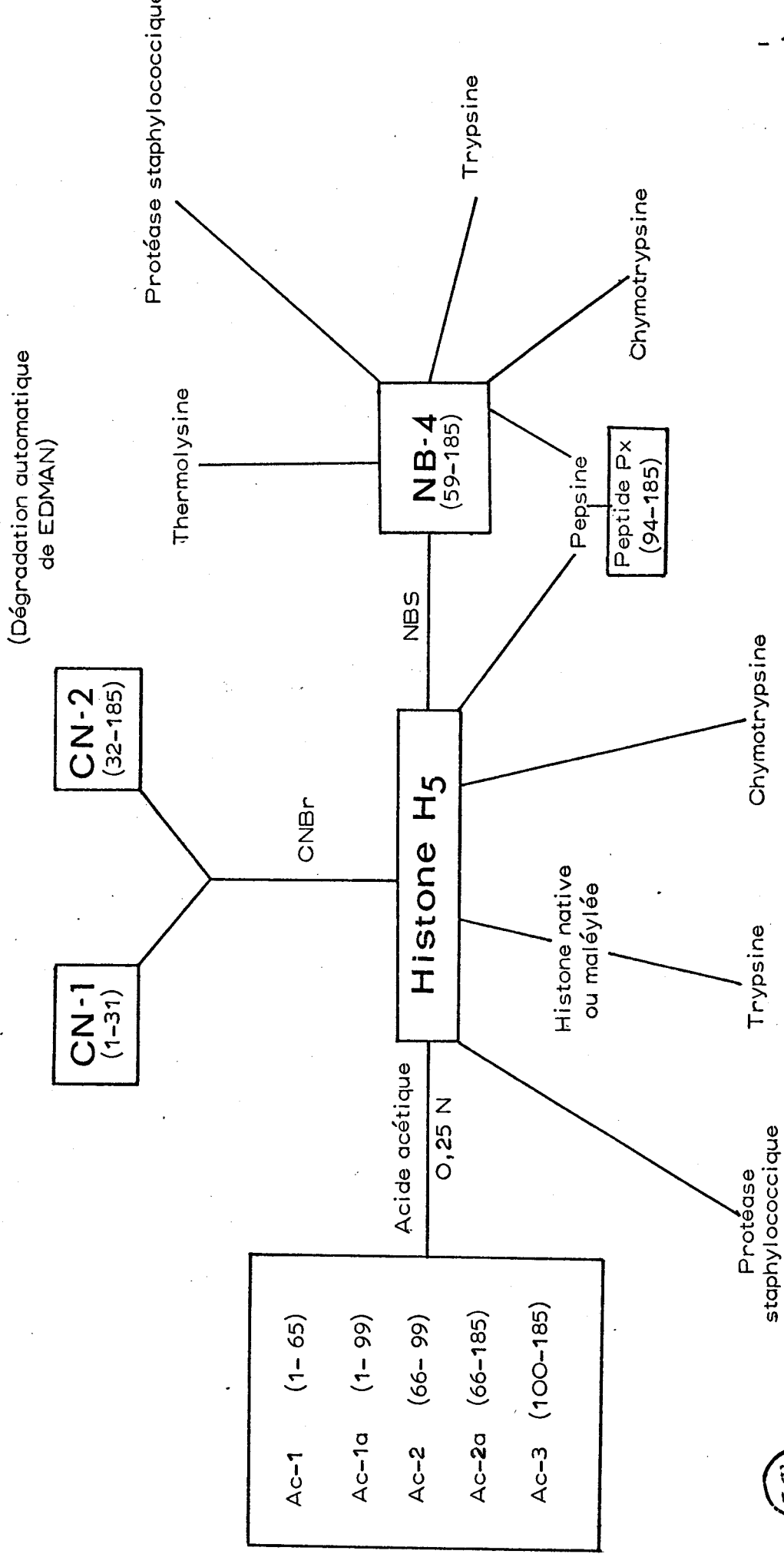
Pour cette détermination, l'hydrolyse pepsique se révèle d'un très grand intérêt, puisqu'elle libère à partir du fragment NB-4 ou de la molécule entière d'histone H<sub>5</sub> un fragment peptidique de 92 résidus en position COOH-terminale dans la protéine. Ce peptide est obtenu avec un excellent rendement (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 position 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-1a (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.

TABLEAU VI

SCHEMA DE LA STRATEGIE ADOPTEE POUR LA DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE L'HISTONE H5<sub>5</sub>



BUS LILLE

Notre travail consiste en l'étude des peptides obtenus par hydrolyse enzymatique (protéase staphylococcique et thermolysine) et par hydrolyse en milieu acide dilué de la protéine.

Il s'insère dans un ensemble de travaux réalisés en collaboration avec :

- Melle Odile LOY. Etude des peptides chymotrypsiques et pepsiques de l'histone H<sub>5</sub> et de son fragment NB-4.

- M. Daniel KMIECIK. Etude des peptides trypsiques de l'histone H<sub>5</sub> native et maléylée et de son fragment NB-4.

## CHAPITRE II

---

### MATERIEL et METHODES

---

- A - ACTION DE LA N-BROMOSUCCINIMIDE SUR L'HISTONE H<sub>5</sub> :  
ISOLEMENT DU FRAGMENT COOH-TERMINAL NB-4
  
- B - METHODES DE COUPURE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> ET DE SON  
FRAGMENT NB-4

A) ACTION DE LA N-BROMOSUCCINIMIDE SUR L'HISTONE H<sub>5</sub> :

ISOLEMENT DU FRAGMENT COOH-TERMINAL NB-4

I - GENERALITES

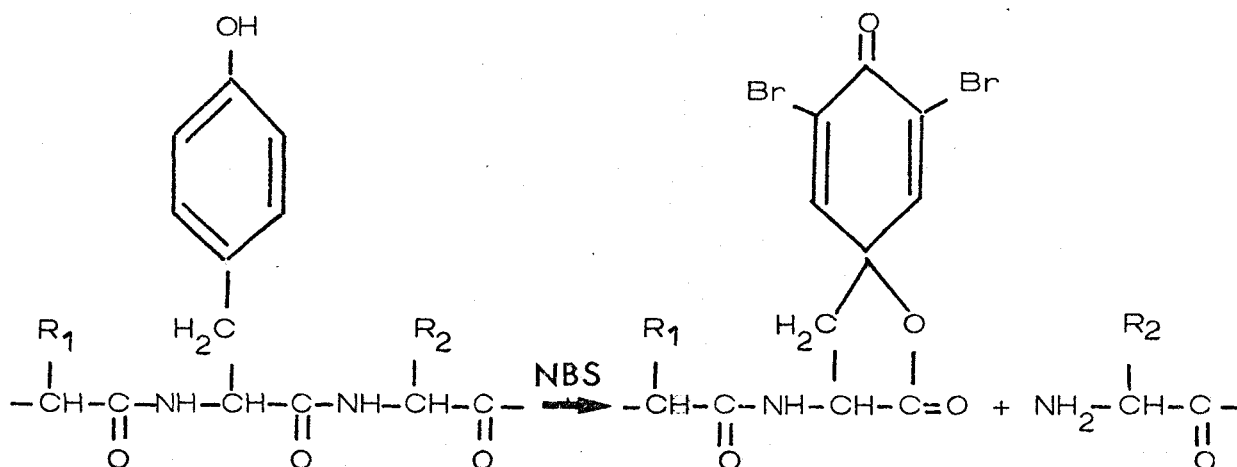
L'action de la N-bromosuccinimide (NBS) sur une chaîne peptidique s'exerce au niveau des liaisons tryptophyle, tyrosyle et histidyle

L'histone H<sub>5</sub> contient 3 résidus de tyrosine et 3 résidus d'histidine.

Dans des conditions relativement douces, température ambiante, milieu acide acétique 50 %, on obtient uniquement la coupure des liaisons tyrosyle

Cependant, cette méthode présente un inconvénient car l'histidine est bromée. La coupure au niveau du résidu d'histidine peut être obtenue par chauffage pendant une heure à 100° C dans l'acide acétique à 50 %.

II - MECANISME D'ACTION DE LA NBS



d'après RAMACHANDRAN et WITKOP (1967)

### III - MODE OPERATOIRE

La réaction est réalisée à la température ambiante et en milieu acide acétique à 50 % avec un rapport de sept  $\mu$ moles de NBS pour une  $\mu$ mole de tyrosine.

La NBS est ajoutée en 5 fois avec une demi-heure d'agitation à l'obscurité entre chaque addition. La solution diluée 10 fois est ensuite lyophilisée.

L'hydrolysats est chromatographié sur colonne de carboxyméthyl-cellulose (CM. 52 Whatman) en milieu acétate de sodium 0,125 M et à pH 4,3 et élué par un gradient de chlorure de sodium de 0 à 1 M.

### IV - RESULTATS

Les fragments NB-1, NB-2, NB-3, NB-4 (figure 1) obtenus par coupure au niveau des 3 résidus de tyrosine sont repérés dans l'éluat par lecture à 230 nm et à 260 nm.

Le fragment NB-4, facilement séparé des 3 autres fragments et élué à force ionique élevée, n'absorbe pas à 260 nm car ne comportant pas de tyrosine modifiée (diénone spirolactone) qui absorbe intensément à cette longueur d'onde.

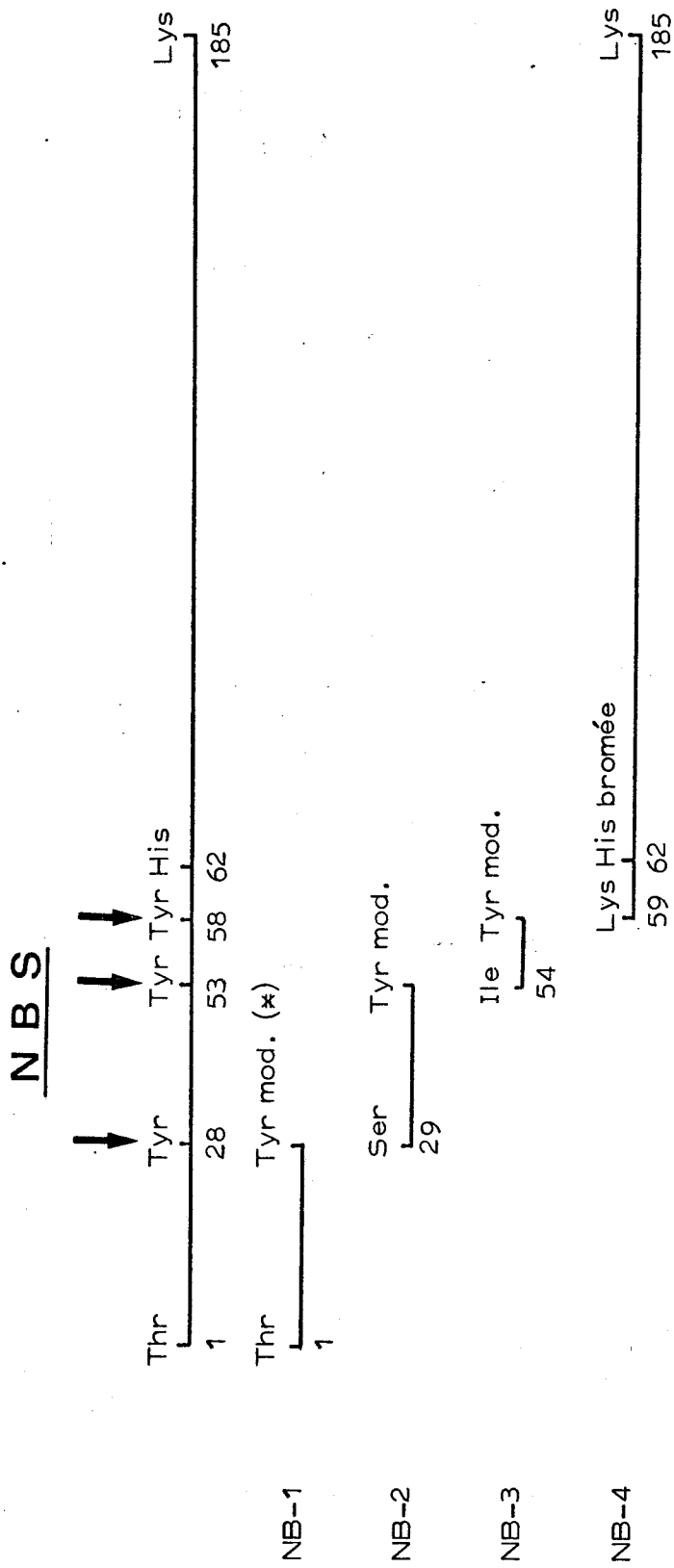
La composition en acides aminés des 4 fragments de l'histone H<sub>5</sub> est donnée dans le tableau VII.

Le fragment NB-4 contient 127 résidus d'acides aminés parmi lesquels on compte 3 résidus d'acide aspartique, 2 résidus d'acide glutamique, 1 résidu de phénylalanine, plusieurs résidus hydrophobes et surtout la plupart des résidus basiques de la molécule.

Le fragment NB-4 est plus court que l'histone H<sub>5</sub> (2/3 de la molécule environ) et le nombre de sites de coupure par la chymotrypsine, la protéase staphylococcique, la thermolysine, la pepsine, est plus restreint. De ce fait, les hydrolysats obtenus sont moins complexes.

Figure 1

ACTION DE LA N-BROMOSUCCINIMIDE (NBS) SUR L'HISTONE H<sub>5</sub>



(\*) Tyr mod. : tyrosine modifiée (diénone spirolactone)



TABLEAU VII

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

Acides aminés	H <sub>5</sub>	NB-1	NB-2	NB-3	NB-4
Acide aspartique	3	-	-	-	3
Thréonine	6	2	-	-	4
Sérine	25	5	5	1	14
Acide glutamique	7-8	1-2	4	-	2
Proline	13	4	-	-	9
Glycine	9	-	2	-	7
Alanine	29	4	4	-	21
$\frac{1}{2}$ Cystine	-	-	-	-	-
Valine	8	2	-	-	6
Méthionine	1	-	1	-	-
Isoleucine	6	-	3	1	2
Leucine	8	2	-	-	6
Tyrosine	3	1	1	1	-
Phénylalanine	1	-	-	-	1
Histidine	3	ND <sup>(*)</sup>	-	ND <sup>(*)</sup>	ND <sup>(*)</sup>
Lysine	42	3	2	1	36
Arginine	21-20	3-2	3	-	15
Nombre de résidus	185	28	25	5	127

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

BUS  
LILLE



## B - LES METHODES DE COUPURE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> ET DE SON

### FRAGMENT NB-4

#### I - COUPURE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> OU DE SON FRAGMENT NB-4 PAR LA PROTEASE STAPHYLOCOCCIQUE

DRAPEAU et al., (1972) et HOUMARD et DRAPEAU (1972) ont isolé et étudié une protéase de la souche V8 de staphylococcus aureus. La protéase coupe spécifiquement les liaisons aspartyle et glutamyle en tampon phosphate de potassium ou sodium à pH 7,8. La spécificité peut être limitée aux seules liaisons glutamyle en milieu bicarbonate d'ammonium à pH 7,8 ou acétate d'ammonium à pH 4,0.

L'histone H<sub>5</sub> renferme 8 résidus d'acide glutamique. Neuf peptides devraient donc théoriquement être obtenus en utilisant la protéase staphylococcique (\*) en milieu bicarbonate d'ammonium à pH 7,8.

#### 1 - HYDROLYSE PAR LA PROTEASE STAPHYLOCOCCIQUE

L'hydrolyse de l'histone H<sub>5</sub> (2,5 µmoles) par la protéase staphylococcique est réalisée en milieu bicarbonate d'ammonium 0,05 M de pH 8,0 à 37° C durant 18 heures avec un rapport enzyme-substrat de 1/40.

L'hydrolyse du fragment NB-4 (7,5 µmoles) de l'histone H<sub>5</sub> pendant 10 heures est réalisée dans les mêmes conditions que pour l'histone H<sub>5</sub>.

#### 2 - FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS

##### a) Chromatographie de gel-filtration

Les peptides des hydrolysats sont séparés par chromatographie de gel-filtration sur colonne de Sephadex G. 50 ou G. 100 (200 x 2,5 cm) équilibrée et éluée par l'acide chlorhydrique 0,01 N.

---

(\*) La protéase staphylococcique utilisée pour notre travail a été aimablement fournie par le Docteur R. DRAPEAU.

Les fractions correspondant à un pic du diagramme d'élution obtenu par lecture des densités optiques à 220 ou 230 nm sont rassemblées et lyophilisées. Les fractions peptidiques sont dissoutes dans 2 ml d'acide acétique à 10 % et conservées à -20° C.

#### b) Chromatographie d'échanges d'ions sur résine Dowex 50 x 2

Après chromatographie de gel-filtration, les fractions très complexes sont déposées sur une colonne d'échange d'ions, Chromobeads P. Les peptides sont élués par des tampons volatils à base de pyridine utilisés en gradient continu de molarité et de pH.

Les peptides basiques, encore fixés sur la résine après le passage du gradient, sont élués avec du tampon pyridine 2 M-acide acétique pH 5,0.

La détection des peptides s'effectue par la réaction à la ninhydrine, la réaction de SAKAGUCHI sur des aliquotes prélevées automatiquement dans chaque fraction de l'éluat.

### 3 - CONTROLE DE PURETE

Chaque fraction peptidique obtenue est soumise à un contrôle d'homogénéité par chromatographie et électrophorèse sur papier Whatman 3 MM lavé à l'acide acétique à 10 %, en présence des marqueurs externes (rouge de phénol pour la chromatographie, mélange d'acides aminés : acide aspartique, tyrosine et arginine pour l'électrophorèse). Ce mélange d'acides aminés témoins permet d'identifier les peptides de caractère acide, neutre ou basique.

La chromatographie est réalisée pendant 18 heures dans le solvant butanol/ pyridine/ acide acétique/ eau (15 : 10 : 3 : 12) (v : v). L'électrophorèse se fait perpendiculairement à la chromatographie, pendant 90 minutes avec un voltage de 2 200 V, dans un tampon de pH 3,6 (pyridine/ acide acétique/ eau) (1 : 10 : 289) (v : v).

Les peptides sont localisés sur l'électrochromatogramme avec le réactif ninhydrine-cadmium. Pour les peptides renfermant de l'arginine, la coloration spécifique à la phénanthrène-quinone a été utilisée.

## II - COUPURE DU FRAGMENT NB-4 DE L'HISTONE H<sub>5</sub> PAR LA THERMOLYSINE

La thermolysine agit spécifiquement au niveau des liaisons où se trouve engagé le groupe  $\alpha$ -aminé des acides aminés à chaîne latérale hydrophobe : isoleucine, leucine, valine, phénylalanine, alanine, thréonine et à un moindre degré au niveau de la sérine.

Le fragment NB-4 contient 21 résidus d'alanine, 6 résidus de leucine, 6 résidus de valine, 4 résidus de thréonine, 2 résidus d'isoleucine et 1 résidu de phénylalanine.

Une hydrolyse relativement courte et la présence de 10 résidus de proline dans la molécule sont des facteurs susceptibles de limiter le nombre de peptides.

### 1 - HYDROLYSE PAR LA THERMOLYSINE

L'hydrolyse du fragment NB-4 de l'histone H<sub>5</sub> par la thermolysine est réalisée en milieu bicarbonate d'ammonium 0,1 M de pH 8,0 à 40° C pendant 2 heures et avec un rapport enzyme/ substrat de 1/100. L'hydrolyse est arrêtée en abaissant le pH à 3,5 par de l'acide formique. L'hydrolysate est ensuite lyophilisé.

### 2 - FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT THERMOLYSIQUE

#### a) Chromatographie de gel-filtration

Les peptides de l'hydrolysate sont séparés par chromatographie de gel-filtration sur colonne de Sephadex G. 25 (200 x 2,5 cm) équilibrée et éluée par l'acide chlorhydrique 0,01 N.

Le diagramme est obtenu par lecture de la densité optique à 215 nm. Les fractions sont rassemblées et lyophilisées.

#### b) Chromatographie d'échange d'ions

- Chromatographie sur carboxyméthylcellulose :

Les peptides les plus basiques sont fractionnés sur une colonne (20 x 2,5 cm) de carboxyméthylcellulose (CMC 52 Whatman).

Les peptides sont élués grâce à un gradient en chlorure de sodium de 0 à 1 M. Le diagramme est obtenu par lecture de la densité optique à 230 nm. Chaque fraction correspondant à un pic est dessalée par passage sur Sephadex G. 25 (100 x 2,5 cm) en milieu acide chlorhydrique 0,01 N puis lyophilisée.

- Chromatographie sur résine Dowex 50 x 2 :

Après chromatographie sur gel-filtration, les fractions les plus complexes sont fractionnées sur une colonne échangeuse d'ions, Chromobeads P. Le mode opératoire et le repérage des peptides dans l'éluat ont été décrits dans le paragraphe I 2b, (p. 23).

### 3 - CONTROLE DE PURETE

Chaque fraction peptidique obtenue est soumise à un contrôle d'homogénéité en électrochromatographie sur papier suivant les conditions décrites au paragraphe I.3 (p.23 ).

### III - COUPURE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> PAR L'ACIDE ACETIQUE 0,25 N

L'hydrolyse partielle acide des protéines est connue depuis longtemps. Les tentatives réalisées avec l'acide sulfurique concentré (FISCHER et ABDERHALDEN, 1907), l'acide oxalique 0,25 N (PARTRIDGE et DAVIS, 1950), l'acide chlorhydrique 0,03 N (SCHULTZ et al., 1962) ou l'acide acétique 0,25 N (SCHROEDER et al., 1963), montrent que le site de coupure est situé au niveau du résidu d'acide aspartique avec sa libération par énucléation.

Le mécanisme d'hydrolyse proposé par GARETT (1960), BENDER (1960), BRUYLANTS et KEZDY (1961) est présenté dans la figure 2.

LEECH (1955) explique la libération préférentielle de l'acide aspartique par la présence du groupe  $\beta$  - carboxylique.

SCHROEDER et al. (1963) ont utilisé l'acide acétique 0,25 N pendant 8 heures à 100° C pour hydrolyser un peptide tryptique de la chaîne de l'hémoglobine foetale humaine. Ces auteurs ont remarqué que dans

ces conditions, il n'y avait pas de coupure au niveau des résidus d'asparagine, de glutamine ou d'acide glutamique ; seul, l'acide aspartique est libéré.

La méthode de coupure chimique des liaisons peptidiques est intéressante dans l'étude de la structure primaire des protéines mais également dans l'obtention de gros fragments nécessaires aux biophysiciens pour l'étude des structures secondaire et tertiaire surtout dans le cas où les résidus d'acide aspartique sont peu nombreux.

La composition en acides aminés de l'histone H<sub>5</sub> est présentée dans le tableau III (p. 8).

Parmi les trois résidus d'acide aspartique présents dans la molécule, un seul est sous forme amide.

Les résidus d'acide aspartique sont situés en position 66 et 99 dans la séquence en acides aminés de la protéine (tableau XXII p. 109).

L'intérêt de l'hydrolyse partielle acide réside :

- d'une part, dans l'obtention du fragment COOH-terminal (résidus 100 à 185) dont la séquence primaire est inconnue. Il est possible d'utiliser ce fragment pour des coupures secondaires en vue de la détermination de la structure primaire,

- d'autre part, dans l'obtention de gros fragments de caractéristiques structurales bien définies et qui seront utilisés pour étudier les structures secondaire et tertiaire de l'histone H<sub>5</sub>.

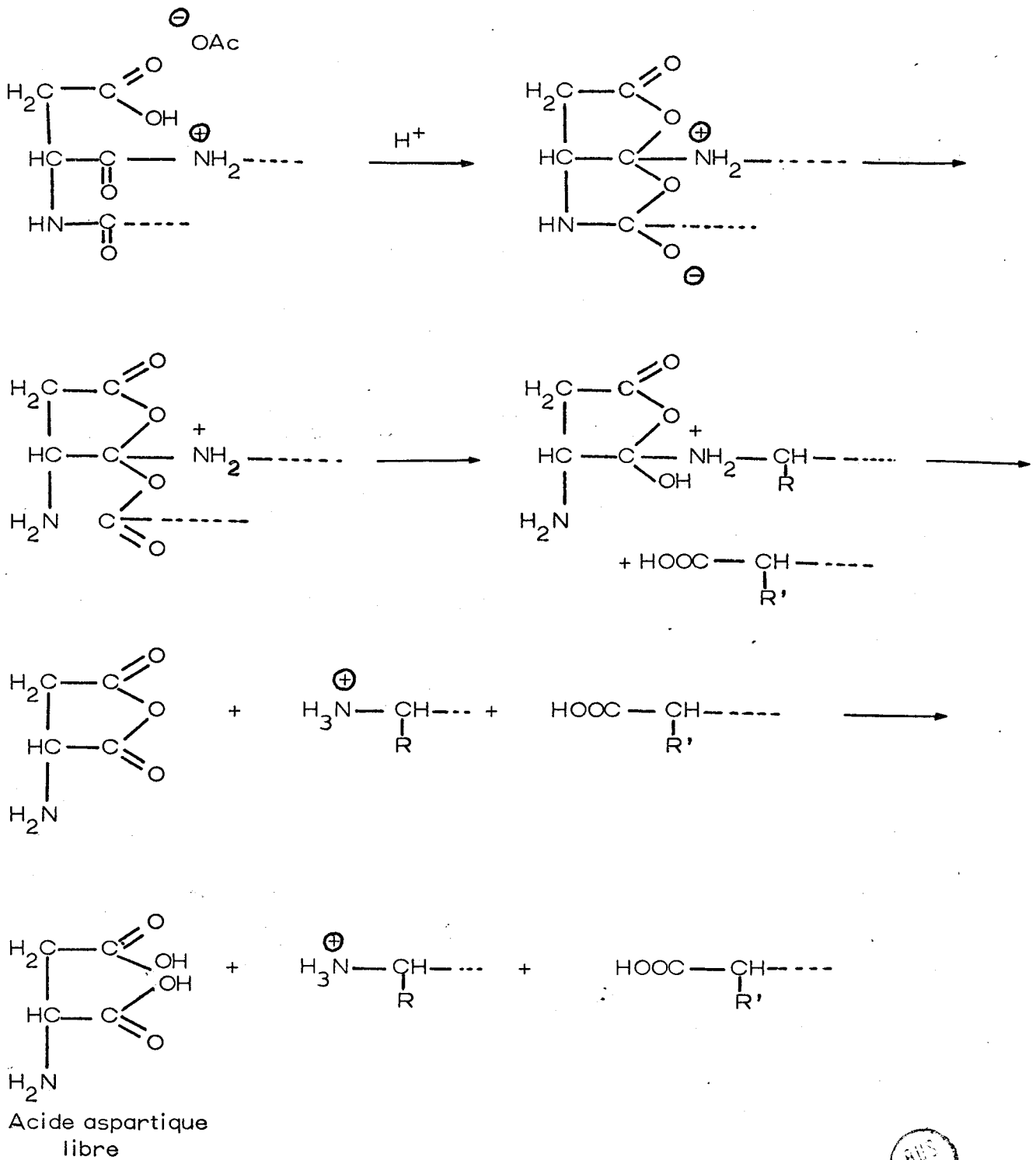
Pour réaliser ce travail nous nous sommes intéressés à la méthode de coupure par l'acide chlorhydrique 0,03 N qui nous a donné peu de résultats et surtout à la méthode de coupure à l'acide acétique 0,25 N préconisée par SCHROEDER et al.

### 1 - HYDROLYSE PAR L'ACIDE ACETIQUE 0,25 N

L'hydrolyse de l'histone H<sub>5</sub> par l'acide acétique 0,25 N est réalisée à 105°C en tubes scellés sous vide pendant 6 heures ou 12 heures. La protéine est dissoute dans l'acide acétique 0,25 N à la concentration de 10 mg par ml.

Figure 2

HYDROLYSE DU RESIDU D'ACIDE ASPARTIQUE EN MILIEU ACIDE



D'après GARETT (1960), BENDER (1960), BRUYLANTS et KEZDY (1961)

Les hydrolysats sont lyophilisés. Ils sont ensuite dissous dans 4 à 5 ml d'acide chlorhydrique 0,01 N et lyophilisés de nouveau. Cette opération, qui a pour but d'éliminer toute trace d'acide acétique, est répétée 3 fois.

## 2 - FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS

Les peptides des hydrolysats sont séparés par chromatographie de gel-filtration sur colonne de Sephadex G. 50 F ou Biogel P. 60 (200 x 2,5 cm) équilibrée et éluée par l'acide chlorhydrique 0,01 N.

Les fractions correspondant à un pic du diagramme d'éluion obtenu par lecture de la densité optique à 220 ou 230 nm et 278 nm sont rassemblées et lyophilisées. Les fractions peptidiques sont dissoutes dans 2 ml d'acide chlorhydrique 0,01 N et conservées à - 20° C.

## 3 - CONTROLE DE PURETE

### a) Gel de polyacrylamide

-----

Les différentes fractions peptidiques sont soumises à l'analyse électrophorétique en gel à 17 % de polyacrylamide en milieu urée 2,5 M et à pH 2,7 selon la technique de PANYIM et CHALKLEY (1969).

### b) Carte peptidique

-----

Chaque fraction peptidique est soumise à un contrôle d'homogénéité par électrochromatographie dans les conditions décrites au paragraphe I.3 (p. 23 ).

#### IV - PURIFICATION DES PEPTIDES

Les fractions renfermant plusieurs peptides sont alors purifiées par électrophorèse ou par chromatographie préparative ou encore par les deux méthodes associées sur papier Whatman 3 MM lavé à l'acide acétique à 10 p. 100.

En électrophorèse, nous utilisons en plus du tampon de pH 3,6 déjà décrit dans le paragraphe I-3, le tampon de pH 1,9 (acide formique 98 % / acide acétique/ eau) (25:87:888) (v : v).

#### V - ETUDES DES PEPTIDES

##### 1 - COMPOSITION EN ACIDES AMINES

Une fraction aliquote de chaque peptide est hydrolysée sous vide à 110° C pendant 24 heures par de l'acide chlorhydrique 6 N en présence d'une goutte de phénol à 1 p. 100 pour éviter une dégradation excessive de la tyrosine.

L'analyse des acides aminés est réalisée sur un autoanalyseur Beckman, type Multichrom en utilisant un système monocolonne et équipé d'un intégrateur Infotronics CRS 210. L'élution des acides aminés se fait selon un procédé adapté de MOORE et STEIN à l'aide de 3 tampons de pH croissant : 3.25 - 4.25 - 6.28 (1.2 N en Na).

##### 2 - DETERMINATION DE L'EXTREMITE NH<sub>2</sub>-TERMINALE PAR DANSYLATION

La dansylation des peptides est effectuée suivant le protocole recommandé par GRAY et HARTLEY (1963-a).



Les dansyl-peptides contenant des résidus de thréonine ou de sérine sont hydrolysés sous vide à 105° C pendant 16 heures.

Les dansylamino-acides sont identifiés sur couche mince de gel de silice, soit en chromatographie monodimensionnelle selon la technique de STEHELIN et DURANTON (1969) avec un seul système solvant, benzène/ pyridine/ acide acétique (80 : 20 : 5) (v : v), soit en chromatographie bidimensionnelle avec les systèmes solvants I et II préconisés par GROS et LABOUESSE (1969).

### 3 - DETERMINATION DE L'EXTREMITE COOH-TERMINALE

La détermination de l'extrémité COOH-terminale des peptides isolés a été effectuée par hydrolyse par les carboxypeptidases A, B ou C.

