

50376  
1976  
82

50376  
1976  
82

Numéro d'ordre :

UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

## MÉMOIRE

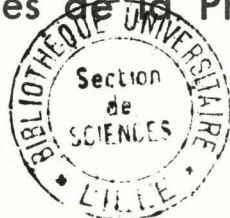
présenté à l'Université de Lille I  
pour obtenir le titre de  
DOCTEUR DE 3<sup>ème</sup> CYCLE EN BIOCHIMIE

par

**Odile LOY**

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

(Etude des Peptides Chymotrypsiques  
et Pepsiques de la Protéine)



Membres du Jury : MM. J. MONTREUIL, Président

G. BISERTE

J. KREMBEL

P. SAUTIERE

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

Présenté le 8 Juillet 1976

A mes parents ,

qui ont toujours tout sacrifié au bonheur  
et à la réussite de leurs enfants,  
en faible témoignage de ma reconnaissance  
et de ma profonde affection.

A mon fiancé ,

toujours présent et attentif,  
en signe de mon Amour.

A mes beaux-parents ,

pour leur accueil  
et leur chaleureuse compréhension.

A tous mes amis .

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 C.N.R.S.

Il s'inscrit dans le cadre de l' A.C.C. - Interactions Moléculaires en Biologie : Interactions Histone - DNA ;  
( Contrats D.G.R.S.T. 72.7.0505 et 75.7.0187 ).

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

**Présentations :**

.....

- Study of the primary structure of histone H<sub>5</sub> .

International Symposium on the Chromatin.  
Strasbourg, 6-7 April 1974.

- La séquence amino-terminale de l'histone H<sub>5</sub> .

Société de Chimie Biologique - Forum des Jeunes.  
Montpellier, 5-6-7 Septembre 1974.

- Méthodes de détermination de la structure primaire des histones.

( affiches )

Colloque sur les méthodes physico-chimiques appliquées  
à la biologie - Paris, 13-14 Novembre 1975.

- Sequence of the amino-terminal half of the chicken erythrocyte  
histone H<sub>5</sub> ( affiches ).

Tenth International Congress of Biochemistry.  
Hamburg, 25-31 July 1976.



Publications :

.....

- Chicken erythrocyte histone H<sub>5</sub> ;

I. Amino-terminal sequence (70 residues).

A. GAREL, A. MAZEN and M. CHAMPAGNE

and

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

Febs Letters (1975) , 50 , 195-199.

- Chicken erythrocyte histone H<sub>5</sub> ;

II. Amino acid sequence adjacent to the phenylalanine residue.

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

and G. BISERTE

and

A. GAREL and M. CHAMPAGNE

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

- Chicken erythrocyte histone H<sub>5</sub> ;

III. Sequence of the amino-terminal half of the molecule (111 residues).

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

and G. BISERTE

and

A. GAREL and M. CHAMPAGNE

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

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

A. GAREL, A. MAZEN and M. CHAMPAGNE

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

and

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

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

Received 4 December 1974

**1. Introduction**

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

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

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

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

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

**2. Materials and methods**

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

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

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

\* The new histone nomenclature used here was accepted by the participants at the CIBA Foundation Symposium on the Structure and Function of Chromatin, April 3-5, 1974. This new nomenclature which has been proposed to the appropriate international nomenclature committee is as follows for each histone where the previous names are given in brackets: H<sub>1</sub> (F<sub>1</sub>, I, KAP); H<sub>2A</sub> (F<sub>2A2</sub>, II<sub>b1</sub>, ALK); H<sub>2B</sub> (F<sub>2B</sub>, II<sub>b2</sub>, KSA); H<sub>3</sub> (F<sub>3</sub>, III, ARK); H<sub>4</sub> (F<sub>4A1</sub>, IV, GRK) and H<sub>5</sub> (F<sub>5C</sub>, V, KAS).

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

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

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

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

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

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

### 3. Results and discussion

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

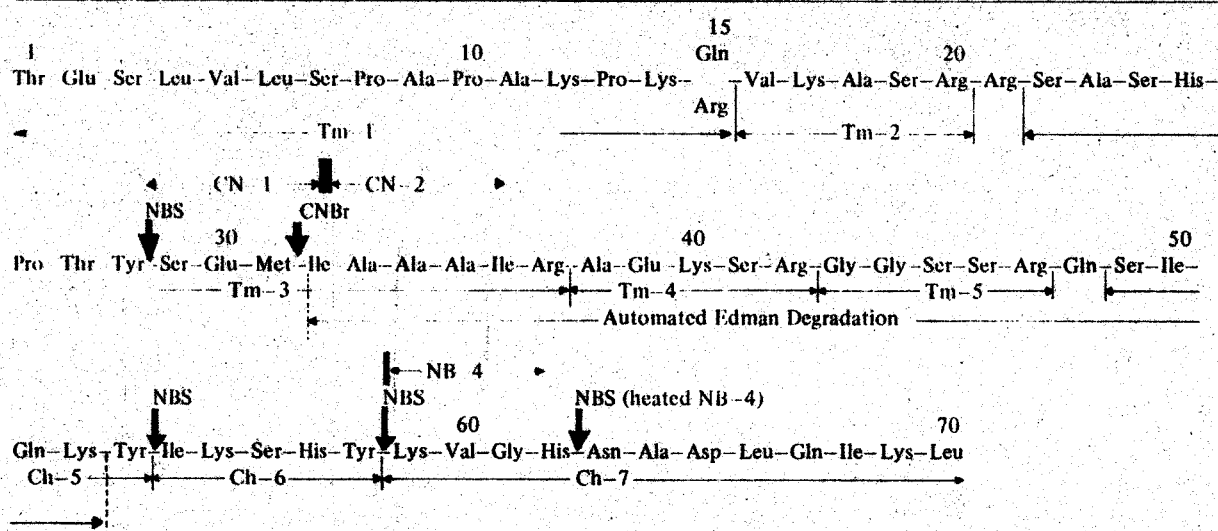
\* These peptides are numbered according to their position in the sequence of the protein.

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

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

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

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



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

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

#### Acknowledgements

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

#### References

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



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

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

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

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

and

A. GAREL and M. CHAMPAGNE

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

Received 4 December 1974

### 1. Introduction

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

### 2. Materials and methods

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

\* The new histone nomenclature used here was accepted by the participants at the CIBA Foundation Symposium on the Structure and Function of Chromatin, April 3-5, 1974. This new nomenclature which has been proposed to the appropriate international nomenclature committee is as follows for each histone where the previous names are given in brackets: H<sub>1</sub> (F<sub>1</sub>, I, KAP); H<sub>2</sub>A (F<sub>2A2</sub>, II<sub>B1</sub>, ALK); H<sub>2</sub>B (F<sub>2B</sub>, II<sub>B2</sub>, KSA); H<sub>3</sub> (F<sub>3</sub>, III, ARK); H<sub>4</sub> (F<sub>4A</sub>, IV, GRK) and H<sub>5</sub> (F<sub>5C</sub>, V, KAS).

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

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

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

### 3. Results and discussion

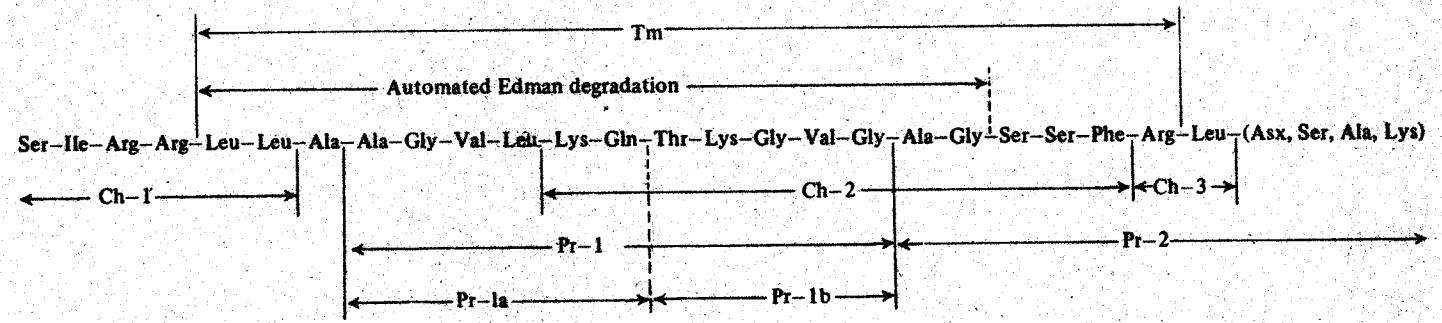
In the tryptic hydrolysate of the maleylated histone a peptide containing the only phenylalanyl residue present in the protein was identified. This peptide (20 residues) has the following amino acid composition: Thr, Ser<sub>2</sub>, Glu, Ala<sub>3</sub>, Val<sub>2</sub>, Leu<sub>2</sub>, Phe, Lys<sub>2</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 P<sub>7</sub>-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)



**Table 1**  
**Amino acid sequence adjacent to the phenylalanyl residue in the chicken erythrocyte histone H<sub>2</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, Socoli, 94000, Saint Maur, France, for the automated Edman degradation and to Mrs D. Belafche-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.

#### Reference

- [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- -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. SAUTIERE, G. BRIAND, D. KMIÉCIK, O. LOY, G. BISERTE

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

and

A. GAREL, M. CHAMPAGNE

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

Received 21 January 1976

### 1. Introduction

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

### 2. Materials and methods

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

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

### 3. Results and discussion

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

This peptide designated by Ac-2 contains 34

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

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



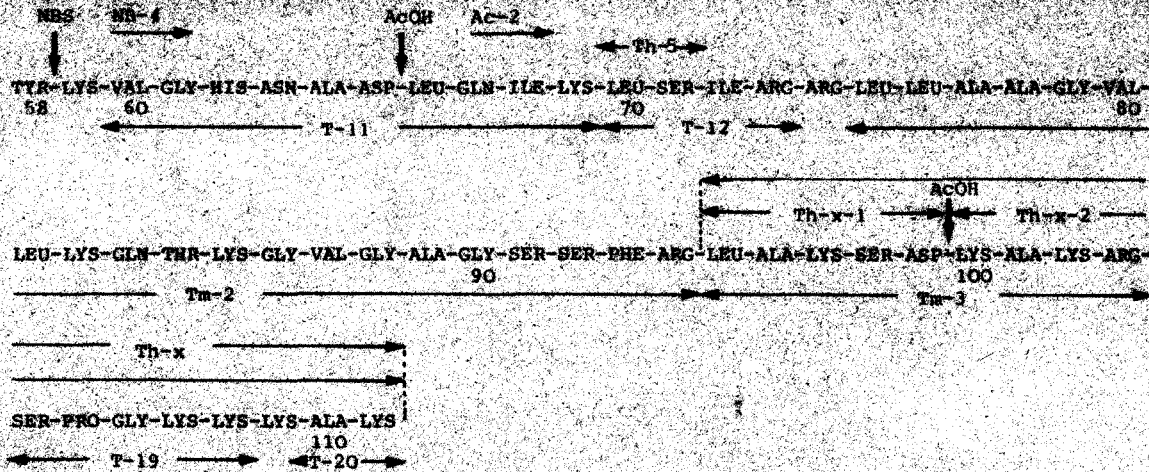


Fig. 1. Ordering of the peptides from residue 58 to residue 111 in the amino acid sequence of chicken erythrocyte histone H<sub>2</sub>. Tryptic peptides are designated by T and Tm (from maleylated peptide NB-4), and thermolytic peptides by Th. Sites of cleavage of the protein by *N*-bromosuccinimide 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

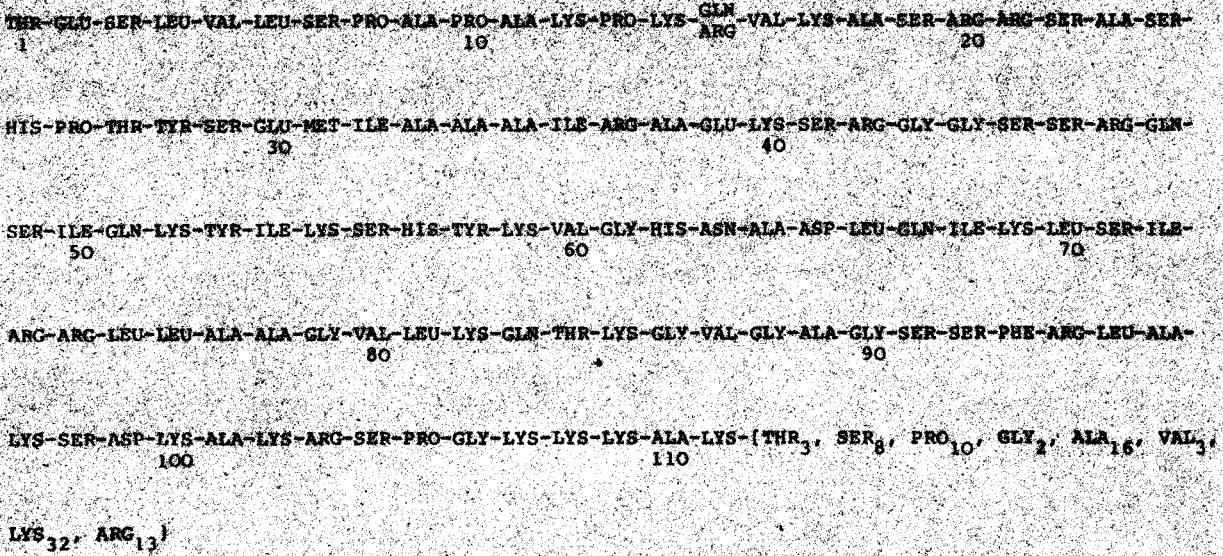


Fig. 2. Sequence of the amino-terminal half of the chicken erythrocyte histone H<sub>2</sub>.

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.

UNIVERSITE DES SCIENCES  
ET TECHNIQUES DE LILLE

---

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 FERJET, 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
Mlle	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
Mme	EVARD 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.	GOSSÉLIN Gabriel	Sociologie
M.	GRANELLE Jean-Jacques	Sciences Economiques
M.	GUILLAUME Henri	Sciences Economiques
M.	HECTOR Joseph	Géométrie
M.	HERMAN Maurice	Physique Spatiale
M.	JOURNAL Gérard	Physique Atomique et Moléculaire
Mlle	KOSMAN Yvette	Géométrie
M.	KREMBEL Jean	Biochimie
M.	LAURENT François	Automatique
Mlle	LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle	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.	MACKÉ Bruno	Physique
M.	MAHIEU Jean-Marie	Physique Atomique et Moléculaire
Mme	N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M.	MAIZIERES Christian	Automatique
M.	MALAUSSÉNA Jean-Louis	Sciences Economiques
M.	MESSELYN Jean	Physique Atomique et Moléculaire
M.	MONTUELLE Bernard	Biologie Appliquée
M.	NICOLE Jacques	Chimie Appliquée
M.	PAQUET Jacques	Géologie Générale
M.	PARSY Fernand	Mécanique
M.	PECQUE Marcel	Chimie Physique
M.	PERROT Pierre	Chimie Appliquée
M.	PERTUZON Emile	Physiologie Animale
M.	PONSOLLE Louis	Chimie Physique
M.	POVY Lucien	Automatique
M.	RICHARD Alain	Biologie
M.	ROGALSKI Marc	Analyse
M.	ROY Jean-Claude	Psycho-Physiologie
M.	SIMON Michel	Sociologie
M.	SOMME Jean	Géographie
Mlle	SPIK Geneviève	Biochimie
M.	STANKIEWICZ François	Sciences Economiques
M.	STEEN Jean-Pierre	Informatique
M.	THERY Pierre	Electronique
M.	TOULOTTE Jean-Marc	Automatique
M.	TREANTON Jean-René	Sociologie
M.	VANDORPE Bernard	Chimie Minérale
M.	VILLETTE Michel	Mécanique
M.	WALLART Francis	Chimie
M.	WERNIER Georges	Informatique
M.	WATERLOT Michel	Géologie Générale
Mme	ZINN-JUSTIN Nicole	Algèbre

ABRÉVIATIONS UTILISÉES DANS LE TEXTE

.....