Les hydrolyses par les carboxypeptidases A et B sont réalisées à 37° C en milieu bicarbonate d'ammonium 0,01 M et à pH 8,5.

Les hydrolyses par la carboxypeptidase C sont réalisées à 30° C en milieu citrate de sodium 0,05 M et à pH 5,3.

### 4 - DEGRADATION DES PEPTIDES PAR LA METHODE DE EDMAN

La dégradation récurrente des peptides par la méthode de EDMAN (1956) est schématisée dans la figure 2a (p. 31).

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 soustractive) (HIRS et al., 1960).

Associée à la dégradation de EDMAN, selon le protocole décrit par GRAY et HARTLEY (1963-b) la dansylation permet l'identification de l'acide aminé en position NH<sub>2</sub>-terminale dans le peptide qui apparaît après chaque cycle de dégradation.

Les dansylamino-acides ont été identifiés en chromatographie bidimensionnelle avec les systèmes solvants I et II de GROS et LABOUESSE chaque fois que la présence dans un même peptide des résidus d'alanine et de lysine rendait l'identification difficile. Ces dérivés sont en effet mal séparés.

Figure 2a

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 trifluoroacétique



7 mn. 50°C

Formation du dérivé 2-anilinothiazolinone

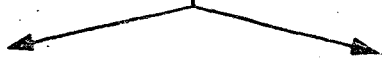


HCl N 80° C. 10 mn.

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 systèmes solvants D et E

(EDMAN and SJÖQUIST, 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 and ITANO, 1966) (EASLEY et al., 1969)

- Réaction de PAULY (détection de l'histidine)



## VI - ETUDE DES PEPTIDES EN RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE

Les peptides ont été étudiés au laboratoire de biophysique de Portsmouth en collaboration avec les professeurs M. BRADBURY et C. CRANE-ROBINSON sur un spectromètre RMN Brucker de 270 MHz, équipé d'un transformé de Fourier.

Les peptides sont repris par un volume donné d'eau lourde (D<sub>2</sub>O) afin d'obtenir une concentration finale de l'ordre de 1  $\mu$ mole/ml.

Les solutions sont alors ramenées au pH d'expérience (2,5) au moyen de DCl 0,3 M. Les expériences sont réalisées à force ionique nulle puis à force ionique de 0,5 obtenue par addition de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solide et qui est susceptible d'induire des changements de conformation.

CHAPITRE III

---

DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE

---

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

---

- A - HYDROLYSE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> ET DE SON FRAGMENT NB-4  
PAR LA PROTEASE STAPHYLOCOCCIQUE
  
- B - HYDROLYSE DU FRAGMENT NB-4 PAR LA THERMOLYSINE
  
- C - HYDROLYSE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> PAR L'ACIDE ACETIQUE 0,25 N

A - HYDROLYSE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> ET DE SON FRAGMENT NB-4

---

PAR UNE PROTEASE STAPHYLOCOCCIQUE

---

I - HYDROLYSE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> PAR LA PROTEASE  
STAPHYLOCOCCIQUE

(\*) Les peptides de l'hydrolysate de l'histone H<sub>5</sub> ont été séparés par chromatographie de gel-filtration sur colonne de Sephadex G. 50 F.

La courbe d'élution de ces peptides est présentée dans la figure 3.

Six fractions sont obtenues : 1S, 2S, 3S, 4S, 5S, 6S. Elles sont soumises à un contrôle d'homogénéité par chromatographie et électrophorèse sur papier.

Nomenclature : Les peptides obtenus par hydrolyse de l'histone H<sub>5</sub> par la protéase staphylococcique sont désignés par Pr et numérotés suivant l'ordre d'élution de la colonne.

Les deux premières fractions apparaissent complexes en carte peptidique. Constituées de peptides basiques, elles n'ont pu être étudiées de façon satisfaisante.

Fraction 3S : La fraction 3S renferme un peptide majeur qui a été purifié par chromatographie préparative sur papier.

- Peptide Pr-3S (résidus 3 à 17)

Ser-Leu-Val-Leu-Ser-Pro-Ala-Pro-Ala-Lys-Pro-Lys-Arg-Val-Lys

a) Composition en acides aminés

Ser , Pro , Ala , Val , Leu , Lys , Arg  
1,71 (2) 3,17 (3) 2,11 (2) 1,94 (2) 2,09 (2) 2,92 (3) 1,00 (1)

b) Dégradation de EDMAN

Quatre cycles de dégradation de EDMAN ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale : Ser-Leu-Val-Leu .

---

(\*) La composition et la séquence en acides aminés de ces peptides sont respectivement présentées dans les tableaux VIII et IX.

CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION SUR SEPHADEX G. 50 F DES PEPTIDES OBTENUS  
PAR HYDROLYSE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> AVEC UNE PROTEASE STAPHYLOCOCCIQUE

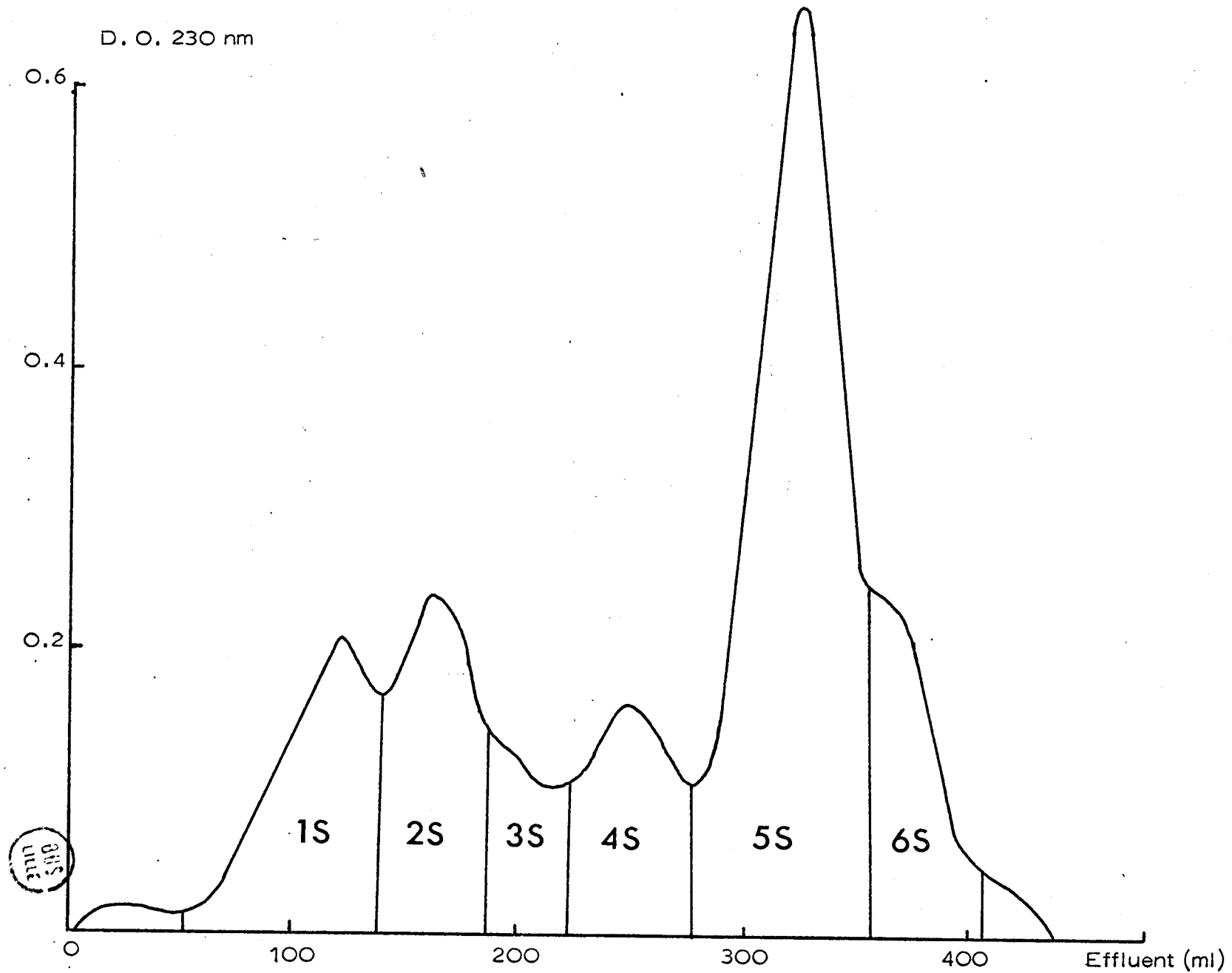


Figure 3

Les caractéristiques de la composition en acides aminés - présence de 3 résidus de proline, de 2 résidus de valine et de 2 résidus de leucine - et la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide Th-3S correspondent à la séquence (résidus 3 à 17) établie par GREENAWAY et MURRAY.

Fraction 4S : La fraction 4S a été purifiée par chromatographie préparative sur papier.

- Peptide Pr-4S (résidus 78 à 88)

Ala-Gly-Val-Leu-Lys-Gln-Thr-Lys-Gly-Val-Gly

a) Composition en acides aminés

Thr	,	Glu	,	Gly	,	Ala	,	Val	,	Leu	,	Lys	
0,90	(1)	1,06	(1)	2,93	(3)	1,16	(1)	1,75	(2)	1,09	(1)	2,11	(2)

b) Dégradation de EDMAN

Six cycles de dégradation de EDMAN avec identification des PTH amino-acides ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale : Ala-Gly-Val-Leu-Lys-Gln.

La séquence du peptide Pr-4S a pu être complétée grâce au peptide Pr-3 dont la structure est la suivante : Thr-Lys-Gly-Val-Gly.

Fractions 5S et 6S : Les fractions 5S et 6S, constituées d'un mélange de peptides ont été rassemblées et fractionnées sur une colonne de Chromobeads P.

Le diagramme d'élution est présenté dans la figure 4 . Les peptides sont numérotés selon leur ordre d'élution de la colonne.

- Peptide Pr (5S + 6S)-1 (résidus 63 à 65)

Asn-Ala-Asp.

a) Composition en acides aminés

Asp	,	Ala	
2,00	(2)	1,22	(1)

Le faible rendement est imputé à une coupure mineure de la liaison His-Asn par la protéase staphylococcique.



SEPARATION DES PEPTIDES DES FRACTIONS 5S ET 6S SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P.

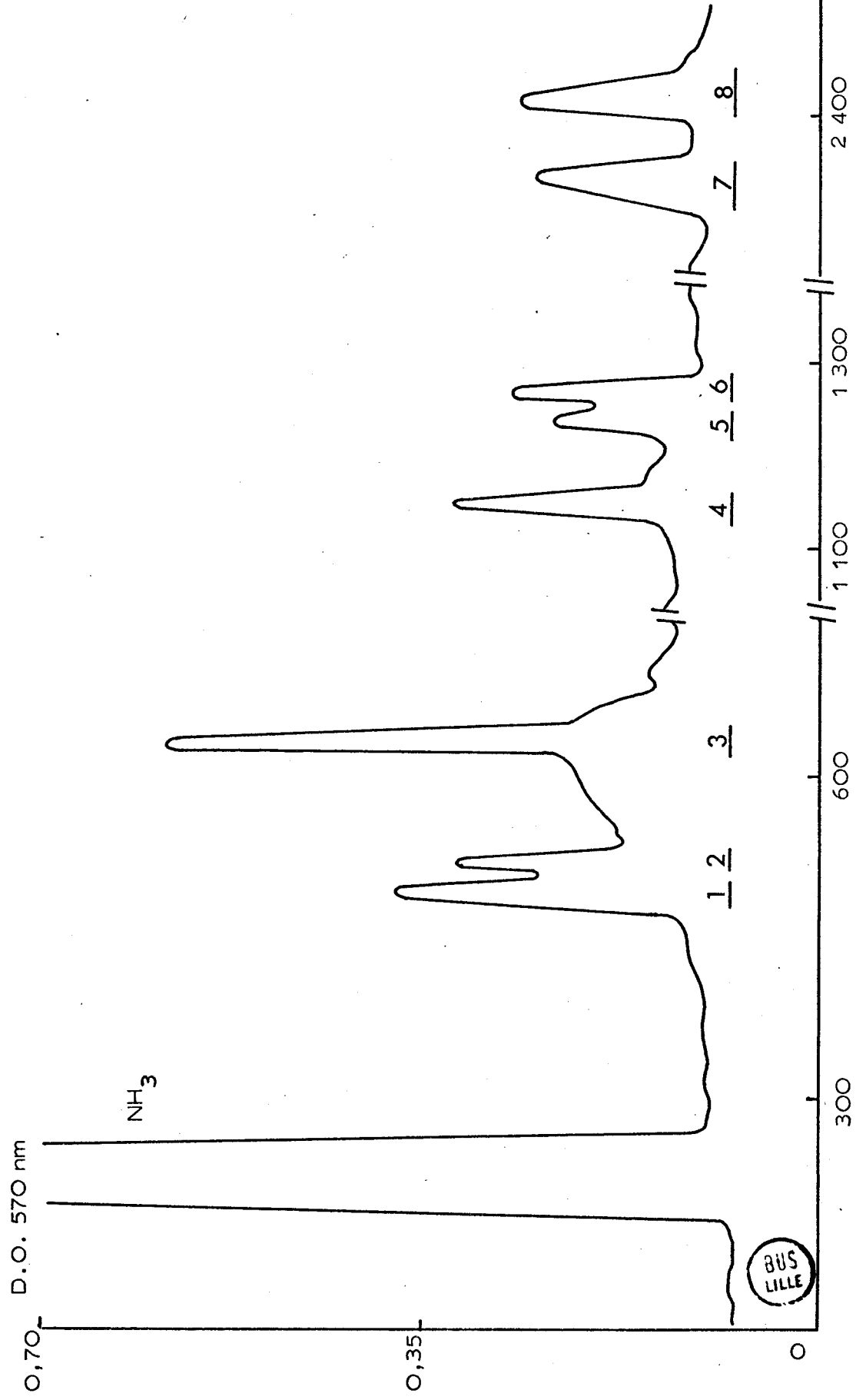


Figure 4

TABLEAU VIII

COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES OBTENUS PAR HYDROLYSE DE L'HISTONE H<sub>5</sub>  
PAR LA PROTEASE STAPHYLOCOCCIQUE  
 (exprimées en rapports molaires) (\*)

Acides aminés	Pr-3S	Pr-4S	Pr (5S + 6S)-1	Pr (5S + 6S)-2	Pr (5S + 6S)-3
Acide aspartique			2,00 (2)		
Thréonine		0,90 (1)			0,98 (1)
Sérine	1,71 (2)				
Acide glutamique		1,06 (1)		1,05 (1)	
Proline	3,13 (3)				
Glycine		2,93 (3)		1,2 (1)	1,96 (2)
Alanine	2,11 (2)	1,16 (1)	1,22 (1)	1,05 (1)	
Valine	1,94 (2)	1,75 (2)		1,0 (1)	1,12 (1)
Isoleucine					
Leucine	2,09 (2)	1,09 (1)		0,90 (1)	
Tyrosine					
Phénylalanine					
Histidine					
Lysine	2,92 (3)	2,11 (2)		0,87 (1)	0,95 (1)
Arginine	1,00 (1)				
Nombre de résidus	15	11	3	6	5

(\*) Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de résidus arrondi à l'unité.

TABLEAU VIII (suite)

COMPOSITIONS EN ACIDES AMINÉS DES PEPTIDES OBTENUS PAR HYDROLYSE DE L'HISTONE H<sub>5</sub>

PAR LA PROTEASE STAPHYLOCOCCIQUE

(exprimées en rapports molaires) (\*)

Acides aminés	Pr (5S + 6S)-4	Pr (5S + 6S)-5	Pr (5S + 6S)-6	Pr (5S + 6S)-7	Pr (5S + 6S)-8
Acide aspartique		1,08 (1)			
Thréonine	0,75 (1)				
Sérine	1,05 (1)	2,80 (3)	1,34 (1)	3,16 (3)	
Acide glutamique			1,30 (1)	1,29 (1)	
Proline	1,12 (1)				
Glycine		1,38 (1)		2,30 (2)	
Alanine		2,0 (2)			1,07 (1)
Valine					
Isoleucine			1,79 (2)		0,82 (1)
Leucine		1,07 (1)			2,13 (2)
Tyrosine			1,0 (1)		
Phénylalanine		0,96 (1)			
Histidine					
Lysine	2,08 (2)	1,27 (1)	1,82 (2)	0,96 (1)	
Arginine		1,14 (1)		1,60 (2)	1,98 (2)
Nombre de résidus	5	11	7	9	6

SHS  
LILLE

(\*) Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de résidus arrondi à l'unité.

TABLEAU IX

SEQUENCES EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES OBTENUS PAR HYDROLYSE DE L'HISTONE H<sub>5</sub>

AVEC LA PROTEASE STAPHYLOCOCCIQUE

Pr-3S	(résidus 3 à 17)	→ → → → → Ser-Leu-Val-Leu-Ser-Pro-Ala-Pro-Ala-Lys-Pro-Lys-Arg-Val-Lys
Pr-4S	(résidus 78 à 88)	→ → → → → Ala-Gly-Val-Leu-Lys-Gln-Thr-Lys-Gly-Val-Gly
Pr-(5S + 6S)-1	(résidus 63 à 65)	Asn-Ala-Asp
Pr-(5S + 6S)-2	(résidus 78 à 83)	→ → → → → Ala-Gly-Val-Leu-Lys-Gln
Pr-(5S + 6S)-3	(résidus 84 à 88)	→ → → → → Thr-Lys-Gly-Val-Gly
Pr-(5S + 6S)-4		→ → → → → Thr-Ser-Pro-Lys-Lys
Pr-(5S + 6S)-5	(résidus 89 à 99)	→ → → → → Ala-Gly-Ser-Ser-Phe-Arg-Leu-Ala-Lys-Ser-Asp
Pr-(5S + 6S)-6	(résidus 50 à 56)	→ → → → → Ile-Gln-Lys-Tyr-Ile-Lys-Ser
Pr-(5S + 6S)-7	(résidus 40 à 48)	→ → → → → Lys-Ser-Arg-Gly-Gly-Ser-Ser-Arg-Gln
Pr-(5S + 6S)-8	(résidus 72 à 77)	→ → → → → Ile-Arg-Arg-Leu-Leu-Ala

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 A, B ou C ← placé en-dessous du résidu d'acide aminé.



En raison de la faible quantité disponible, l'étude structurale de ce peptide n'a pas été poussée plus loin. La séquence complète du peptide a été déduite du peptide chymotrypsique 15-2-3: Lys-Val-Gly-His-Asn-Ala-Asp-Leu-Gln-Ile-Lys-Leu.

- Peptide Pr(5S + 6S)-2 (résidus 78 à 83)

Ala-Gly-Val-Leu-Lys-Gln

a) Composition en acides aminés

Glu	,	Gly	,	Ala	,	Val	,	Leu	,	Lys
1,05 (1)		1,2 (1)		1,05 (1)		1,0 (1)		0,90 (1)		0,87 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Ala

Ce peptide constitue la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide Pr-4S qui a été déterminée avec 6 cycles de dégradation de EDMAN.

- Peptide Pr (5S + 6S)-3 (résidus 84 à 88)

Thr-Lys-Gly-Val-Gly

a) Composition en acides aminés

Thr	,	Gly	,	Val	,	Lys
0,98 (1)		1,96 (2)		1,12 (1)		0,95 (1)

b) Dégradation de EDMAN

Quatre cycles de dégradation de EDMAN ont permis d'établir la séquence du peptide Pr (5S + 6S)-3, le dernier résidu ( Gly 88) étant placé par différence.

La séquence du peptide Pr (5S + 6S)-3 est donc : Thr-Lys-Gly-Val-Gly. Ce peptide constitue la partie COOH-terminale du peptide Pr-4S.

La séquence complète du peptide Pr-4S a donc pu être établie par la séquence du peptide Pr (5S + 6S)-3.

- Peptide Pr(5S + 6S)-4

Thr-Ser-Pro-Lys-Lys

a) Composition en acides aminés

Thr ,	Ser ,	Pro ,	Lys
0,75 (1)	1,05 (1)	1,12 (1)	2,08 (2)

b) Dansyl-amino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Thr

c) Dégradation de EDMAN

Trois cycles de dégradation de EDMAN ont permis d'établir la séquence du peptide Pr (5S + 6S)-4, les deux résidus de lysine étant placés par différence.

- Peptide Pr (5S + 6S)-5 (résidus 89 à 99)

Ala-Gly-Ser-Ser-Phe-Arg-Leu-Ala-Lys-Ser-Asp

a) Composition en acides aminés

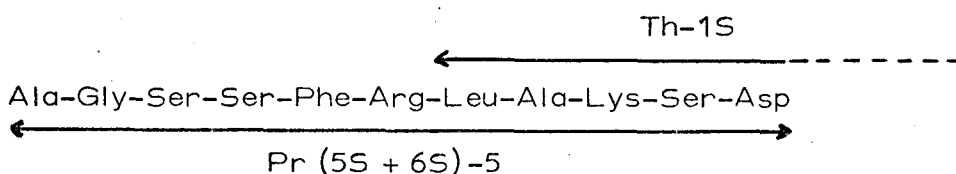
Asp ,	Ser ,	Gly ,	Ala ,	Leu ,	Phe ,	Lys ,	Arg
1,08 (1)	2,80 (3)	1,38 (1)	2,0 (2)	1,07 (1)	0,96 (1)	1,27 (1)	1,14 (1)

Ce peptide est caractérisé par la présence de l'unique résidu de phénylalanine et du troisième résidu d'acide aspartique présents dans l'histone H<sub>5</sub>.

b) Dégradation de EDMAN

Sept cycles de dégradation de EDMAN ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide Pr (5S + 6S)-5 :  
Ala-Gly-Ser-Ser-Phe-Arg-Leu.

Le reste de la séquence du peptide Pr (5S + 6S)-5 a été déduite de l'étude structurale du peptide thermolysique Th-1S dont la séquence NH<sub>2</sub>-terminale, Leu-Ala-Lys-Ser-Asp, caractérisée par la présence d'un résidu d'acide aspartique qui constitue un acide aminé marqueur, recouvre la partie COOH-terminale du peptide Pr(5S + 6S)-5 suivant le schéma :



Nous observons une coupure au niveau d'un résidu d'acide aspartique malgré l'emploi du bicarbonate d'ammonium lors de l'hydrolyse de la protéine par la protéase.

- Peptide Pr (5S + 6S)-6 (résidus 50 à 56)

Ile-Gln-Lys-Tyr-Ile-Lys-Ser

a) Composition en acides aminés

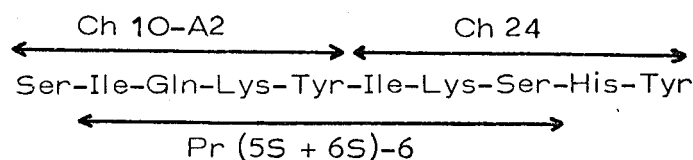
Ser ,	Glu ,	Ile ,	Tyr ,	Lys
1,34 (1)	1,30 (1)	1,79 (2)	1,0 (1)	1,82 (2)

Ce peptide est caractérisé par la présence d'un résidu de tyrosine et de deux résidus d'isoleucine.

b) Dégradation de EDMAN

Deux cycles de dégradation de EDMAN avec identification des PTH amino-acides ont déterminé la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide Pr(5S+6S)-Ile-Gln.

La séquence complète du peptide Pr (5S + 6S)-6 a été déduite des études structurales réalisées sur les peptides chymotrypsiques Ch 10-A2 et Ch 24 suivant le schéma :



- Peptide Pr (5S + 6S)-7 (résidus 40 à 48)

Lys-Ser-Arg-Gly-Gly-Ser-Ser-Arg-Gln

Ce peptide a été purifié par chromatographie préparative sur papier.

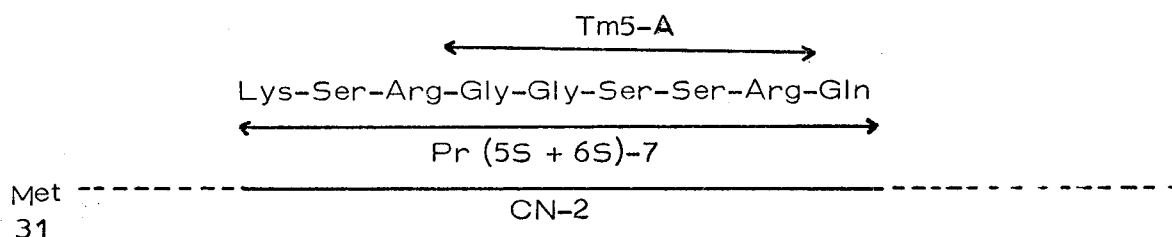
a) Composition en acides aminés

Ser ,	Glu ,	Gly ,	Lys ,	Arg
3,16 (3)	1,29 (1)	2,30 (2)	0,96 (1)	1,60 (2)

b) Dégradation de EDMAN

Cinq cycles de dégradation de EDMAN ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide Pr(5S + 6S)-7 : Lys-Ser-Arg-Gly-Gly

La séquence complète a été déduite des études structurales réalisées sur le peptide tryptique Tm5-A Gly-Gly-Ser-Ser-Arg et de la dégradation automatique de EDMAN réalisée sur le fragment COOH-terminal obtenu par coupure de l'histone H<sub>5</sub> avec le bromure de cyanogène (tableau V p. 12) suivant le schéma :



- Peptide Pr (5S + 6S)- 8 (résidus 72 à 77)  
 Ile-Arg-Arg-Leu-Leu-Ala

Ce peptide a été purifié par chromatographie préparative sur papier.

a) Composition en acides aminés

Ala	Ile	Leu	Arg
1,07 (1)	0,82 (1)	2,13 (2)	1,98 (2)

b) Dégradation de EDMAN

Cinq cycles de dégradation de EDMAN ont permis d'établir la séquence du peptide Pr (5S+ 6S)-8, le résidu d'alanine étant placé par différence.



II - HYDROLYSE DU FRAGMENT NB-4 DE L'HISTONE H<sub>5</sub>  
PAR LA PROTEASE STAPHYLOCOCCIQUE

Les peptides obtenus par hydrolyse du fragment NB-4 avec la protéase staphylococcique ont été fractionnés par chromatographie de gel-filtration sur colonne de Sephadex G. 100. Le diagramme d'élution des peptides est présenté dans la figure 5.

Cinq fractions, 1S, 2S, 3S, 4S, 5S, ont été obtenues. En raison de leur grande complexité, les 4 premières fractions renfermant des peptides de taille moléculaire élevée n'ont pas été étudiées. Nous nous sommes exclusivement intéressés à la fraction 5S. Cette fraction apparaît constituée de plusieurs peptides qui ont été séparés par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Chromobeads P. Le diagramme d'élution obtenu est présenté dans la figure 6. La composition et la séquence en acides aminés des peptides sont respectivement présentées dans les tableaux X et XI.

- Peptide NB-4 Pr-5S-1 (résidus 78 à 83)

Ala-Gly-Val-Leu-Lys-Gln

Ce peptide a été purifié par chromatographie préparative sur papier.

a) Composition en acides aminés

Glu	, Gly	, Ala	, Val	, Leu	, Lys
1,28 (1)	1,50 (1)	0,86 (1)	1,0 (1)	0,99 (1)	0,84 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Ala

Nous n'avons pas poussé plus avant l'étude de la structure de ce peptide qui est manifestement identique, en raison des caractéristiques de sa composition au peptide Pr (5S + 6S)-2 obtenu par hydrolyse de l'histone H<sub>5</sub> avec la protéase staphylococcique.

CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION SUR SEPHADEX G. 100 DES PEPTIDES OBTENUS

PAR HYDROLYSE DU FRAGMENT NB-4 DE L'HISTONE H<sub>5</sub> AVEC UNE PROTEASE STAPHYLOCOCCIQUE

D.O. 220 nm

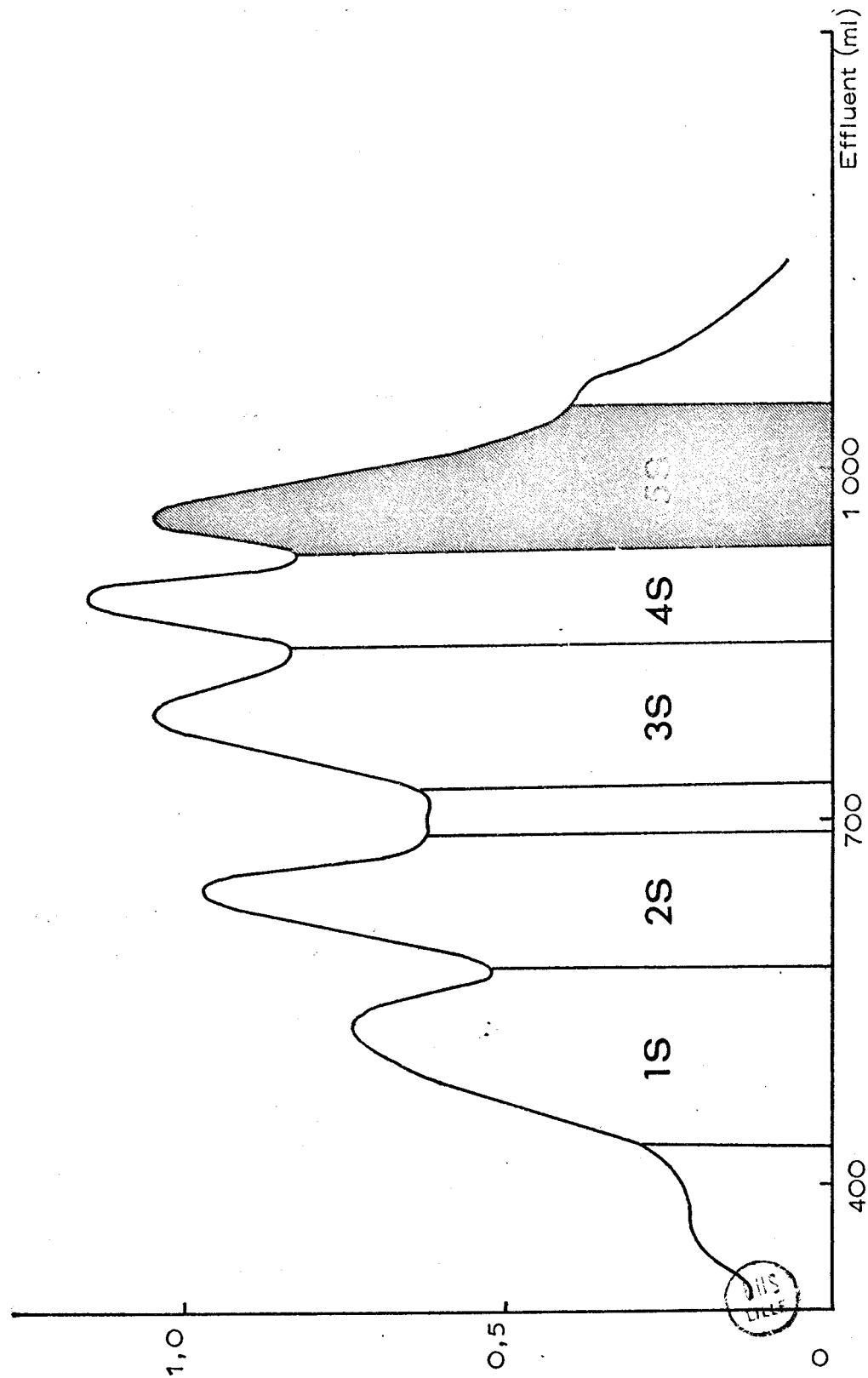


Figure 5

SEPARATION DES PEPTIDES DE LA FRACTION 5S SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P.

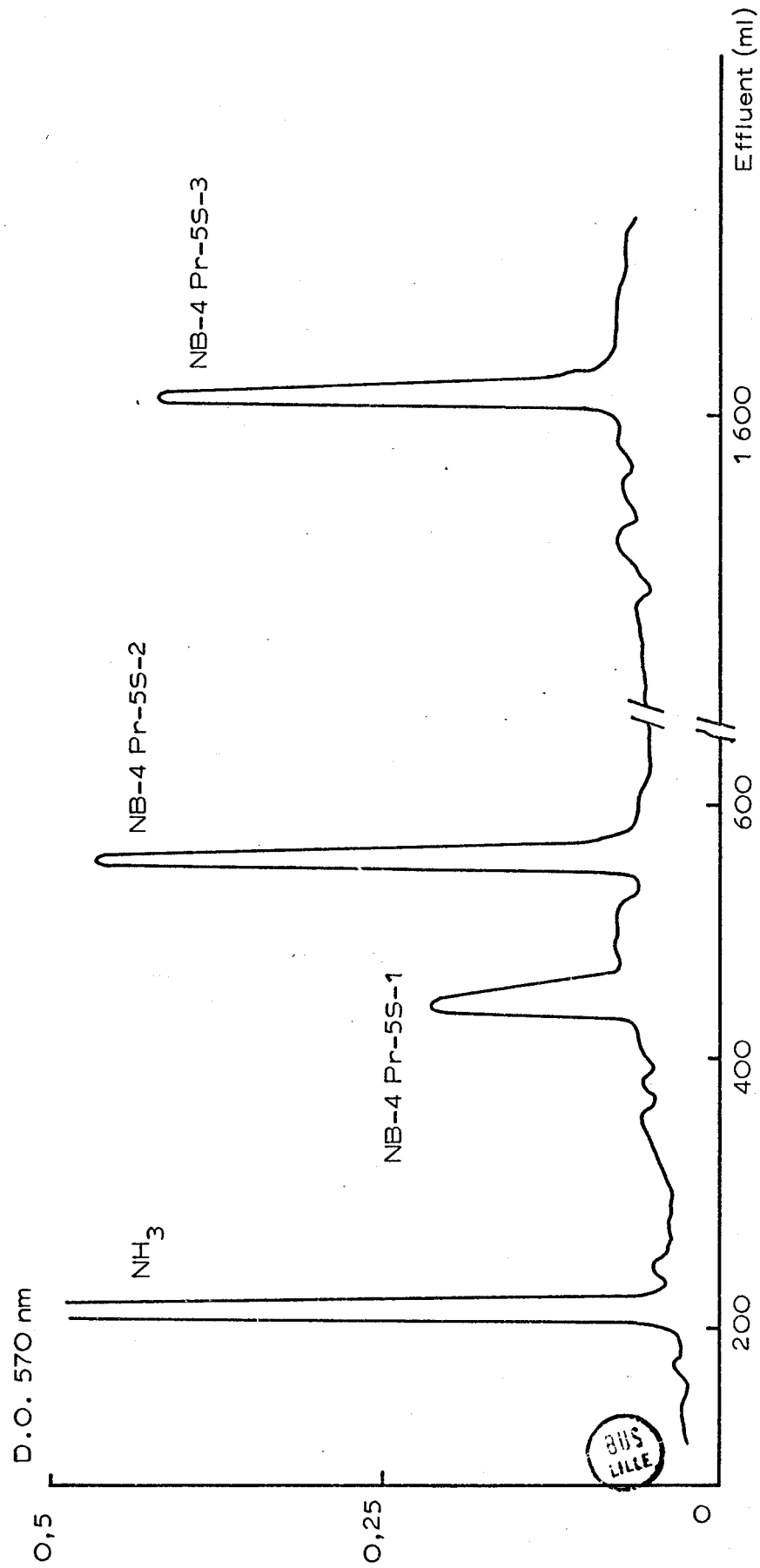


Figure 6

TABLEAU X

COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES OBTENUS PAR HYDROLYSE DU FRAGMENT NB-4 DE L'HISTONE H<sub>5</sub>  
 PAR LA PROTEASE STAPHYLOCOCCIQUE  
 (exprimées en rapports molaires) (\*)

Acides aminés	NB-4 Pr-5S-1		NB-4 Pr-5S-2		NB-4 Pr-5S-3	
Acide aspartique					1,13	(1)
Thréonine					0,92	(1)
Sérine			0,99	(1)	2,96	(3)
Acide glutamique	1,28	(1)	1,15	(1)		
Proline						
Glycine	1,50	(1)			3,3	(3)
Alanine	0,86	(1)			2,09	(2)
Valine	1,0	(1)			0,93	(1)
Isoleucine			0,93	(1)		
Leucine	0,99	(1)	2,0	(2)	1,04	(1)
Tyrosine						
Phénylalanine					0,89	(1)
Histidine						
Lysine	0,84	(1)	0,93	(1)	1,74	(2)
Arginine					1,16	(1)
Nombre de résidus	6		6		16	

(\*) Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de résidus arrondi à l'unité.



TABLEAU XI

SEQUENCES EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES OBTENUS PAR HYDROLYSE DU FRAGMENT NB-4 DE L'HISTONE H<sub>5</sub>

AVEC LA PROTEASE STAPHYLOCOCCIQUE

NB-4 Pr-5S-1 (résidus 78 à 83)	(*) — Ala - Gly - Val - Leu - Lys - Gln
NB-4 Pr-5S-2 (résidus 66 à 71)	— → → → → Leu - Gln - Ile - Lys - Leu - Ser ←
NB-4 Pr-5S-3 (résidus 84 à 99)	— Thr-Lys-Gly-Val-Gly-Ala-Gly-Ser-Ser-Phe-Arg-Leu-Ala-Lys-Ser-Asp ← ← ←

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



- Peptide NB-4 Pr-5S-2 (résidus 66 à 71)

Leu-Gln-Ile-Lys-Leu-Ser

Le peptide a été purifié par chromatographie préparative sur papier.

a) Composition en acides aminés

Ser	Glu	Ile	Leu	Lys
0,99 (1)	1,15 (1)	0,93 (1)	2,0 (2)	0,93 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Leu

c) Dégradation de EDMAN

Cinq cycles de dégradation de EDMAN avec identification des PTH amino-acides ont permis d'établir la séquence du peptide NB-4 Pr-5S- le résidu de sérine étant placé par différence.

d) Hydrolyse par la carboxypeptidase C

Les résultats de la dégradation de EDMAN ont été confirmés par l'hydrolyse du peptide NB-4 Pr-5S-2 par la carboxypeptidase C. L'hydrolyse de 3 heures libère une mole de sérine et 0,75 mole de leucine.

- Peptide NB-4 Pr-5S-3 (résidus 84 à 99)

Thr-Lys-Gly-Val-Gly-Ala-Gly-Ser-Ser-Phe-Arg-Leu-Ala-Lys-Ser-Asp

Ce peptide a été purifié par chromatographie préparative sur papier.

a) Composition en acides aminés

Asp	Thr	Ser	Gly	Ala	Val	Leu	Phe
1,13 (1)	0,92 (1)	2,96 (3)	3,3 (3)	2,09 (2)	0,93 (1)	1,04 (1)	0,89 (1)
Lys	Arg						
1,74 (2)	1,16 (1)						

Ce peptide est caractérisé par la présence de l'unique résidu de phénylalanine et du troisième résidu d'acide aspartique de la protéine.

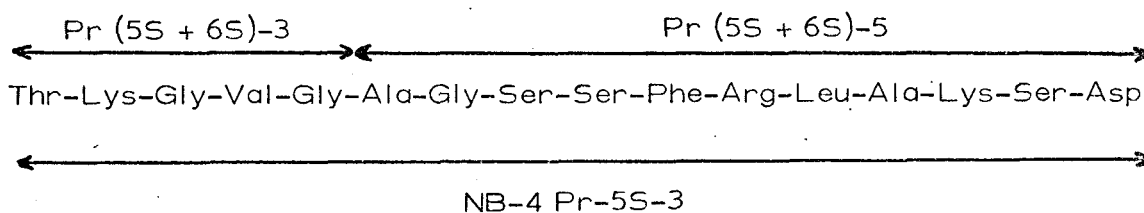
b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Thr

c) Hydrolyse par la carboxypeptidase C

L'hydrolyse du peptide NB-4 Pr-5S-3 par la carboxypeptidase C, pendant 4 heures, libère une mole d'acide aspartique et 0,70 mole de sérine.

En raison des caractéristiques de sa composition en acides aminés, l'étude structurale de ce peptide n'a pas été poussée plus loin. La structure complète du peptide NB-4 Pr-5S-3 peut en effet être déduite de l'étude structurale des peptides Pr-(5S + 6S)-3 et Pr (5S + 6S)-5 obtenus par hydrolyse de la protéine avec la protéase staphylococcique.



### III - DISCUSSION

La composition en acides aminés de la protéine indique dix sites de coupures (3 résidus d'acide aspartique, 7 résidus d'acide glutamique).

L'hydrolyse de l'histone H<sub>5</sub> et du fragment NB-4 par la protéase staphylococcique étant réalisée en milieu bicarbonate d'ammonium à pH 7,8, la spécificité de l'enzyme doit être limitée aux seules liaisons glutamyle.

Les résultats montrent que la protéase staphylococcique, outre sa spécificité pour les liaisons glutamyle (Glu-Ser et Glu-Lys) a une activité thermolysique comme en témoignent les coupures suivantes :

Lys-Ala 17 18	Peptide Pr-3S (résidus 3 à 17)
Gln-Ser 48 49	Peptide Pr (5S + 6S)-7 (résidus 40 à 48)
Ser-Ile 49 50	Peptide Pr (5S + 6S)-6 (résidus 50 à 56)
His-Asn 62 63	Peptide Pr (5S + 6S)-1 (résidus 63 à 65)
Ser-Ile 71 72	Peptide Pr (5S + 6S)-8 (résidus 72 à 77)
Ala-Ala 77 78	Peptide Pr (5S + 6S)-2 (résidus 78 à 83)
Gln-Thr 83 84	Peptide Pr (5S + 6S)-3 (résidus 84 à 88)
Gly-Ala 88 89	Peptide Pr (5S + 6S)-5 (résidus 89 à 99)
Ser-Thr	Peptide Pr (5S + 6S)-4

Il faut noter les coupures au niveau des résidus d'acide aspartique 65 et 99 (Asp-Leu et Asp-Lys) malgré l'emploi du bicarbonate d'ammonium. La coupure Asp-Leu peut être également imputée à l'activité thermolysique de la protéase staphylococcique.

Les peptides sont situés, pour la plupart, dans la partie NH<sub>2</sub>-terminale de la molécule. Cependant, malgré les résultats partiels, les peptides obtenus ont été très utiles pour des recouvrements avec des peptides d'autres hydrolysats.



B - HYDROLYSE DU FRAGMENT NB-4 DE L'HISTONE H<sub>5</sub>

---

PAR LA THERMOLYSINE

---

## HYDROLYSE DU FRAGMENT NB-4 DE L'HISTONE H<sub>5</sub> PAR LA

### THERMOLYSINE

Les peptides résultant de l'hydrolyse du fragment NB-4 par la thermolysine ont été fractionnés par chromatographie de gel-filtration sur colonne de Sephadex G. 25.

La courbe d'élution de ces peptides est présentée dans la figure 7. Cinq fractions, 1S, 2S, 3S, 4S, 5S sont obtenues.

Nomenclature : Les peptides thermolysiques sont désignés par Th et numérotés suivant l'ordre d'élution des colonnes Sephadex et Chromobeads P, le mode de purification étant désigné par une lettre (électrophorèse) ou un chiffre (chromatographie).

Exemple : Th-4S-17-1 - peptide, provenant de la fraction 4S (Sephadex) passée sur Chromobeads P., purifié par chromatographie.

Fraction 1S : La fraction 1S apparaît homogène en carte peptidique. La détermination de l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale par dansylation confirme cette homogénéité.

#### - Peptide Th-1S (résidus 95 à 111)

Leu-Ala-Lys-Ser-Asp-Lys-Ala-Lys-Arg-Ser-Pro-Gly-Lys-Lys-Lys-Ala-Lys

Ce peptide est caractérisé par la présence du 3e résidu d'acide aspartique présent dans l'histone H<sub>5</sub>

#### a) Composition en acides aminés

Asp , Ser , Pro , Gly , Ala , Leu , Lys , Arg  
1,01 (1) 1,95 (2) 1,21 (1) 1,12 (1) 2,73 (3) 0,82 (1) 6,85 (7) 1,29 (1)

#### b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Leu

CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION SUR SEPHADEX G. 25 DES PEPTIDES THERMOLYSIQUES  
DU FRAGMENT NB-4 DE L'HISTONE H<sub>5</sub>

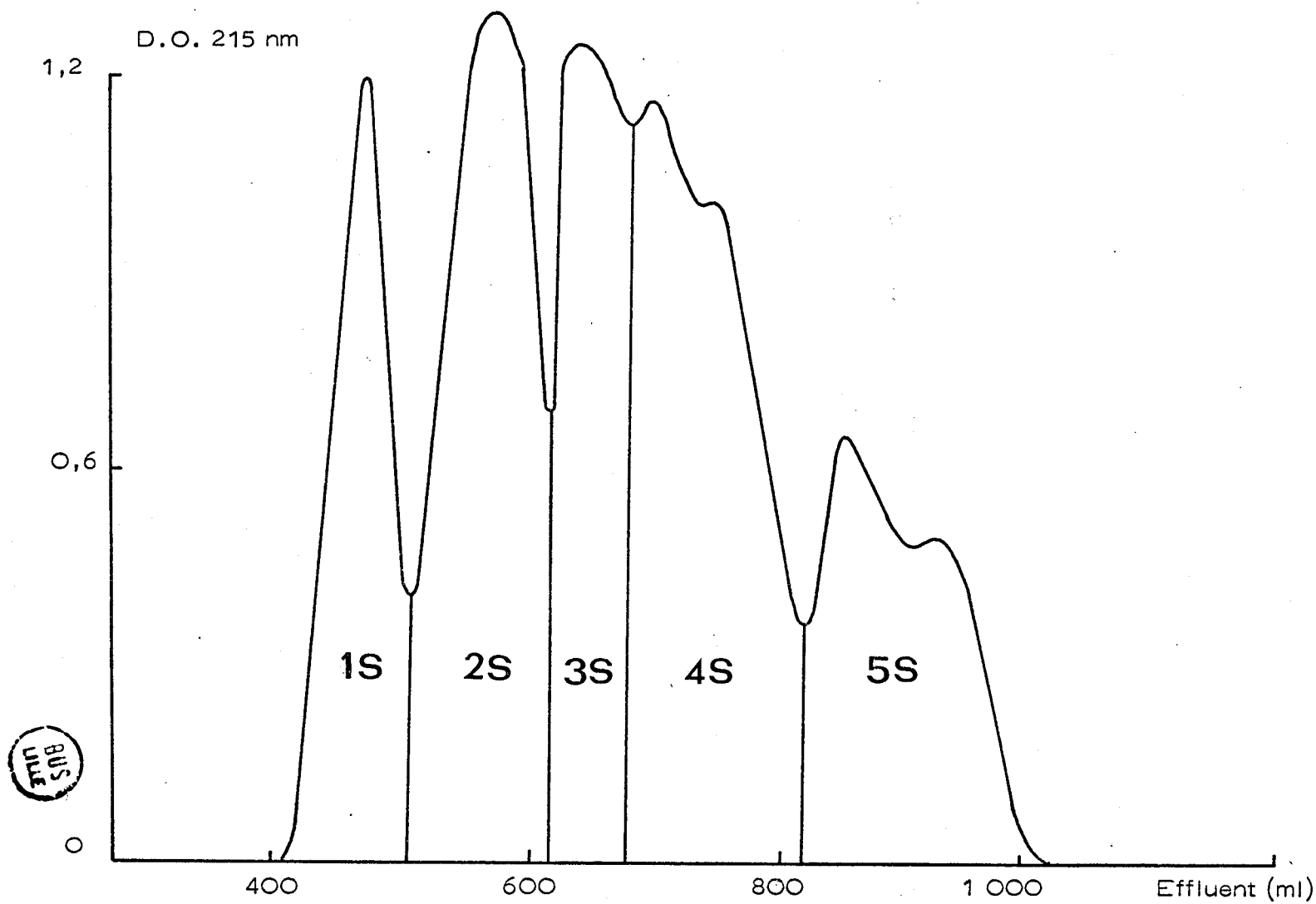


Figure 7

TABEAU XII

COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES THERMOLYSIQUES DES FRACTIONS 1S et 2S  
(exprimées en rapports molaires) (\*)

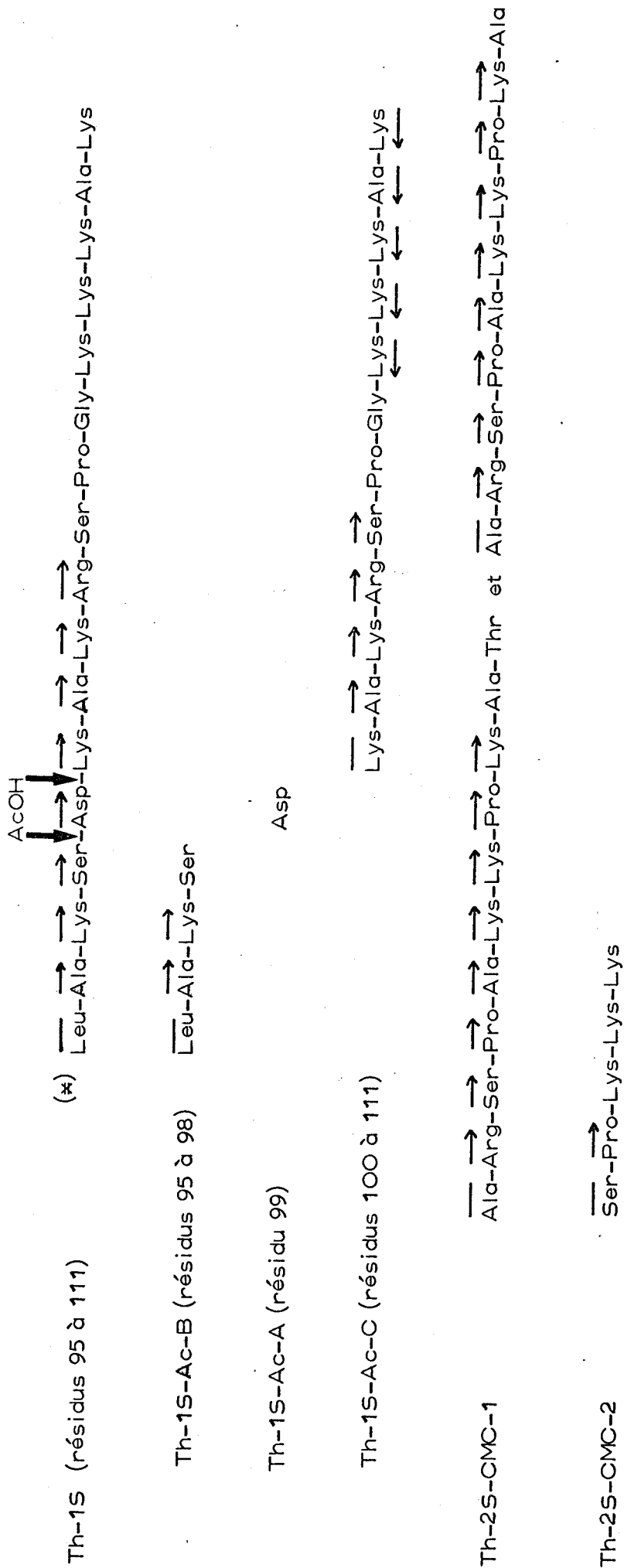
Acides aminés	Th-1S	Th-2S-CMC-1		Th-2S-CMC-2
Acide aspartique	1,01 (1)			
Thréonine		1,0 (1)		
Sérine	1,95 (2)	1,11 (1)	1,0 (1)	1,10 (1)
Acide glutamique				
Proline	1,21 (1)	1,88 (2)	2,0 (2)	0,93 (1)
Glycine	1,12 (1)			
Alanine	2,73 (3)	2,4 (3)	3,0 (3)	
Valine				
Isoleucine				
Leucine	0,82 (1)			
Tyrosine				
Phénylalanine				
Histidine				
Lysine	6,85 (7)	3,34 (3)	3,0 (3)	2,98 (3)
Arginine	1,29 (1)	1,29 (1)	1,0 (1)	
Nombre de résidus	17	10	11	5

(\*) Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de résidus arrondi à l'unité.



TABEAU XIII

SEQUENCES EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES THERMOLYTIQUES DES FRACTIONS 1S ET 2S



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

La longueur du peptide (17 résidus) et la présence d'un seul résidu d'acide aspartique nous ont incités à hydrolyser ce peptide par l'acide acétique 0,25 N pendant 6 heures.

Les deux peptides et le résidu d'acide aspartique énucléé sont facilement séparés par électrophorèse à pH 3,6.

- Peptide Th-1S-Ac-A (résidu 99)

Asp

Ce peptide est constitué uniquement d'acide aspartique libre. Son rendement est de 77 % par rapport au peptide Th-1S-Ac-C

- Peptide Th-1S-Ac-B (résidus 95 à 98)

Leu-Ala-Lys-Ser

a) Composition en acides aminés

Ser	, Ala	, Leu	, Lys
1,00 (1)	1,07 (1)	0,94 (1)	1,00 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Leu

c) Dégradation de EDMAN

Deux cycles de dégradation de EDMAN couplée avec la dansylation ont permis d'établir la séquence du peptide Th-1S-Ac-B, le dernier résidu (Ser 98) étant placé par différence.

- Peptide Th-1S-Ac-C (résidus 100 à 111)

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

a) Composition en acides aminés

Ser	, Pro	, Gly	, Ala	, Lys	, Arg
1,16 (1)	1,01 (1)	1,13 (1)	1,84 (2)	5,75 (6)	1,10 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

diDNS - Lys

c) Dégradation de EDMAN

Cinq cycles de dégradation de EDMAN avec identification des PTH-acides aminés ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide Th-1S-Ac-C.

d) Hydrolyse par les carboxypeptidases A et B

L'hydrolyse du peptide par la carboxypeptidase B pendant 4 heures libère uniquement un résidu de lysine.

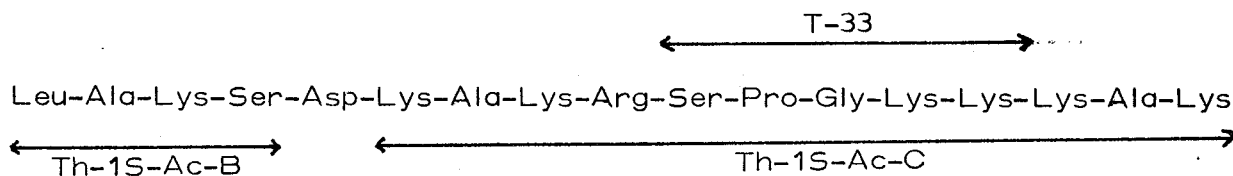
L'hydrolyse du peptide par le mélange des carboxypeptidases A et B libère 4 résidus de lysine et 1 résidu d'alanine.

La cinétique réalisée pendant 12 heures et présentée dans le tableau XIV permet d'établir la séquence COOH-terminale -Lys-Lys-Lys-Ala-Lys.

L'hydrolyse par les carboxypeptidases A et B est arrêtée au résidu d'acide aminé immédiatement situé après un résidu de proline, d'où nous pouvons déduire la séquence Pro-Gly et certainement pas la séquence Gly-Pro. Ceci a d'ailleurs été confirmé par le peptide tryptique T-33, Ser-Pro-Gly-Lys-Lys.

Les résultats obtenus ont été confirmés en soumettant le peptide Th-1S à la dégradation de EDMAN après traitement par le Sulfo-PITC dont le rôle est d'augmenter le caractère hydrophile du peptide. Neuf dégradations de EDMAN avec identification des PTH-acides aminés ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide Th-1S : Leu-Ala-Lys-Ser-Asp-Lys-Ala-Lys-Arg.

La séquence complète du peptide Th-1S peut donc s'écrire :



TABEAU XIV

DETERMINATION DE L'EXTREMITÉ COOH-TERMINALE DU PEPTIDE THERMOLYSIQUE Th-1S

PAR ETUDE CINÉTIQUE DE L'HYDROLYSE PAR LES CARBOXYPEPTIDASES B et A

Acides aminés libérés	Carboxypeptidase B 2 heures	Carboxypeptidase B 6 heures Carboxypeptidase A 4 heures	Carboxypeptidase B 8 heures Carboxypeptidase A 6 heures	Carboxypeptidase B 12 heures Carboxypeptidase A 10 heures
Alanine	8,18 (0,13)	50,13 (0,78)	54,78 (0,86)	57,97 (0,91)
Lysine	81,3 (1,27)	227,70 (3,55)	232,6 (3,63)	(4,07)

Les résultats sont exprimés en nanomoles de résidus libérés.

Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de résidus effectivement libérés.





Fraction 2S : La fraction 2S, hétérogène en carte peptidique, est constituée d'un mélange de peptides basiques migrant très peu en chromatographie

La chromatographie d'échange d'ions sur carboxyméthylcellulose nous est apparue comme la meilleure méthode de séparation de ces peptides.

Le diagramme d'élution et la courbe de dessalage sont présentés dans la figure 8. Deux fractions, Th-2S-CMC-1 et Th-2S-CMC-2, sont obtenues. (\*)

La fraction Th-2S-CMC-1 a été purifiée par chromatographie sur colonne de carboxyméthylcellulose (CMC 52). Le diagramme d'élution et la courbe de dessalage sont présentés dans la figure 9.

- Peptide Th-2S-CMC-1

Ala-Arg-Ser-Pro-Ala-Lys-Lys-Pro-Lys-Ala et Ala-Arg-Ser-Pro-Ala-Lys-Lys-Pro-Lys-Ala-Thr.

a) Composition en acides aminés

Thr	Ser	Pro	Ala	Lys	Arg
0,40	1,06 (1)	1,93 (2)	2,61 (3)	3,21 (3)	1,19 (1)

Nous avons deux peptides dont les compositions sont les suivantes :

	Ser	Pro	Ala	Lys	Arg
	1,11 (1)	1,88 (2)	2,4 (3)	3,34 (3)	1,29 (1)
Thr	Ser	Pro	Ala	Lys	Arg
1,0 (1)	1,0 (1)	2,0 (2)	3,0 (3)	3,0 (3)	1,0 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminale

DNS - Ala

c) Dégradation de EDMAN

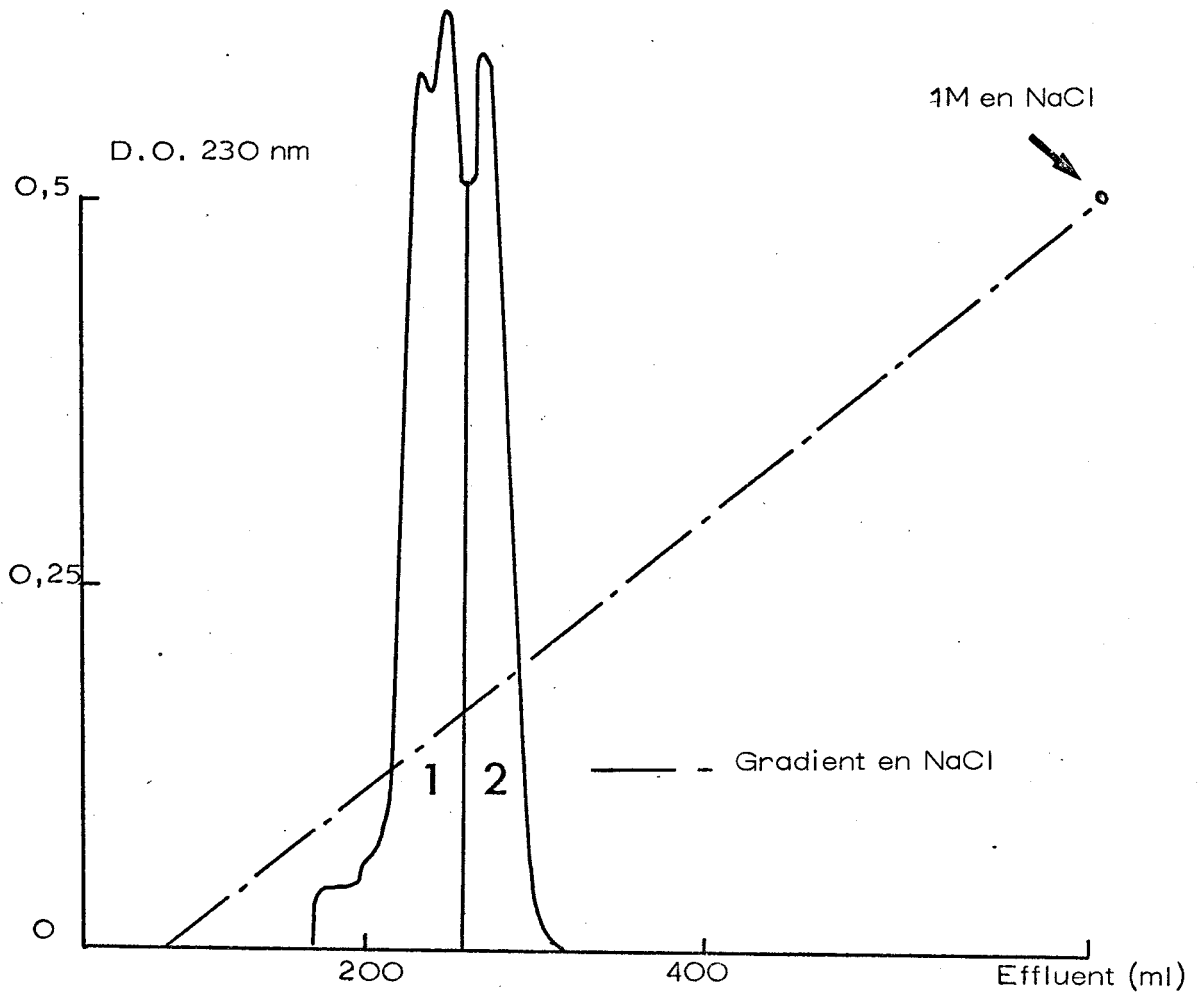
Neuf cycles de dégradation de EDMAN utilisée en méthode soustractive ont permis d'établir la séquence des peptides Th-2S-CMC-1a et Th-2S-CMC-1b.

---

(\*) La composition et la séquence en acides aminés de ces peptides sont respectivement présentées dans les tableaux XII et XIII.