AcOH	acide acétique
CMC	carboxyméthyl cellulose
CNBr	bromure de cyanogène
Cp A	carboxypeptidase A
Cp B	carboxypeptidase B
Cp C	carboxypeptidase C
DNA	acide désoxyribonucléique
DNS	dansylamino - acide
NBS	N - bromosuccinimide
NEM	N - éthyl - morpholine
PTC (ou PITC)	phénylisothiocyanate
PTH	phénylthiohydantoïne d'acide aminé
RMN	résonance magnétique nucléaire
TCA	acide trichloracétique
TFA	acide trifluoro acétique
TPCK	L-1-tosylamido-2-phényl-éthyl chlorométhyl- kétone



TABLE DES MATIERES

	<u>Page</u>
<u>INTRODUCTION</u> .....	1
<u>CHAPITRE I : PREPARATION ET CARACTERISATION DE L'HISTONE H<sub>5</sub></u>	5
<u>PREPARATION DE L'HISTONE H<sub>5</sub></u> .....	6
A. Préparation de la chromatine à partir des érythrocytes de Poulets .....	6
B. Extraction de l'histone H <sub>5</sub> à partir de la chromatine ..	6
C. Purification de l'histone H <sub>5</sub> .....	8
<u>COMPOSITION EN ACIDES AMINES</u> .....	9
<u>ETAPES DE LA DETERMINATION DE</u> <u>LA STRUCTURE PRIMAIRE DE L'HISTONE H<sub>5</sub></u> .....	12

	<u>Page</u>
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES .....	20
<hr/> <hr/>	
<u>CHOIX DES METHODES</u> .....	21
<u>PREPARATION DU FRAGMENT COOH-TERMINAL NB-4</u> .....	22
A. Principe .....	22
B. Coupure de l'histone H <sub>5</sub> par la N-bromosuccinimide (NBS) .....	23
C. Séparation des produits de clivage .....	23
D. Discussion .....	24
 <u>HYDROLYSES ENZYMATIQUES DE L'HISTONE H<sub>5</sub></u> .....	
<u>OU DE SON FRAGMENT NB-4</u> .....	27
A. Hydrolyse par la chymotrypsine .....	27
- Principe .....	27
- Conditions d'hydrolyse .....	28
. Hydrolyse chymotrypsique de l'histone native	
. Hydrolyse chymotrypsique du fragment NB-4	
B. Hydrolyse par la pepsine .....	29
- Principe .....	29
- Conditions d'hydrolyse .....	29

FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS ..... 31

- A. Chromatographie de gel-filtration ..... 31
- B. Chromatographie d'échange d'ions ..... 31

CONTROLE D'HOMOGENEITE ET

PURIFICATION DES FRACTIONS PEPTIDIQUES ..... 34

- A. Contrôle d'homogénéité et purification des fractions  
obtenues par chromatographie de gel-filtration ..... 34
  - Chromatographie ..... 34
  - Electrophorèse ..... 34
  - Révélation des électrochromatogrammes ..... 35
  - Contrôle de pureté par électrophorèse  
en gel de polyacrylamide .. 35
  - Purification des fractions hétérogènes ..... 36
    - . Purification par chromatographie de gel-filtration
    - . Purification sur papier
- B. Contrôle d'homogénéité et purification des fractions  
obtenues par chromatographie d'échange d'ions ..... 37

ETUDE DES PEPTIDES ..... 38

- A. Composition en acides aminés ..... 38
- B. Détermination de l'extrémité NH<sub>2</sub>-terminale par dansylation 38
- C. Détermination de l'extrémité COOH-terminale ..... 39
- D. Dégradation des peptides par la méthode de Edman .... 40

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

PAR LES CARBOXYPEPTIDASES ..... 42



---

---

**CHAPITRE III : DETERMINATION DE L'EXTREMITE COOH-TERMINALE**

---

---

DE L'HISTONE H <sub>5</sub> ET DE SON FRAGMENT NB-4 .....	44
<u>CHOIX DES METHODES</u> .....	45
<u>RESULTATS</u> .....	46
A. Hydrolyse du fragment NB-4 par les carboxypeptidases A et B .....	46
B. Hydrolyse de l'histone H <sub>5</sub> et du fragment NB-4 par la carboxypeptidase B .....	46
C. Hydrolyse de l'histone H <sub>5</sub> par la carboxypeptidase C .....	48
. Rapport enzyme / substrat : 1 / 100 .....	48
. Rapport enzyme / substrat : 1 / 500 .....	50
<u>CONCLUSION</u> .....	51

---

---

**CHAPITRE IV : HYDROLYSE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> ET DE**

---

---

**SON FRAGMENT NB-4 PAR LA CHYMOTRYPSINE ..... 53**

---

---

**HYDROLYSE CHYMOTRYPSIQUE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> ..... 54****A. Fractionnement des peptides ..... 54****- Chromatographie de gel-filtration ..... 54****- Chromatographie d'échange d'ions ..... 59****B. Etude des peptides chymotrypsiques de l'histone H<sub>5</sub> ..... 64****HYDROLYSE CHYMOTRYPSIQUE DU FRAGMENT NB-4 ..... 94****A. Fractionnement des peptides ..... 94****- Chromatographie de gel-filtration ..... 94****- Chromatographie d'échange d'ions ..... 96****B. Etude des peptides chymotrypsiques du fragment NB-4 ... 100****DISCUSSION ..... 105**

---

---

**CHAPITRE V : HYDROLYSE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> ET DE**

---

---

**SON FRAGMENT NB-4 PAR LA PEPSINE** 107

---

---

**CHOIX DE LA METHODE** ..... 108**ETUDE COMPARATIVE DES HYDROLYSATS TOTAUX DE****L'HISTONE H<sub>5</sub> ET DU FRAGMENT NB-4 (Etude qualitative)** 109A. **Electrochromatographie** ..... 109B. **Gels de polyacrylamide** ..... 111**HYDROLYSE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> ET DE SON FRAGMENT NB-4****PAR LA PEPSINE (Etude quantitative)** ..... 113A. **Fractionnement des hydrolysats** ..... 113B. **Contrôle d'homogénéité des fractions peptidiques** 116. **Electrochromatographie** ..... 116. **Electrophorèse en gel de polyacrylamide** ..... 118C. **Composition en acides aminés**  
des fractions peptidiques homogènes ..... 118

ETUDE DU PEPTIDE Px .....	121
A. Critères de pureté .....	121
B. Détermination de l'acide aminé en position NH <sub>2</sub> -terminale	121
C. Détermination de la séquence NH <sub>2</sub> -terminale par dégradation de Edman .....	121
D. Détermination de l'acide aminé en position COOH-terminale	122
E. Détermination de la séquence COOH-terminale .....	122
F. Etude de la séquence en acides aminés du peptide Px ..	125
- Choix des méthodes .....	125
- Principe de la succinylation .....	127
- Succinylation du peptide Px .....	127
- Hydrolyse trypsique du peptide Px succinylé .....	128
- Séparation des peptides tryptiques du peptide Px succinylé .....	131
- Quelques problèmes liés à l'étude structurale des peptides obtenus par hydrolyse tryptique, après succinylation, des peptides Px-1 et Px-2 .....	131
. Analyses d'acides aminés	
. Dansylation des peptides	
. Dégradation de Edman	
. Hydrolyse des peptides par les carboxypeptidases A, B et C	

G. Séparation et étude des peptides tryptiques du peptide Px-1 succinylé (préparé à partir du fragment NB-4) .....	133
H. Séparation et étude des peptides tryptiques du peptide Px-2 succinylé (préparé à partir de l'histone H <sub>5</sub> ) .....	152

SEPARATION ET ETUDE DES PEPTIDES PEPSIQUES

<u>DE LA FRACTION NB-4 - 3S</u> .....	166
---------------------------------------	-----

<u>DISCUSSION</u> .....	180
-------------------------	-----

<u>C O N C L U S I O N</u> .....	184
----------------------------------	-----

<u>B I B L I O G R A P H I E</u> .....	I à VII
--	---------

**I N T R O D U C T I O N**

---

## 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 répétitives, composées à la fois de DNA et d'histones, appelées "  $\nu$  bodies" (OLINS et OLINS, 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 comprenant 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 façon générale, les histones n'ont aucune spécificité de tissu ou d'espèce. Toutefois, l'histone  $H_1$  montre une certaine spécificité et une plus grande multiplicité que les autres histones. On trouve, par exemple, une histone  $H_1^0$  dans les tissus à forte activité métabolique, tels que le foie et le pancréas.

Afin d'aborder le problème des interactions DNA - histone 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 de 4 histones :  $H_4$  (DE LANGE et al., 1969 -a-b),  $H_{2B}$  (TSAI et al., 1970),  $H_3$  (DE LANGE et al., 1972),  $H_{2A}$  (SAUTIERE et al., 1972), (YEOMAN et al., 1972), (SAUTIERE et al., 1974).

Les séquences d'histone  $H_1$  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  $H_5$  spécifique de l'érythrocyte de Poulet a été entreprise dans notre laboratoire.

L'histone  $H_5$  s'apparente à l'histone  $H_1$  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  $H_1$ . Absente de la moelle et de la rate, l'histone  $H_5$  est trouvée uniquement dans les réticulocytes et les érythrocytes matures (MAZEN et al., 1972).

La détermination de la structure primaire de l'histone  $H_5$  spécifique des érythrocytes nucléés est doublement motivée, d'une part pour l'étude des interactions DNA - histone et histone - histone, d'autre part pour le rôle particulier qu'elle pourrait avoir dans la condensation de la chromatine.

TABLEAU I

RASMUSSEN (1962)	JOHNS (1964-1967)	CIBA SYMPOSIUM Londres 1974	Masse moléculaire
I	F <sub>1</sub>	H <sub>1</sub>	21.000
II <sub>b2</sub>	F <sub>2b</sub>	H <sub>2B</sub>	13.774
II <sub>b1</sub>	F <sub>2a2</sub>	H <sub>2A</sub>	14.005
III	F <sub>3</sub>	H <sub>3</sub>	15.324
IV	F <sub>2a1</sub>	H <sub>4</sub>	11.282
V	F <sub>2c</sub>	H <sub>5</sub>	20.300

Très riche en lysine

Riche en lysine

Riches en arginine

Très riche en lysine  
Spécifique des  
érythrocytes nucléés

NOMENCLATURE ET MASSES MOLECULAIRES DES HISTONES



## CHAPITRE I

---

### PREPARATION ET CARACTERISATION DE L'HISTONE H<sub>5</sub>

---

---

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

## 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.

### A - PREPARATION DE LA CHROMATINE A PARTIR DES ERYTHROCYTES ..... DE POULETS .....

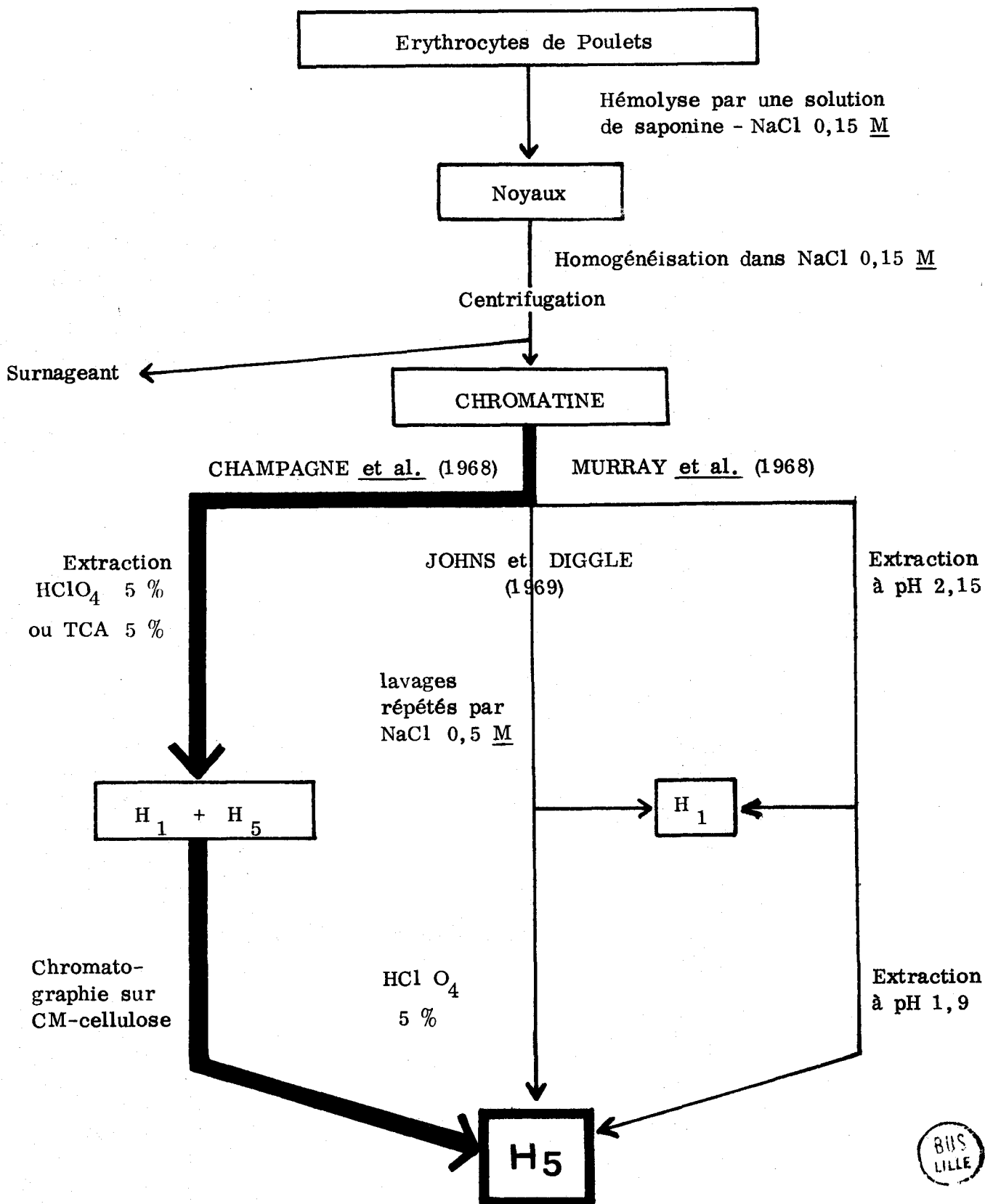
Après hémolyse des érythrocytes dans une solution de saponine, les noyaux ainsi libérés sont traités par une solution de NaCl 0,15 M, dans laquelle la chromatine est insoluble (CHAMPAGNE et al., 1968).

### B - 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 %.

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



BUS LILLE

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.

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

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

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

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

La fraction éluée par HCl 0,02 N est la fraction spécifique des érythrocytes de poulets, analogue à la fraction F<sub>2c</sub> de HNILICA (1964), ou la fraction F<sub>5</sub> de NEELIN et al. (1964), ou encore le composant 5 des  $\alpha$ -histones de BELLAIR et MAURITZEN (1964).

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

## II. COMPOSITION EN ACIDES AMINES

---

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

L'hydrolyse est réalisée à 110° C en tubes scellés sous vide, en milieu HCl 6 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 : citrate de sodium 0,2 N pH 4,25
- Tampon 3 : citrate de sodium 0,2 N + chlorure de sodium 1 M  
pH 6,28.

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

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

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

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

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

(°°) Ces valeurs témoignent du polymorphisme de l'histone H<sub>5</sub> (Gln → Arg) en position 15 dans la séquence en acides aminés, mis en évidence par GREENAWAY et MURRAY (1971) et CHAMPAGNE *et al.* (1968).

(°°°) 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.





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 2,0 .

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

### 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 la Figure 1. Ces auteurs ainsi que CHAMPAGNE et al. (1972) ont mis en évidence une microhétérogénéité au niveau du résidu 15, qui se traduit par l'obtention de deux peptides dont l'un contient de l'arginine et l'autre de la glutamine en position 15.

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

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

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

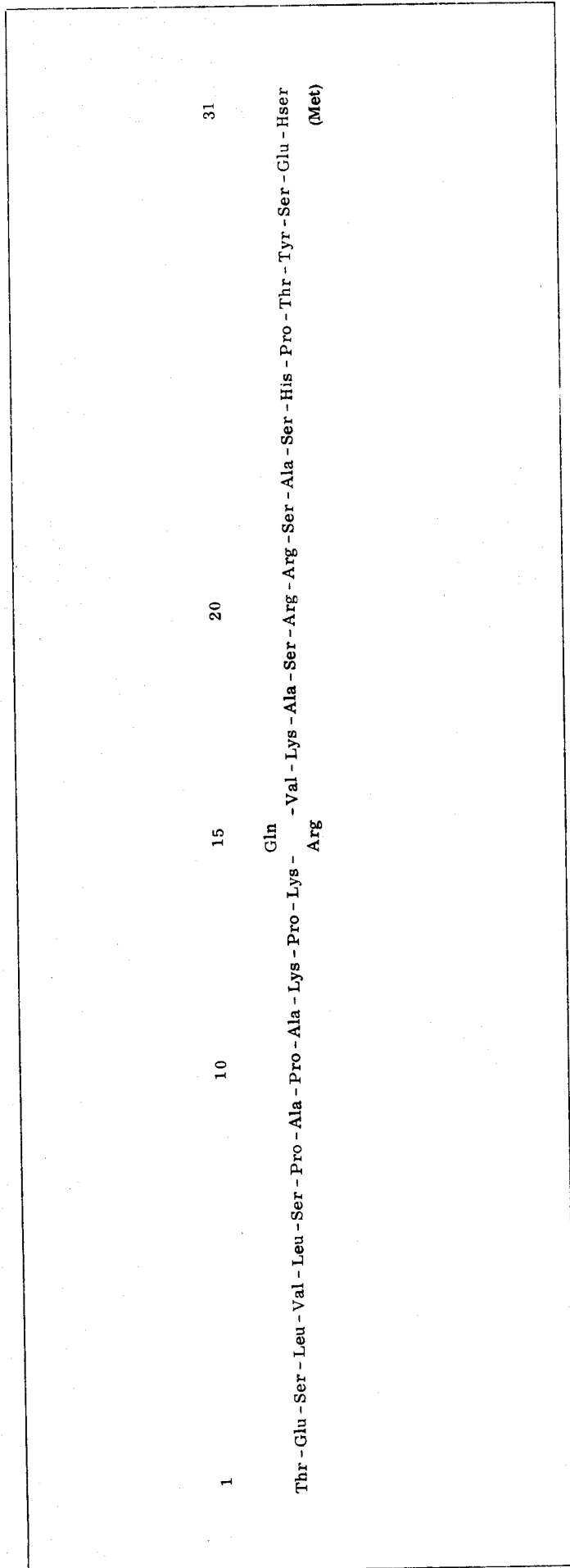


Figure 1 - Séquence en acides aminés du Fragment NH<sub>2</sub>-terminal de l'HISTONE H<sub>5</sub>, obtenu après coupure de la protéine par le Bromure de Cyanogène

( d'après GREENAWAY et al. ) (1971)



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 (Figure 2).