Figure 8

Chromatographie de la fraction 2S sur colonne de CM-Cellulose



Courbes de dessalage des fractions :

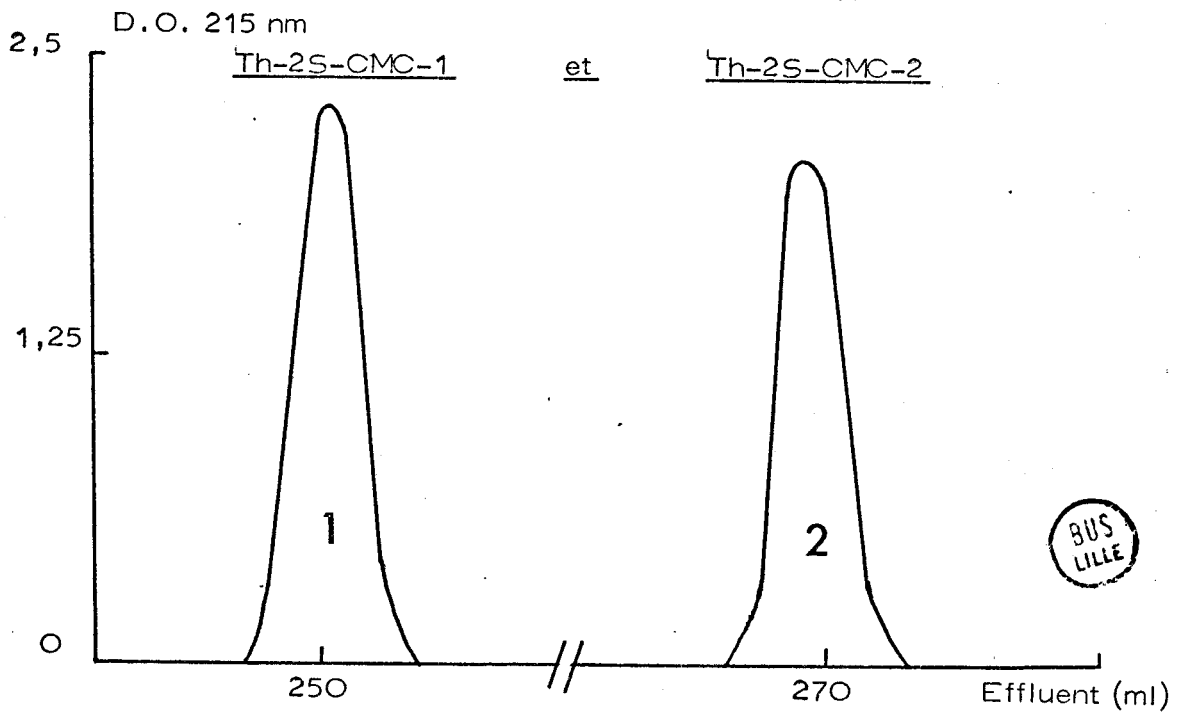
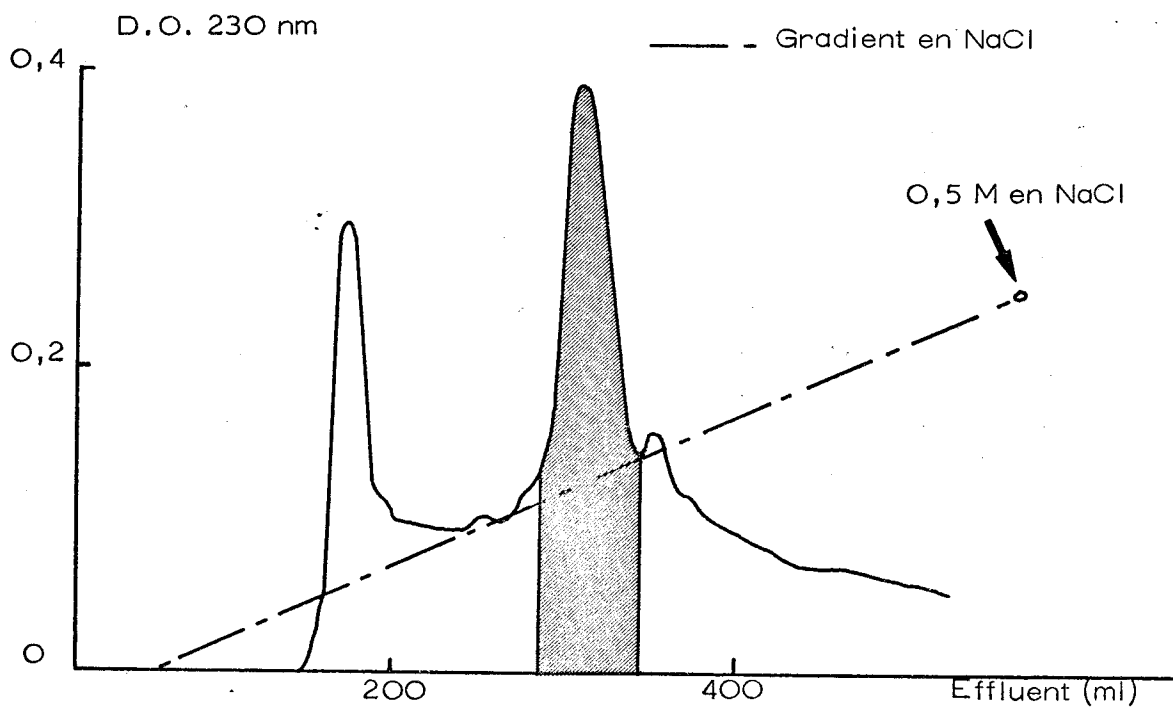
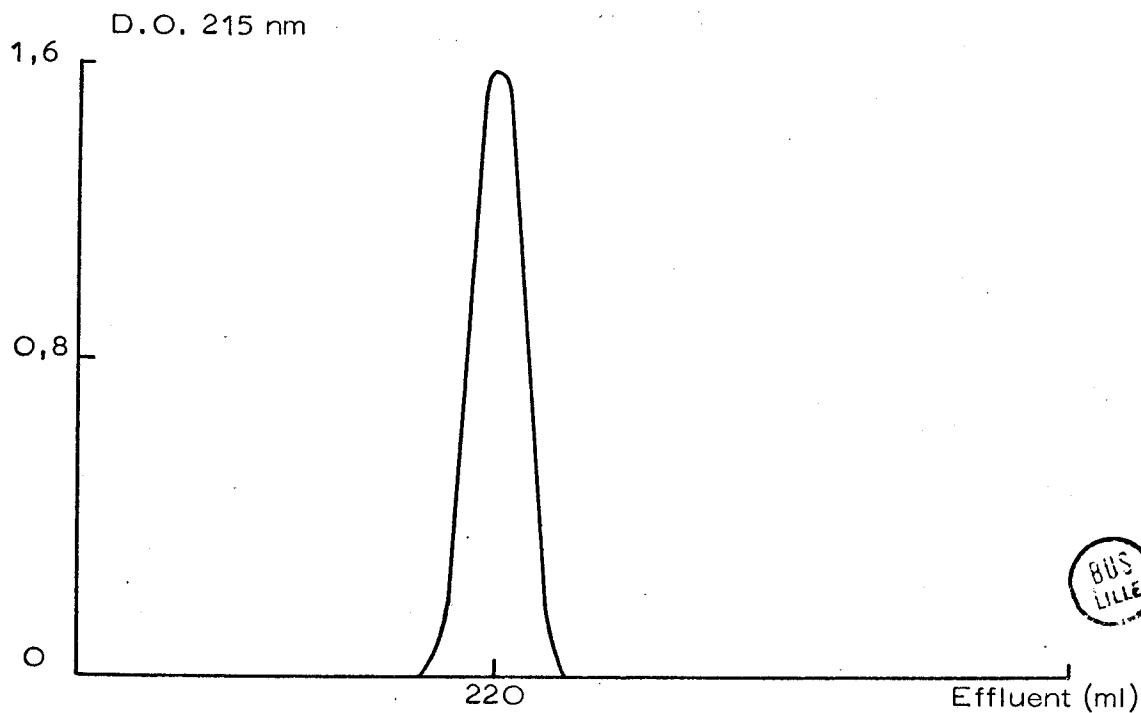


Figure 9  
Purification de la fraction Th-2S-CMC-1 par chromatographie  
sur colonne de CM-Cellulose



Courbe de dessalage de la fraction Th-2S-CMC-1



	Thr ,	Ser ,	Pro ,	Ala ,	Lys ,	Arg
<u>Composition :</u>	0,40	1,06	1,93	2,61	3,21	1,19
1er cycle	0,40	1,12	1,94	<u>1,63</u>	3,19	1,12
2ème cycle	0,44	1,23	2,06	1,72	2,99	<u>0</u>
3ème cycle	0,53	<u>0</u>	2,14	1,80	3,05	-
4ème cycle	0,60	-	<u>1,37</u>	1,80	2,83	-
5ème cycle	0,53	-	1,24	<u>1,16</u>	2,60	-
6ème cycle	0,49	-	1,23	1,07	<u>1,70</u>	-
7ème cycle	0,50	-	1,16	0,75	<u>1,08</u>	-
8ème cycle	0,48	-	<u>0</u>	1,11	0,89	-
9ème cycle	0,40	-	-	1,00	<u>0</u>	-

La faible quantité de thréonine présente dans la fraction Th-2S-CMC-1 s'explique donc par la présence du peptide Ala-Arg-Ser-Pro-Ala-Lys-Lys-Pro-Lys-Ala-Thr.

Cette hypothèse se confirme par la présence dans l'hydrolysat thermolytique des peptides suivants : Thr-Ala-Lys-Arg et Ala-Lys-Arg dont les études structurales seront présentées ultérieurement.

- Peptide Th-2S-CMC-2

Ser - Pro - Lys - Lys - Lys

a) Composition en acides aminés

Ser ,	Pro ,	Lys
1,10 (1)	0,93 (1)	2,98 (3)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Ser

c) Dégradation de EDMAN

Un cycle de dégradation de EDMAN associée à la dansylation a permis d'établir la séquence du peptide Th-2S-CMC-2, les 3 résidus de lysine étant placés par différence.

L'obtention de ce peptide implique l'hydrolyse par la thermolysine d'une liaison X-Ser placée immédiatement avant un résidu de proline. Cette hydrolyse est inhabituelle car dans les séquences de type X-AA hydrophobe - Pro, la liaison susceptible à l'action de la thermolysine n'est pas coupée par l'enzyme (AMBLER, 1968) (MATSUBARA, 1969) (SAUTIERE, 1973)

Fraction 3S : Cette fraction, constituée d'un mélange complexe de peptides, est fractionnée par chromatographie d'échange d'ions sur une résine Chromobeads P.

Le diagramme d'élution des peptides est présenté dans la figure 10.

Les peptides thermolysiques de la fraction 3S sont numérotés suivant leur ordre d'élution de la colonne. La composition et la séquence en acides aminés de ces peptides sont respectivement présentées dans les tableaux XV et XVI.

- Peptide Th-3S-1

Ser - Thr - Ser - Pro - Lys - Lys

Il est caractérisé par la présence d'un des trois résidus de thréonine de la partie COOH-terminale (résidus 112 à 185).

a) Composition en acides aminés

Thr	,	Ser	,	Pro	,	Lys
1,00 (1)		1,79 (2)		1,03 (1)		2,18 (2)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Ser

c) Dégradation de EDMAN

Quatre cycles de dégradation de EDMAN utilisée en méthode soustractive ont permis d'établir la séquence du peptide Th-3S-1, les deux résidus de lysine étant placés par différence.

SEPARATION DES PEPTIDES THERMOLYSIQUES DE LA FRACTION 3S SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P.

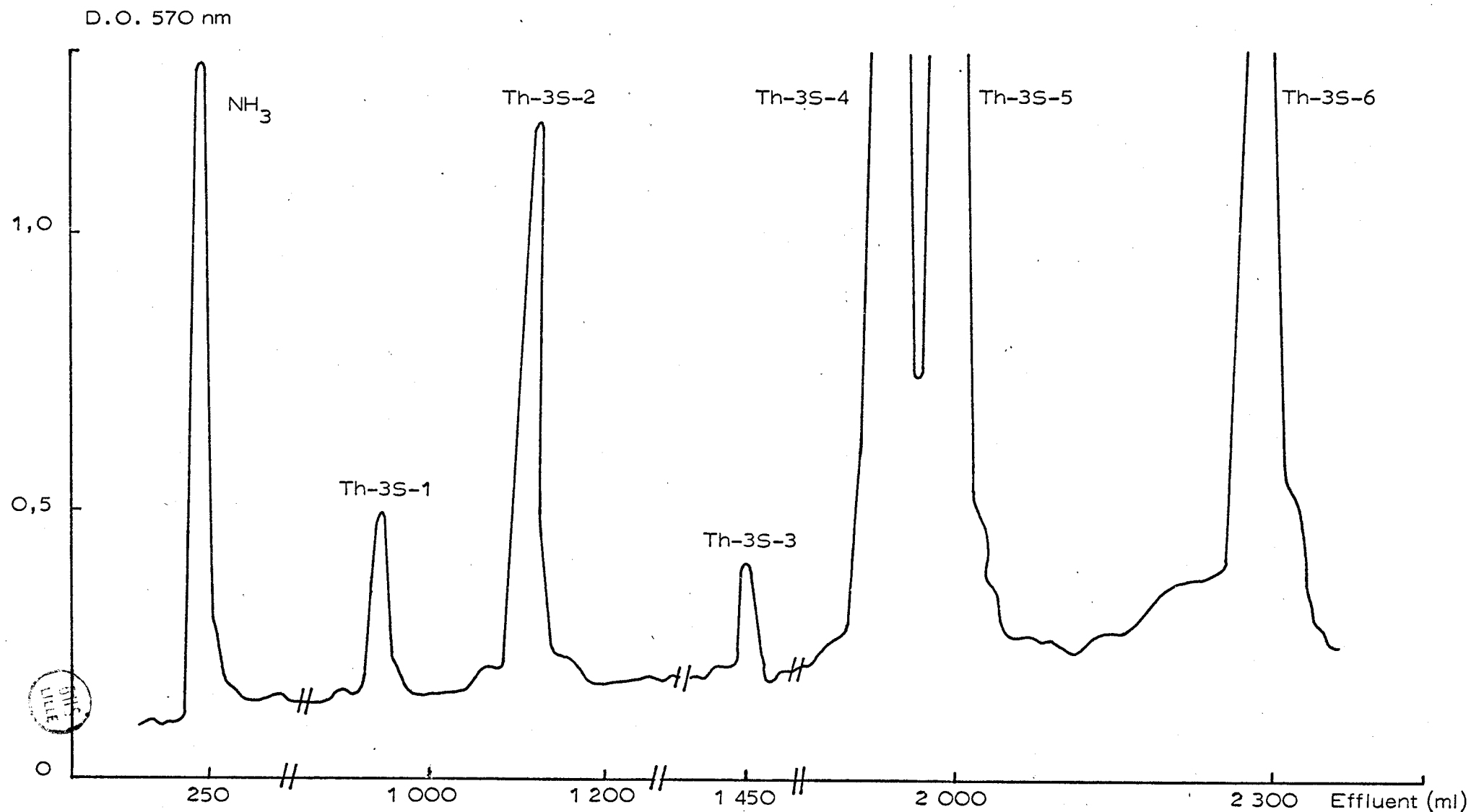


Figure 10

TABLEAU XV

COMPOSITIONS EN ACIDES AMINÉS DES PEPTIDES THERMOLYSIQUES DE LA FRACTION 3S

(exprimées en rapports molaires) (\*)

Acides aminés	Th-3S-1	Th-3S-2	Th-3S-3	Th-3S-4	Th-3S-5	Th-3S-6
Acide aspartique						
Thréonine	1,00 (1)			0,96 (1)	1,00 (1)	
Sérine	1,79 (2)	0,94 (1)				1,71 (2)
Acide glutamique						
Proline	1,03 (1)	1,01 (1)			1,04 (1)	0,81 (1)
Glycine						
Alanine		0,67 (1)	1,08 (1)	2,03 (2)	1,11 (1)	1,04 (1)
Valine			0,89 (1)			
Isoleucine						
Leucine						
Tyrosine						
Phénylalanine						
Lysine	2,18 (2)	2,0 (2)	2,03 (2)	3,00 (3)	2,85 (3)	2,04 (2)
Histidine						
Arginine						0,92 (1)
Nombre de résidus	6	5	4	6	6	7

(\*) Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de résidus arrondi à l'unité.

BRS  
LIFE

TABLEAU XVI.

SEQUENCES EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES THERMOLYSIQUES DE LA FRACTION 3S

Th-3S-1	$\overline{\text{Ser}} - \overrightarrow{\text{Thr}} - \overrightarrow{\text{Ser}} - \overrightarrow{\text{Pro}} - \overrightarrow{\text{Lys}} - \text{Lys}$
Th-3S-2	$\overline{\text{Ala}} - \overrightarrow{\text{Ser}} - \overrightarrow{\text{Pro}} - \text{Lys} - \text{Lys}$
Th-3S-3	$\overline{\text{Val}} - \overrightarrow{\text{Lys}} - \overrightarrow{\text{Ala}} - \text{Lys}$
Th-3S-4	$\overline{\text{Ala}} - \overrightarrow{\text{Ser}} - \overrightarrow{\text{Lys}} - \overrightarrow{\text{Ala}} - \text{Lys} - \text{Lys}$
Th-3S-5	$\overline{\text{Ala}} - \overrightarrow{\text{Lys}} - \overrightarrow{\text{Lys}} - \overrightarrow{\text{Pro}} - \overrightarrow{\text{Lys}} - \text{Thr}$
Th-3S-6	$\overline{\text{Ser}} - \overrightarrow{\text{Arg}} - \overrightarrow{\text{Ala}} - \overrightarrow{\text{Ser}} - \overrightarrow{\text{Pro}} - \text{Lys} - \text{Lys}$

(\*) La signification des signes placés au-dessus des résidus d'acides aminés est présentée dans le tableau IX p. 41.





	Thr	Ser	Pro	Lys
<u>Composition :</u>	1,00	1,79	1,03	2,18
2ème cycle	<u>0</u>	1,14	1,07	1,79
3ème cycle	-	<u>0</u>	1,00	1,63
4ème cycle	-	-	<u>0</u>	2,0

- Peptide Th-3S-2

Ala - Ser - Pro - Lys - Lys

a) Composition en acides aminés

Ser	Pro	Ala	Lys
0,94 (1)	1,01 (1)	0,67 (1)	2,0 (2)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Ala

c) Dégradation de EDMAN

Deux cycles de dégradation de EDMAN en couplage avec la méthode de dansylation ont permis d'établir la séquence du peptide Th-3S-2, les deux résidus de lysine étant placés par différence.

- Peptide Th-3S-3

Val - Lys - Ala - Lys

Ce peptide a été purifié par chromatographie préparative sur papier. Il est caractérisé par la présence d'un des trois résidus de valine de la partie COOH-terminale encore inconnue (résidus 112 à 185).

a) Composition en acides aminés

Ala	Val	Lys
1,08 (1)	0,89 (1)	2,03 (2)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Val

c) Dégradation de EDMAN

Deux cycles de dégradation de EDMAN en couplage avec la dansylation ont permis d'établir la séquence du peptide Th-3S-3, le 2ème résidu de lysine étant placé par différence.

- Peptide Th-3S-4

Ala - Ser - Lys - Ala - Lys - Lys

a) Composition en acides aminés

Ser	,	Ala	,	Lys
0,96 (1)		2,03 (2)		3,00 (3)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Ala

c) Dégradation de EDMAN

Quatre cycles de dégradation de EDMAN utilisée en méthode soustractive ont permis d'établir la séquence du peptide Th-3S-4, les deux résidus de lysine étant placés par différence.

	Ser	,	Ala	,	Lys
<u>Composition :</u>	0,96		2,03		3,00
2ème cycle	<u>0</u>		1,18		2,81
3ème cycle	-		1,18		<u>1,83</u>
4ème cycle	-		<u>0</u>		2,0

- Peptide Th-3S-5

Ala - Lys - Lys - Pro - Lys - Thr

Ce peptide est caractérisé par la présence d'un résidu de thréonine, acide aminé marqueur de la partie COOH-terminale.

a) Composition en acides aminés

Thr , Pro , Ala , Lys  
1,00 (1) 1,04 (1) 1,11 (1) 2,85 (3)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Ala

c) Dégradation de EDMAN

Cinq cycles de dégradation de EDMAN utilisée en méthode soustractive ont permis d'établir la séquence du peptide Th-3S-5, le résidu de thréonine étant placé par différence.

	Thr ,	Pro ,	Ala ,	Lys
<u>Composition :</u>	1,00	1,04	1,11	2,85
2ème cycle	0,93	1,09	0	<u>1,98</u>
3ème cycle	0,91	1,10	-	<u>0,99</u>
4ème cycle	1,10	<u>0</u>	-	0,91
5ème cycle	1,00	-	-	<u>0</u>

- Peptide Th-3S-6

Ser - Arg - Ala - Ser - Pro - Lys - Lys

a) Composition en acides aminés

Ser , Pro , Ala , Lys , Arg  
1,71 (2) 0,80 (1) 1,04 (1) 2,04 (2) 0,92 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Ser

c) Dégradation de EDMAN

Cinq cycles de dégradation de EDMAN utilisée en méthode soustractive ont permis d'établir la séquence du peptide Th-3S-6, les deux résidus de lysine étant placés par différence.

	Ser ,	Pro ,	Ala ,	Lys ,	Arg
<u>Composition :</u>	1,71	0,80	1,04	2,04	0,82
2ème cycle	0,99	1,07	1,07	1,87	<u>0</u>
3ème cycle	1,11	1,18	<u>0</u>	2,07	-
4ème cycle	<u>0</u>	0,92	-	2,07	-
5ème cycle	-	<u>0</u>	-	2,0	-

Ce peptide a été obtenu avec un rendement important par coupure au niveau d'un résidu de sérine, malgré la présence d'un résidu d'alanine, site favorable de coupure pour la thermolysine.

Fraction 4S : La fraction 4S qui apparaît très complexe en carte peptidique est fractionnée par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Chromobeads P.

Le diagramme d'éluion obtenu est présenté dans la figure 11. Les peptides sont désignés par un chiffre correspondant à l'ordre d'éluion de la colonne et les purifications par une lettre (électrophorèse) ou un chiffre (chromatographie). La composition et la séquence en acides aminés de ces peptides sont respectivement présentées dans les tableaux XVII et XVIII.

- Peptide Th-4S-1 (résidus 87 à 92)

Val - Gly - Ala - Gly - Ser - Ser

a) Composition en acides aminés

Ser ,	Gly ,	Ala ,	Val
1,93 (2)	2,15 (2)	0,86 (1)	1,05 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Val

c) Dégradation de EDMAN

Trois cycles de dégradation de EDMAN associée à la

SEPARATION DES PEPTIDES THERMOLYSIQUES DE LA FRACTION 4S SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P.

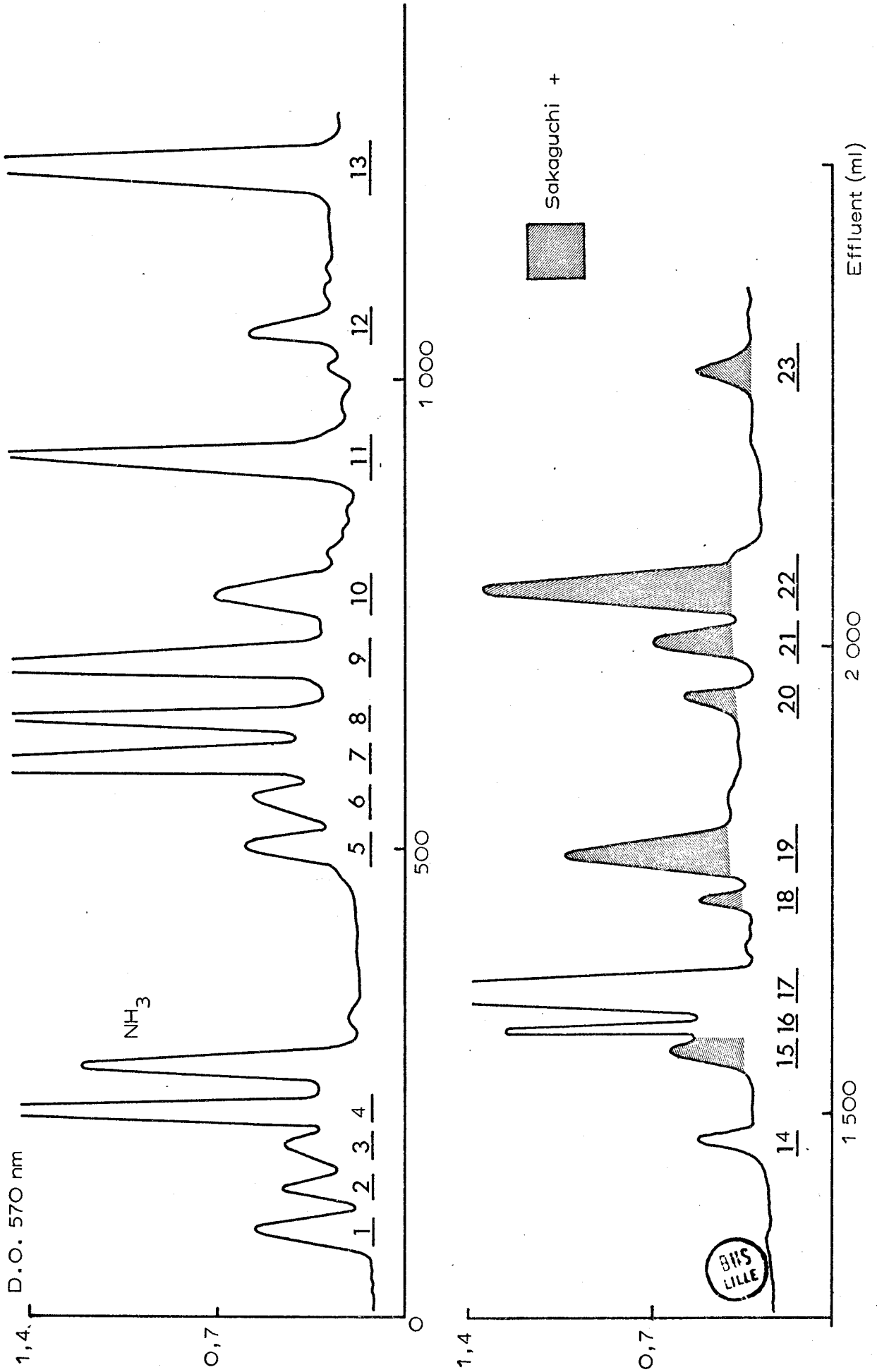


Figure 11

TABLEAU XVII

COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES THERMOLYSIQUES DE LA FRACTION 4S  
(exprimées en rapports molaires) (\*)

Acides aminés	Th-4S-1	Th-4S-2	Th-4S-3-1	Th-4S-3-2	Th-4S-4-1	Th-4S-4-2	Th-4S-4-3	Th-4S-5-A
Acide aspartique								0,84 (1)
Thréonine		1,08 (1)						
Sérine	1,93 (2)					0,99 (1)		
Acide glutamique					1,01 (1)			
Proline								
Glycine	2,15 (2)		0,82 (1)	0,99 (1)			1,22 (1)	1,16 (1)
Alanine	0,86 (1)	0,92 (1)	1,18 (1)	2,08 (2)			1,90 (2)	
Valine	1,05 (1)							
Isoleucine								
Leucine				0,93 (1)	0,99 (1)	1,01 (1)	1,88 (2)	
Tyrosine								
Phénylalanine								
Histidine								N.D.
Lysine								
Arginine								
Nombre de résidus	6	2	2	4	2	2	5	3

(\*) Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de résidus arrondi à l'unité.

TABLEAU XVII (suite)

COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES THERMOLYSIQUES DE LA FRACTION 4S

(exprimées en rapports molaires) (\*)

Acides aminés	Th-4S-5-B	Th-4S-6	Th-4S-7-1	Th-4S-7-2	Th-4S-8	Th-4S-9	Th-4S-10	Th-4S-11
Acide aspartique		1,82 (2)				0,96 (1)		
Thréonine								
Sérine	1,25 (1)		1,05 (1)					
Acide glutamique					1,05 (1)			
Proline								
Glycine	0,85 (1)	1,33 (1)		1,00 (1)		1,16 (1)	1,06 (1)	
Alanine	1,00 (1)	0,99 (1)	0,97 (1)			0,90 (1)		
Valine		1,00 (1)			0,98 (1)		0,98 (1)	
Isoleucine								0,96 (1)
Leucine					1,01 (1)			
Tyrosine								
Phénylalanine								
Histidine		N.D.		N.D.				
Lysine	0,84 (1)	0,80 (1)	0,98 (1)		0,96 (1)	1,98 (2)	0,96 (1)	1,04 (1)
Arginine								
Nombre de résidus	4	7	3	2	4	5	3	2

(\*) Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de résidus arrondi à l'unité.

TABLEAU XVII (suite)

COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES THERMOLYSIQUES DE LA FRACTION 4S

(exprimées en rapports molaires) (\*)

Acides aminés	Th-4S-12-1	Th-4S-12-2	Th-4S-13	Th-4S-14	Th-4S-15	Th-4S-16	Th-4S-17-1
Acide aspartique							
Thréonine			0,71 (1)		0,90 (1)		
Sérine	1,02 (1)		1,83 (2)	1,13 (1)			
Acide glutamique							
Proline			1,83 (2)	0,89 (1)			
Glycine							
Alanine			1,17 (1)		1,99 (2)	1,12 (1)	1,0 (1)
Valine						0,95 (1)	
Isoleucine		0,96 (1)					
Leucine		1,09 (1)					
Tyrosine							
Phénylalanine							
Histidine							
Lysine	1,00 (1)	0,96 (1)	3,74 (4)	1,98 (2)	1,00 (1)	1,92 (2)	2,04 (2)
Arginine					1,28 (1)		
Nombre de résidus	2	3	10	4	5	4	3

(\*) Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de résidus arrondi à l'unité.



TABLEAU XVII (suite)  
COMPOSITIONS EN ACIDES AMINÉS DES PEPTIDES THERMOLYSIQUES DE LA FRACTION 4S  
(exprimées en rapports molaires) (\*)

Acides aminés	Th-4S-17-2	Th-4S-18	Th-4S-19	Th-4S-20	Th-4S-21	Th-4S-22	Th-4S-23
Acide aspartique							
Thréonine			0,85 (1)				
Sérine		0,70 (1)		1,00 (1)			1,09 (1)
Acide glutamique							
Proline		1,0 (1)					
Glycine	1,13 (1)						
Alanine			1,00 (1)	1,02 (1)		0,80 (1)	
Valine	0,97 (1)			0,83 (1)	0,80 (1)		0,90 (1)
Isoleucine							
Leucine							
Tyrosine							
Phénylalanine							
Histidine	N.D.						
Lysine	0,90 (1)	1,07 (1)	1,01 (1)		1,04 (1)	1,07 (1)	
Arginine		1,22 (1)	1,01 (1)	2,14 (2)	1,17 (1)	1,13 (1)	2,00 (2)
Nombre de résidus	4	4	4	5	3	3	4

(\*) Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de résidus arrondi à l'unité.