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

$\epsilon$ -P.T.C. par extraction dans les solvants organiques, la protéine a été succinylée puis coupée par le bromure de cyanogène. Le fragment COOH-terminal, CN - 2, seul porteur d'un groupe  $\alpha$ -aminé libre, n'a pas été séparé de la protéine non coupée. Le mélange a été directement soumis à la dégradation automatique de Edman.

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

Les ambiguïtés qui apparaissent aux positions 41, 43, 45, 46, 48, 49, 50 et 52 de la séquence ainsi déterminée (Figure 2) ont été levées grâce à l'étude des peptides tryptiques et chymotryptiques de la protéine.

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

Toutefois, l'avantage de la maléylation, qui permet d'obtenir un nombre restreint de peptides (théoriquement 22 au lieu de 63), est en partie oblitéré 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 chymotrypsine, la thermolysine, la protéase staphylococcique et plus récemment par la pepsine.

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

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

Pour cette détermination, l'hydrolyse pepsique se révèle d'un très grand intérêt, puisqu'elle libère à partir du fragment NB-4 ou de la

molécule entière d'histone H<sub>5</sub>, un fragment peptidique de 92 résidus en position COOH-terminale dans la protéine. Ce peptide est obtenu avec un excellent rendement (supérieur à 80 %) par coupure de l'unique liaison phénylalanyle présente dans l'histone H<sub>5</sub> (Phe-93).

Nous concluons 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 A c-1-a (résidus 1 à 99) qui contient la plupart des résidus hydrophobes : Val, Ile et tous les résidus aromatiques de la protéine, le fragment A c-3 (résidus 100 à 185) où sont accumulés la plupart des résidus basiques de l'histone.

Notre travail consiste en l'étude des peptides chymotrypsiques et pepsiques de l'histone H<sub>5</sub> et de son fragment NB-4.

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

Daniel KMIECIK : Etude des peptides tryptiques de la protéine native ou maléylée et de son fragment NB-4 maléylé.

Gilbert BRIAND : Etude des peptides obtenus par hydrolyse enzymatique (Protéase staphylococcique et thermolysine) et par hydrolyse en milieu acide dilué, de la protéine.



( Dégradation automatique de Edman )

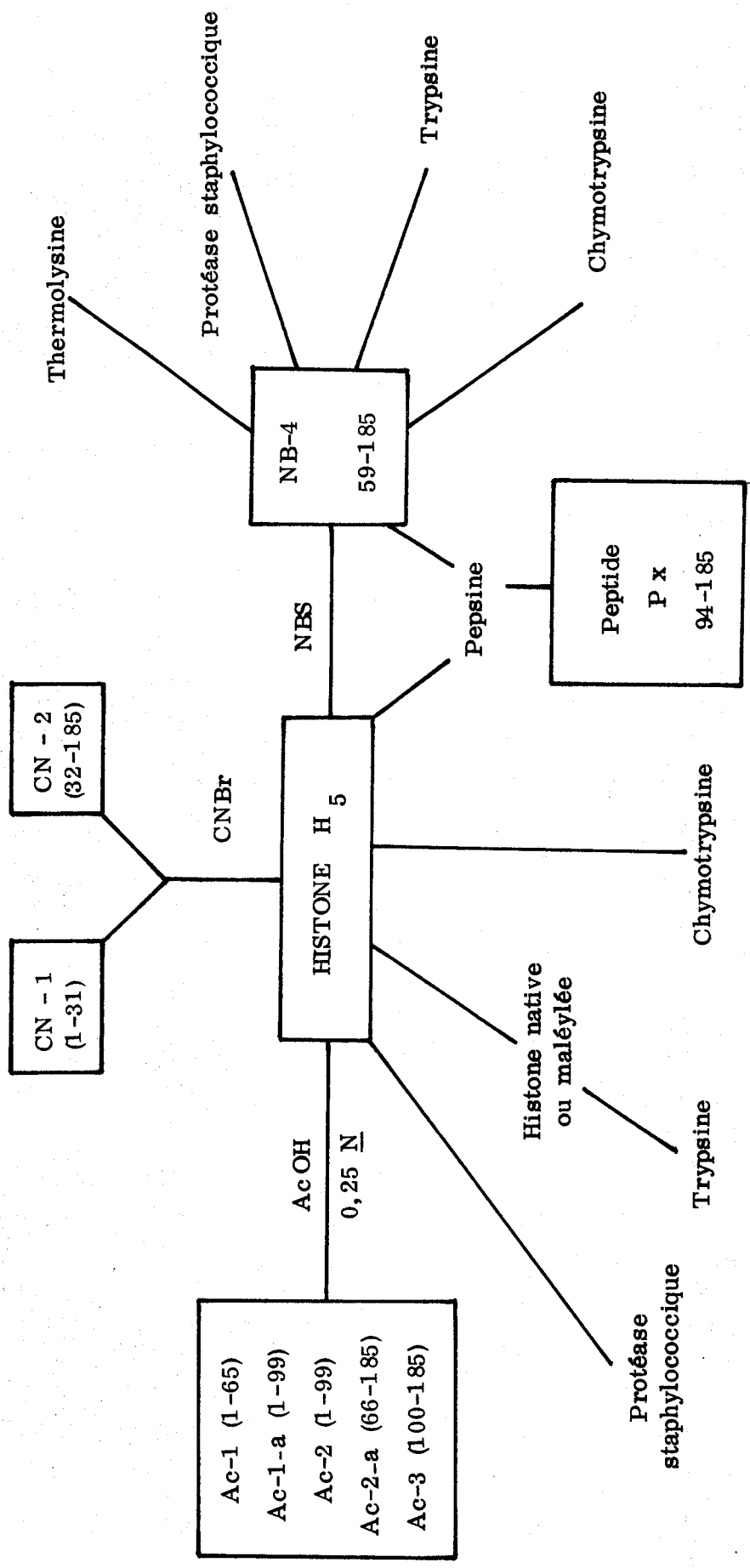


Figure 3

SCHEMA DE LA STRATEGIE ADOPTEE POUR LA DETERMINATION DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE L'HISTONE H 5

## CHAPITRE II

---

### MATERIEL ET METHODES

---

---

- I - CHOIX DES METHODES
- II - PREPARATION DU FRAGMENT COOH-TERMINAL  
NB-4
- III - HYDROLYSES ENZYMATIQUES DE L'HISTONE H<sub>5</sub>  
OU DE SON FRAGMENT NB-4
- IV - FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS
- V - CONTROLE D'HOMOGENEITE ET PURIFICATION  
DES FRACTIONS PEPTIDIQUES
- VI - ETUDE DES PEPTIDES
- VII - HYDROLYSE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> ET DE SON  
FRAGMENT NB-4 PAR LES CARBOXYPEPTIDASES

## I. CHOIX DES METHODES

---

La séquence de l'histone H<sub>5</sub> est caractérisée par la présence d'une liaison phénylalanyle, de trois liaisons tyrosyle et de huit liaisons leucyle, qui constituent autant de sites potentiels de clivage par la chymotrypsine ou la pepsine. Le nombre restreint de ces sites de clivage constituait un des avantages de l'hydrolyse chymotrypsique, à laquelle nous avons successivement soumis l'histone H<sub>5</sub> et son fragment COOH-terminal NB-4.

Mais les résultats fort limités obtenus avec cet hydrolysats nous ont amenés à utiliser la pepsine pour hydrolyser le fragment NB-4.

L'acquisition essentielle de cette méthode d'hydrolyse est l'obtention du peptide COOH-terminal P x (92 résidus), qui peut également être obtenu par hydrolyse pepsique de la protéine.

L'étude des peptides chymotrypsiques et pepsiques de l'histone H<sub>5</sub> ou de son fragment NB-4 a fourni un certain nombre de recoupements avec les peptides tryptiques et thermolysiques, recoupements nécessaires pour la détermination de la séquence en acides aminés de l'histone H<sub>5</sub>.

## II. PREPARATION DU FRAGMENT COOH - TERMINAL NB-4

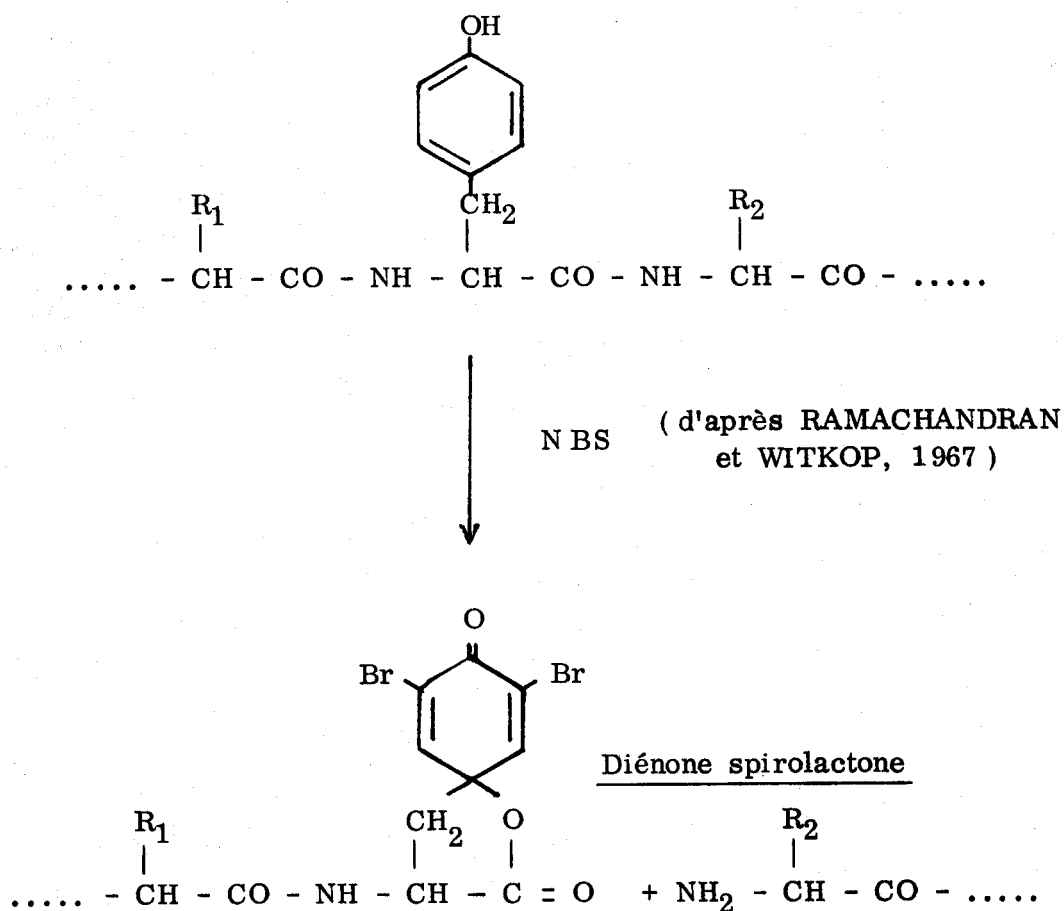
---

Elle est réalisée au laboratoire de Mademoiselle CHAMPAGNE à Strasbourg.

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

### A - PRINCIPE

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



## B - COUPURE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> PAR LA N-BROMOSUCCINIMIDE (NBS)

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

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

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

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

La solution, diluée dix fois, est ensuite lyophilisée.

## C - SEPARATION DES PRODUITS DE CLIVAGE

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

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

## D - DISCUSSION

.....

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

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

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

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

Le fragment NB-4 (127 résidus) se caractérise par sa richesse en acides aminés basiques qui constituent 40 % de la totalité des résidus.

Il renferme le seul résidu de phénylalanine et les 3 résidus d'acide aspartique présents dans la molécule d'histone H<sub>5</sub>.

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

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

L'obtention du fragment NB-4 présente un grand avantage : sa préparation est aisée, et il est obtenu avec un rendement de 50 %.

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
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	N.D. (°)	-	N.D. (°)	N.D. (°)
Lysine .....	42	3	2	1	36
Arginine .....	21 - 20	3 - 2	3	-	15
Nombre total 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.

COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS DES FRAGMENTS OBTENUS

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



Situé en position COOH-terminale de la protéine, il ne renferme plus que les 2/3 des résidus de la molécule.

Son isolement est donc une étape déterminante dans l'étude de la structure primaire de l'histone H<sub>5</sub>, puisqu'il va désormais constituer le matériel de base pour les différentes hydrolyses enzymatiques nécessaires à la détermination de la séquence COOH-terminale de la protéine.



### III. HYDROLYSES ENZYMATIQUES DE L'HISTONE H<sub>5</sub>

---

#### OU DE SON FRAGMENT NB - 4

---

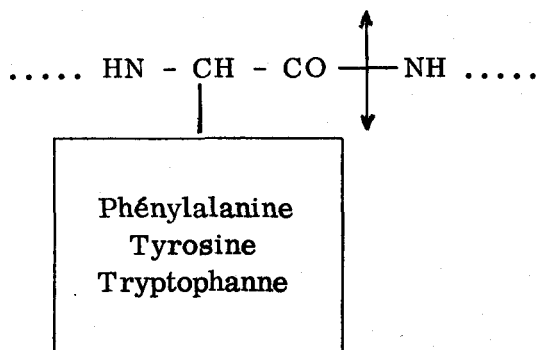
#### A - HYDROLYSE PAR LA CHYMOTRYPSINE

---

##### 1. Principe

---

La spécificité primaire de la chymotrypsine est restreinte aux liaisons peptidiques dans lesquelles sont engagés les groupements  $\alpha$ -COOH d'acides aminés aromatiques :



Cependant, il faut signaler une spécificité d'action plus large de l'enzyme, au niveau des liaisons leucyle.

L'histone H<sub>5</sub> renferme un résidu de phénylalanine, 3 résidus de tyrosine et 8 résidus de leucine.

L'utilisation de la chymotrypsine devait donc nous permettre d'obtenir un nombre restreint de peptides (13 en théorie). A partir du fragment NB-4, ce nombre théorique n'est que de 8, puisque le résidu de phénylalanine et 6 résidus de leucine constituent dans ce fragment autant de sites potentiels de clivage par la chymotrypsine.

## 2. Conditions d'hydrolyse

---

L'hydrolyse par la chymotrypsine est réalisée à 37° C en milieu bicarbonate d'ammonium 0,1 M pH 8,0 , sous agitation constante.

L'enzyme (  $\alpha$ -chymotrypsine EC 3.4.4.5 , Worthington WCDS) est ajouté en une seule fois.

Nous avons utilisé des conditions de temps et de concentration en enzyme différentes pour l'histone native et le fragment NB-4.

### a) Hydrolyse chymotrypsique de l'histone native

L'histone H<sub>5</sub> (213,15 mg) est dissoute dans 20 ml d'eau distillée.

20 ml de bicarbonate d'ammonium 0,2 M sont ensuite ajoutés, de façon à obtenir une concentration finale en bicarbonate de 0,1 M.

Le pH est ajusté à 8,0 à l'aide de HCl 3 N, et la protéine est hydrolysée pendant une heure par la chymotrypsine.

Le rapport enzyme / substrat est de 1/50 en poids.

### b) Hydrolyse chymotrypsique du fragment NB-4

Etant donné le nombre important de petits peptides obtenus à partir de la protéine, dans les conditions précitées, nous avons volontairement limité l'action de la chymotrypsine sur le fragment NB-4.

Notre but était d'obtenir un nombre restreint de peptides, plus longs, afin d'établir des recoupements avec les peptides chymotrypsiques de l'histone native.

106,4 mg de fragment NB-4 (soit environ 7,5 micromoles) sont dissous dans 7,5 ml d'eau distillée.

7,5 ml de bicarbonate d'ammonium 0,2 M sont ajoutés, pour obtenir une concentration finale en bicarbonate de 0,1 M.

Le pH est ajusté à 8,0 à l'aide de HCl N, et le fragment NB-4 est hydrolysé pendant 20 minutes par la chymotrypsine.

Le rapport enzyme / substrat est de 1/250 en poids.

Dans les 2 cas, l'arrêt de l'hydrolyse est obtenu en abaissant le pH à 3,5 à l'aide de HCl 3 N.

Les hydrolysats, restés limpides, sont alors lyophilisés.

## B - HYDROLYSE PAR LA PEPSINE

.....

### 1. Principe

-----

La pepsine est un enzyme protéolytique, qui hydrolyse du côté NH<sub>2</sub>- ou COOH-terminal, les liaisons peptidiques dans lesquelles sont impliqués des résidus de phénylalanine, tyrosine ou leucine, essentiellement.

La coupure est facilitée par la présence de chaînes latérales hydrophobes de chaque côté de la liaison.

Le résidu de phénylalanine, les 3 résidus de tyrosine et les 8 résidus de leucine, présents dans l'histone H<sub>5</sub>, constituent donc 12 sites potentiels majeurs de coupure par la pepsine. Ces sites sont au nombre de 8 pour le fragment NB-4.

### 2. Conditions d'hydrolyse

-----

Plusieurs essais d'hydrolyse, en utilisant des températures, des concentrations en enzyme et des temps différents, nous ont permis de déterminer les conditions optimales d'action de la pepsine sur l'histone H<sub>5</sub> et sur le fragment NB-4.

L'hydrolyse est effectuée pendant 2 heures, à 37° C, en milieu acide formique à 5 %.

L'enzyme (Pepsine EC 3.4.4.1 SIGMA) est ajouté en une seule fois, et le rapport enzyme / substrat est de 1 / 50 en poids.

L'arrêt de l'hydrolyse est obtenu par dilution du mélange réactionnel avec de l'eau distillée, suivie d'une lyophilisation, ou par élévation du pH à 6,5 avec de la pyridine.

Nous avons hydrolysé, dans ces conditions, respectivement 200 mg d'histone H<sub>5</sub> , et 83,5 mg de fragment NE-1.

#### IV. FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS

---

##### A - CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION

---

La chromatographie de gel-filtration sur colonne de Sephadex G-25 F ou G-50 F (195 x 2,5 cm), équilibrée et éluée avec une solution de HCl 0,01 N, a été utilisée pour le fractionnement des peptides chymotrypsiques et pepsiques de l'histone H<sub>5</sub> ou du fragment NB-4.

L'hydrolysate lyophilisé est repris par 5 ml d'acide acétique à 10 %. Le matériel insoluble est éliminé par centrifugation et le surnageant limpide est déposé au sommet de la colonne.

Un débit constant est maintenu à l'aide d'une pompe péristaltique, et des fractions sont collectées automatiquement.

Les peptides sont détectés dans l'éluat par lecture des densités optiques de chaque fraction, à 220 ou 230 nm.

##### B - CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS

---

Certaines fractions peptidiques obtenues en chromatographie de gel-filtration, sont très hétérogènes : elles correspondent généralement à des peptides de petite taille moléculaire. Ces fractions ont donc été soumises à une chromatographie d'échange d'ions, selon la méthode mise au point par SAUTIERE et al. (1970).

Cette technique utilise une résine cationique de type Dowex 50 x 2 (résine Chromobeads P Technicon) avec une colonne de dimensions 110 x 0,635 cm.

Les fractions peptidiques sont évaporées à sec et dissoutes dans 3 ml d'acide formique à 10 %.

La fraction insoluble est éliminée par centrifugation, et le surnageant limpide est déposé au sommet de la colonne de Chromobeads P, thermostatée à 60° C, et équilibrée en tampon pyridine - acide formique 0,1 M pH 2,9.

Un débit constant de 33 ml/heure est maintenu à l'aide d'une pompe MILTON-ROY, et des fractions de 5,5 ml sont collectées automatiquement toutes les 10 minutes.

Les peptides sont élués par un gradient continu, réalisé avec des tampons volatils à base de pyridine, de pH et de molarité croissants.

Le pH croît de 2,9 à 5,0, tandis que la molarité en pyridine croît de 0,1 M à 2 M.

Ce gradient est réalisé à l'aide d'un appareil VARIGRAD à 9 cellules. Le tableau V indique la composition de chacune de ces cellules.

Pour le fractionnement des peptides chymotrypsiques du fragment NB-4, nous avons utilisé une hauteur de résine moins importante (63 x 0,635 cm), avec un gradient moins long (100 ml dans chaque cellule).

Après le passage du gradient, les peptides fortement basiques sont élués de la colonne par un tampon pyridine 2 M - acide acétique, de pH 5,0, pendant 24 heures.

Le repérage des peptides dans l'éluat, s'effectue par la réaction à la ninhydrine et la réaction de SAKAGUCHI, à l'aide d'une chaîne TECHNICON spécialement équipée.

TABLEAU V

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



## V.      CONTRÔLE D'HOMOGENEITE ET PURIFICATION

---

### DES FRACTIONS PEPTIDIQUES

---

#### A -    CONTRÔLE D'HOMOGENEITE ET PURIFICATION DES FRACTIONS ..... OBTENUES PAR CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION .....

Le contrôle d'homogénéité des fractions obtenues par chromatographie de gel-filtration sur colonne de Sephadex, est réalisé en électrochromatographie sur papier WHATMAN 3 MM, préalablement lavé à l'acide acétique à 10 % pendant 48 heures.

Les fractions correspondant à chaque pic des diagrammes d'élution, sont rassemblées, évaporées à sec et reprises par 2 ml d'acide acétique à 10 %. Elles sont alors soumises à une chromatographie suivie d'une électrophorèse.

#### 1.    Chromatographie

---

La chromatographie descendante est effectuée pendant 18 heures dans le solvant n-butanol-pyridine-acide acétique-eau (15 : 10 : 3 : 12) (v : v).

Le rouge de phénol, qui migre avec le front du solvant, est utilisé comme témoin externe de migration.

#### 2.    Electrophorèse

---

L'électrophorèse est réalisée pendant 90 minutes dans le tampon pyridine - acide acétique - eau (1 : 10 : 289) (v : v), de pH 3,6, sous une tension de 2.200 volts.



L'appareil utilisé est un Electrophorator GILSON (modèle D, 5.000 volts).

Un mélange d'acides aminés (acide aspartique, tyrosine, arginine) sert de témoin externe de migration électrophorétique.

### 3. Révélation des électrochromatogrammes

Les peptides sont localisés sur l'électrochromatogramme par coloration avec le réactif à la ninhydrine - cadmium (LIU et al., 1965).

Des colorations spécifiques peuvent être utilisées : la réaction à la phénanthrène-quinone est spécifique des peptides contenant de l'arginine (YAMADA et al., 1966), (EASLEY et al., 1969). Sous lumière ultraviolette, à 366 nm, les peptides contenant de l'arginine donnent une tache de fluorescence bleutée sur un fond bleu foncé. Cette coloration a l'avantage d'être très sensible et très stable.

Les peptides contenant de l'histidine ou de la tyrosine, sont révélés par la réaction de PAULY.

### 4. Contrôle de pureté par électrophorèse en gel de polyacrylamide

Certaines fractions peptidiques, obtenues par chromatographie de gel-filtration, ont été également soumises à un contrôle de pureté, par électrophorèse en gel de polyacrylamide.

Cette méthode s'applique plus spécialement aux fractions peptidiques éluées en premier des colonnes de Sephadex, et renfermant des peptides de taille moléculaire relativement élevée.

La technique utilisée est celle de PANYIM et CHALKLEY (1969) sur gels à 17 % d'acrylamide (120 x 5 mm), en milieu urée 2,5 M à pH 2,7.

La migration est conduite pendant 1 à 4 heures, sous une intensité de 1,5 mA par tube, en présence de témoins internes.

Les gels sont colorés à l'Amido schwarz 10 B , et décolorés par agitation douce dans le mélange acide acétique - éthanol - eau (1 : 2 : 7) (v : v).

## 5. Purification des fractions hétérogènes

---

### a) Purification par chromatographie de gel-filtration

Les fractions obtenues par chromatographie de gel-filtration des hydrolysats chymotrypsiques de l'histone H<sub>5</sub> et du fragment NB-4, sont très hétérogènes.

Elles ont été soumises à un nouveau fractionnement par chromatographie de gel-filtration sur colonne de Sephadex G-25 F ou G-50 F (195 x 2,5 cm), équilibrée et éluée avec HCl 0,01 N.

### b) Purification sur papier

Les fractions rechromatographiées renfermant plusieurs peptides (visualisés par plusieurs taches en électrochromatographie) sont purifiées par chromatographie ou électrophorèse préparative, ou par les 2 méthodes associées, sur papier WHATMAN 3 MM préalablement lavé à l'acide acétique à 10 % pendant 48 heures.

Les conditions de migration sont les mêmes que pour l'électrochromatographie.

Les peptides repérés sont élués avec de l'acide acétique à 10 %, évaporés à sec et repris dans un volume déterminé d'acide acétique à 10 % (1 ou 2 ml).

**B - CONTRÔLE D'HOMOGENEITE ET PURIFICATION DES FRACTIONS**  
.....  
**OBTENUES PAR CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS**  
.....

Les fractions correspondant à chaque pic du diagramme d'éluion sont rassemblées, évaporées à sec et reprises par 1 ou 2 ml d'acide acétique à 10 %.

Le contrôle d'homogénéité est réalisé pour chaque fraction, en électrochromatographie sur papier WHATMAN 3 MM dans les mêmes conditions que celles précitées (voir paragr. V : A. 1 et 2).

Les fractions hétérogènes sont purifiées par chromatographie ou électrophorèse préparative, ou les 2 méthodes associées, sur papier WHATMAN 3 MM, dans les mêmes conditions que celles précitées (voir paragr. V : 5-b et V : A. 1 et 2).

## VI. ETUDE DES PEPTIDES

---

### A - COMPOSITION EN ACIDES AMINÉS

---

La composition en acides aminés des peptides est établie à l'aide d'un Autoanalyseur d'acides aminés Multichrom-Beckman, équipé d'un intégrateur Infotronics type CRS 210.

Les peptides sont hydrolysés pendant 24 heures, et éventuellement 72 heures, à 110° C en tubes scellés sous vide, en milieu HCl 6 N additionné d'une goutte d'une solution de phénol à 1 % pour éviter une dégradation excessive de la tyrosine.

Chaque hydrolysat est ensuite dilué au demi avec de l'eau distillée, évaporé à sec et repris par 1 ml d'un tampon citrate de sodium de pH 2,2, contenant 100 nanomoles de norleucine par ml.

0,8 ml sont déposés au sommet de la colonne (0,9 x 54 cm) garnie de résine M-82 Beckman et thermostatée à 55° C.

Les acides aminés sont élués selon un procédé adopté de MOORE et STEIN, à l'aide de 3 tampons citrate de sodium (0,2 N, 0,2 N et 1,2 N en sodium) de pH croissant (pH 3,22 ; pH 4,25 et pH 6,28).

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

---

La dansylation des peptides est effectuée selon le protocole de GRAY et HARTLEY (1963 - a).

Les dansyl-peptides sont hydrolysés pendant 18 heures à 105° C en milieu HCl 6 N.

Lorsque le peptide contient de la sérine, la durée de l'hydrolyse est limitée à 16 heures, pour éviter la dégradation de cet acide aminé.

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, soit en chromatographie bidimensionnelle avec les solvants I et II préconisés par GROS et LABOUESSE (1969).

La chromatographie bidimensionnelle est particulièrement indiquée pour l'identification non ambiguë de l'alanine et de la lysine.

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

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

La carboxypeptidase C présente le grand intérêt de libérer de façon récurrente, à partir de l'extrémité COOH-terminale du peptide, tous les acides aminés, acides, basiques ou neutres, y compris la proline, qui constitue pour les carboxypeptidases A et B, un obstacle, et limite donc leur action.

Pour les carboxypeptidases A et B, l'hydrolyse est effectuée à 40° C, en milieu N-éthyl-morpholine 0,2 M pH 8,5 ou bicarbonate d'ammonium 0,1 M pH 8,0, avec un rapport enzyme / substrat d'environ 1/20 en poids.

L'hydrolyse par la carboxypeptidase C est réalisée à 30° C en milieu citrate de sodium trisodique 0,05 M pH 5,3, avec une concentration en enzyme moins importante (1/100 à 1/500).

Le ou les acides aminés libérés sont identifiés avec l'analyseur d'acides aminés.

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

Les peptides sont dégradés de façon récurrente, à partir de leur extrémité  $\text{NH}_2$ -terminale, par la méthode de Edman (1956).

Après chaque cycle de dégradation, l'acide aminé libéré peut être identifié directement sous forme de son dérivé PTH (phénylthiohydantoïne de l'acide aminé), par chromatographie sur couche mince de gel de silice (JEPPSSON et SJÖQUIST, 1967).

L'association de la dansylation à la dégradation de Edman, selon le protocole de GRAY et HARTLEY (1963 - b), permet d'identifier l'acide aminé en position  $\text{NH}_2$ -terminale, dans le peptide résiduel apparaissant après chaque cycle de dégradation.

L'acide aminé libéré après chaque cycle de dégradation, peut encore être identifié indirectement, en déterminant la composition en acides aminés du peptide résiduel (méthode soustractive) (HIRS et al., 1960). Cette méthode soustractive est employée généralement, lorsque la présence de résidus d'isoleucine, de leucine et de valine dans un même peptide, rend difficile leur identification sous forme de dérivés dansylés, ces dérivés étant mal séparés.

Les étapes de la dégradation de Edman sont résumées dans le tableau VI.

## TABLEAU VI

## SCHEMA DES ETAPES DE LA DEGRADATION DE EDMAN

Réaction de couplage avec le P.I.T.C. (phénylisothiocyanate)



Elimination de l'excès de P.I.T.C.



Cyclisation et coupure par l'acide trifluoroacétique (TFA)



Formation de dérivés 2-anilinothiazolinone



HCl 80° C 10 mn

Phénylthiohydantoïne de l'acide aminé

Extraction par l'acétate d'éthyle

Phase organique  
.....

Phase aqueuse  
.....

Séparation des phénylthiohydantoïne -  
acides - aminés par chromatographie  
sur couche mince de gel de silice à  
l'aide des systèmes solvants D et E :

- Solvant E (EDMAN et SJÖQUIST,  
1956)

acétate de butyle / eau / formamide /  
acide propionique (97/3/4/3) (v : v)

- Solvant D

La plaque est trempée dans un mé-  
lange acétone - formamide - xylène.

- Phénylthiohydantoïne - arginine  
- Phénylthiohydantoïne - histidine

Electrophorèse à pH 3,6

Identification sur papier :

■ Réaction de SAKAGUCHI ou réac-  
tion à la phénanthrène-quinone  
( détection de l' ARGININE )

■ Réaction de PAULY  
( détection de l' HISTIDINE )

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

---

PAR LES CARBOXYPEPTIDASES

---

La séquence COOH-terminale de l'histone H<sub>5</sub> a été établie par une étude cinétique de l'hydrolyse de la protéine par les carboxypeptidases A, B et C.

Une étude identique a été effectuée parallèlement sur le fragment NB-4.

Les conditions d'hydrolyse sont rassemblées dans le tableau VII.

Le ou les acides aminés libérés, sont identifiés sur l'auto-analyseur Beckman.



TABLEAU VII

ENZYME	SUBSTRAT	RAPPORT ENZYME / SUBSTRAT	TAMPON	pH	TEMPE- RATURE	DUREE D'HYDROLYSE
Cp B + Cp A	NB-4	1 / 20	N.E.M. 0,2 <u>M</u> (*)	8,5	40° C	Cinétique d'hydrolyse
Cp B	H 5 NB-4	1 / 20 1 / 20	N.E.M. 0,2 <u>M</u> (*)	8,5	40° C	3 heures 6 heures
Cp C	H 5	1 / 100 1 / 500	Citrate de sodium trisodique 0,05 <u>M</u>	5,3	30° C	Cinétique d'hydrolyse

(\*) N.E.M. : N - Ethyl - Morpholine

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

PAR LES CARBOXYPEPTIDASES A, B et C



## CHAPITRE III

---

### DETERMINATION DE L'EXTREMITE COOH - TERMINALE

---

---

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

---

---

#### I - CHOIX DES METHODES

#### II - RESULTATS

#### III - CONCLUSIONS

## I. CHOIX DES METHODES

---

GREENAWAY *et al.* (1971) et CHAMPAGNE *et al.* (1968) ont identifié la lysine à l'extrémité COOH-terminale de l'histone H<sub>5</sub>.

Nous avons voulu aller au-delà de cette simple identification, en étudiant la cinétique de l'hydrolyse de l'histone H<sub>5</sub> et de son fragment NB-4, par les carboxypeptidases A, B et C.

Cette étude cinétique avait donc pour but de déterminer la séquence COOH-terminale de l'histone H<sub>5</sub>, de façon à pouvoir identifier dans les hydrolysats tryptiques et thermolysiques, ainsi que dans l'hydrolysats tryptique du peptide Px succinylé, le peptide situé en position COOH-terminale dans la protéine.

Les conditions d'hydrolyse de l'histone H<sub>5</sub> et du fragment NB-4 par les carboxypeptidases, sont présentées dans les tableaux VIII et IX.