TABEAU XVIII

SEQUENCES EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES THERMOLYSIQUES DE LA FRACTION 4S

Th-4S-1	(résidus 87 à 92)	(*) Val - Gly - Ala - Gly - Ser - Ser
Th-4S-2		Ala - Thr
Th-4S-3-1		Ala - Gly
Th-4S-3-2	(résidus 76 à 79)	Leu - Ala - Ala - Gly
Th-4S-4-1	(résidus 66 et 67)	Leu - Gln
Th-4S-4-2	(résidus 70 et 71)	Leu - Ser
Th-4S-4-3	(résidus 75 à 79)	Leu - Leu - Ala - Ala - Gly
Th-4S-5-A	(résidus 61 à 63)	Gly - His - Asn
Th-4S-5-B		Ala - Lys - Ser - Gly
Th-4S-6	(résidus 59 à 65)	Lys - Val - Gly - His - Asn - Ala - Asp
Th-4S-7-1		Ala - Ser - Lys
Th-4S-7-2	(résidus 61 et 62)	Gly - His
Th-4S-8	(résidus 80 à 83)	Val - Leu - Lys - Gln
Th-4S-9	(résidus 84 à 86)	Thr - Lys - Gly et Ala - Lys
Th-4S-10	(résidus 59 à 61)	Lys - Val - Gly

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



SEQUENCES EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES THERMOLYTIQUES DE LA FRACTION 4S

	(*)	(suite)
Th-4S-11 (résidus 68 et 69)	Ile - Lys	
Th-4S-12-1	Ser - Lys	
Th-4S-12-2 (résidus 68 à 70)	Ile - Lys - Leu	
Th-4S-13	Thr - Ser - Pro - Lys - Lys et Ala - Ser - Pro - Lys - Lys	
Th-4S-14	Ser - Pro - Lys - Lys	
Th-4S-15	Ala - Thr - Ala - Arg - Lys	
Th-4S-16	Val - Lys - Ala - Lys	
Th-4S-17-1	Ala - Lys - Lys	
Th-4S-17-2 (résidus 59 à 62)	Lys - Val - Gly - His	
Th-4S-18	Ser - Lys - Pro - Arg	
Th-4S-19	Thr - Ala - Arg - Lys	
Th-4S-20	Ala - Val - Arg - Arg - Ser	
Th-4S-21	Val - Lys - Arg	
Th-4S-22	Ala - Arg - Lys	
Th-4S-23	Val - Arg - Arg - Ser	

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



dansylation ont permis d'établir la séquence du peptide Th-4S-1, les deux résidus de sérine étant placés par différence.

- Peptide Th-4S-2

Ala - Thr

Ce peptide est caractérisé par un des trois résidus de thréonine de la partie COOH-terminale (résidus 112 à 185) de la molécule.

a) Composition en acides aminés

Thr	,	Ala
1,08 (1)		0,92 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Ala

- Peptide Th-4S-3-1 (résidus 78 et 79)

Ala - Gly

Ce peptide est isolé de la fraction Th-4S-3 par chromatographie préparative sur papier.

a) Composition en acides aminés

Gly	,	Ala
0,82 (1)		1,18 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Ala

- Peptide Th-4S-3-2 (résidus 76 à 79)

Leu - Ala - Ala - Gly

Ce peptide est isolé de la fraction Th-4S-3 par chromatographie sur papier.

a) Composition en acides aminés

Gly	,	Ala	,	Leu.
0,99 (1)		2,08 (2)		0,93 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminale

DNS - Leu

c) Dégradation de EDMAN

Deux cycles de dégradation de EDMAN en couplage avec la dansylation permettent d'établir la séquence du peptide Th-4S-3-2, le résidu de glycine étant placé par différence.

- Peptide Th-4S-4-1 (résidus 66 et 67)

Leu - Gln

Ce peptide est isolé de la fraction Th-4S-4 par chromatographie sur papier.

a) Composition en acides aminés

Glu	,	Leu
1,01 (1)		0,99 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Leu

c) Dégradation de EDMAN

Deux cycles de dégradation de EDMAN avec identification des PTH amino-acides ont permis d'établir la séquence du peptide Th-4S-4-1.

- Peptide Th-4S-4-2 (résidus 70 et 71)

Leu - Ser

Ce peptide est isolé de la fraction Th-4S-4 par chromatographie sur papier.

a) Composition en acides aminés

Ser	,	Leu
0,99 (1)		1,01 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Leu

- Peptide Th-4S-4-3 (résidus 75 à 79)

Leu - Leu - Ala - Ala - Gly

Ce peptide est isolé de la fraction Th-4S-4 par chromatographie sur papier.

a) Composition en acides aminés

Gly	, Ala	, Leu
1,22 (1)	1,90 (2)	1,88 (2)

c) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Leu

La séquence du peptide Th-4S-4-3 a été déduite des études structurales réalisées sur le peptide Th-4S-3-2, Leu-Ala-Ala-Gly.

- Peptide Th-4S-5-A (résidus 61 à 63)

Gly - His - Asn

Ce peptide est isolé de la fraction Th-4S-5 par chromatographie sur papier.

a) Composition en acides aminés

Asp	, Gly	, His
0,84 (1)	1,16 (1)	non déterminé

En raison de la bromation du résidu d'histidine résultant de l'action de la N-bromosuccinimide sur l'histone H<sub>5</sub>, l'histidine ne peut être déterminée au cours de l'analyse des acides aminés.

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Gly

c) Hydrolyse par la carboxypeptidase C

L'hydrolyse du peptide Th-4S-4 par la carboxypeptidase C pendant 3 heures libère un résidu d'asparagine.

La séquence est donc Gly-His-Asn, le résidu d'histidine étant placé par différence. Cette séquence a été confirmée par les études structurales réalisées sur le peptide chymotrypsique Ch-1S-2-3 :

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

L'obtention du peptide Gly-His-Asn implique l'hydrolyse de la liaison Val-Gly par la thermolysine bien que la glycine n'ait pas de caractère hydrophobe. La coupure des liaisons de type X-Gly n'est cependant pas un fait isolé puisqu'elle a déjà été signalée par SUNG et DIXON (1970).

- Peptide Th-4S-5-B

Ala - Lys - Ser - Gly

Ce peptide a été purifié par électrophorèse préparative à pH 3,6 sur papier. Il est caractérisé par la présence d'un des deux résidus de glycine de la partie COOH-terminale (résidus 112 à 185).

a) Composition en acides aminés

Ser , Gly , Ala , Lys .  
1,25 (1) 0,85 (1) 1,00 (1) 0,84 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Ala

c) Dégradation de EDMAN

Deux cycles de dégradation de EDMAN en couplage avec la méthode de dansylation ont permis d'établir la séquence du peptide Th-4S-5, le résidu de glycine étant placé par différence.

- Peptide Th-4S-6 (résidus 59 à 65)

Lys - Val - Gly - His - Asn - Ala - Asp

Ce peptide a été purifié par électrophorèse préparative à pH 3,6 sur papier. Il est caractérisé par la présence de deux des trois résidus d'acide aspartique de la molécule d'histone.

a) Composition en acides aminés

Asp , Gly , Ala , Val , His , Lys  
1,82 (2) 1,33 (1) 0,99 (1) 1,00 (1) N.D. 0,80 (1)

En raison de la bromation du résidu d'histidine résultant de l'action de la N-bromosuccinimide sur l'histone H<sub>5</sub>, l'histidine ne peut être déterminée au cours de l'analyse des acides aminés.

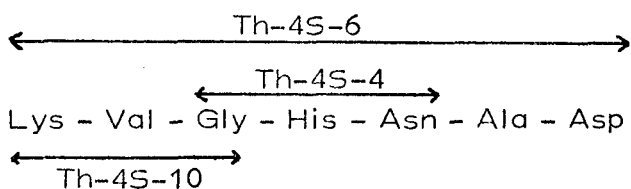
b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

diDNS - Lys

c) Hydrolyse par la carboxypeptidase C

L'hydrolyse du peptide Th-4S-6 par la carboxypeptidase C pendant 4 heures libère un résidu d'acide aspartique.

La séquence du peptide Th-4S-6 a été déduite des études structurales des peptides Th-4S-4 Gly-His-Asn et Th-4S-10 Lys-Val-Gly suivant le schéma



Le résidu de lysine en position NH<sub>2</sub>-terminale et la présence du résidu d'histidine et des deux résidus d'acide aspartique permettent d'affirmer que le peptide Th-4S-6 correspond à la partie NH<sub>2</sub>-terminale du fragment NB-4 de l'histone H<sub>5</sub>.

- Peptide Th-4S-7-1

Ala - Ser - Lys

Ce peptide est isolé de la fraction Th-4S-7 par chromatographie préparative sur papier.



a) Composition en acides aminés

Ser	,	Ala	,	Lys
1,05 (1)		0,97 (1)		0,98 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Ala

c) Dégradation de EDMAN

Deux cycles de dégradation de EDMAN utilisée en méthode soustractive ont permis d'établir la séquence du peptide Th-4S-7-1, le résidu de lysine étant placé par différence.

	Ser	,	Ala	,	Lys
<u>Composition :</u>	1,05		0,97		0,98
1er cycle	1,20		<u>0</u>		0,85
2ème cycle	<u>0</u>		-		1,00

- Peptide Th-4S-7-2 (résidus 61 et 62)

Gly - His

Ce peptide est obtenu de la même façon que le peptide Th-4S-7-1.

a) Composition en acides aminés

Gly	,	His
1,00 (1)		N.D.

Le caractère basique de ce peptide qui se manifeste par son volume de rétention sur la colonne de Chromobeads P. et par son comportement cathodique en électrophorèse sur papier à pH 3,6 traduit la présence du résidu d'histidine bromé que l'analyse d'acides aminés ne peut mettre en évidence.

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Gly

L'obtention de ce peptide implique la coupure de la liaison His-Asn par la thermolysine.

- Peptide Th-4S-8 (résidus 80 à 83)

Val - Leu - Lys - Gln

a) Composition en acides aminés

Glu , Val , Leu , Lys  
1,05 (1) 0,98 (1) 1,01 (1) 0,96 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Val

c) Dégradation de EDMAN

Deux cycles de dégradation de EDMAN au couplage avec la dansylation ont permis d'établir la séquence du peptide Th-4S-8, le résidu de glutamine étant placé par différence.

La présence de glutamine dans ce peptide a été déduite des études structurales réalisées sur le peptide Pr-4S :

Ala-Gly-Val-Leu-Lys-Gln-Thr-Lys-Gly-Val-Gly

- Peptide Th-4S-9 (résidus 84 à 86)

Thr - Lys - Gly et Ala - Lys

a) Composition en acides aminés

Thr , Gly , Ala , Lys  
0,96 (1) 1,16 (1) 0,90 (1) 1,98 (2)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Thr et DNS - Ala

c) Dégradation de EDMAN

Un cycle de dégradation de EDMAN utilisée en méthode soustractive a permis d'établir les séquences Ala-Lys et Thr-Lys.

La présence des deux dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminaux DNS-Thr et DNS-Ala et la disparition des deux résidus de lysine lors de la dégradation de EDMAN prouvent la présence de deux peptides. Le résidu de glycine ne peut provenir que du peptide Thr-Lys-Gly car le résidu de glycine placé dans la partie COOH-terminale encore inconnue est engagé dans une liaison Ser-Gly (peptide Th-4S-5-B : Ala-Lys-Ser-Gly).

- Peptide Th-4S-10 (résidus 59 à 61)

Lys - Val - Gly

a) Composition en acides aminés

Gly , Val , Lys  
1,06 (1) 0,98 (1) 0,96 (1)

Son comportement en électrophorèse sur papier à pH 3,6 et son volume de rétention sur la colonne de Chromobeads P. permettent d'affirmer que ce peptide ne contient pas le résidu d'histidine bromé que l'analyse d'acides aminés ne peut mettre en évidence.

b) Dansylamino-acide-NH<sub>2</sub>-terminal

diDNS - Lys

c) Dégradation de EDMAN

Un cycle de dégradation de EDMAN en couplage avec la dansylation a permis d'établir la séquence du peptide Th-4S-10, le résidu de glycine étant placé par différence.

Le peptide Th-4S-10 correspond à la partie NH<sub>2</sub>-terminale du fragment NB-4 de l'histone H<sub>5</sub>.

- Peptide Th-4S-11 (résidus 68 et 69)

Ile - Lys

a) Composition en acides aminés

Ile , Lys  
0,96 (1) 1,04 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Ile

La séquence de ce peptide est évidente.

- Peptide Th-4S-12-1

Ser - Lys

Ce peptide a été isolé de la fraction Th-4S-12 par chromatographie préparative sur papier.

a) Composition en acides aminés

Ser , Lys  
1,02 (1) 1,00 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Ser

La séquence de ce peptide est évidente.

- Peptide Th-4S-12-2 (résidus 68 à 70)

Ile - Lys - Leu

Ce peptide a été isolé de la fraction Th-4S-12 par chromatographie préparative sur papier.

a) Composition en acides aminés

Ile , Leu , Lys  
0,96 (1) 1,09 (1) 0,96 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Ile

c) Dégradation de EDMAN

Un cycle de dégradation de EDMAN en couplage avec la dansylation a permis d'établir la séquence du peptide Th-4S-12-2, le résidu de leucine étant placé par différence.

- Fraction Th-4S-13

Thr-Ser-Pro-Lys-Lys et Ala-Ser-Pro-Lys-Lys

a) Composition en acides aminés

Thr , Ser , Pro , Ala , Lys  
0,71 (1) 1,83 (2) 1,83 (2) 1,17 (1) 3,74 (4)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Thr et DNS - Ala

c) Dégradation de EDMAN

Trois cycles de dégradation utilisée en méthode soustractive ont permis d'établir les séquences des peptides de la fraction Th-4S-13.

	Thr ,	Ser ,	Pro ,	Ala ,	Lys
<u>Composition :</u>	0,71	1,83	1,83	1,17	3,74
2ème cycle	-	<u>0</u>	1,89	-	4,10
3ème cycle	-	-	<u>0</u>	-	4,00

La présence des deux dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminaux et la dégradation de EDMAN montrent que nous avons deux peptides en quantité équivalente : Thr-Ser-Pro-Lys-Lys et Ala-Ser-Pro-Lys-Lys.

Le peptide Th-3S-2, Ala-Ser-Pro-Lys-Lys, et les peptides de la fraction Th-4S-13 ont un volume de rétention sur la colonne de Chromo-beads P. et un comportement électrophorétique identiques.

- Peptide Th-4S-14

Ser - Pro - Lys - Lys

a) Composition en acides aminés

Ser ,	Pro ,	Lys
1,13 (1)	0,89 (1)	1,98 (2)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Ser

c) Hydrolyse par la carboxypeptidase C

L'hydrolyse du peptide Th-4S-14 par la carboxypeptidase C pendant 4 heures libère deux résidus de lysine.

Le résidu de proline étant placé par différence, la séquence du peptide Th-4S-14 est donc Ser-Pro-Lys-Lys.

L'obtention de ce peptide implique l'hydrolyse par la thermolysine d'une liaison X-Ser placée immédiatement avant un résidu de proline.

Cette hydrolyse est inhabituelle car dans les séquences de type X-AA Hydrophobe-Pro, la liaison susceptible à l'action de la thermolysine n'est pas coupée par l'enzyme (AMBLER, 1968) (MATSUBARA, 1969) (SAUTIERE, 1973).

- Peptide Th-4S-15

Ala - Thr - Ala - Arg - Lys

Ce peptide est caractérisé par la présence d'un des trois résidus de thréonine présents dans la partie COOH-terminale (résidus 112 à 185) de l'histone H<sub>5</sub>.

a) Composition en acides aminés

Thr	,	Ala	,	Lys	,	Arg
0,90 (1)		1,99 (2)		1,00 (1)		1,28 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Ala

c) Dégradation de EDMAN

Trois cycles de dégradation de EDMAN associée à la dansylation ont permis d'établir la séquence du peptide Th-4S-15, le résidu de lysine étant placé par différence.

- Peptide Th-4S-16

Val - Lys - Ala - Lys

a) Composition en acides aminés

Ala	,	Val	,	Lys
1,12 (1)		0,95 (1)		1,92 (2)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Val

Nous n'avons pas poussé plus avant l'étude de la structure de ce peptide qui est manifestement identique en raison des caractéristiques de sa composition au peptide Th-3S-3.

La présence d'un même peptide dans deux fractions adjacentes n'est pas étonnante.

- Peptide Th-4S-17-1

Ala - Lys - Lys

Ce peptide est purifié par chromatographie préparative sur papier.

a) Composition en acides aminés

Ala	,	Lys
1,0 (1)		2,04 (2)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Ala

La séquence du peptide Th-4S-17-1 est évidente.

- Peptide Th-4S-17-2 (résidus 59 à 62)

Lys - Val - Gly - His

a) Composition en acides aminés

Gly	,	Val	,	Lys	,	His
1,13 (1)		0,97 (1)		0,90 (1)		N.D.

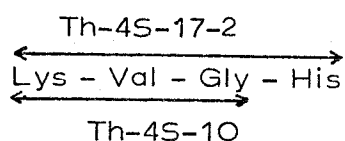
En raison de la bromation du résidu d'histidine résultant de l'action de la N-bromosuccinimide sur l'histone H<sub>5</sub>, l'histidine ne peut être déterminée au cours de l'analyse des acides aminés.

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

diDNS - Lys

Son comportement en électrophorèse sur papier à pH 3,6 et sa position d'élution de la colonne de Chromobeads P. au niveau des peptides contenant deux résidus basiques permettent d'affirmer que ce peptide contient le résidu d'histidine bromé (His 62).

La séquence complète du peptide Th-4S-17-2 est déduite des études structurales réalisées sur le peptide Th-4S-10 suivant le schéma :



- Peptide Th-4S-18

Ser - Lys - Pro - Arg

a) Composition en acides aminés

Ser	Pro	Lys	Arg
0,70 (1)	1,0 (1)	1,07 (1)	1,22 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Ser

c) Dégradation de EDMAN

Deux cycles de dégradation de EDMAN, en couplage avec la dansylation ont permis d'établir la séquence du peptide Th-4S-18, le résidu d'arginine étant placé par différence.

- Peptide Th-4S-19

Thr - Ala - Arg - Lys

Ce peptide est purifié par électrophorèse préparative sur papier.

a) Composition en acides aminés

Thr	Ala	Lys	Arg
0,85 (1)	1,00 (1)	1,01 (1)	1,01 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Thr

La séquence complète du peptide Th-4S-19 est déduite des études structurales réalisées sur le peptide Th-4S-15 Ala-Thr-Ala-Arg-Lys.



- Peptide Th-4S-20

Ala - Val - Arg - Arg - Ser

Ce peptide est caractérisé par la présence d'un résidu de valine, acide aminé marqueur de la partie COOH-terminale (résidus 112 à 185) de l'histone H<sub>5</sub>.

a) Composition en acides aminés

Ser , Ala , Val , Arg  
1,00 (1) 1,02 (1) 0,83 (1) 2,14 (2)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Ala

c) Dégradation de EDMAN

Quatre cycles de dégradation de EDMAN utilisée en méthode soustractive ont permis d'établir la séquence du peptide Th-4S-20, le résidu de sérine se plaçant par différence.

	Ser ,	Ala ,	Val ,	Arg
<u>Composition :</u>	1,00	1,02	0,83	2,14
2ème cycle	0,97	-	<u>0</u>	2,03
3ème cycle	0,82	-	-	<u>1,18</u>
4ème cycle	1,00	-	-	<u>0</u>

- Peptide Th-4S-21

Val - Lys - Arg

Ce peptide se caractérise par un résidu de valine, acide aminé marqueur de la partie COOH-terminale (résidus 112 à 185) de l'histone H<sub>5</sub>.

a) Composition en acides aminés

Val , Lys , Arg  
0,80 (1) 1,04 (1) 1,17 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Val

c) Dégradation de EDMAN

Un cycle de dégradation de EDMAN associée à la dansylation a permis d'établir la séquence du peptide Th-4S-21, le résidu d'arginine se plaçant par différence.

- Peptide Th-4S-22

Ala - Arg - Lys

a) Composition en acides aminés

Ala	,	Lys	,	Arg
0,80 (1)		1,07 (1)		1,13 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Ala

c) Dégradation de EDMAN

Un cycle de dégradation de EDMAN associée à la dansylation a permis d'établir la séquence du peptide Th-4S-22, le résidu d'arginine se plaçant par différence.

- Peptide Th-4S-23

Val - Arg - Arg - Ser

a) Composition en acides aminés

Ser	,	Val	,	Arg
1,09 (1)		0,90 (1)		2,00 (2)

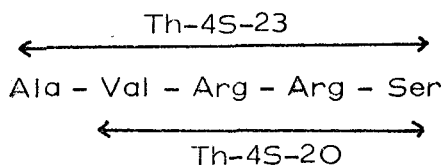
b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Val

c) Dégradation de EDMAN

Deux cycles de dégradation de EDMAN associée à la dansylation ont permis d'établir la séquence du peptide Th-4S-23, le résidu de sérine se plaçant par différence.

Ce peptide recouvre la partie COOH-terminale du peptide Th-4S-20 suivant le schéma :



Fraction 5S : La fraction 5S, hétérogène en carte peptidique, a été fractionnée sur une colonne de Chromobeads P.

Le diagramme d'élution est présenté dans la figure 12. La composition et la séquence en acides aminés de ces peptides sont respectivement présentées dans les tableaux XIX et XX.

- Peptide Th-5S-1

Ala - Thr

a) Composition en acides aminés

Thr	,	Ala
1,02 (1)		1,00 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Ala

La séquence de ce peptide est évidente.

- Peptide Th-5S-2 (résidus 78 et 79)

Ala - Gly

a) Composition en acides aminés

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

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Ala

La séquence de ce peptide est évidente.

SEPARATION DES PEPTIDES THERMOLYTIQUES DE LA FRACTION 5S SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P.

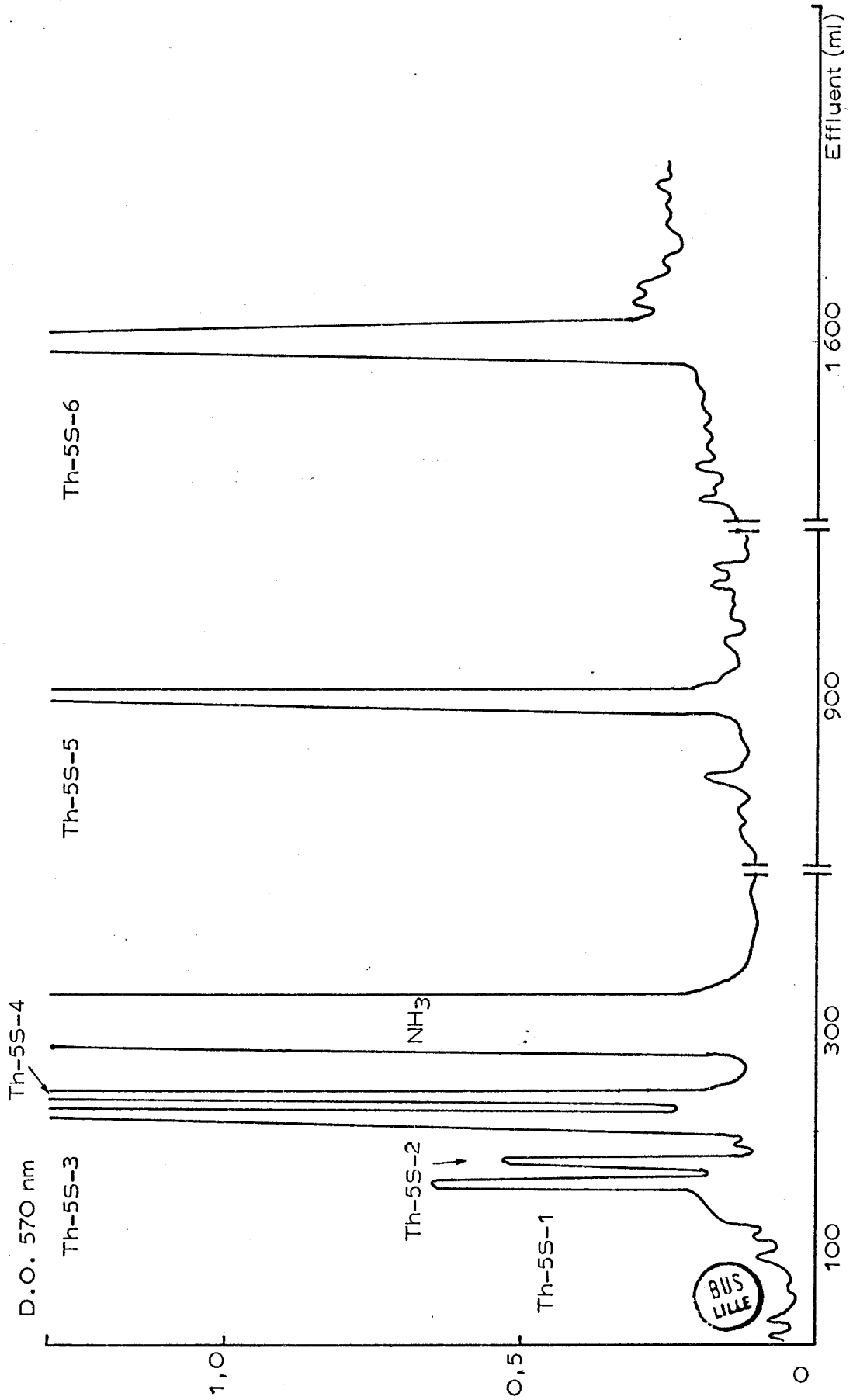


Figure 12

TABLEAU XIX

COMPOSITIONS EN ACIDES AMINÉS DES PEPTIDES THERMOLYSIQUES DE LA FRACTION 5S

(exprimées en rapports molaires) (\*)

Acides aminés	Th-5S-1	Th-5S-2	Th-5S-3-A	Th-5S-3-B	Th-5S-4	Th-5S-5	Th-5S-6
Acide aspartique							
Thréonine	1,02 (1)						
Sérine			1,00 (1)	0,90 (1)		0,95 (1)	
Acide glutamique					1,06 (1)		
Proline							
Glycine		1,00 (1)	0,93 (1)				
Alanine	1,00 (1)	1,00 (1)					
Valine							
Isoleucine							
Leucine				1,1 (1)	0,93 (1)		
Tyrosine							
Phénylalanine							1,06 (1)
Histidine							
Lysine							
Arginine						1,05 (1)	0,94 (1)
Nombre de résidus	2	2	2	2	2	2	2

(\*) Le chiffre entre parenthèses indique le nombre de résidus arrondi à l'unité.

TABLEAU XX

SEQUENCES EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES THERMOLYSIQUES DE LA FRACTION 5S

Th-5S-1	(*) $\overline{\text{Ala}} - \text{Thr}$
Th-5S-2 (résidus 78 et 79)	$\overline{\text{Ala}} - \text{Gly}$
Th-5S-3-A	$\overline{\text{Ser}} - \text{Gly}$
Th-5S-3-B (résidus 70 et 71)	$\overline{\text{Leu}} - \text{Ser}$
Th-5S-4 (résidus 66 et 67)	$\overline{\text{Leu}} - \overrightarrow{\text{Gln}}$
Th-5S-5	$\overline{\text{Ser}} - \text{Arg}$
Th-5S-6 (résidus 93 et 94)	$\overline{\text{Phe}} - \text{Arg}$

(\*) La signification des signes placés au-dessus des résidus d'acides aminés est présentée dans le tableau IX p. 41.



- Peptide Th-5S-3-A

Ser - Gly

a) Composition en acides aminés

Ser	,	Gly
1,00 (1)		0,93 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Ser

La séquence de ce peptide est évidente.

- Peptide Th-5S-3-B

Leu - Ser

a) Composition en acides aminés

Ser	,	Leu
0,90 (1)		1,1 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Leu

La séquence de ce peptide est évidente.

- Peptide Th-5S-4 (résidus 66 et 67)

Leu - Gln

a) Composition en acides aminés

Glu	,	Leu
0,94 (1)		1,06 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Leu

La séquence de ce peptide est évidente.

Ce peptide, identifié dans la fraction 45, a déjà été séquencé. La présence d'un même peptide dans deux fractions adjacentes n'est cependant pas étonnante.

- Peptide Th-5S-5

Ser - Arg

a) Composition en acides aminés

Ser	,	Arg
0,95 (1)		1,05 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Ser

La séquence de ce peptide est évidente.

- Peptide Th-5S-6 (résidus 93 et 94)

Phe - Arg

Ce peptide contient l'unique résidu de phénylalanine de l'histone H<sub>5</sub>.

a) Composition en acides aminés

Phe	,	Arg
0,96 (1)		1,04 (1)

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Phe

La séquence de ce peptide est évidente.

La fraction 5S est constituée uniquement de dipeptides provenant essentiellement de la partie NH<sub>2</sub>-terminale du fragment NB-4 où sont localisés la plupart des résidus hydrophobes Val, Ile, Leu et Phe.



Discussion : La composition en acides aminés du fragment NB-4 de l'histone H<sub>5</sub> indique 36 sites potentiels majeurs susceptibles à l'action de la thermolysine : Thr, Ala, Val, Ile, Leu, Phe. Nous avons identifié 43 peptides dans l'hydrolysat thermolysique du fragment NB-4. Parmi ces peptides, nous en avons obtenus plusieurs avec un résidu de sérine en position NH<sub>2</sub>-terminale bien que cet acide aminé n'ait pas un caractère hydrophobe. Certains de ces peptides sont obtenus à des rendements relativement élevés comme Th-3S-1, Th-3S-6, Th-4S-19, d'autres à des rendements faibles, Th-4S-13, Th-4S-14, Th-4S-18, Th-5S-3-A.

L'intérêt de limiter à 2 heures le temps d'hydrolyse du fragment NB-4 par la thermolysine réside dans l'obtention de gros peptides : peptide Th-1S (17 résidus) et peptide Th-2S-CMC-1 (11 résidus). Toutefois, certaines liaisons ne sont que partiellement hydrolysées et il en résulte un nombre plus élevé de peptides.

L'étude des peptides thermolysiques montre que l'action de l'enzyme est limitée par la présence du résidu de proline dans l'environnement du site d'hydrolyse. Exemple : peptide Th-2S-CMC-1.

Des acides aminés libres, alanine, valine, leucine, sont également présents dans l'hydrolysat et proviennent vraisemblablement de coupures au niveau de la séquence : Leu-Leu-Ala-Ala et Val-Leu.

75                      78      80    81

La région NH<sub>2</sub>-terminale du fragment NB-4 (résidus 59 à 111) est recouverte par les peptides thermolysiques à l'exception du peptide Ile-Arg-Arg qui n'a pas été retrouvé.

71            73

Enfin, les peptides thermolysiques de la partie COOH-terminale (résidus 112 à 185) de l'histone H<sub>5</sub> sont des peptides relativement longs (4 à 11 résidus). Ils présentent un intérêt majeur pour les recouvrements qu'ils offrent notamment avec les peptides tryptiques, recouvrements nécessaires à la détermination de la séquence en acides aminés de cette région très basique de la protéine.

C. - HYDROLYSE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> PAR L'ACIDE ACETIQUE 0,25 N

---

I - HYDROLYSE DE 6 HEURES DE L'HISTONE H<sub>5</sub> PAR L'ACIDE ACETIQUE 0,25 N

1) Fractionnement sur Sephadex G. 50 F

Le diagramme de fractionnement sur Sephadex G. 50 F de l'hydrolysate acétique (2,5  $\mu$ moles) de 6 heures de l'histone H<sub>5</sub> est présenté dans la figure 13. 5 fractions peptidiques ont été obtenues : 1S, 2S, 3S, 4S, 5S.

Les gels de polyacrylamide réalisés par les 4 premières fractions sont représentés dans la figure 13.

Fractions 1S et 2S : Les 2 fractions qui apparaissent complexes en gel de polyacrylamide n'ont pu être étudiées de façon satisfaisante.

Fraction 3S : La fraction 3S renferme 2 peptides majeurs qui sont séparés par chromatographie de gel filtration sur colonne de Biogel P 60 (200 x 2,5 cm) dans les conditions décrites précédemment. Le diagramme d'éluion est présenté dans la figure 14.

Les sous-fractions 3S-1 et 3S-2 sont soumises à une électrophorèse en gel de polyacrylamide selon la méthode de PANYIM et CHALKLEY. Les gels obtenus sont représentés dans la figure 14.