Le ou les acides aminés libérés sont identifiés sur auto-analyseur Beckman.

## II. R E S U L T A T S

---

### A. HYDROLYSE DU FRAGMENT NB-4 PAR LES CARBOXYPEPTIDASES

#### A ET B

La carboxypeptidase A a été ajoutée après 2 heures d'hydrolyse par la carboxypeptidase B.

Les résultats de la cinétique d'hydrolyse, effectuée pendant 4 heures, sont présentés dans le tableau VIII.

- Après 10 minutes d'hydrolyse par la carboxypeptidase B, il apparaît déjà de la lysine.
- Une hydrolyse de 2 heures par cette même carboxypeptidase, libère 1,82  $\mu$ mole de lysine par  $\mu$ mole de fragment NB-4, ainsi que des traces d'arginine, d'alanine et de sérine.
- L'addition de carboxypeptidase A fait apparaître des taux croissants de ces acides aminés, notamment ceux de lysine et d'arginine.

### B. HYDROLYSE DE L'HISTONE<sub>5</sub> ET DU FRAGMENT NB-4 PAR LA CARBOXY- PEPTIDASE B

Les résultats préliminaires obtenus par hydrolyse du fragment NB-4 par les carboxypeptidases A et B, suggèrent que la séquence C-terminale est constituée par deux résidus de lysine : - Lys - Lys (OH).

TABLEAU VIII

Acides aminés libérés	CINETIQUE D'HYDROLYSE DU FRAGMENT NB-4 PAR LES CARBOXYPEPTIDASES A ET B (*)									
	Cp B 10'	Cp B 20'	Cp B 30'	Cp B 60'	Cp B 120'	Cp B + Cp A 10'	Cp B + Cp A 20'	Cp B + Cp A 30'	Cp B + Cp A 60'	Cp B + Cp A 120'
S E R		1,725 (0,03)	1,929 (0,04)	1,735 (0,03)	2,346 (0,04)	3,106 (0,06)	3,918 (0,07)	4,481 (0,08)	6,637 (0,12)	9,471 (0,18)
A L A		0,428 (0,008)	1,006 (0,019)	1,216 (0,023)	2,567 (0,048)	6,200 (0,12)	8,289 (0,16)	10,767 (0,20)	16,369 (0,31)	23,415 (0,44)
L Y S	8,894 (0,17)	79,977 (1,51)	81,537 (1,54)	89,365 (1,68)	96,434 (1,82)	131,581 (2,48)	132,202 (2,49)	135,93 (2,56)	143,38 (2,70)	152,693 (2,88)
A R G		6,869 (0,13)	6,355 (0,12)	9,328 (0,18)	11,743 (0,22)	16,769 (0,32)	19,229 (0,36)	21,478 (0,40)	28,168 (0,53)	41,664 (0,79)

CINETIQUE D'HYDROLYSE DU FRAGMENT NB-4 PAR LES CARBOXYPEPTIDASES A ET B (\*)

(\*) Les résultats sont exprimés en nanomoles d'acides aminés libérés.  
Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de moles d'acides aminés libérés par mole de NB-4.



Cette hypothèse peut être confirmée par l'utilisation de la carboxypeptidase B seule :

Les résultats sont rassemblés dans le tableau IX.

- 1° Une hydrolyse de 3 heures de l'histone H<sub>5</sub> par la carboxypeptidase B libère 2,11  $\mu$ moles de lysine par  $\mu$ mole de protéine, et 0,69  $\mu$ mole d'arginine.
- 2° Une hydrolyse de 6 heures de l'histone H<sub>5</sub> par la carboxypeptidase B libère 2,5  $\mu$ moles de lysine, et 1,84  $\mu$ mole d'arginine par  $\mu$ mole de protéine, ainsi que des traces de sérine et d'alanine.
- 3° Une hydrolyse de 6 heures du fragment NB-4 par la carboxypeptidase B libère 2,63  $\mu$ moles de lysine et 1,47  $\mu$ mole d'arginine par  $\mu$ mole de NB-4, ainsi que des traces de sérine et d'alanine.

#### C. HYDROLYSE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> PAR LA CARBOXYPEPTIDASE C

La carboxypeptidase C libère tous les acides aminés : neutres, acides ou basiques, à partir de l'extrémité COOH-terminale d'une protéine ou d'un peptide.

Les résultats des cinétiques d'hydrolyse, effectuées pendant 6 heures, en utilisant deux rapports enzyme / substrat différents (1 / 100 et 1 / 500), sont rassemblés dans le tableau IX.

##### 1. Rapport enzyme / substrat : 1 / 100

Une hydrolyse de 30 minutes de l'histone H<sub>5</sub> par la carboxypeptidase C libère 1,77  $\mu$ mole de lysine par  $\mu$ mole de protéine, ainsi que des traces de sérine, proline, alanine et arginine.

TABLEAU IX

	Cp B 3 heures H <sub>5</sub>	Cp B 6 heures		H <sub>5</sub>			
		H <sub>5</sub>	NB - 4	Cp C 30 mn Enzyme/Substrat = 1 / 100	Cp C	Enzyme/Substrat = 1 / 500	
				30 mn	30 mn	120 mn	360 mn
S E R		6,898 (0,12)	6,641 (0,12)	11,4 (0,2)		2,661 (0,05)	16,662 (0,29)
P R O				10,184 (0,18)			11,352 (0,20)
A L A		7,518 (0,13)	12,605 (0,22)	13,280 (0,23)			19,076 (0,33)
L Y S	120,132 (2,11)	144,157 (2,54)	149,341 (2,63)	100,760 (1,77)	17,472 (0,31)	58,345 (1,02)	119,256 (2,09)
A R G	39,289 (0,69)	104,659 (1,84)	83,318 (1,47)	10,451 (0,18)		5,454 (0,1)	traces

HYDROLYSE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> ET DU FRAGMENT NB - 4 PAR LES CARBOXYPEPTIDASES F OU C (\*)



(\*) Les résultats sont exprimés en nanomoles d'acides aminés libérés.  
Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de moles d'acides aminés libérés par mole de protéine ou de peptide.

2. Rapport enzyme / substrat : 1 / 500

- Après 30 minutes d'hydrolyse, il apparaît déjà des traces de lysine.
- Après 2 heures d'hydrolyse, 1  $\mu$ mole de lysine est libérée par  $\mu$ mole de protéine, ainsi que des traces de sérine et d'arginine.
- Après 6 heures d'hydrolyse, il y a libération de 2  $\mu$ moles de lysine, ainsi que des traces de sérine, proline, alanine et arginine.



### III. C O N C L U S I O N S

---

Les résultats des cinétiques d'hydrolyse de l'histone H<sub>5</sub> et de son fragment NB-4 par les carboxypeptidases A, B et C, nous permettent d'affirmer sans ambiguïté, que la séquence COOH-terminale de la protéine est : Lys - Lys (OH) .

D'autre part, ces résultats suggèrent que le voisinage immédiat de cette séquence COOH-terminale est constitué par les acides aminés suivants : arginine, alanine, lysine, sérine et proline , dont l'ordre reste à préciser.

Toutefois, l'hydrolyse de l'histone H<sub>5</sub> par la carboxypeptidase C libère des taux croissants de ces 5 acides aminés, tandis que la proline n'apparaît pas lors de l'hydrolyse de la protéine ou du fragment NB-4 par la carboxypeptidase A.

Ce résidu d'acide aminé constitue en effet un obstacle à l'action de cette exopeptidase.

Nous proposons donc, pour l'histone H<sub>5</sub>, la séquence COOH-terminale suivante :

185

..... (Pro, Ser), (Lys, Ala, Arg) - Lys - Lys (OH)

L'étude des peptides thermolysiques de la protéine ou du fragment NB-4, devrait nous permettre de confirmer cette séquence.

TABLEAU X

---

H<sub>5</sub> (résidus 1 à 185) (Cp B + Cp A ; Cp C) : ..... (Pro, Ser), (Lys, Ala, Arg) - Lys - Lys (OH)  
 185

NB-4 (résidus 59 à 185) (Cp B + Cp A) : ..... (Ser, Lys, Ala, Arg) - Lys - Lys (OH)  
 185

---

SEQUENCES COOH - TERMINALES DE L'HISTONE H<sub>5</sub> ET DE SON FRAGMENT NB-4,

---

OBTENUES PAR HYDROLYSE AVEC LES CARBOXYPEPTIDASES A, B ET C

---



CHAPITRE IV

---

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

---

---

PAR LA CHYMOTRYPSINE

---

---

I - HYDROLYSE CHYMOTRYPSIQUE DE L'HISTONE H<sub>5</sub>  
SEPARATION ET ETUDE DES PEPTIDES.

II - HYDROLYSE CHYMOTRYPSIQUE DU FRAGMENT NB-4  
SEPARATION ET ETUDE DES PEPTIDES.

III - D I S C U S S I O N . -



## I. HYDROLYSE CHYMOTRYPSIQUE DE L'HISTONE H<sub>5</sub>

---

L'histone H<sub>5</sub> est hydrolysée par la chymotrypsine pendant une heure à 37° C et à pH 8,0.

Le milieu réactionnel reste limpide pendant toute la durée de l'hydrolyse.

### A - FRACTIONNEMENT DES PEPTIDES

---

#### 1. Chromatographie de gel-filtration

---

Le diagramme d'élution de l'hydrolysate chymotrypsique de l'histone H<sub>5</sub>, fractionné par chromatographie de gel-filtration sur colonne de Sephadex G-25 (195 x 2,5 cm), équilibrée et éluée avec HCl 0,01 N, est présenté dans la Figure 4.

Comme le montre cette figure, la chromatographie sur Sephadex G-25 ne permet pas d'obtenir un fractionnement satisfaisant de l'hydrolysate chymotrypsique de la protéine.

Toutefois, il apparaît une amorce de séparation. 4 fractions peptidiques sont ainsi obtenues. Elles sont désignées par un chiffre correspondant à leur ordre d'élution de la colonne, suivi de la lettre S pour Sephadex : fractions 1 S, 2 S, 3 S et 4 S.

CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION DE L'HYDROLYSAT CHYMOTRYPSIQUE DE L'HISTONE H<sub>5</sub>,

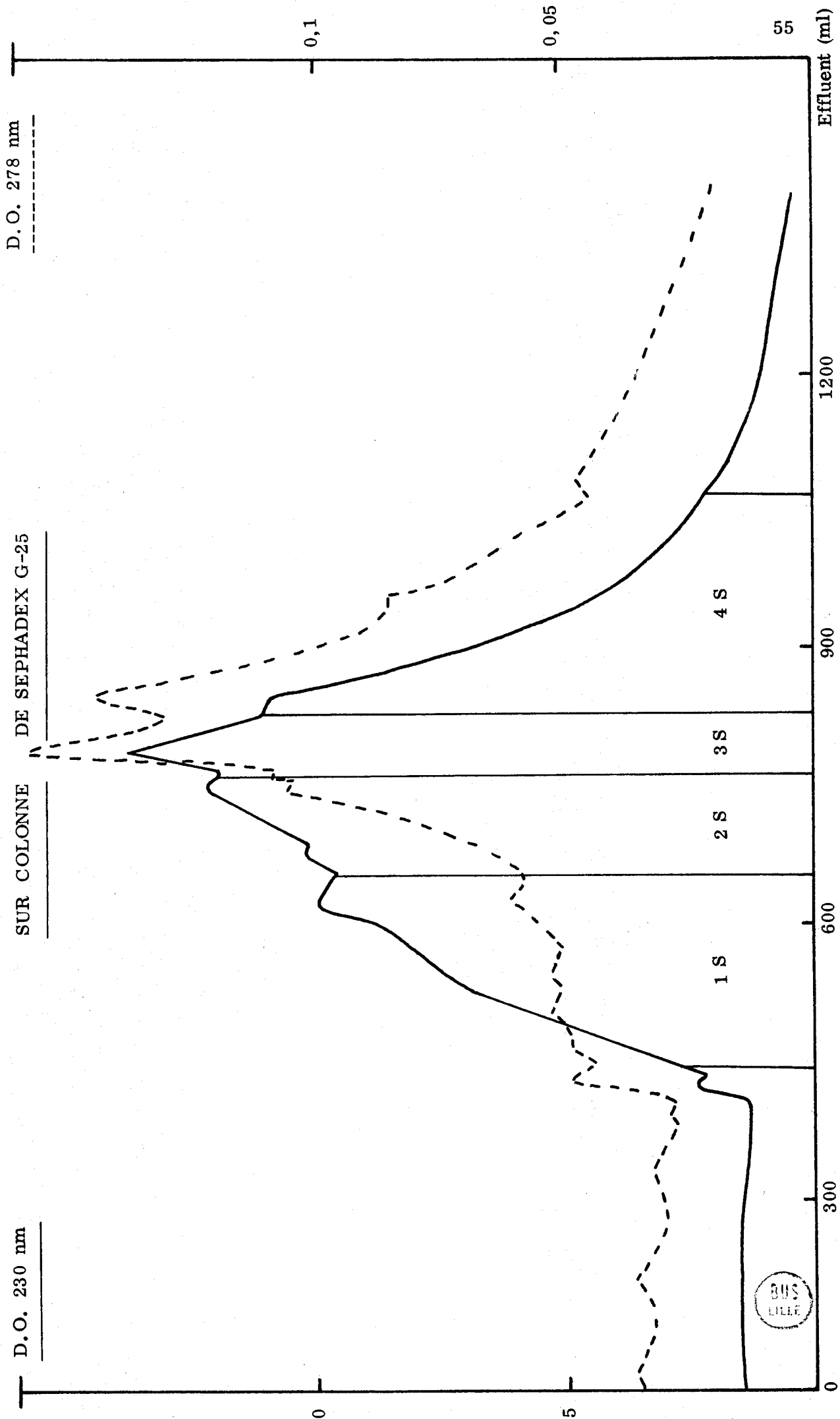


Figure 4

Chacune de ces fractions, hétérogène, est soumise à un nouveau fractionnement par chromatographie de gel-filtration sur colonne de Sephadex G-25 (fractions 2 S, 3 S et 4 S) ou G-50 (fraction 1 S), équilibrée et éluée avec HCl 0,01 N.

Les diagrammes d'élution sont présentés dans la Figure 5.

Les différentes fractions obtenues par rechromatographie des fractions 1 S, 2 S, 3 S et 4 S sur Sephadex, sont encore très hétérogènes, et nécessitent une nouvelle purification par chromatographie préparative sur papier WHATMAN 3 MM.

Par souci de simplicité, nous avons résumé l'ensemble de ces opérations de purification, dans le tableau XI.

### Nomenclature

Les fractions obtenues par rechromatographie sur colonne Sephadex, sont désignées par un chiffre correspondant à leur ordre d'élution de la colonne, suivant immédiatement le nom de la fraction rechromatographiée.

Un second chiffre éventuel indique que la fraction a été ultérieurement purifiée par chromatographie préparative sur papier.

exemple : fraction 1 S-2-1 : fraction obtenue par purification en chromatographie préparative sur papier de la fraction 1 S-2, elle-même obtenue par rechromatographie sur Sephadex de la fraction 1 S.

### Discussion

Le fractionnement des peptides chymotrypsiques de l'histone H<sub>5</sub> par chromatographie de gel-filtration sur colonne de Sephadex G-25 ou G-50, se révèle très insatisfaisant.

Fig. 5 A :           Rechromatographie de la fraction 1 S sur colonne  
de Sephadex G-50   (Eluent : HCl 0,01 N).

Fig. 5 B :           Rechromatographie de la fraction 2 S sur colonne  
de Sephadex G-25   (Eluent : HCl 0,01 N).

Fig. 5 C :           Rechromatographie de la fraction 3 S sur colonne  
de Sephadex G-25   (Eluent : HCl 0,01 N).

Fig. 5 D :           Rechromatographie de la fraction 4 S sur colonne  
de Sephadex G-25   (Eluent : HCl 0,01 N).



SUR COLONNE DE SEPHADEX G-25 OU G-50

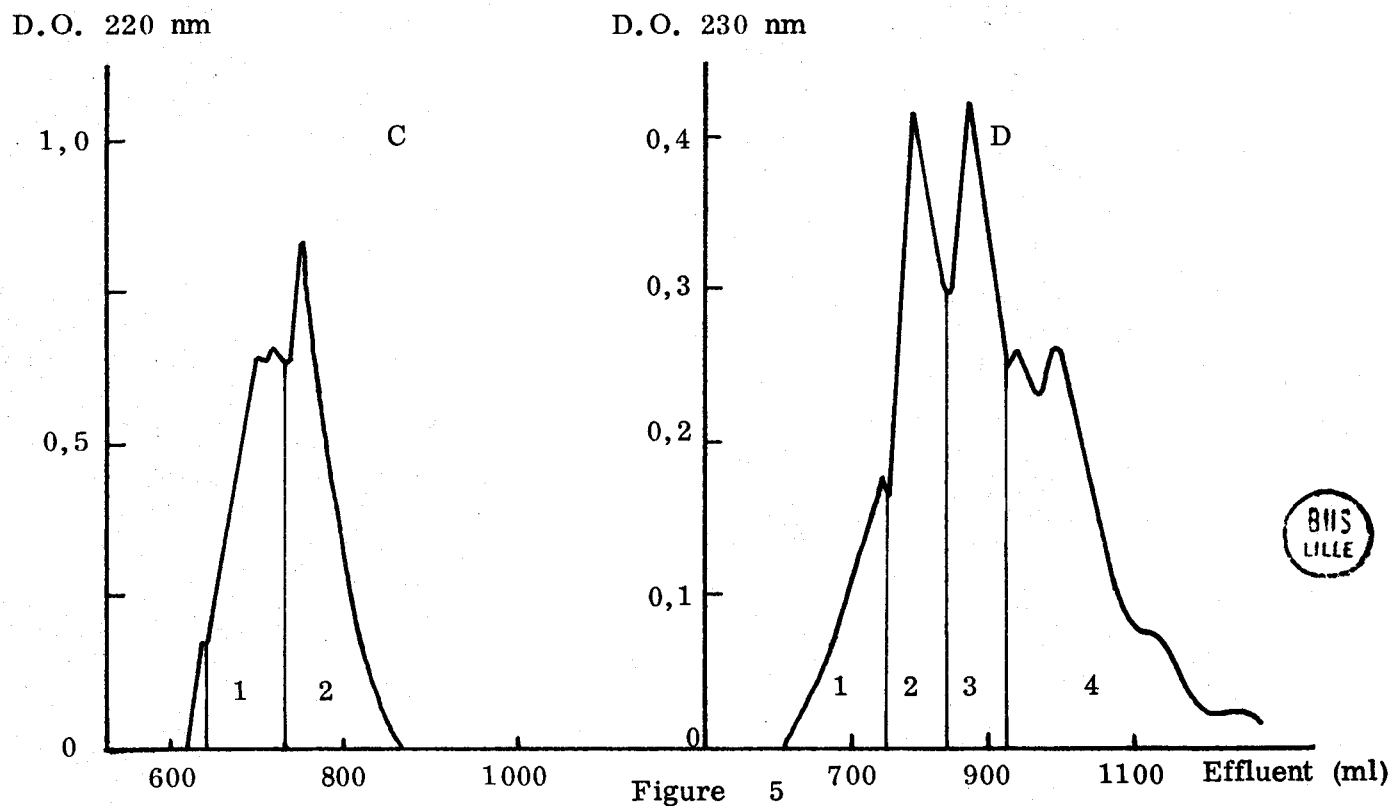
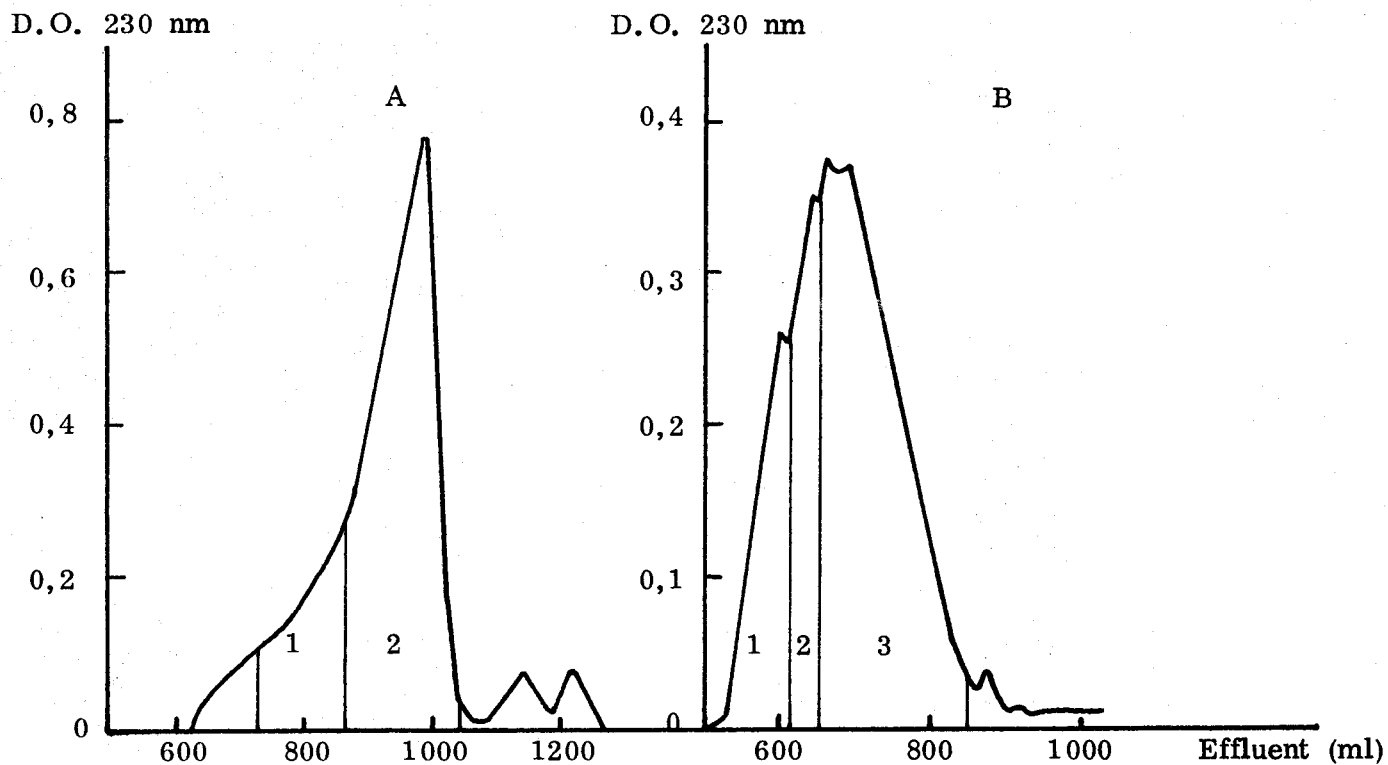
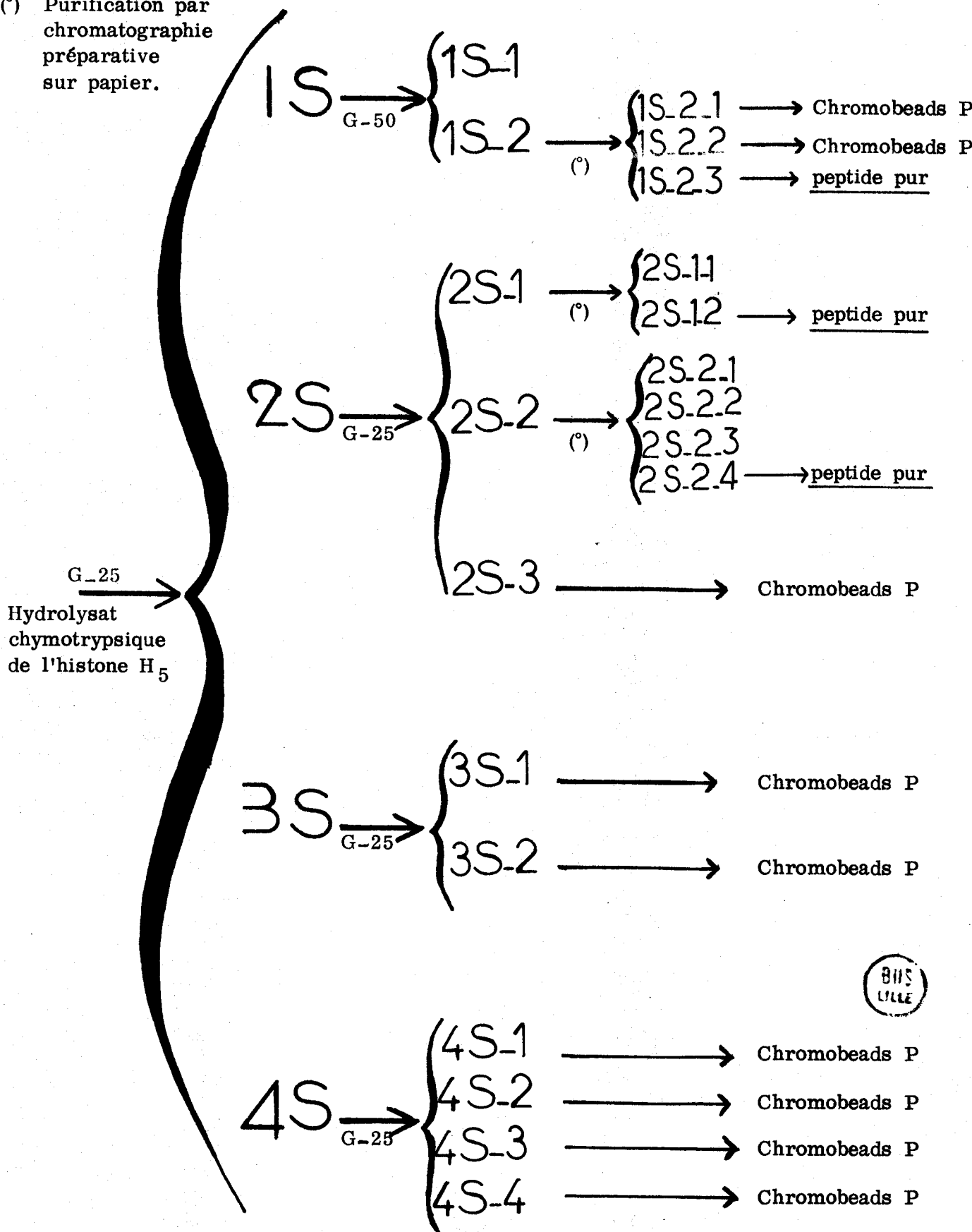


Figure 5

ETAPES DE FRACTIONNEMENT ET DE PURIFICATION

DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES DE L'HISTONE H<sub>5</sub>

(\*) Purification par chromatographie préparative sur papier.



Les différentes fractions obtenues sont hétérogènes, et l'obtention des peptides purs nécessite une longue série de séparations par chromatographie sur Sephadex, suivies de purifications par chromatographie préparative sur papier.

En définitive, toutes ces opérations ne nous ont permis d'obtenir que 3 fractions homogènes (fractions 1 S-2-3 ; 2 S-1-2 et 2 S-2-4) correspondant chacune à un peptide pur, dont nous avons déterminé la composition en acides aminés et la séquence. Nous appellerons ce peptide : Ch-1 S-2-3.

Ces résultats sont présentés respectivement dans les tableaux XII et XIII, et feront l'objet d'un paragraphe ultérieur.

Les fractions 1 S-1 ; 2 S-1-1 ; 2 S-2-1 ; 2 S-2-2 et 2 S-2-3, trop complexes, n'ont pu être étudiées.

Quant à toutes les autres fractions, étant donné leur extrême complexité et la difficulté de les séparer, nous avons préféré les rassembler et les fractionner par chromatographie d'échange d'ions sur résine Chromobeads P selon la technique mise au point par SAUTIERE et al. (1970-a).

## 2. Chromatographie d'échange d'ions

---

Le diagramme d'élution des peptides chymotrypsiques de l'histone H<sub>5</sub>, fractionnés par chromatographie d'échange d'ions sur résine Chromobeads P, est présenté dans la figure 6, et montre la séparation des peptides en 29 fractions.

## Nomenclature

Les fractions sont numérotées suivant leur ordre d'élution de la colonne : fractions 1 à 29.

Etant donné que la séquence en acides aminés de l'histone H<sub>5</sub> n'est pas totalement connue, nous n'avons pu replacer tous les peptides selon leur position dans la séquence de la protéine. Nous désignerons donc les peptides chymotrypsiques par les lettres Ch- suivies d'un chiffre ou nombre correspondant à la fraction dans laquelle ils sont élués.

Le mode de purification de ces peptides est désigné par une lettre (électrophorèse préparative) ou un chiffre (chromatographie préparative) ou les deux, si ces deux méthodes de purification sur papier ont été successivement utilisées.

Exemple :

Ch-13-B : peptide obtenu par purification de la fraction 13 par électrophorèse préparative sur papier.

Ch-3-2-A : peptide obtenu par purification de la fraction 3 par chromatographie préparative sur papier, suivie d'une électrophorèse préparative sur papier.

La composition et la séquence en acides aminés de chaque peptide, sont respectivement présentées dans les tableaux XII et XIII.

DIAGRAMME D'ELUTION DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES DE L'HISTONE H 5

FRACTIONNES SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P

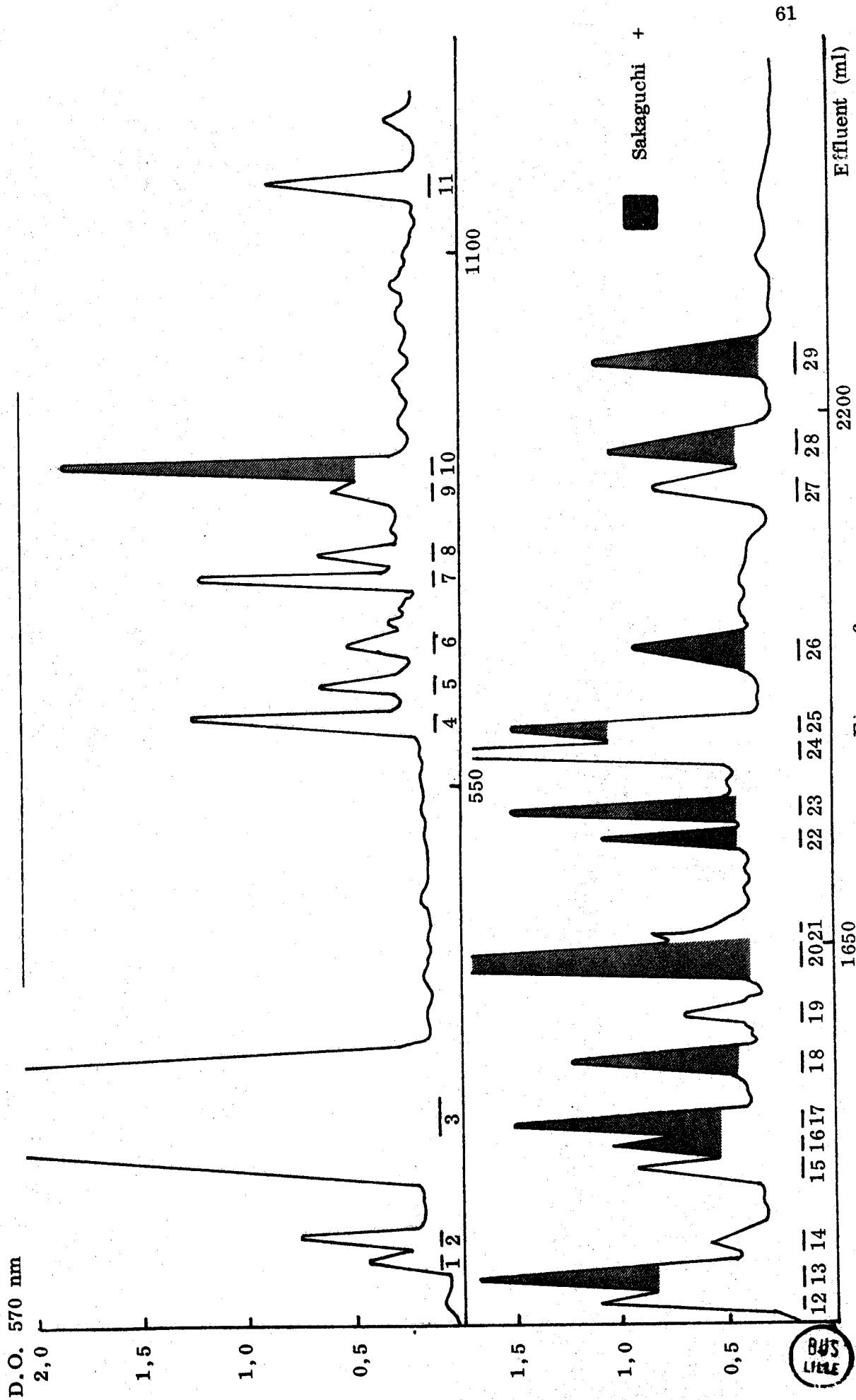


Figure 6

TABLEAU XII

ACIDES AMINES	Ch-1S-2-3 Ch-2S-1-2 Ch-2S-2-4	Ch-2	Ch-3-2-A	Ch-3-2-B	Ch-3-3	Ch-4	Ch-5	Ch-7	Ch-8	Ch-10-A-1	Ch-10-A-2	Ch-10-B	Ch-11	Ch-12	Ch-13
Acide aspartique	1,96 (2)														
Thréonine		0,85 (1)								0,82 (1)				1,07 (1)	
Sérine	1,00 (1)	1,00 (1)			0,99 (1)			0,95 (1)	0,77 (1)	1,75 (2)	0,86 (1)			2,04 (2)	
Acide glutamique	1,08 (1)	1,00 (1)	1,09 (1)					1,42 (1)		1,10 (1)	1,08 (1)			1,22 (1)	
Proline					0,87 (1)				1,24 (1)						
Glycine	1,08 (1)			1,01 (1)	0,99 (1)					2,93 (3)				3,42 (3)	
Alanine	1,19 (1)			2,33 (2)	2,10 (2)		0,97 (1)		1,05 (1)	1,05 (1)	0,95 (1)			1,16 (1)	
Valine	1,05 (1)		1,05 (1)	0,91 (1)	1,01 (1)					0,88 (1)				1,00 (1)	
Méthionine		0,33 (1)													
Isoleucine	1,02 (1)							1,11 (1)			1,03 (1)				
Leucine	2,00 (2)		2,09 (2)	1,07 (1)	1,76 (2)										1,06 (1)
Tyrosine								0,94 (1)			0,99 (1)		1,14 (1)		
Phénylalanine										0,75 (1)				1,19 (1)	
Histidine	0,96 (1)														
Lysine	2,00 (2)					1,13 (1)	1,03 (1)	1,00 (1)	0,93 (1)	1,64 (2)	1,01 (1)		0,87 (1)	1,82 (2)	
Arginine											1,05 (1)				0,94 (1)
Nombre de résidus	12	3	6	5	6	3	2	5	4	12	5	2	2	12	2

COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES DE L'HISTONE H<sub>5</sub> FRACTIONNES SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P (\*)

(\*) Les valeurs sont exprimées en rapports molaire. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre arrondi de résidus.