- Peptide 3S-1

a) Composition en acides aminés

Le peptide 3S-1 dont la composition est présentée dans le tableau XXI renferme 99 résidus d'acides aminés au nombre desquels on trouve le résidu de méthionine, tous les résidus aromatiques et deux des trois résidus d'acide aspartique présents dans l'histone H<sub>5</sub>. Cette composition est caractéristique de la moitié NH<sub>2</sub>-terminale de la protéine.

GELS (migration 3 heures)

- Le premier gel correspond à l'hydrolysate total
- Le gel 1 correspond à la fraction 1S
- Le gel 2                   "                   2S
- Le gel 3                   "                   3S
- Le gel 4                   "                   4S

Figure 13

CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION SUR SEPHADEX G. 50 F.  
DES PEPTIDES OBTENUS PAR HYDROLYSE DE 6 HEURES  
DE L'HISTONE H<sub>5</sub> AVEC L'ACIDE ACETIQUE 0,25 N

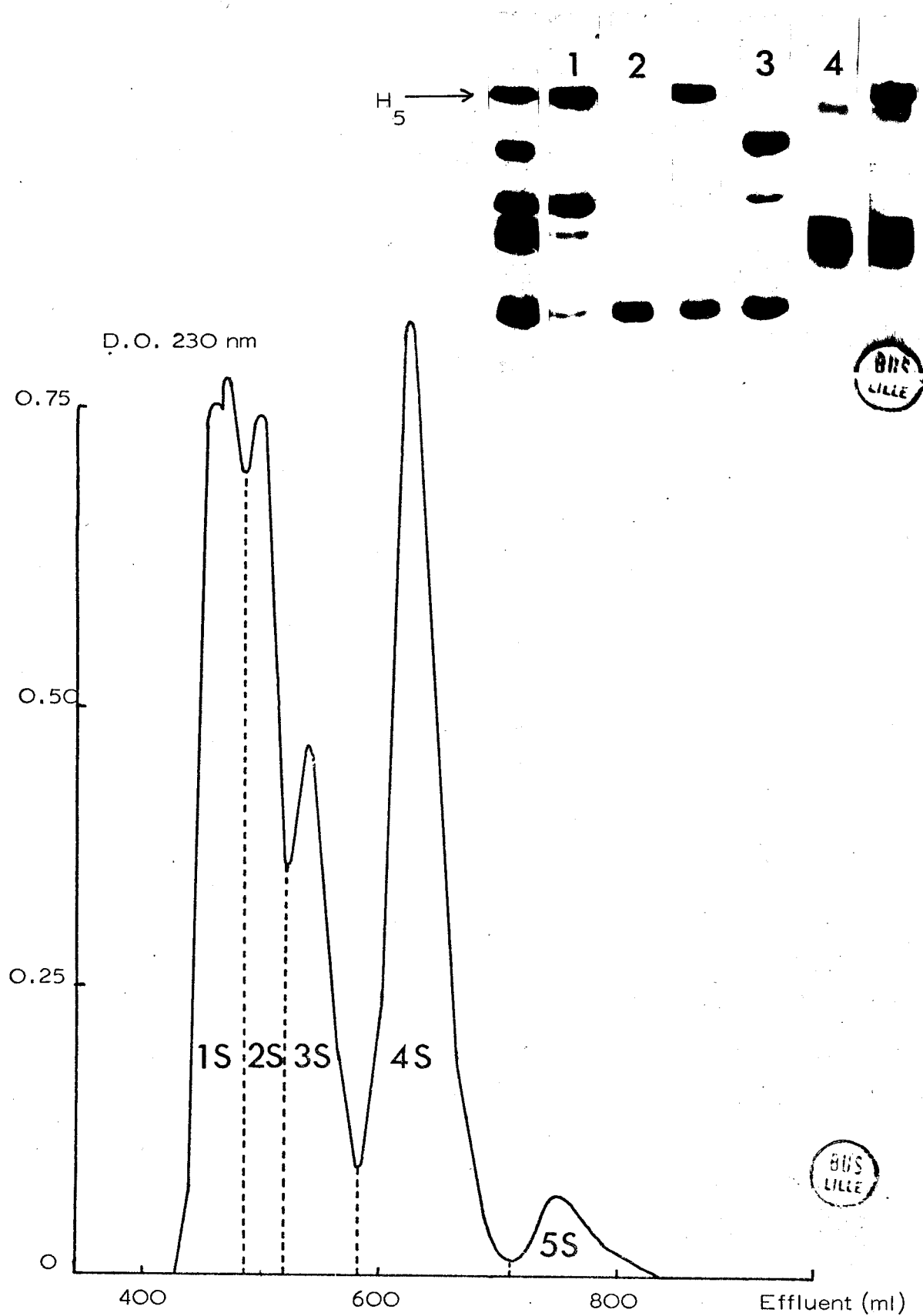


Figure 14

RECHROMATOGRAPHIE DE LA FRACTION 3S SUR BIOGEL P. 60

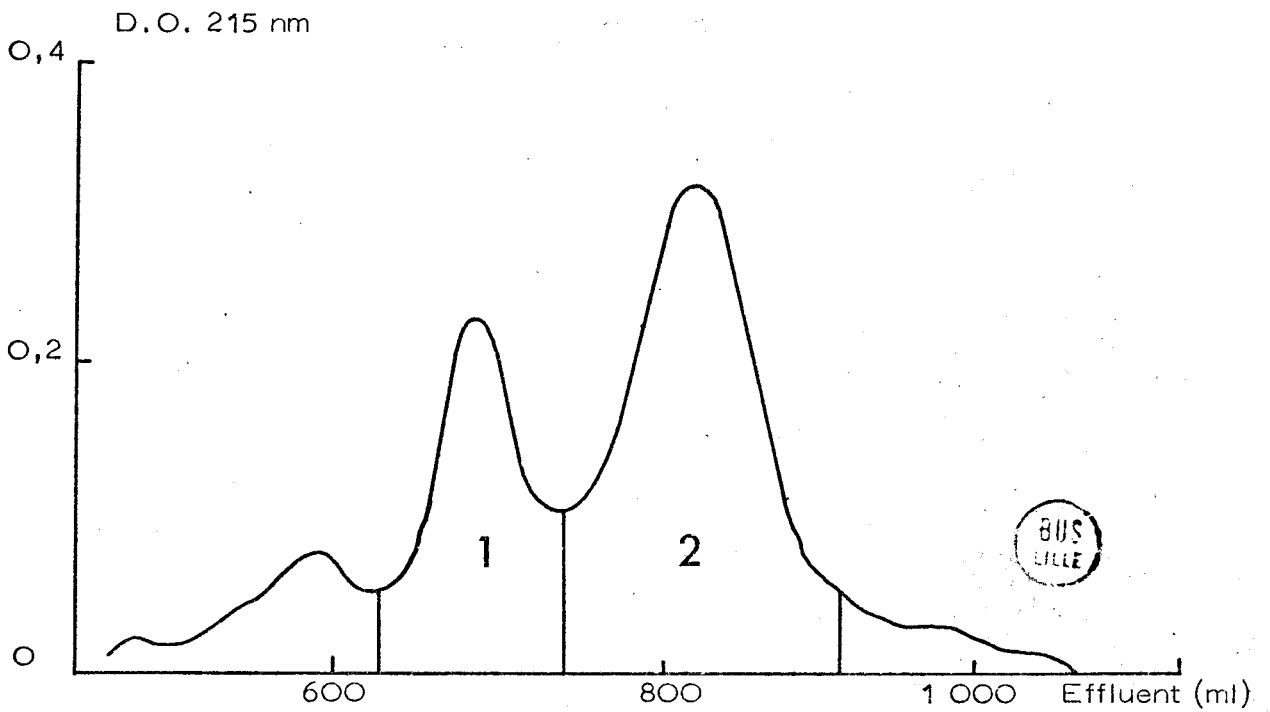



TABLEAU XXI

COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES OBTENUS PAR FRACTIONNEMENT SUR SEPHADEX G. 50 F  
D'UN HYDROLYSAT ACETIQUE DE 6 HEURES DE L'HISTONE H<sub>5</sub>

(exprimées en rapports molaires) (\*)

Acides aminés	Peptide 3S-1 résidus 1 à 99		Peptide 3S-2		Peptide 4S résidus 1 à 65		Peptide 5S résidus 66 à 99	
ACIDE ASPARTIQUE	2,51	(3)	0,97	(1)	1,75	(2)	0,71	(1)
Thréonine	2,92	(3)	2,90	(3)	1,84	(2)	1,02	(1)
Sérine	13,19	(15)**	9,84	(10)	10,23	(11)	4,14	(4)
Acide glutamique	6,38	(7)	1,70	(2)	5,33	(5)	2,07	(2)
Proline	4,58	(4)	7,55	(8)	4,30	(4)	-	-
Glycine	6,61	(7)	3,21	(3)	3,35	(3)	3,63	(4)
Alanine	13,00	(13)	13,84	(14)	9,50	(9)	4,23	(4)
Valine	4,59	(5)	3,00	(3)	3,14	(3)	1,84	(2)
METHIONINE	0,79	(1)	-	-	1,02	(1)	-	-
Isoleucine	6,00	(6)	-	-	4,05	(4)	1,81	(2)
Leucine	7,14	(8)	1,34	(1)	2,19	(2)	5,11	(5)
TYROSINE	2,50	(3)	-	-	2,95	(3)	-	-
PHENYLALANINE	0,82	(1)	-	-	-	-	0,58	(1)
HISTIDINE	2,51	(3)	-	-	2,76	(3)	-	-
Lysine	13,74	(11)**	27,25	(27)	7,00	(7)	4,18	(4)
Arginine	9,00	(9)	11,10	(11)	5,98	(6)	3,00	(3)
 Nombre de résidus	99				65		34	

\* Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de résidus arrondi à l'unité.

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

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Thr

La tache de DNS - Thr est d'intensité faible car le résidu de thréonine est partiellement acétylé, (EDWARDS et HNILICA, 1968).

c) Hydrolyse par la carboxypeptidase C

L'hydrolyse du peptide 3S-1 par la carboxypeptidase C pendant 4 heures libère de la sérine, de la lysine, de l'alanine, de la leucine mais également de l'acide aspartique car son énucléation n'est pas totale.

La nature des acides aminés libérés est caractéristique de la séquence Leu-Ala-Lys-Ser-Asp qui constitue la partie NH<sub>2</sub>-terminale du peptide thermolysique 1S (p. 55 ).

95	99
----	----

L'ensemble de ces résultats définit sans ambiguïté le peptide NH<sub>2</sub>-terminal Ac-1a (résidus 1 à 99) de l'histone H<sub>5</sub> (tableau XXII).

- Peptide 3S-2

Le peptide 3S-2 dont la composition est présentée dans le tableau XXI semble appartenir, en raison de sa richesse en lysine et arginine à la partie COOH-terminale de la molécule. Nous n'avons pu le définir avec certitude étant donnée la faible quantité de produit disponible. Il existe des contaminations de leucine, d'acide glutamique et de lysine dans cette composition en acides aminés.

Fraction 4S : Cette fraction qui apparaît hétérogène en carte peptidique est purifiée par chromatographie préparative sur papier dans le solvant Butanol/ Pyridine/ Acide acétique/ Eau.

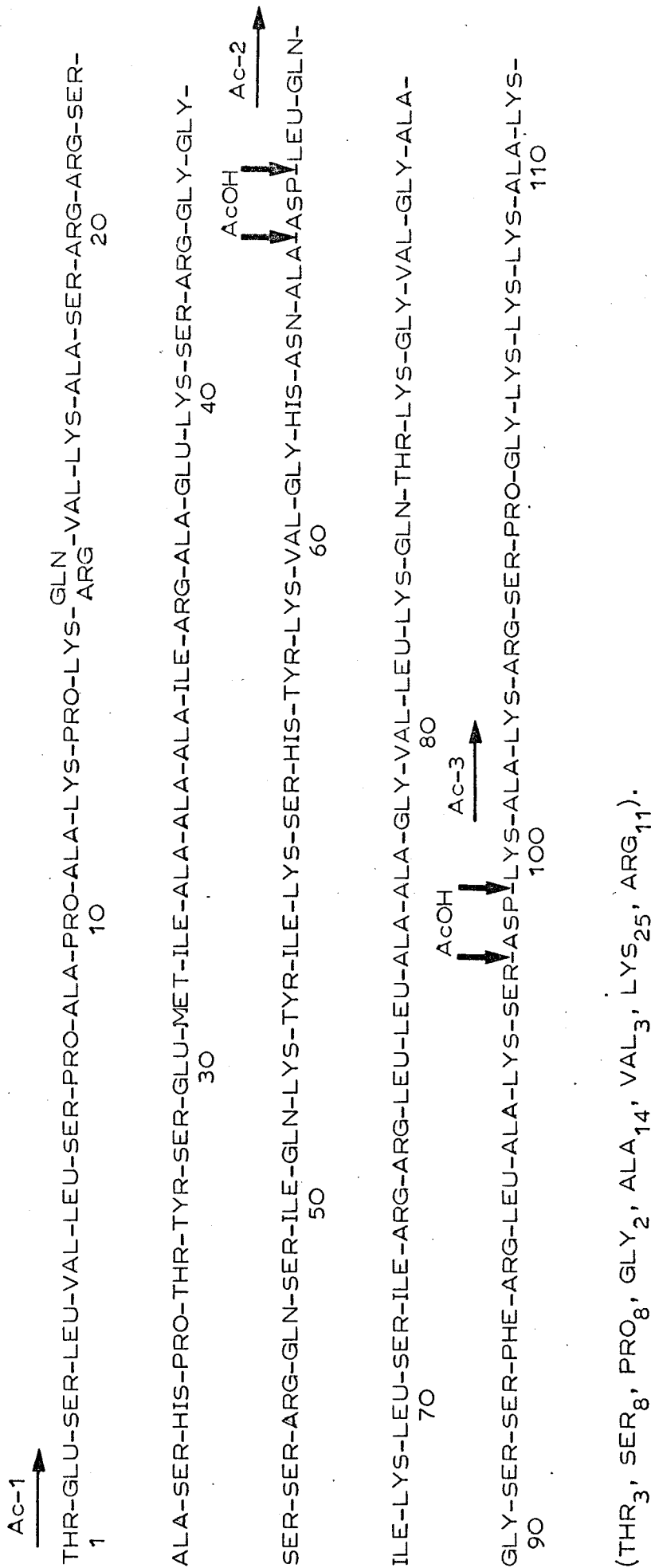
a) Composition en acides aminés

Le peptide 4S, dont la composition est présentée dans le tableau XXI est constitué de 65 résidus d'acides aminés parmi lesquels on note le résidu de méthionine, les trois résidus de tyrosine et les trois résidus d'histidine présents dans l'histone H<sub>5</sub>.



TABEAU XXII

SEQUENCE EN ACIDES AMINES DE LA PARTIE NH<sub>2</sub>-TERMINALE DE L'HISTONE H<sub>5</sub>



b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Thr

L'intensité faible de la tache de DNS - Thr s'explique par l'acétylation partielle du résidu de thréonine.

c) Hydrolyse par la carboxypeptidase C

L'hydrolyse du peptide pendant 4 heures libère un résidu d'alanine mais également un peu d'aspartique car son énucléation n'est pas totale. La séquence de la partie COOH-terminale du peptide 4S peut s'écrire : Ala - Asp.

L'ensemble de ces caractéristiques définit le peptide NH<sub>2</sub>-terminal Ac-1 (résidus 1 à 65) de l'histone H<sub>5</sub>.

Les deux bandes apparaissant sur le gel de ce peptide mettent en évidence la microhétérogénéité de l'histone H<sub>5</sub> en position 15. Ces deux bandes n'ont pas été observées pour le peptide Ac-1a (résidus 1 à 99).

Fraction 5S : La fraction 5S apparaît constituée d'un seul peptide en carte peptidique.

a) Composition en acides aminés

La composition en acides aminés de ce peptide apparaît dans le tableau XXI.

Le peptide est constitué de 33 résidus d'acides aminés parmi lesquels on note surtout l'unique résidu de phénylalanine présent dans l'histone H<sub>5</sub>.

b) Dégradation de EDMAN

5 cycles de dégradation de EDMAN ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale :

Leu - Gln - Ile - Lys - Leu

### c) Hydrolyse par la carboxypeptidase C

L'action de l'enzyme pendant 4 heures libère de la sérine, de la lysine, de l'alanine mais également un peu d'acide aspartique car son énucléation n'est pas totale.

La séquence COOH-terminale du peptide 5S en analogie avec celle du peptide Ac-1a peut s'écrire : Ala - Lys - Ser - Asp.

L'ensemble de ces caractéristiques définit le peptide Ac-2 (résidus 66 à 99).

Ce fractionnement sur Sephadex G. 50 F ne permettant pas d'obtenir tous les peptides après coupure par l'acide acétique, nous nous sommes intéressés au fractionnement sur Biogel P. 60 en milieu acide chlorhydrique 0,01 N.

### 2) Fractionnement sur Biogel P. 60

L'hydrolysate de 10 umoles est déposé en 3 fois sur une colonne de Biogel P. 60 (200 x 2,5 cm) équilibrée et éluée par l'acide chlorhydrique 0,01 N. Le diagramme d'éluion est présenté dans la figure 15 .

Les fractions correspondant à chaque pic du diagramme d'éluion sont alors rassemblées et hyophilisées.

La photographie des gels obtenus est présentée dans la figure 15 .

Fraction 1B : La fraction 1B en gel de polyacrylamide apparaît constituée de 2 peptides, l'un correspondant à l'histone H<sub>5</sub> non coupée par l'acide acétique 0,25 N, l'autre à une contamination de la fraction 2B.

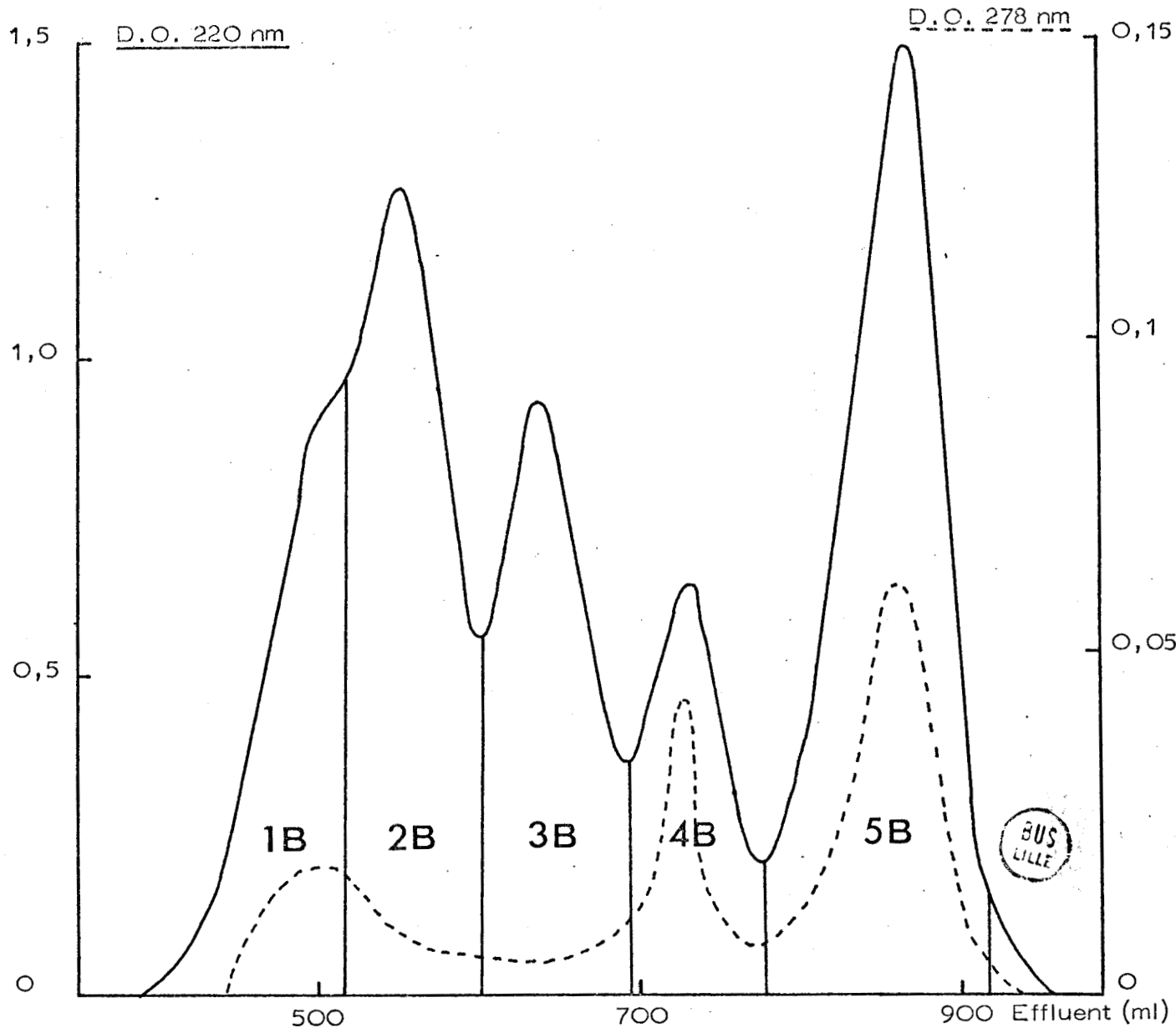
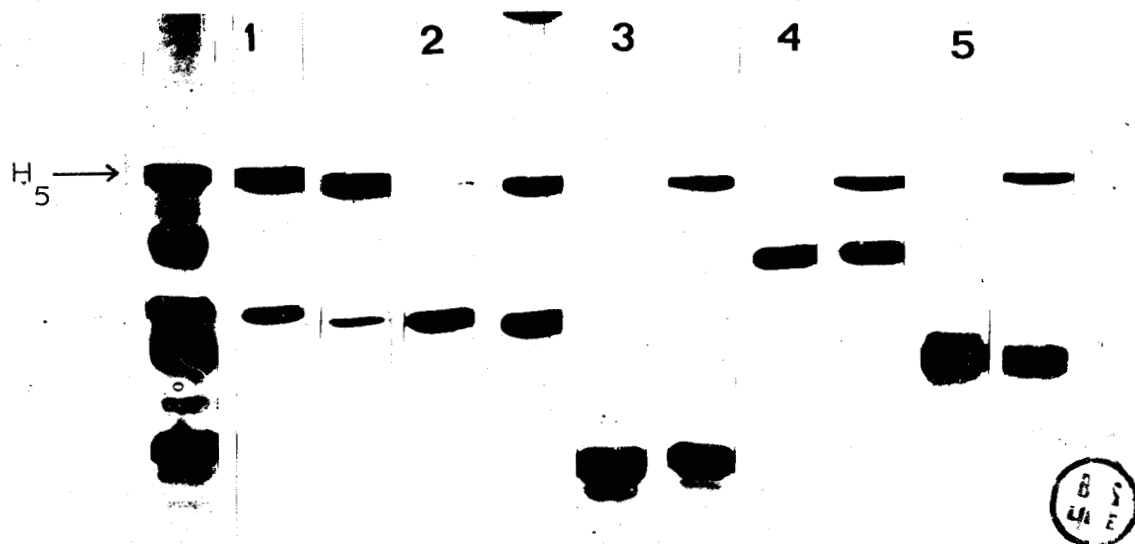
Fraction 2B : La fraction 2B apparaît constituée d'une fraction majeure légèrement contaminée par l'histone H<sub>5</sub> et par le peptide de la fraction 3B.

GELS (migration 3 heures)

- Le premier gel correspond à l'hydrolysate total
- Le gel 1 correspond à la fraction 1B
- Le gel 2 " 2B
- Le gel 3 " 3B
- Le gel 4 " 4B
- Le gel 5 " 5B

Figure 15

CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION SUR BIOGEL P. 60  
DES PEPTIDES OBTENUS PAR HYDROLYSE DE 6 HEURES  
DE L'HISTONE H<sub>5</sub> AVEC L'ACIDE ACETIQUE 0,25 N



Le peptide 2B est alors purifié par chromatographie de gel filtration sur une colonne de Biogel P. 60 (200 x 2,5 cm).

Le diagramme d'éluion et les gels de polyacrylamide obtenus sont représentés dans la figure 16 .

a) Composition en acides aminés

Le peptide 2B dont la composition en acides aminés est présentée dans le tableau XXIII , est caractérisé par la présence d'un résidu de phénylalanine à l'exclusion de tout autre résidu aromatique. Il renferme en outre, deux résidus d'acide aspartique et un nombre élevé de résidus d'arginine et de lysine.

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Leu

c) Hydrolyse par les carboxypeptidases A et B

La cinétique réalisée pendant 6 heures est présentée dans le tableau XXIV. . Elle permet d'établir la séquence COOH-terminale :

(Ala, Lys) - Arg - Lys - Lys

L'ensemble de ces résultats nous permet d'affirmer que le peptide 2B correspond à la partie COOH-terminale de l'histone H<sub>5</sub> (résidus 66 à 185). Ce peptide apparaîtra dans la suite de notre exposé comme peptide Ac-2a.

Fraction 3B : La fraction 3B apparaît constituée d'une fraction très basique mais contaminée très légèrement par la fraction 2B.

Le peptide 3B est alors purifié par chromatographie de gel filtration sur Biogel P. 60 (200 x 2,5 cm). Le diagramme d'éluion et le gel de polyacrylamide obtenus sont représentés dans la figure 16 .

Fraction 2B

- avant purification

migration 3 h. | gel 1 : contamination de la fraction 2B  
par l'histone H<sub>5</sub> (c) et par le  
peptide de la fraction 3B (c')  
gel 2

- après purification

migration 4 h. | gel 3  
gel 4

Fraction 3B

- avant purification

migration 3 h. | gel 1 : contamination de la fraction 3B par le  
peptide de la fraction 2B (c)  
gel 2

- après purification

migration 3 h. | gel 3  
gel 4

PURIFICATIONS DES FRACTIONS 2B et 3B PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COLONNE DE BIOGEL P. 60

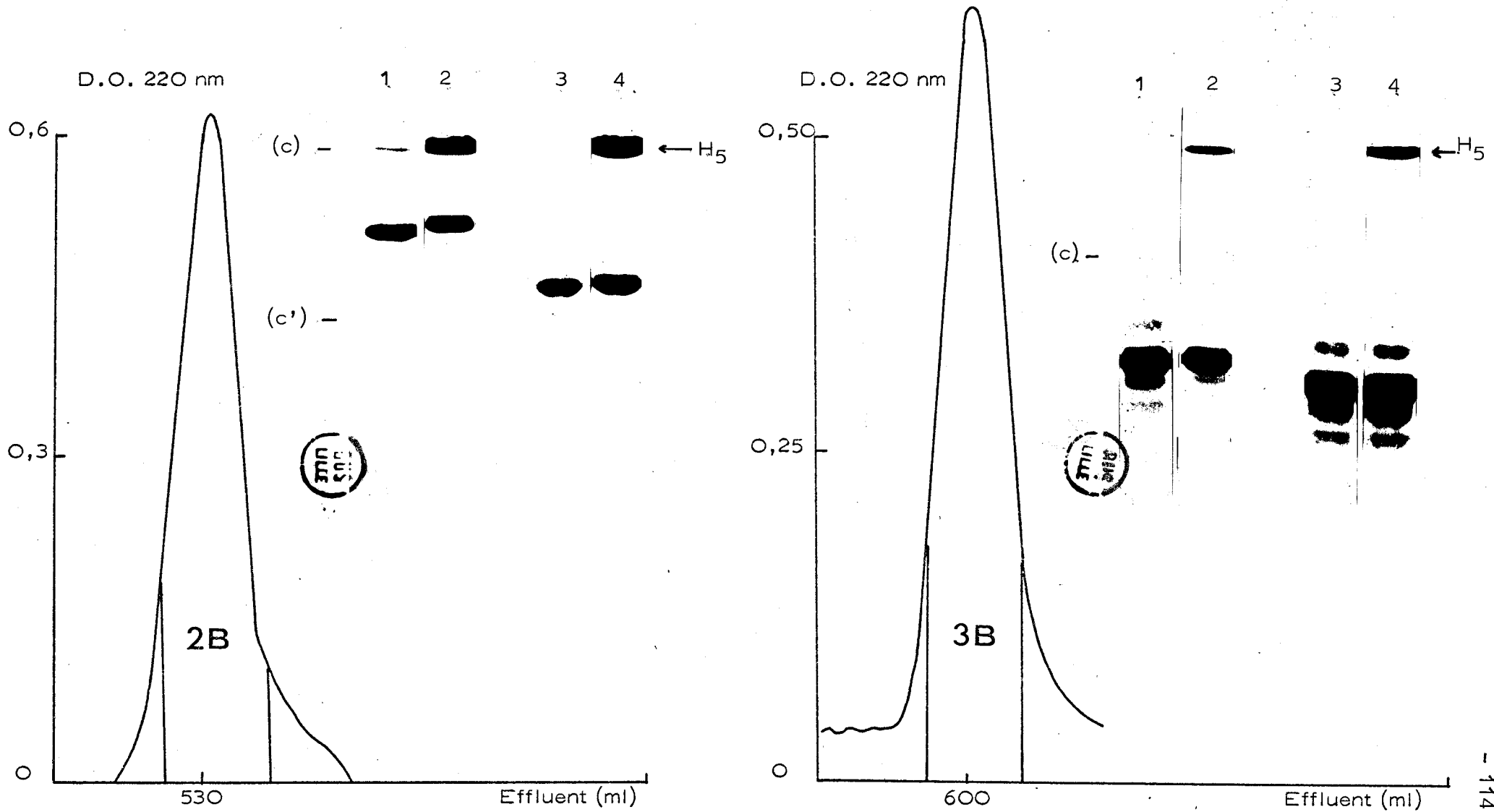


Figure 16



TABLEAU XXIII

COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES OBTENUS PAR FRACTIONNEMENT SUR BIOGEL P. 60

D'UN HYDROLYSAT ACETIQUE DE 6 HEURES DE L'HISTONE H<sub>5</sub>  
(exprimées en rapports molaires) (\*)

Acides aminés	Peptide 2B résidus 66 à 185		Peptide 3B résidus 100 à 185		Peptide 4B (**) résidus 1 à 99		Peptide 5B résidus 1 à 65	
ACIDE ASPARTIQUE	1,39	(1)	-	-	2,82	(3)	1,76	(2)
Thréonine	4,12	(4)	2,99	(3)	2,96	(3)	1,93	(2)
Sérine	14,48	(14)	10,18	(10)	12,59	(15)	10,14	(11)
Acide glutamique	3,07	(3)	-	-	6,13	(7)	5,40	(5)
Proline	9,0	(9)	9,03	(9)	4,70	(4)	4,26	(4)
Glycine	6,91	(7)	2,59	(2)	6,32	(7)	3,36	(3)
Alanine	20,0	(20)	15,95	(16)	13,12	(13)	9,16	(9)
Valine	4,98	(5)	3,00	(3)	4,52	(5)	3,04	(3)
METHIONINE	-	-	-	-	1,02	(1)	1,05	(1)
Isoleucine	2,24	(2)	-	-	4,84	(6)	3,76	(4)
Leucine	5,87	(6)	-	-	6,63	(8)	2,16	(2)
TYROSINE	-	-	-	-	2,91	(3)	2,59	(3)
PHENYLALANINE	0,82	(1)	-	-	1,30	(1)	-	-
HISTIDINE	-	-	-	-	2,96	(3)	2,91	(3)
Lysine	34,36	(34)	30,54	(31)	15,3	(11)	7,43	(7)
Arginine	15	(15)	12,15	(12)	10,14	(9)	6,05	(6)
Nombre de résidus	121		86		99		65	

(\*) Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de résidus arrondi à l'unité.