TABLEAU XII

ACIDES AMINES	Ch-15-1	Ch-15-2	Ch-16	Ch-17	Ch-18	Ch-20	Ch-22	Ch-23	Ch-24	Ch-25	Ch-26	Ch-27	Ch-25	Ch-29-1	Ch-29-2
Acide aspartique				0,98 (1)											
Thréonine				1,80 (2)	1,69 (2)	1,07 (1)		1,07 (1)						0,95 (1)	0,50 (1)
Sérine	0,61 (1)														
Acide glutamique				1,09 (1)	1,00 (1)	0,82 (1)	1,00 (1)				1,02 (1)				
Proline															
Glycine		1,46 (1)													
Alanine	1,04 (1)				1,13 (1)	1,96 (2)	2,00 (2)	1,12 (1)		1,02 (1)	0,98 (1)				
Valine		0,98 (1)						0,95 (1)						0,94 (1)	
Méthionine															
Isoleucine									0,92 (1)					1,06 (1)	1,04 (1)
Leucine			1,94 (2)											1,02 (1)	2,18 (2)
Tyrosine									0,98 (1)						
Phénylalanine															
Histidine		0,71 (1)							0,98 (1)						
Lysine	0,96 (1)	0,85 (1)		1,08 (1)	1,09 (1)	0,96 (1)		0,98 (1)	1,05 (1)	0,90 (1)		Non déterminé	3,00 (3)		
Arginine			1,00 (1)	0,84 (1)	1,05 (1)	1,19 (1)	1,96 (2)	0,96 (1)		1,09 (1)	2,35 (2)		1,07 (1)	1,92 (2)	1,97 (2)
Nombre de résidus	3	4	3	6	6	6	5	4	5	3	4		12	5	6

COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES CHYMOTRYSIQUES DE L'HISTONE H<sub>5</sub> FRACTIONNES SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P (\*)

(\*) Les valeurs sont exprimées en rapports molaires. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre arrondi de résidus.





Ch-11	résidus 52 et 53	$\overline{\text{Lys}} - \text{Tyr}$
Ch-12	résidus 82 à 93	$\overrightarrow{\text{Lys}} - \overrightarrow{\text{Gln}} - \overrightarrow{\text{Thr}} - \overrightarrow{\text{Lys}} - \text{Gly} - \text{Val} - \text{Gly} - \text{Ala} - \text{Gly} - \text{Ser} - \text{Ser} - \text{Phe}$
Ch-13	résidus 94 et 95	$\overrightarrow{\text{Arg}} - \text{Leu}$
Ch-15-1	résidus 17 à 19	$\overrightarrow{\text{Lys}} - \overrightarrow{\text{Ala}} - \text{Ser}$
Ch-15-2	résidus 59 à 62	$\overrightarrow{\text{Lys}} - \overrightarrow{\text{Val}} - \overrightarrow{\text{Gly}} - \text{His}$
Ch-16	résidus 74 à 76	$\overrightarrow{\text{Arg}} - \text{Leu} - \text{Leu}$
Ch-17		$\overrightarrow{\text{Arg}} - \overrightarrow{\text{Ser}} - \overrightarrow{\text{Thr}} - \overrightarrow{\text{Ser}} - \overrightarrow{\text{Pro}} - \text{Lys}$
Ch-18		$\overrightarrow{\text{Ser}} - \overrightarrow{\text{Arg}} - \overrightarrow{\text{Ala}} - \overleftarrow{\text{Ser}} - \overleftarrow{\text{Pro}} - \overleftarrow{\text{Lys}}$
Ch-20		$\overrightarrow{\text{Lys}} - \overrightarrow{\text{Ala}} - \overrightarrow{\text{Arg}} - \overrightarrow{\text{Ala}} - \text{Pro} - \text{Ser}$
Ch-22		$\overrightarrow{\text{Ala}} - \overrightarrow{\text{Ala}} - \text{Arg} - \text{Pro} - \text{Arg}$
Ch-23		$\overrightarrow{\text{Lys}} - \overrightarrow{\text{Ala}} - \overrightarrow{\text{Val}} - \overrightarrow{\text{Arg}}$
Ch-24	résidus 54 à 58	$\overrightarrow{\text{Ile}} - \overrightarrow{\text{Lys}} - \overrightarrow{\text{Ser}} - \overrightarrow{\text{His}} - \text{Tyr}$
Ch-25		$\overrightarrow{\text{Lys}} - \overrightarrow{\text{Ala}} - \text{Arg}$
Ch-26		$\overrightarrow{\text{Ala}} - \overrightarrow{\text{Arg}} - \text{Pro} - \text{Arg}$
Ch-27		$(\text{Lys})_n$
Ch-28	résidus 7 à 18	$\overrightarrow{\text{Ser}} - \overrightarrow{\text{Pro}} - \overrightarrow{\text{Ala}} - \overrightarrow{\text{Pro}} - \overrightarrow{\text{Ala}} - (\text{Lys}, \text{Pro}, \text{Lys}, \text{Arg}, \text{Val}, \text{Lys}, \text{Ala})$
Ch-29-1	résidus 71 à 75	$\overrightarrow{\text{Ser}} - \overrightarrow{\text{Ile}} - \overrightarrow{\text{Arg}} - \overrightarrow{\text{Arg}} - \text{Leu}$
Ch-29-2	résidus 71 à 76	$\overrightarrow{\text{Ser}} - \overrightarrow{\text{Ile}} - \overrightarrow{\text{Arg}} - \overrightarrow{\text{Arg}} - \text{Leu} - \text{Leu}$

## B - ETUDE DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES DE L'HISTONE H<sub>5</sub>

La séquence en acides aminés de l'histone H<sub>5</sub> est connue jusqu'au résidu de lysine en position 111.

Dans un souci de clarté, nous commencerons par l'étude des peptides chymotrypsiques situés dans cette partie de la protéine, dans l'ordre de leur position dans la séquence.

Les peptides appartenant à la séquence COOH-terminale de l'histone, seront ensuite étudiés, selon leur ordre d'éluion de la colonne de Chromobeads P, ne pouvant pas encore être replacés les uns par rapport aux autres.

◦◦

Peptide Ch-3-2-A (résidus 1 à 6)

Thr - Glu - Ser - Leu - Val - Leu

Le peptide Ch-3-2-A est localisé dans la fraction 3 avec l'ammoniaque et avec les peptides Ch-3-1, Ch-3-2-B et Ch-3-3, dont il est séparé par chromatographie préparative sur papier, suivie d'une électrophorèse préparative sur papier à pH 2,4 .

### Composition

Thr	Ser	Glu	Val	Leu
0,85	1,00	1,09	1,05	2,09

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

DNS - Thr

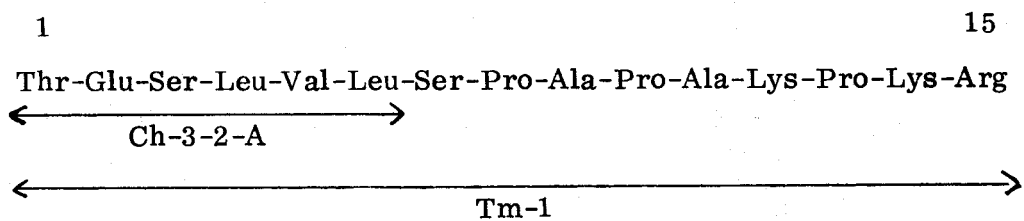
### Dégradation de Edman

---

3 cycles de dégradation de Edman avec identification directe des dérivés PTH-libérés, ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide Ch-3-2-A : Thr-Glu-Ser.

Un résidu de leucine occupe la position COOH-terminale, en raison de la spécificité de la chymotrypsine.

La séquence complète de ce peptide, situé en position NH<sub>2</sub>-terminale de l'histone H<sub>5</sub>, a été déduite des travaux de GREENAWAY et MURRAY (1971), ainsi que de la séquence du peptide Tm-1 obtenu par hydrolyse trypsique de la protéine maléylée :



∴

Peptide Ch-28 (résidus 7 à 18)

---

Ser-Pro-Ala-Pro-Ala-(Lys, Pro, Lys, Arg, Val, Lys, Ala)

Le peptide Ch-28, élué dans la fraction 28, est purifié par chromatographie préparative sur papier.

#### Composition

---

Ser	,	Pro	,	Ala	,	Val	,	Lys	,	Arg
0,98		2,93		3,05		0,94		3,00		1,07

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

---

DNS - Ser



Peptide Ch-2 (résidus 29 à 31)

Ser - Glu - Met

Le peptide Ch-2 est obtenu pur dans la fraction 2.

Composition

Ser	,	Glu	,	Met
1,00		1,00		0,33

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

DNS - Ser

Dégradation de Edman

Un cycle de dégradation de Edman, suivi de la dansylation du peptide résiduel, a permis d'établir la séquence du peptide Ch-2 : Ser - Glu - Met, le résidu de méthionine étant placé par différence en position COOH-terminale.

Le peptide Ch-2 renferme l'unique résidu de méthionine présent dans la molécule d'histone H<sub>5</sub> .

Il est situé en position COOH-terminale du fragment CN - 1, obtenu par action du bromure de cyanogène sur la protéine, et son obtention résulte de la coupure d'une liaison méthionyle (Met - Ile) par la chymotrypsine.

31      32

°°

Peptide Ch-10-A-2 (résidus 49 à 53)

Ser - Ile - Gln - Lys - Tyr

Peptide Ch-7 (résidus 49 à 53)

Ser - Ile - Glu - Lys - Tyr

Peptide Ch-11 (résidus 52 et 53)

Lys - Tyr

Le peptide Ch-10-A-2 est localisé dans la fraction 10 avec les peptides

Ch-10-A-1 et Ch-10-B, dont il est séparé par électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6 , suivie d'une chromatographie préparative sur papier.

#### Composition

Ser	Glu	Ile	Tyr	Lys
0,86	1,08	1,03	0,99	1,01

#### Dégradation de Edman

4 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des dérivés PTH- libérés, ont suffi pour déterminer la séquence du peptide Ch-10-A-2 : Ser - Ile - Gln - Lys - Tyr. Le résidu de tyrosine est placé en position COOH-terminale, selon la spécificité de la chymotrypsine.

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

#### Composition

Ser	Glu	Ile	Tyr	Lys
0,95	1,42	1,11	0,94	1,00

#### Dégradation de Edman

4 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des dérivés PTH- libérés, ont permis d'établir la séquence du peptide Ch-7 : Ser - Ile - Glu - Lys - Tyr, le résidu de tyrosine se plaçant en position COOH-terminale, selon la spécificité de la chymotrypsine.

#### ■ Discussion

L'obtention du peptide Ch-7 s'explique par la désamidation partielle du résidu de glutamine en position 51, dans le peptide Ch-10-A-2. Cette désamidation confère au peptide Ch-7 un caractère plus acide. Ce peptide est donc élué plus tôt que le peptide Ch-10-A-2, de la colonne de Chromobeads P.

L'obtention des peptides Ch-7 et Ch-10-A-2 résulte de la coupure de la liaison Gln - Ser par la chymotrypsine.



### Dégradation de Edman

---

4 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des dérivés PTH- libérés, ont permis d'établir la séquence du peptide Ch-24, le résidu de tyrosine se plaçant par différence en position COOH-terminale, selon la spécificité de la chymotrypsine.

Le peptide Ch-24 contient le troisième résidu de tyrosine de l'histone H<sub>5</sub>. Sa position, adjacente au peptide Ch-10-A-2, a été déduite par comparaison des compositions en acides aminés des fragments CN-2 et NB-4.

°°

Peptides Ch-1 S-2-3 ; Ch-2 S-1-2 et Ch-2 S-2-4 (résidus 59 à 70)

---

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

Peptide Ch-15-2 (résidus 59 à 62)

---

Lys - Val - Gly - His

Les fractions 1 S-2-3 , 2 S-1-2 et 2 S-2-4 sont les seules à avoir été obtenues pures par chromatographie de gel-filtration sur Sephadex, de l'hydrolysate chymotrypsique de l'histone H<sub>5</sub> (voir tableau XI, page 58).

Elles correspondent à un seul et même peptide que nous appellerons Ch-1 S-2-3, dont la séquence est indiquée ci-dessus.

### Composition

---

Asp	, Glu	, Gly	, Ala	, Val	, Ile	, Leu	, His	, Lys
1,96	1,08	1,08	1,19	1,05	1,02	2,00	0,96	2,00

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

---

di - DNS - Lys



## Dégradation de Edman

---

3 cycles de dégradation de Edman, en couplage avec la méthode de dansylation, ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub> - terminale de ce peptide :

Lys - Val - Gly - His.

Ces résultats nous ont permis de placer sans ambiguïté le peptide Ch-1 S-2-3 (ou Ch-2 S-1-2 ou Ch-2 S-2-4) en position NH<sub>2</sub> - terminale du fragment NB-4 obtenu par coupure de l'histone H<sub>5</sub> avec la N-bromosuccinimide.

En effet, la séquence NH<sub>2</sub> - terminale du fragment NB-4 a été déterminée comme étant : Lys - Val - Gly - His.

Rappelons que la dégradation automatique de Edman sur séquenceur, du fragment NB-4, n'avait pu être poursuivie au-delà du résidu de glycine en position 61.

Ce blocage est dû à la bromation du résidu d'histidine placé immédiatement après ce résidu de glycine, sous l'action de la N-bromo-succinimide.

Cependant, en chauffant le fragment NB-4 à 100° C pendant une heure, il se produit une coupure partielle de la liaison histidinyle (His - Asn).

62      63

3 cycles de dégradation manuelle de Edman, réalisés sur ce fragment NB-4 chauffé, ont permis d'identifier les dérivés PTH- suivants :

1 <sup>er</sup> cycle	:	PTH - Lys	+	PTH - Asn
2 <sup>ème</sup> cycle	:	PTH - Val	+	PTH - Ala
3 <sup>ème</sup> cycle	:	PTH - Gly	+	PTH - Asp

La séquence NH<sub>2</sub> - terminale de notre peptide peut donc s'écrire :



TABLEAU XIV

ACIDES AMINES LIBERES	Cp A	Cp A + Cp B			
	90 minutes	100 minutes	120 minutes	150 minutes	210 minutes
Acide aspartique	-	0,612 (0,04)	0,618 (0,05)	0,829 (0,06)	2,381 (0,18)
Glutamine	-	5,350 (0,41)	5,815 (0,45)	6,934 (0,53)	10,691 (0,82)
Alanine	-	-	0,273 (0,02)	2,125 (0,16)	4,674 (0,36)
Isoleucine	-	-	9,060 (0,70)	9,264 (0,71)	11,282 (0,87)
Leucine	10,959 (0,84)	11,400 (0,88)	12,526 (0,96)	14,999 (1,15)	20,079 (1,54)
Lysine	-	-	9,217 (0,71)	9,499 (0,73)	11,955 (0,92)

ETUDE CINETIQUE DE L'HYDROLYSE DU PEPTIDE Ch-1 S-2-3 PAR LES CARBOXYPEPTIDASES A ET B (°)

(°) Les résultats sont exprimés en nanomoles d'acides aminés libérés.  
Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de moles d'acides aminés libérés par mole de peptide.