(\*\*) Ce peptide est rechromatographié sur Biogel P. 60.

BIB  
LILLE

TABLEAU XXIV

## ETUDE DE L'EXTREMITE COOH-TERMINALE DU PEPTIDE Ac-2a (résidus 66 à 185)

Acides aminés libérés	Carboxypeptidase B 2 heures		Carboxypeptidase B 4 heures Carboxypeptidase A 2 heures		Carboxypeptidase B 6 heures Carboxypeptidase A 4 heures	
	Lysine	107,36	(2,15)	137,13	(2,74)	167,24
Arginine	28,71	(0,57)	50,18	(1,00)	70,47	(1,41)
Alanine	13,66	(0,27)	31,14	(0,62)	45,94	(0,92)

## ETUDE DE L'EXTREMITE COOH-TERMINALE DU PEPTIDE Ac-3 (résidus 100 à 185)

Acides aminés libérés	Carboxypeptidase B 2 heures		Carboxypeptidase B 4 heures Carboxypeptidase A 2 heures		Carboxypeptidase B 6 heures Carboxypeptidase A 4 heures	
	Lysine	82,19	(2,05)	115,44	(2,89)	123,58
Arginine	22,59	(0,56)	43,35	(1,08)	51,85	(1,29)
Alanine	6,85	(0,17)	23,82	(0,60)	33,88	(0,85)

Les résultats sont exprimés en nanomoles de résidus libérés.

Les chiffres entre parenthèses correspondent au nombre de résidus effectivement libérés.



a) Composition en acides aminés

La composition en acides aminés de ce peptide apparaît dans le tableauXXIII. Le peptide 3S est constitué de 86 résidus d'acides aminés parmi lesquels on note trois résidus de thréonine, deux résidus de glycine, trois résidus de valine. Ce peptide, riche en acides aminés basiques, ne contient aucun résidu d'acides aminés aromatiques.

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

di DNS - Lys

c) Hydrolyse par les carboxypeptidases A et B

La cinétique réalisée pendant 6 heures donne la séquence COOH-terminale :

(Ala, Lys) - Arg - Lys - Lys.

Les différents résultats obtenus sont présentés dans le tableauXXIV.

Ces résultats caractérisent le peptide COOH-terminal Ac-3 de l'histone H<sub>5</sub> (résidus 100 à 185).

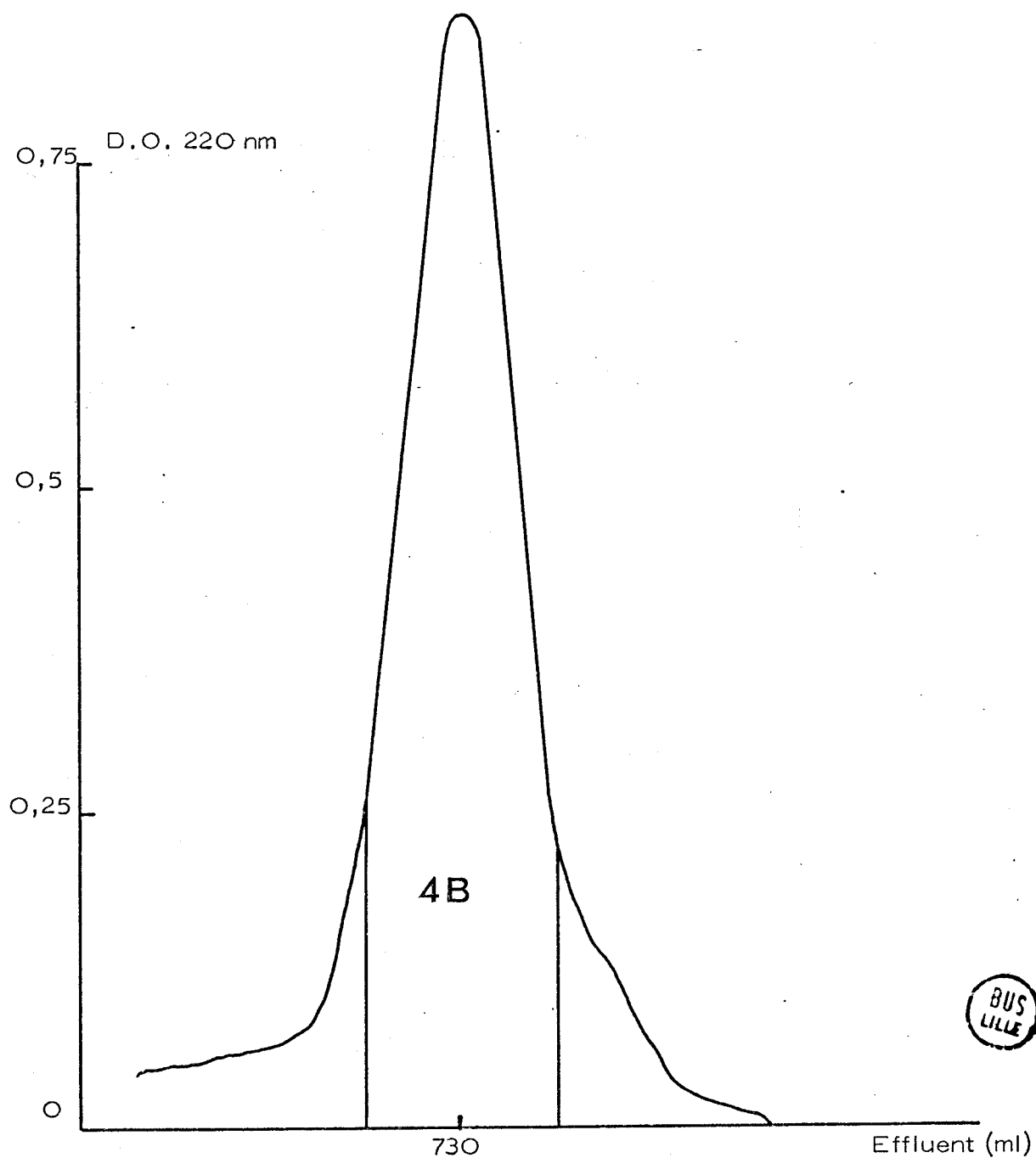
Fraction 4B : La fraction 4B apparaît homogène en gel de polyacrylamide. La composition en acides aminés de ce peptide 4B, donnée dans le tableauXXIII est caractérisée par l'unique résidu de méthionine et de l'unique résidu de phénylalanine, des trois résidus de tyrosine et des trois résidus d'histidine de l'histone H<sub>5</sub>.

Une contamination au niveau de la lysine nécessite une purification sur une colonne de Biogel P. 60 (200 x 2,5 cm). La courbe de fractionnement obtenue est présentée dans la figure 17 .

Les caractéristiques de la composition en acides aminés de ce peptide correspondent à celles du peptide NH<sub>2</sub>-terminal Ac-1a (résidus 1 à 99) identifié dans l'hydrolysat de 6 heures fractionné sur Sephadex G. 50 F.

Figure 17

PURIFICATION DE LA FRACTION 4B PAR CHROMATOGRAPHIE  
SUR COLONNE DE BIOGEL P. 60



Fraction 5B : La fraction 5B apparaît hétérogène en gel de polyacrylamide et en carte peptidique. Le peptide 5B est purifié par chromatographie préparative sur papier dans le solvant Butanol/ Pyridine/ Acide acétique/ Eau.

Les caractéristiques de la composition en acides aminés du peptide 5B donnée dans le tableau XXIII correspondent à celles du peptide Ac-1 (résidus 1 à 65) identifié dans l'hydrolysat de 6 heures fractionné sur Sephadex G. 50 F.

Nous voyons que le fractionnement sur Biogel P. 60 nous permet contrairement au fractionnement sur Sephadex G. 50 F d'obtenir la plupart des peptides de l'histone H<sub>5</sub> dans de meilleures conditions. Cependant, nous n'avons pu récupérer le peptide Ac-2 (résidus 66 à 99) que dans le fractionnement sur G. 50 F.

L'hydrolyse de 6 heures de l'histone H<sub>5</sub> par l'acide acétique 0,25 N nous donne tous les peptides malheureusement avec un faible rendement.

Ce rendement calculé pour le peptide COOH-terminal (résidus 100 à 185) est de 20 %. Nous avons pu remarquer que la fraction 1B était principalement constituée de l'histone H<sub>5</sub> non coupée par l'acide acétique 0,25 N. Ceci prouve que l'hydrolyse de 6 heures n'est pas suffisamment longue. Aussi, dans une troisième expérience, l'hydrolyse de la protéine par l'acide acétique 0,25 N a été effectuée pendant 12 heures.

## II - HYDROLYSE DE 12 HEURES DE L'HISTONE H<sub>5</sub> PAR L'ACIDE ACETIQUE 0,25 N

L'hydrolysate de 12 heures de l'histone H<sub>5</sub> (2,5 umoles) est déposé sur une colonne de Biogel P. 60 (200 x 2,5 cm) équilibrée et éluée par l'acide chlorhydrique 0,01 N.

Le diagramme d'éluion obtenu est présenté dans la figure 18

5 fractions peptidiques ont été obtenues : 1B, 2B, 3B, 4B, 5B.

L'analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide de chaque fraction est présentée dans la figure 18 .

Fraction 1B : Cette fraction apparaît hétérogène en électrophorèse en gel de polyacrylamide. Le peptide majeur de cette fraction est purifié par chromatographie de gel-filtration sur une colonne de Biogel P. 60. Le diagramme d'éluion et l'analyse électrophorétique sont présentés dans la figure 19 .

### a) Composition en acides aminés

La composition en acides aminés du peptide 1B apparaît dans le tableau XXV. Ce peptide renferme de nombreux résidus basiques ainsi qu'un résidu d'acide aspartique et l'unique résidu de phénylalanine présent dans la molécule d'histone H<sub>5</sub> à l'exclusion de tout autre résidu aromatique.

### b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Leu

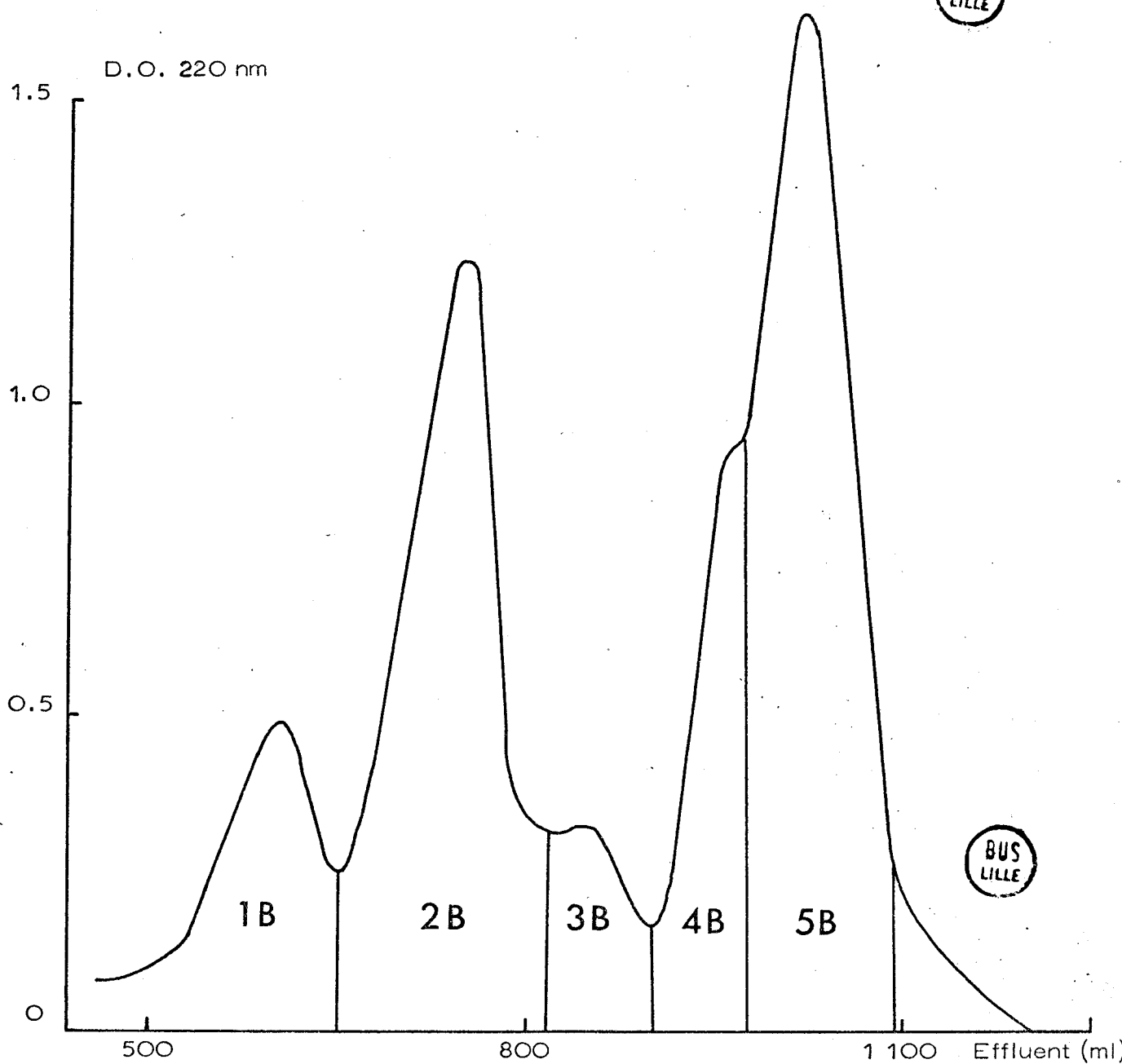
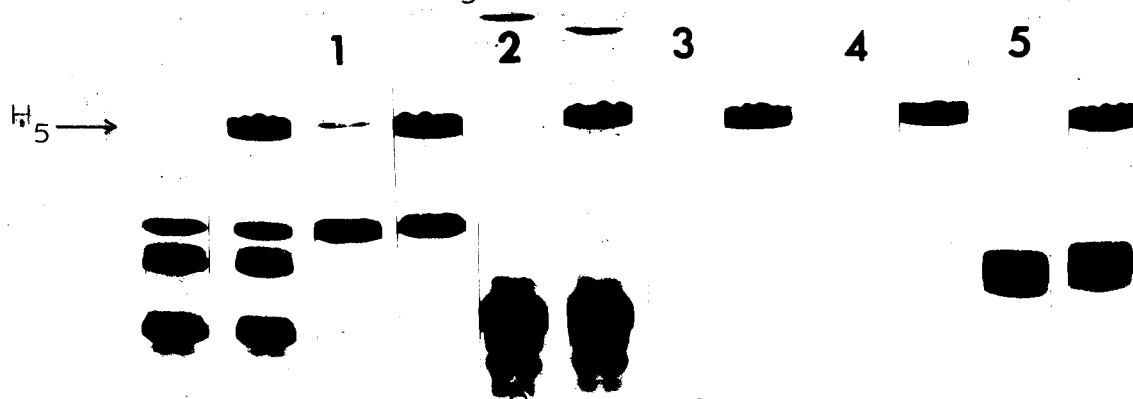
Ce peptide correspond au peptide Ac-2a isolé de la fraction 2B de l'hydrolysate de 6 heures : les compositions en acides aminés, les dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminaux et les migrations électrophorétiques sont identiques.

GELS (migration 3 heures)

- Le premier gel correspond à l'hydrolysate total
- Le gel 1 correspond à la fraction 1B
- Le gel 2 " 2B
- Le gel 3 " 3B
- Le gel 4 " 4B
- Le gel 5 " 5B

Figure 18

CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION SUR BIOGEL P. 60  
DES PEPTIDES OBTENUS PAR HYDROLYSE DE 12 HEURES  
DE L'HISTONE H<sub>5</sub> AVEC L'ACIDE ACETIQUE 0,25 N





Fraction 1B

- avant purification

migration 3 h. | gel 1 : contamination de la fraction 1B par  
l'histone H<sub>5</sub> (c) et le peptide de la  
fraction 2B<sup>5</sup> (c')  
| gel 2

- après purification (courbe hachurée)

migration 4 h. | gel 3  
| gel 4

Figure 19

RECHROMATOGRAPHIE DE LA FRACTION 1B SUR BIOGEL P. 60

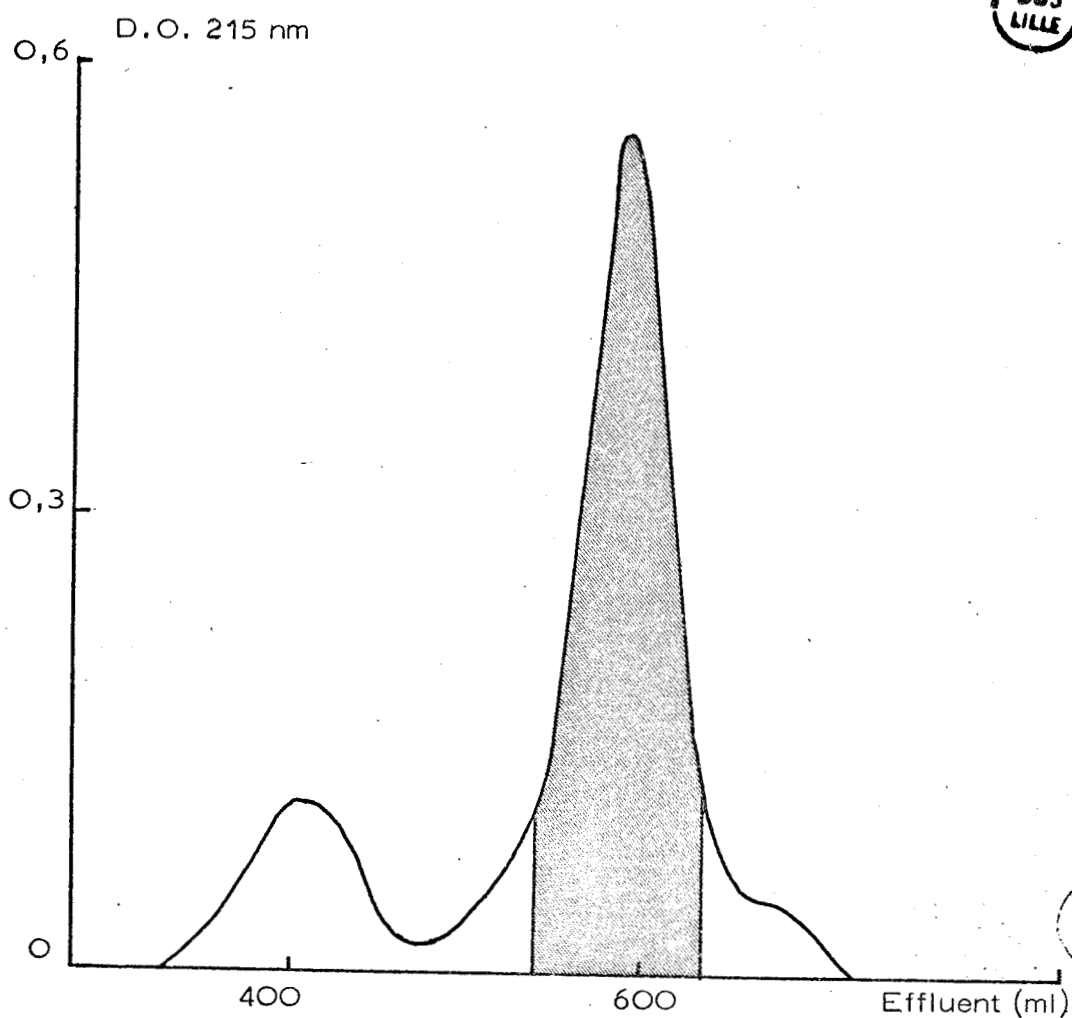
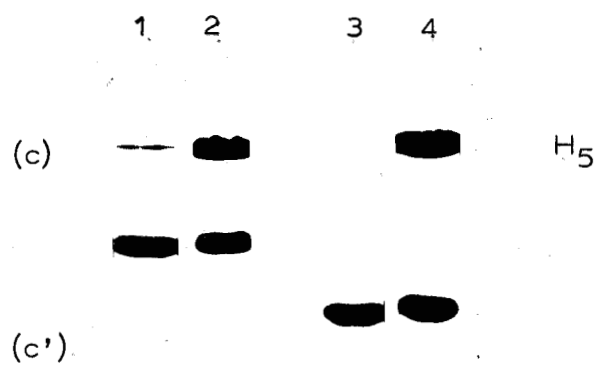


TABLEAU XXV

COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES OBTENUS PAR FRACTIONNEMENT SUR BIOGEL P. 60 D'UN HYDROLYSAT ACETIQUE DE 12 HEURES DE L'HISTONE H<sub>5</sub>  
(exprimées en rapports molaires)(\*)

Acides aminés	Peptide 1B résidus 66 à 185		Peptide 2B résidus 100 à 185		Peptide 5B résidus 1 à 65	
ACIDE ASPARTIQUE	1,50	(1)**	-	-	1,52	(2)
Thréonine	3,94	(4)	3,0	(3)	2,01	(2)
Sérine	13,54	(14)	9,75	(10)	9,14	(11)**
Acide glutamique	2,93	(3)			4,99	(5)
Proline	9,95	(10)	8,76	(9)	4,30	(4)
Glycine	6,69	(7)	2,23	(2)	3,58	(3)
Alanine	19,36	(19)	15,93	(16)	9,06	(9)
Valine	4,30	(4)	3,02	(3)	3,21	(3)
METHIONINE		-		-	0,85	(1)
Isoleucine	2,0	(2)		-	3,68	(4)
Leucine	5,80	(6)		-	2,06	(2)
TYROSINE		-		-	2,59	(3)
PHENYLALANINE	0,82	(1)		-		-
HISTIDINE		-		-	2,63	(3)
Lysine	34,18	(34)	31,04	(31)	7,56	(7)**
Arginine	14,97	(15)	12,54	(12-13)	6,36	(6)
Nombre de résidus	119		86-87		65	

(\*) Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de résidus arrondi à l'unité.

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



Ainsi donc, malgré une hydrolyse de 12 heures par l'acide acétique 0,25 N, le clivage n'est que partiel au niveau de l'acide aspartique en position 99 dans l'histone H<sub>5</sub> puisque l'on retrouve le peptide Ac-2a (résidus 66 à 185) dans l'hydrolysats.

Fraction 2B : Elle apparaît essentiellement formée d'un constituant de migration électrophorétique très cathodique.

a) Composition en acides aminés

La composition en acides aminés de ce peptide est présentée dans le tableau XXV. L'absence de résidus aromatiques et la richesse en résidus basiques sont les principales caractéristiques de ce peptide.

b) Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

diDNS - Lys

Tous ces résultats indiquent clairement que le peptide 2B de l'hydrolysats de 12 heures est le peptide COOH-terminal Ac-3 (résidus 100 à 185) de la protéine. Par sa composition en acides aminés, son dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal, sa migration électrophorétique en gel de polyacrylamide, ce peptide est identique au peptide 3B de l'hydrolysats de 6 heures de l'histone H<sub>5</sub>.

Fraction 3B : Cette fraction apparaît homogène en gel de polyacrylamide, mais l'intensité de coloration de la bande correspondante est faible. Sa migration très anodique est à comparer à celle du peptide NH<sub>2</sub>-terminal Ac-1a (résidus 1 à 99) isolé des fractionnements précédents.

La composition en acides aminés donnée dans le tableau XXVI se distingue par la présence de nombreux acides aminés hydrophobes et de tous les résidus aromatiques que contient l'histone H<sub>5</sub>. Cette composition est caractéristique du fragment NH<sub>2</sub>-terminal (résidus 1 à 99).

Mais une contamination au niveau de la lysine ne permet pas d'affirmer que la fraction 3B obtenue en faible rendement corresponde uniquement à ce fragment.

Le faible rendement obtenu peut être expliqué par une coupure plus complète au bout de 12 heures que de 6 heures au niveau du résidu d'acide aspartique en position 65. De ce fait, le peptide  $\text{NH}_2$ -terminal Ac-1a (résidus 1 à 99) disparaît au fur et à mesure que l'hydrolyse se prolonge.

Fraction 4B : Cette fraction apparaît être identique à la fraction 5B. Le contrôle électrophorétique montre que la quantité de peptide présent dans cette fraction est faible.

Fraction 5B : Cette fraction est hétérogène en carte peptidique. Le constituant majeur de cette fraction a été obtenu pur par chromatographie préparative sur papier dans le solvant Butanol/ Pyridine/ Acide acétique/Eau.

#### a) Composition en acides aminés

La composition en acides aminés du peptide 5B donnée dans le tableau XXV est caractérisée par la présence de l'unique résidu de méthionine, des trois résidus de tyrosine, des trois résidus d'histidine de la molécule.

#### b) Dansyl amino-acide $\text{NH}_2$ -terminal

DNS - Thr

Les caractéristiques de ce peptide, composition en acides aminés, dansylamino-acide  $\text{NH}_2$ -terminal, migration électrophorétique, sont identiques à ceux du peptide  $\text{NH}_2$ -terminal Ac-1 (résidus 1 à 65) déjà trouvé et défini dans l'hydrolysate de 6 heures de l'histone  $\text{H}_5$  par l'acide acétique 0,25 N.

L'hydrolyse de 12 heures par l'acide acétique 0,25 N de l'histone  $\text{H}_5$  permet d'obtenir les peptides : Ac-1 (résidus 1 à 65), Ac-2a (résidus 66 à 185) et Ac-3 (résidus 100 à 185). Le rendement d'obtention du peptide  $\text{COOH}$ -terminal Ac-3 est de 65 %.

Finalement, l'hydrolyse de l'histone H<sub>5</sub> par l'acide acétique 0,25 N permet d'obtenir les fragments d'histone suivant :

- Peptide Ac-1 (résidus 1 à 65)
- Peptide Ac-1a (résidus 1 à 99)
- Peptide Ac-2 (résidus 66 à 99)
- Peptide Ac-2a (résidus 66 à 185)
- Peptide Ac-3 (résidus 100 à 185)

L'obtention et la composition en acides aminés des peptides obtenus par hydrolyse de l'histone H<sub>5</sub> avec l'acide acétique 0,25 N sont présentés respectivement dans les tableaux XXVI et XXVII.

Le peptide Ac-2 (résidus 66 à 99) a permis de localiser avec certitude, dans la séquence, la position du peptide (résidus 71 à 99) renfermant l'unique résidu de phénylalanine de l'histone H<sub>5</sub> (SAUTIERE et al., 1975).

L'obtention du peptide Ac-3 présente un double intérêt :

- il permet de contribuer à la détermination de la structure primaire de la protéine,
- il s'avère être un outil très intéressant pour les biophysiciens car il constitue la moitié COOH-terminale de l'histone H<sub>5</sub>.

TABLEAU XXVI

SCHEMA D'OBTENTION DES PEPTIDES ACETIQUES DE L'HISTONE H<sub>5</sub>

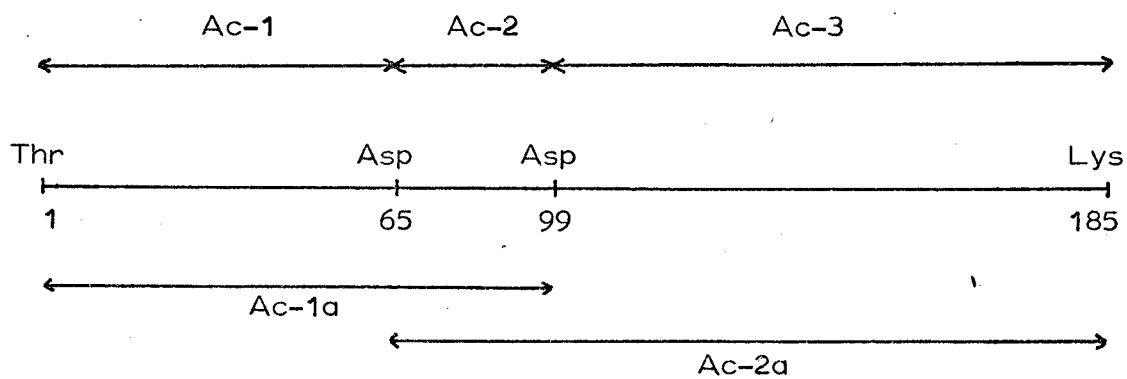
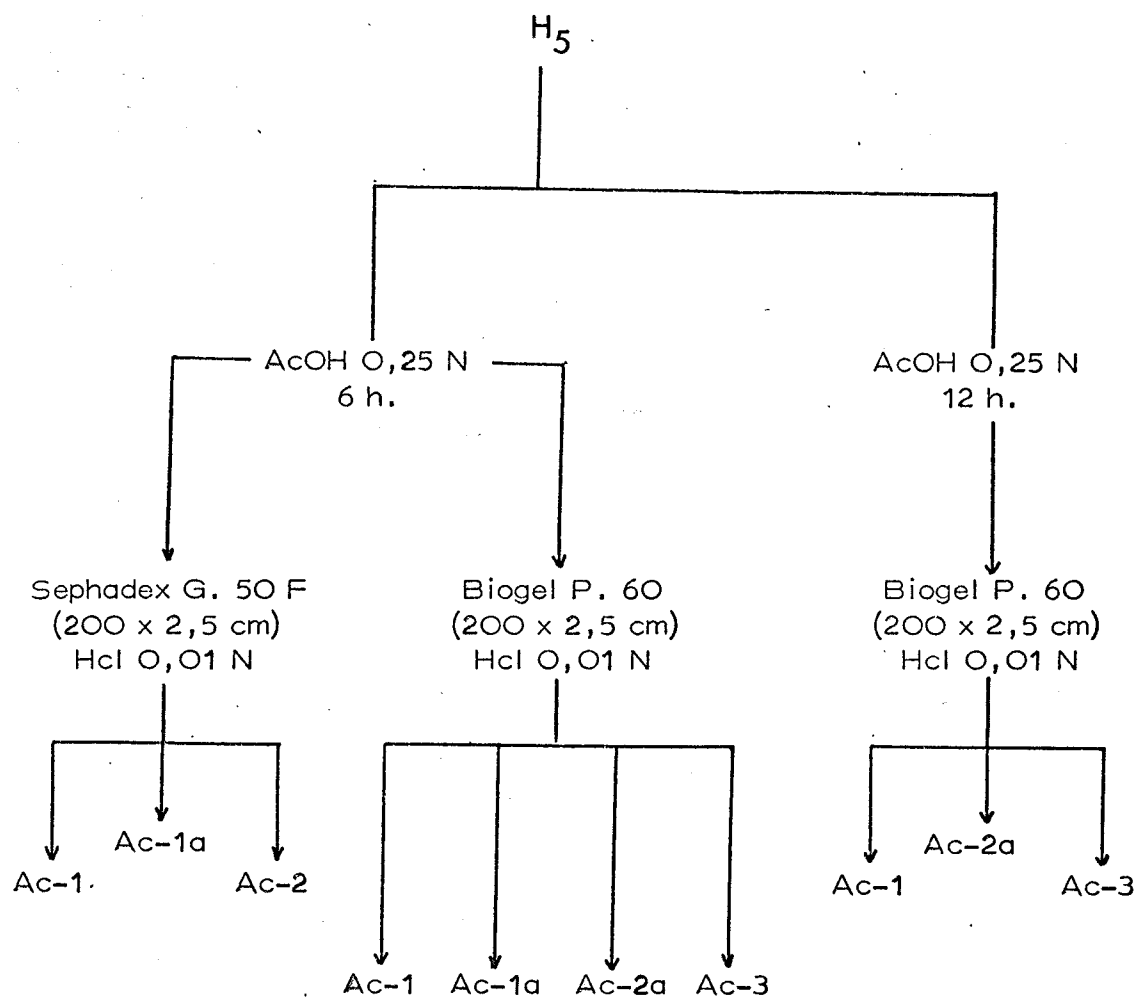


TABLEAU XXVII

COMPOSITIONS EN ACIDES AMINÉS DES PEPTIDES OBTENUS PAR HYDROLYSE DE L'HISTONE H<sub>5</sub>

AVEC L'ACIDE ACETIQUE 0,25 N

Acides aminés	Histone H <sub>5</sub>	Peptide Ac-1 résidus 1 à 65	Peptide Ac-1a résidus 1 à 99	Peptide Ac-2 résidus 66 à 99	Peptide Ac-2a résidus 66 à 185	Peptide Ac-3 résidus 100 à 185
ACIDE ASPARTIQUE	3	2	3	1	1	-
Thréonine	6	2	3	1	4	3
Sérine	25	11	15	4	14	10
Acide glutamique	7-8 (*)	5-6 (*)	7-8 (*)	2	2	-
Proline	13	4	4	-	9	9
Glycine	9	3	7	4	6	2
Alanine	29	9	13	4	20	16
Valine	8	3	5	2	5	3
METHIONINE	1	1	1	-	-	-
Isoleucine	6	4	6	2	2	-
Leucine	8	2	8	6	6	-
TYROSINE	3	3	3	-	-	-
PHENYLALANINE	1	-	1	1	1	-
HISTIDINE	3	3	3	-	-	-
Lysine	42	7	11	4	35	31
Arginine	21-20 (*)	6-5 (*)	9-8 (*)	3	15	12
Nombre de résidus	185	65	99	34	120	86

(\*) 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)



### III - ETUDE EN RESONANCE MAGNETIQUE NUCLEAIRE ET RESULTATS PARTIELS

L'histone H<sub>5</sub> d'érythrocyte de Poulet à une composition en acides aminés caractérisée :

- par le caractère hydrophobe de la partie NH<sub>2</sub>-terminale (résidus 1 à 99) où sont localisés tous les résidus d'isoleucine, de leucine et cinq des huit résidus de valine de la molécule.

- par l'accumulation des résidus basiques dans la région COOH-terminale (résidus 100 à 185) qui contient 31 résidus de lysine et 12 résidus d'arginine.

De nombreuses tentatives qui ont été faites pour étudier la corrélation séquence - conformation ont montré que les segments apolaires favorisaient la formation en hélice  $\alpha$ .

Les caractéristiques de l'histone H<sub>5</sub> suggèrent très fortement que la structure globulaire est localisée dans la partie NH<sub>2</sub>-terminale, alors que la partie basique serait sous forme de pelote statistique, libre d'intervenir dans les liaisons électrostatiques avec le DNA.

Les fragments d'histone obtenus à partir de l'histone H<sub>5</sub> après coupure par l'acide acétique 0,25 N sont donc particulièrement intéressants pour étudier les structures secondaire et tertiaire de la molécule. En effet, le peptide NH<sub>2</sub>-terminal Ac-1a (résidus 1 à 99) correspond exactement au fragment hydrophobe et le peptide COOH-terminal Ac-3 (résidus 100 à 185) au fragment basique de l'histone.

Des études très récentes ont été faites en spectroscopie de RMN à PORTSMOUTH en collaboration avec les Professeurs BRADBURY et CRANE-ROBINSON. Les résultats ne sont encore que partiels car ils doivent être confirmés et complétés par des études en dichroïsme circulaire et en spectroscopie infra-rouge.

Les premiers résultats montrent que la partie NH<sub>2</sub>-terminale hydrophobe de la molécule a une structure globulaire alors que la partie COOH-terminale a une structure en "random coil". En effet, l'élévation de la force ionique induit des changements importants de conformation dans les peptides Ac-1 (résidus 1 à 65) et Ac-1a (résidus 1 à 99). Les peptides Ac-2a (résidus 66 à 185) et Ac-3 (résidus 100 à 185), dans les mêmes conditions, restent en structure désordonnée.

## DISCUSSION ET 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 (tableau XXVIII) et d'autre part, de déterminer l'ensemble des peptides constituant la partie COOH-terminale (résidus 112 à 185) de la molécule (tableau XXIX).

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 de EDMAN automatique en phase liquide à l'aide d'un séquenceur SOCOSI.

Les peptides tryptiques S-2 Tm, S-4.Tm14-A, S-4 Tm3, S-5 Tm11, S-5 Tm5-A, le peptide chymotryptique Ch-10-A-2, le peptide Pr (5S + 6S)-7 obtenu par hydrolyse de l'histone H<sub>5</sub> par la protéase staphylococcique, 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 Ch1S-2-3 recouvre parfaitement cette séquence.

Le peptide Ch-24, Ile-Lys-Ser-His-Tyr, contient le troisième 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-32-A et T-50-2.

Les peptides Ac-2, ~~T28-A, Th454.2~~ et Ch-29-2 ont permis de faire la jonction entre le fragment peptidique correspondant au 70 premiers résidus et la séquence contenant l'unique résidu de phénylalanine et le dernier résidu d'acide aspartique. Enfin, la séquence de la protéine a été prolongée jusqu'au

résidu 111 par le peptide Th-1S dont la séquence est parfaitement recouverte par les peptides Ch-13, S-4 Tm8-A, T-33, T-14-D;

Outre la séquence des 111 premiers résidus nous avons déterminé des séquences peptidiques importantes appartenant à la partie COOH-terminale (résidus 112 à 185) (tableau XXIX ) 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 sur un total de 86 résidus d'acides aminés.

Les peptides acétiques Ac-1a (résidus 1 à 99) et Ac-3 (résidus 100 à 185) obtenus par hydrolyse de l'histone H<sub>5</sub> 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 RMN 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> (tableau XXX ) fait ressortir la présence de nombreux doublets, Lys-Lys, Arg-Arg, Arg-Lys, Lys-Arg et des triplets, Lys-Lys-Lys et Arg-Lys-Lys, sites potentiels d'interactions électrostatiques avec le DNA.

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 - richesse 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 homologues nombreuses de séquence telles que celle située au voisinage du résidu de phénylalanine respectivement en position 106 dans l'histone H<sub>1</sub> RTL<sub>3</sub> (JONES et al., 1974) et 93 dans l'histone H<sub>5</sub> (SAUTIERE et al., 1975) et celles situées dans la partie basique où apparaissent des séquences répétitives de type Ser-Pro-Lys-Lys et Ala-Lys-Lys-Pro. (tableau XXXI) et (tableau XXX).

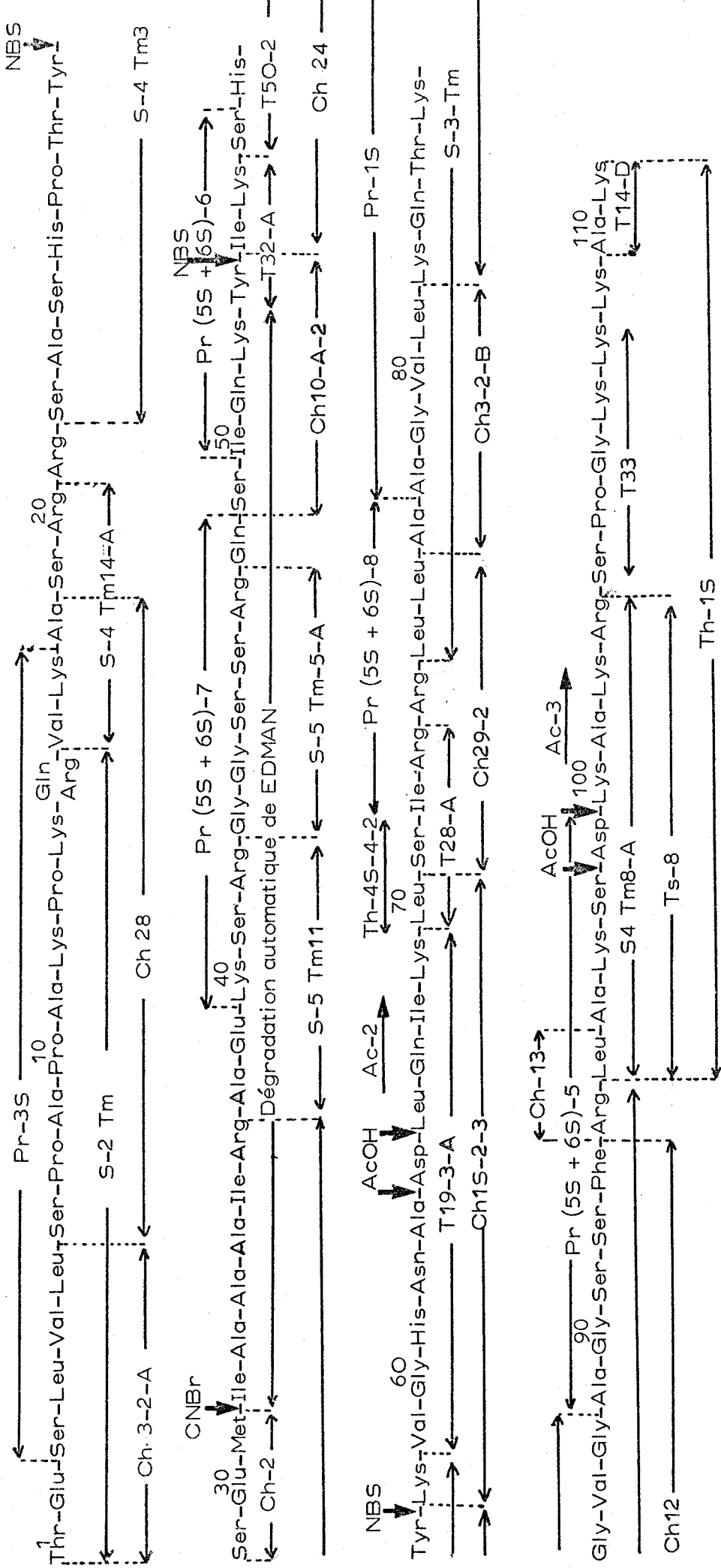
Ceci suggère un rôle particulier de l'histone H<sub>5</sub> dans la condensation de la chromatine et de son maintien dans cet état condensé.

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, par contre 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 aux recouvrements des séquences partielles déjà connues, (tableau XXX).

SEQUENCE DE LA PARTIE NH<sub>2</sub>-TERMINALE (résidus 1 à 111) DE L'HISTONE H<sub>5</sub>

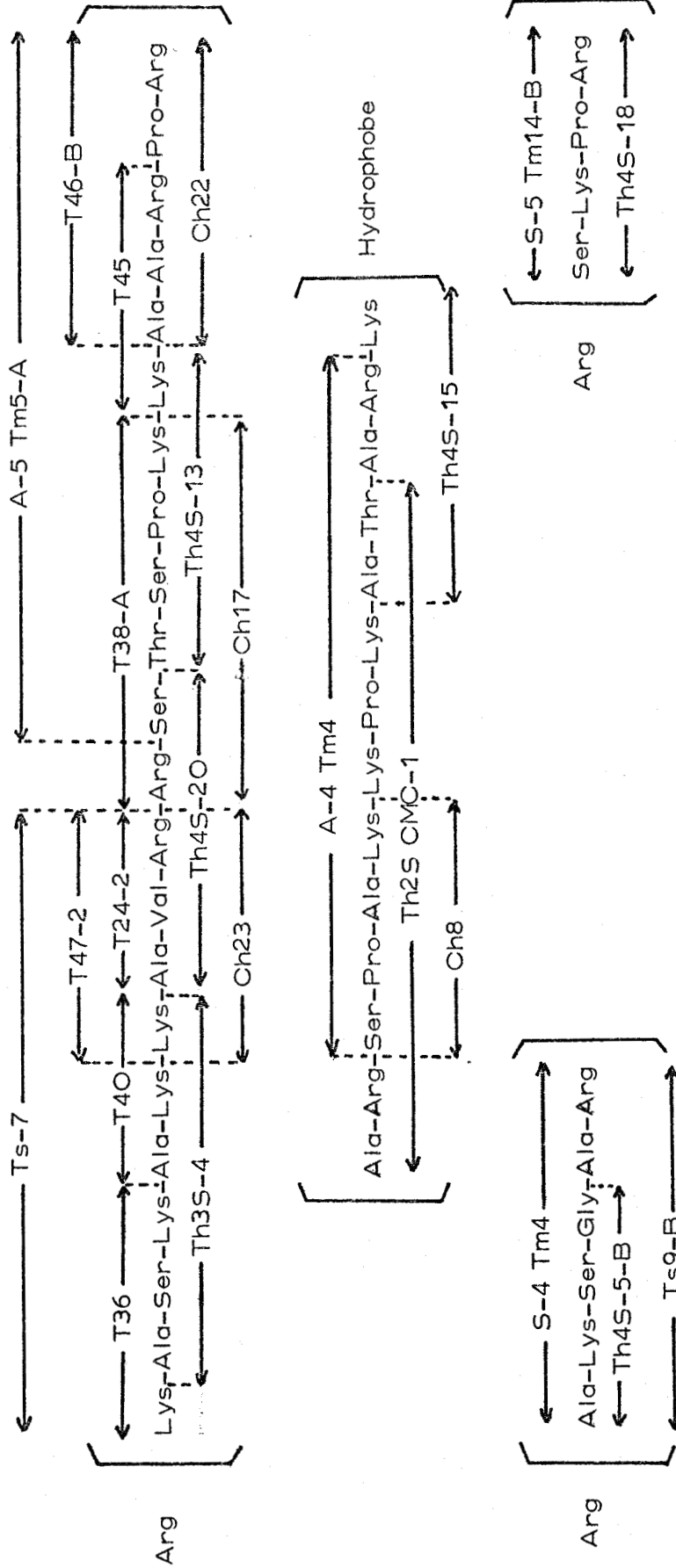


Ch : Chymotrypsine  
 Pr : Protéase staphylococcique  
 T : Trypsine  
 Th : Thermolysine  
 Tm : Trypsine (maléylation)  
 Ts : Trypsine (succinylation)

TABLEAU XXVIII

TABLEAU XXIX

SEQUENCES PEPTIDIQUES DE L'HISTONE H<sub>5</sub> LOCALISEES DANS LA PARTIE COOH-TERMINALE DE LA MOLECULE



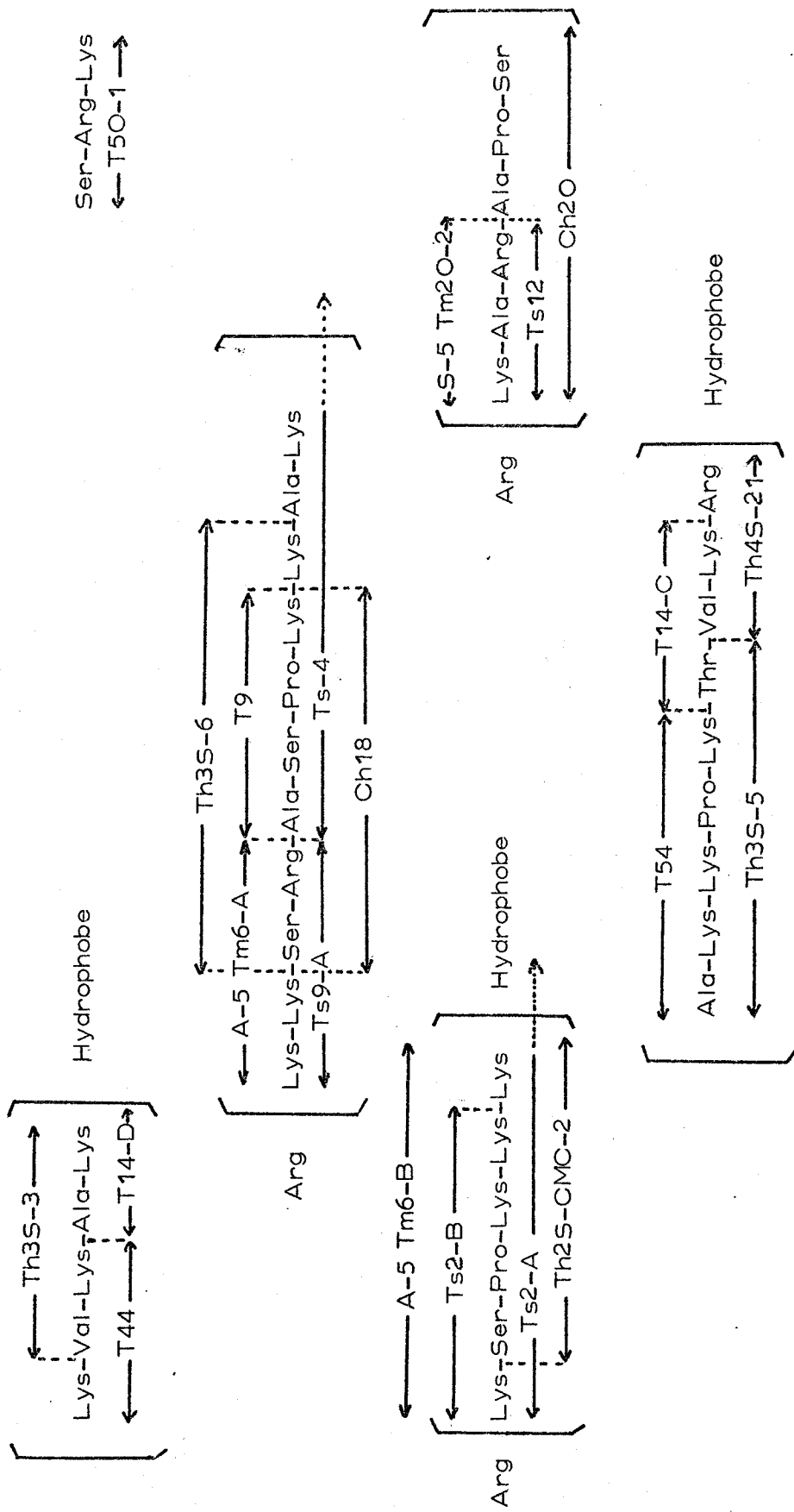
Ch : Chymotrypsine  
 T : Trypsine  
 Th : Thermolysine

Tm : Trypsine (méthylation)  
 Ts : Trypsine (succinylation)  
 .../...



TABLEAU XXIX (suite)

SEQUENCES PEPTIDIQUES DE L'HISTONE H<sub>5</sub> LOCALISEES DANS LA PARTIE COOH-TERMINALE DE LA MOLECULE



Ch : Chymotrypsine  
 T : Trypsine  
 Th : Thermolysine

Tm : Trypsine (maléylation)  
 Ts : Trypsine (succinylation)





TABLEAU XXX

STRUCTURE PRIMAIRE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> D'ERYTHROCYTE DE POULET

THR-GLU-SER-LEU-VAL-LEU-SER-PRO-ALA-LYS-PRO-LYS-<sup>10</sup>ARG-<sup>20</sup>GLN-VAL-LYS-ALA-SER-ARG-ARG-SER-ALA-SER

HIS-PRO-THR-TYR-SER-GLU-MET-ILE-ALA-ALA-ILE-ARG-ALA-GLU-LYS-SER-ARG-GLY-GLY-SER-SER-ARG-GLN-<sup>30</sup>

SER-ILE-GLN-LYS-TYR-ILE-LYS-SER-HIS-TYR-LYS-VAL-GLY-HIS-ASN-ALA-ASP-LEU-GLN-ILE-LYS-LEU-SER-ILE-ARG-<sup>40</sup><sup>70</sup>

ARG-LEU-LEU-ALA-GLY-VAL-LEU-LYS-GLN-THR-LYS-GLY-VAL-GLY-ALA-GLY-SER-SER-PHE-ARG-LEU-ALA-LYS-<sup>80</sup><sup>90</sup><sup>93</sup>

SER-ASP-LYS-ALA-LYS-ARG-SER-PRO-GLY-LYS-LYS-ALA-LYS-(ALA-LYS-LYS-PRO-LYS-THR-VAL-LYS-ARG)<sup>99</sup> <sup>100</sup><sup>110</sup>

(ALA-LYS-SER-GLY-ALA-ARG) (ALA-ARG-SER-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)

**BUS FILE**

[ PRO, SER, LYS, ALA ] -ARG-LYS-LYS (OH)

TABLEAU XXXI

HOMOLOGIES DE SEQUENCE AU VOISINAGE DE RESIDUS AROMATIQUES ENTRE L'HISTONE H<sub>1</sub> RTL<sub>3</sub> DE THYMUS  
DE LAPIN ET L'HISTONE H<sub>5</sub> D'ERYTHROCYTE DE POULET

H<sub>1</sub> Tyr-Asp-Val-Gly-Lys-Asn-Asn- -Ser-Arg-Ile-Lys-Leu-Gly-Leu-Lys-Ser-Leu-Val-Ser-Lys-  
75 80 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- -Glu-Thr-Lys-Gly-Thr-Gly-Ala-Ser-Gly-Ser-Phe-Lys-Leu-  
100 109 110

H<sub>5</sub> Gly- -Val-Leu-Lys-Gln-Thr-Lys-Gly-Val-Gly-Ala-Gly-Ser-Ser-Phe-Arg-Leu-Ala-Lys-Ser-  
80 90 93

H<sub>1</sub> Asp-Lys-Lys-Ala

H<sub>5</sub> Asp-Lys- -Ala  
100



BIBLIOGRAPHIE

---

- |  | <u>Pages</u> |
|--|--------------|
| <p>AMBLER, R.P. and MEADWAY, R.J., (1968)<br/>                     The use of thermolysin in amino acid sequence determination<br/> <u>Biochem. J.</u>, <u>108</u>, 893-895.</p>   | 66, 91       |
| <p>BELLAIR, J.T. and MAURITZEN, C.M., (1964)<br/>                     The fractionation of <math>\alpha</math>-histones from chicken erythrocyte<br/>                     nuclei. II Fractions obtained by exclusion chromatography.<br/> <u>Austral. J. Biol. Sci.</u>, <u>17</u>, 1001.</p>  | 7            |
| <p>BENDER, M.L., (1960)<br/>                     Mechanisms of catalysis of nucleophilic reactions of carboxylic<br/>                     acid derivatives.<br/> <u>Chem. Revs.</u>, <u>60</u>, 53-113.</p>  | 25, 27       |
| <p>BRUYLANTS, A. and KEZDY, F., (1961)<br/>                     Recent studies on the hydrolysis of aliphatic amides.<br/> <u>Record Chem. Progr.</u>, <u>21</u>, 213-240.</p>   | 25, 27       |
| <p>CHAMPAGNE, M., MAZEN, A. et WILHELM, X., (1968)<br/>                     Histones d'érythrocytes de Poulets. I Fractionnement des<br/>                     histones totales et isolement d'une histone spécifique.<br/> <u>Bull. Soc. Chim. Biol.</u>, <u>50</u>, 1261-1272.</p>  | 5, 6, 9      |
| <p>CHAPMAN, G.E., HARTMAN, P.G. and BRADBURY, E.M., (1976)<br/>                     Studies on the role and mode of operation of the very-lysine-rich<br/>                     histone H<sub>1</sub> in eukaryote chromatin.<br/>                     The isolation of the globular and non-globular regions of the<br/>                     histone H<sub>1</sub> molecule.<br/> <u>Eur. J. Biochem.</u>, <u>61</u>, 69-75.</p> | 133          |
| <p>DE LANGE, R.J., FAMBROUGH, D.M., SMITH, E.L.<br/>                     and BONNER, J., (1969)<br/>                     Calf and pea histone IV-II-The complete amino acid sequence<br/>                     of calf thymus histone IV : presence of <math>\epsilon</math>-N-acetyllysine.<br/> <u>J. Biol. Chem.</u>, <u>244</u>, 319-334.</p>   | 2            |

- DE LANGE, R.J., HOOPER, J.A. et SMITH, E.L., (1972) 2  
Complete amino acid sequence of calf thymus histone III.  
Proc. Natl. Acad. Sci. US., 69, 882-884.
- DRAPEAU, G.R., BOILY, Y. and HOUMARD, J., (1972) 22  
Purification and properties of an extracellular protease of  
staphylococcus aureus.  
J. Biol. Chem., 25, 6720-6726.
- EASLEY, C.W., ZEGERS, B.J.M. and DE VIJLDER, M., (1969) 31  
Application of specialized techniques for specific staining  
of peptide maps on various media.  
Biochim. Biophys. Acta., 175, 211-213.
- EDMAN, P., (1956) 30  
On the mechanism of the phenyl isothiocyanate degradation  
of peptides.  
Acta Chem. Scand., 10, 761-768.
- EDMAN, P. et SJOQUIST, J., (1956) 31  
Identification and semi-quantitative determination of phenyl  
thiohydantoins.  
Acta Chem. Scand., 10, 1507-1509.
- EDWARDS, L.J. and HNILICA, L.S., (1968) 9  
The specificity of histones in nucleated erythrocytes.  
Experientia, 24, 228-229.
- FISCHER, E. et ABDERHALDEN, E., (1907) 25  
Ber., 40, 3544.
- GAREL, A., BURCKARD, J., MAZEN, A. et CHAMPAGNE, M., 8, 10  
(1972)  
Histones d'érythrocytes de Poulets. III Mise en évidence de  
l'hétérogénéité du fragment N-terminal de l'histone spécifique.  
Biochimie, 54, 451-455.
- GARETT, E.R., (1960) 25, 27  
The solvolysis of aspirin anhydride.  
J. am. Chem. Soc., 82, 711-718.
- GRAY, W.R. and HARTLEY, B.S., (1963-a) 29  
A fluorescent end-group reagent for proteins and peptides.  
Biochem. J., 89, 59 P. - 60 P.

- GRAY, W.R. and HARTLEY, B.S., (1963-b) 30  
The structure of a chymotryptic peptide from pseudomonas  
cytochrome C-551  
Biochem. J., 89, 379.
- GREENAWAY, P.J., (1971) 10, 11  
Studies of the primary structure of chicken erythrocyte  
histone fraction V.  
Biochem. J., 124, 319-325.
- GREENAWAY, P.J. and MURRAY, K., (1971) 9, 10  
Heterogeneity and polymorphism in chicken erythrocyte  
histone fraction V.  
Nature New Biol., 229, 233-238.
- GROS, C. and LABOUESSE, B., (1969) 30  
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) 30  
The sequence of the amino acid residues in performic acid-  
oxidized ribonuclease.  
J. Biol. Chem., 235, 633-647.
- HNILICA, L.S., (1964) 7  
The specificity of histones in chicken erythrocytes.  
Experientia, 20, 13-14.
- HOUARD, J. and DRAPEAU, G.R., (1972) 22  
Staphylococcal protease ; a proteolytic enzyme specific for  
glutamoyl bonds.  
Proc. Natl. Acad. Sci. US., 69, 3506-3509.
- JOHNS, E.W., PHILLIPS, D.M.P., SIMSON, P. and 7  
BUTLER, J.A.V., (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 fractions F2a1  
et F2a2 from calf thymus deoxyribonucleoprotein at pH 7.  
Biochem. J., 105, 611-614.
- JOHNS, E.W. and DIGGLE, J.H., (1969) 6  
A method for the large scale preparation of the avian erythrocyte  
specific histone F2C.  
Eur. J. Biochem., 11, 495-498.
- JONES, G.M.T., RALL, S.C., and COLE, R.D., (1974) 132  
Extension of the amino acid sequence of a lysine-rich histone  
J. Biol. Chem., 249, 2548-2553.
- IWAI, K., ISHIKAWA, K. and HAYASHI, H., (1970) 2  
Amino acid sequence of slightly lysine-rich histone.  
Nature, 226, 1056-1058.
- LEECH, S.J., (1955) 25  
Proc. Intern. Wool Textile Research Conf.,  
Part I, Commonwealth Scientific and Industrial Research  
Organisation, Melbourne, Australia C-181.
- MATSUBARA, H., SINGER, A. and SASAKI, R.M., (1969) 66, 91  
Effect of proline residue on the hydrolysis of substrates by  
thermolysin.  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 34, 719-724.
- MAZEN, A. et 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) 5, 6  
The step wise removal of histones from chicken erythrocyte  
nucleoprotein.  
Biochem. J., 107, 207-215.
- NEELIN, J.M., CALLAHAN, P.X., LAMB, D.C. and  
MURRAY, K., (1964) 7  
Histones of chicken erythrocyte nuclei.  
Can. J. Biochem., 42, 1743-1752.
- 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 (ν bodies).  
Science (Wash. D.C.), 183, 330-332.
- OUDET, P., GROSS-BELLARD, M. and CHAMBON, P., (1974) 1  
 Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin  
 structure is a repeating unit.  
Cell., 4, 281-300.
- PANYIM, S. and CHALKLEY, R., (1969) 7, 28  
 High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones.  
Arch. Biochem. Biophys., 130, 337-346.
- PARTRIDGE, S.M. and DAVIS, H.F., (1950) 25  
 Preferential release of aspartic acid during hydrolysis of proteins.  
Nature, 165, 62-63.
- RAMACHANDRAN, L.K. and WITKOP, B., (1967) 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. and LUCK, J.M., (1962) 3  
 On the complexity of calf thymus histone.  
Biochemistry, 1, 79-89.
- SAUTIERE, P., TYROU, D., LAINE, B., MIZON, J., 2  
 LAMBELIN-BREYNAERT, M.D., RUFFIN, P. et  
 BISERTE, G., (1972)  
 Structure primaire de l'histone riche en arginine et en lysine du  
 thymus de Veau.  
C.R. Acad. Sci. Paris, 274, 1422-1425.
- SAUTIERE, P., (1973) 66, 91  
 Détermination de la structure primaire d'histones riches en  
 arginine.  
Thèse de Doctorat d'Etat ès Sciences, Lille.
- SAUTIERE, P., TYROU, D., LAINE, B., MIZON, J., 2  
 RUFFIN, P. and BISERTE, G., (1974)  
 Covalent Structure of calf thymus ALK-histone.  
Eur. J. Biochem., 41, 563-576.

- SAUTIERE, P., KMIĘCIK, D., LOY, O., BRIAND, G., 126, 132  
BISERTE, G., 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.
- SCHROEDER, W.A., SHELTON, J.R., SHELTON, J.B., 25, 26  
CORMICK, J. et JONES, R.T., (1963)  
The amino acid sequence of the  $\gamma$  chain of human fetal hémoglobin.  
Biochemistry, 2, 992.
- SCHULTZ, J., ALLISON, H. and GRICE, M., (1962) 25  
Specificity of the cleavage of proteins by dilute acid.  
I Release of aspartic acid from insulin, ribonuclease and glucagon.  
Biochemistry, 1, 694.
- STEHÉLIN, D. et DURANTON, H., (1969) 30  
Dérivés dansylés des acides aminés. Chromatographie mono-  
dimensionnelle et simultanée de plusieurs échantillons sur une  
même couche mince.  
J. Chromatog., 43, 93-102.
- SUNG, M.T. and DIXON, G.H., (1970) 84  
Modification of histones during spermiogenesis in trout :  
a molecular mechanism for altering histone binding to DNA.  
Proc. Natl. Acad. U.S., 67, 1616-1623.
- YAMADA, S., and ITANO, H.A., (1966) 31  
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.