PAR LES CARBOXYPEPTIDASES A ET B

Nombre de nanomoles

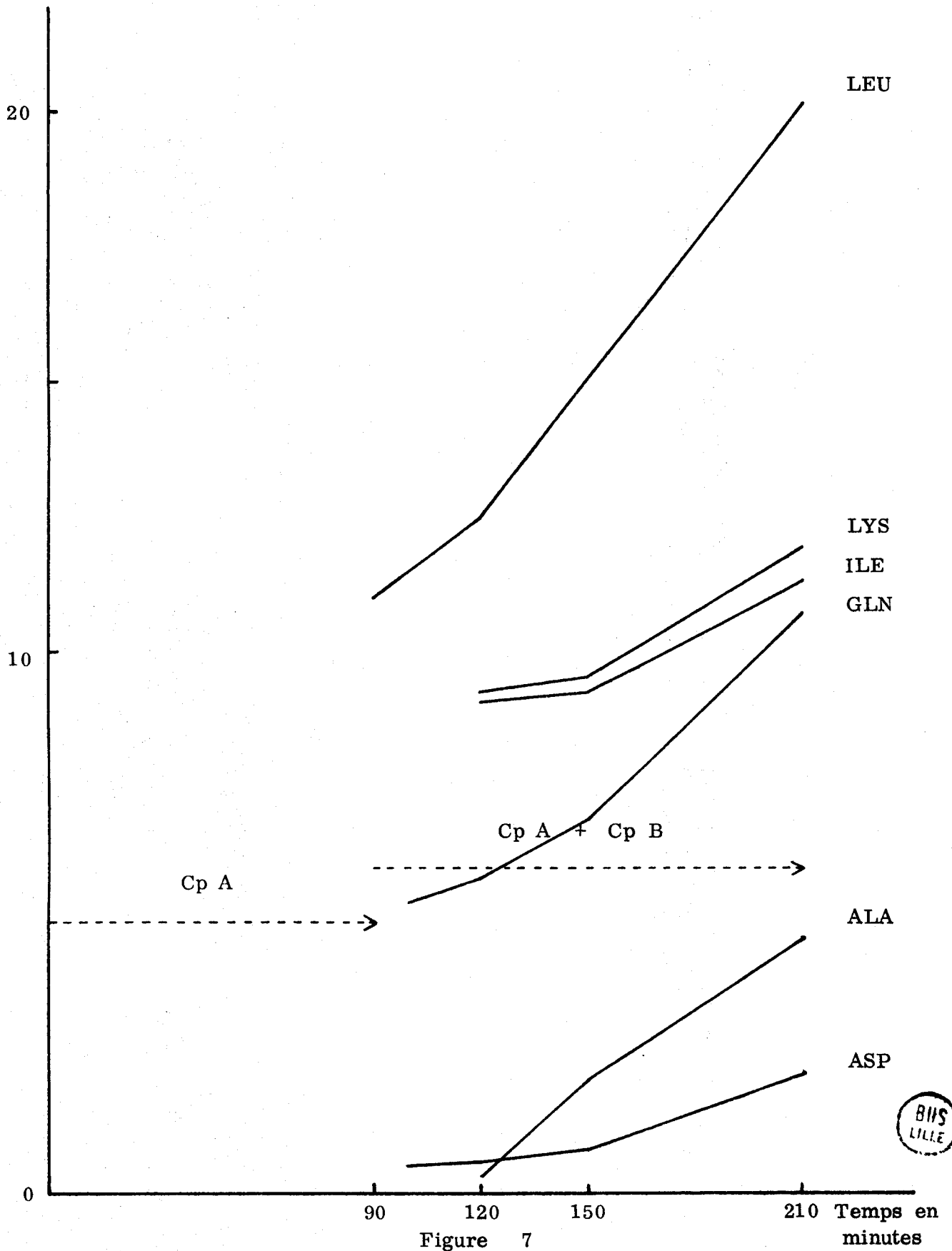


Figure 7



L'ensemble des données fournies par la dégradation de Edman et par l'hydrolyse avec les carboxypeptidases A et B, nous a donc permis d'établir la séquence complète du peptide Ch-1 S-2-3 :

Dégradation de Edman

→ → → → → →

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

← ← ← ← ← ←

Hydrolyse par les carboxypeptidases A et B

Le peptide Ch-15-2 (résidus 59 à 62)

est localisé dans la fraction 15 avec le peptide Ch-15-1, dont il est séparé par chromatographie préparative sur papier.

Composition

Gly	Val	His	Lys
1,46	0,98	0,71	0,85

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

di - DNS - Lys

Dégradation de Edman

2 cycles de dégradation de Edman, en couplage avec la méthode de dansylation, ont permis d'établir la séquence du peptide Ch-15-2, le résidu d'histidine se plaçant par différence en position COOH-terminale :

Lys - Val - Gly - His

Le peptide Ch-15-2 recouvre la séquence NH<sub>2</sub> - terminale du peptide Ch-1 S-2-3 (résidus 59 à 70) :

59

70

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

←—————→  
Ch-15-2

←—————→  
Ch-1 S-2-3 (ou 2 S-1-2 ou 2 S-2-4)

NB-3

NB-4

-----><-----

L'obtention du peptide Ch-15-2 implique la coupure d'une liaison histidinyle : His - Asn par la chymotrypsine. Une telle liaison  
62 63  
est plutôt un site mineur pour l'hydrolyse chymotrypsique.

°°

Peptide Ch-29-2 (résidus 71 à 76)

Ser - Ile - Arg - Arg - Leu - Leu

Peptide Ch-29-1 (résidus 71 à 75)

Ser - Ile - Arg - Arg - Leu

Peptide Ch-16 (résidus 74 à 76)

Arg - Leu - Leu

Le peptide Ch-29-2 est localisé dans la fraction 29 avec le peptide Ch-29-1 dont il est séparé en chromatographie préparative sur papier.

Composition

Ser	,	Ile	,	Leu	,	Arg
0,80		1,04		2,18		1,97

Dégradation de Edman

4 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des dérivés PTH- libérés, ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub> - terminale du peptide Ch-29-2 : Ser - Ile - Arg - Arg.

Les 2 résidus de leucine se placent de façon évidente en position COOH-terminale du peptide.

Le peptide Ch-29-1 est localisé dans la fraction 29 avec le peptide Ch-29-2, dont il est séparé par chromatographie préparative sur papier.

Composition

Ser	,	Ile	,	Leu	,	Arg
0,74		1,06		1,02		1,92

Dégradation de Edman

4 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des dérivés PTH- libérés, ont suffi pour déterminer la séquence complète du peptide Ch-29-1 : Ser - Ile - Arg - Arg - Leu , le résidu de leucine étant placé par différence.

Les peptides Ch-29-1 et Ch-29-2, élués dans la même fraction (fraction 29), ne diffèrent donc que par un résidu de leucine.

L'obtention du peptide Ch-29-1 résulte d'une hydrolyse partielle de la liaison Leu - Leu par la chymotrypsine.

75            76

Le peptide Ch-16 , élué dans la fraction 16, est purifié par électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6.

Composition

Leu	,	Arg
1,94		1,00

Dégradation de Edman

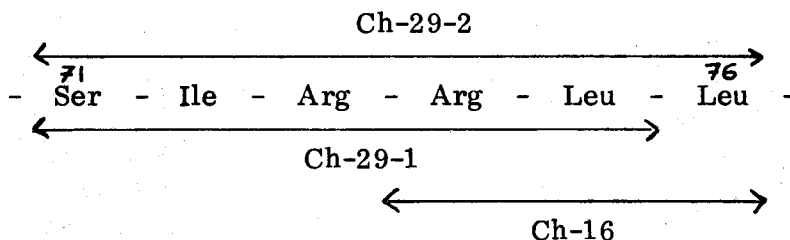
Un seul cycle de dégradation de Edman, avec identification directe du dérivé PTH- libéré, a permis d'identifier le résidu d'arginine en position NH<sub>2</sub> - terminale.

La séquence du peptide Ch-16 est donc évidente :

Arg - Leu - Leu.

L'obtention de ce peptide implique la coupure partielle de la liaison  
 Arg - Arg par la chymotrypsine.  
 73            74

L'étude du peptide Ch-29-2 , et de ses dérivés Ch-29-1  
 et Ch-16, nous permet d'établir la séquence partielle suivante :



∴

Peptide Ch-3-2-B (résidus 77 à 81)

Ala - Ala - Gly - Val - Leu

Peptide Ch-3-3 (résidus 76 à 81)

Leu - Ala - Ala - Gly - Val - Leu

Le peptide Ch-3-2-B est localisé dans la fraction 3 avec l'ammoniaque  
 et les peptides Ch-3-1, Ch-3-2-A et Ch-3-3, dont il est séparé par  
 chromatographie préparative sur papier, suivie d'une électrophorèse prépa-  
 rative sur papier à pH 2,4 .

Composition

Gly	Ala	Val	Leu
1,01	2,33	0,91	1,07

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

DNS - Ala



### Dégradation de Edman

---

4 cycles de dégradation de Edman, en couplage avec la méthode de dansylation, ont permis d'établir la séquence complète du peptide Ch-3-2-B : Ala - Ala - Gly - Val - Leu.

Le résidu de leucine, ainsi identifié en position COOH-terminale, confirme la spécificité de la chymotrypsine.

Le peptide Ch-3-3 est localisé dans la fraction 3 avec l'ammoniaque et les peptides Ch-3-1, Ch-3-2-A et Ch-3-2-B, dont il est séparé par chromatographie préparative sur papier.

### Composition

---

Gly	Ala	Val	Leu
0,99	2,10	1,01	1,76

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

---

DNS - Leu

### Dégradation de Edman

---

3 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des dérivés PTH- libérés, ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub> - terminale du peptide Ch-3-3 : Leu - Ala - Ala.

La séquence du peptide Ch-3-3 se déduit de celle du peptide Ch-3-2-B.

L'obtention de ce peptide résulte d'une hydrolyse incomplète de la liaison Leu - Ala par la chymotrypsine.

76      77

Peptide Ch-12 (résidus 82 à 93)

---

Lys - Gln - Thr - Lys - Gly - Val - Gly - Ala - Gly - Ser - Ser - Phe

Peptide Ch-10-A-1 (résidus 82 à 93)

---

Lys - Glu - Thr - Lys - Gly - Val - Gly - Ala - Gly - Ser - Ser - Phe

Le peptide Ch-12, élué dans la fraction 12, est purifié par chromatographie préparative sur papier.

Composition

---

Thr	,	Ser	,	Glu	,	Gly	,	Ala	,	Val	,	Phe	,	Lys
1,07		2,04		1,22		3,42		1,16		1,00		1,19		1,82

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

---

di - DNS - Lys

Dégradation de Edman

---

4 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des PTH- amino-acides, ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub> - terminale du peptide Ch-12 : Lys - Gln - Thr - Lys.

Le résidu de phénylalanine est placé en position COOH-terminale en raison de la spécificité de la chymotrypsine.

La séquence complète du peptide Ch-12 a été déduite de celles du peptide Tm-14-A obtenu par hydrolyse trypsique de la protéine maléylée, et des peptides Pr-1 et Pr-2 obtenus par hydrolyse de la protéine par la protéase staphylococcique.

Le peptide Ch-10-A-1 est localisé dans la fraction 10 avec les peptides Ch-10-A-2 et Ch-10-B, dont il est séparé par électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6, suivie d'une chromatographie préparative sur papier.

Composition

Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Phe	Lys
0,82	1,75	1,10	2,93	1,05	0,88	0,75	1,64

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

di - DNS - Lys

Dégradation de Edman

2 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des dérivés PTH- libérés, ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub> - terminale du peptide Ch-10-A-1 : Lys - Glu.

Le résidu de phénylalanine est placé en position COOH-terminale en raison de la spécificité de la chymotrypsine.

L'obtention du peptide Ch-10-A-1 résulte d'une désamidation partielle du résidu de glutamine identifié en position 83 dans le peptide Ch-12.

°°

Peptide Ch-13 (résidus 94 et 95)

Arg - Leu

Le peptide Ch-13, élué dans la fraction 13, est purifié par électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6.

Composition

---

Leu , Arg  
1,06 0,94

Dégradation de Edman

---

Un seul cycle de dégradation de Edman, avec identification directe du dérivé PTH- libéré, a suffi pour établir la séquence du peptide Ch-13 :

Arg - Leu.

Les résultats fournis par l'étude du peptide Pr-2, obtenu par hydrolyse de la protéine par la protéase staphylococcique, nous ont permis de placer le peptide Ch-13 immédiatement après le résidu de phénylalanine en position 93 (résidus 94 et 95).

L'obtention du peptide Ch-13 résulte de l'hydrolyse de la liaison  
Phe - Arg par la chymotrypsine.  
93 94

°°

Peptide Ch-5 (résidus 96 et 97 ; 101 et 102, et 110 et 111)

---

Ala - Lys

Le peptide Ch-5, élué dans la fraction 5, est purifié par électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6 .

Composition

---

Ala , Lys  
0,97 1,03

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

---

DNS - Ala



PEPTIDES SITUES DANS LA PARTIE COOH-TERMINALE DE LA PROTEINE

---

La structure primaire de la partie COOH-terminale de l'histone H<sub>5</sub> n'étant pas encore complètement élucidée, nous présenterons les peptides chymotrypsiques situés dans cette région, dans l'ordre de leur élution de la colonne. Nous ne pouvons pas encore, en effet, les replacer de façon certaine selon leur position dans la séquence de la protéine.

Peptide Ch-4

Ser - Pro - Lys

Le peptide Ch-4 est isolé pur dans la fraction 4.

Composition

Ser	Pro	Lys
0,99	0,87	1,13

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

DNS - Ser

Dégradation de Edman

Un cycle de dégradation de Edman suivi de la dansylation du peptide résiduel, a permis d'établir la séquence du peptide Ch-4 : Ser - Pro - Lys, le résidu de lysine étant placé par différence.

Ce résultat a été confirmé par un cycle de dégradation de Edman, utilisée en méthode soustractive.

### Peptide Ch-8

---

Ser - Pro - Ala - Lys

Le peptide Ch-8 est obtenu pur dans la fraction 8.

#### Composition

---

Ser	,	Pro	,	Ala	,	Lys
0,77		1,24		1,05		0,93

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

---

DNS - Ser

#### Dégradation de Edman

---

2 cycles de dégradation de Edman en couplage avec la méthode de dansylation, ont suffi pour déterminer la séquence du peptide Ch-8 :

Ser - Pro - Ala - Lys , le résidu de lysine étant placé par différence en position COOH-terminale.

Un peptide identique a d'ailleurs été isolé de l'hydrolysate tryptique de l'histone native (peptide T-9) .

°°

### Peptide Ch-10-B

---

Ala - Arg

Le peptide Ch-10-B est localisé dans la fraction 10 avec les peptides Ch-10-A-1 et Ch-10-A-2 dont il est séparé par électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6 .

#### Composition

---

Ala	,	Arg
0,95		1,05

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

---

DNS - Ala

La séquence du peptide Ch-10-B est donc Ala - Arg .

∴

Peptide Ch-15-1

Lys - Ala - Ser

Le peptide Ch-15-1 est localisé dans la fraction 15 avec le peptide Ch-15-2 , dont il est séparé par chromatographie préparative sur papier.

Composition

Ser	, Ala	, Lys
0,61	1,04	0,96

Dégradation de Edman

2 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des dérivés PTH- libérés, ont permis d'établir la séquence du peptide Ch-15-1 : Lys - Ala - Ser , le résidu de sérine étant placé par différence en position COOH - terminale.

Une autre séquence Lys - Ala - Ser a été déterminée dans l'hydrolysats tryptique de l'histone H<sub>5</sub> . Il s'agit du peptide T<sub>36</sub> :

Lys - Ala - Ser - Lys , situé également dans la partie COOH-terminale de la protéine.

L'obtention du peptide Ch-15-1 pourrait donc résulter de la coupure d'une liaison séryle par la chymotrypsine. Une telle liaison est cependant un site mineur d'action pour la chymotrypsine.



Dans la partie NH<sub>2</sub> - terminale de la protéine, il existe aussi une séquence Lys - Ala - Ser (résidus 17 à 19).

Mais nous ne pouvons lui faire correspondre notre peptide Ch-15-1, car cela impliquerait, outre la coupure de la liaison Ser - Arg, par la chymotrypsine, la coupure d'une liaison valyle

19	20
----	----

(Val - Lys) tout à fait inhabituelle pour cet enzyme.

16	17
----	----

°°

### Peptide Ch-17

Arg - Ser - Thr - Ser - Pro - Lys

Le peptide Ch-17, élué dans la fraction 17, est purifié par électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6 .

### Composition

Thr	,	Ser	,	Pro	,	Lys	,	Arg
0,98		1,80		1,09		1,08		0,84

### Dégradation de Edman

4 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des dérivés PTH- libérés, ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub> - terminale du peptide Ch-17 :

Arg - Ser - Thr - Ser.

1 cycle supplémentaire de dégradation de Edman, utilisée en méthode soustractive, a permis de placer le résidu de proline juste après le résidu de sérine.

Le résidu de lysine est donc placé par différence en position COOH-terminale.

Le peptide Ch-17 correspond au peptide T<sub>38-A</sub> de l'hydrolysat tryptique de l'histone H<sub>5</sub> .

°°

### Peptide Ch-18

Ser - Arg - Ala - Ser - Pro - Lys

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

### Composition

Ser	Pro	Ala	Lys	Arg
1,69	1,00	1,13	1,09	1,05

### Dégradation de Edman

3 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des dérivés PTH- libérés, ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub> - terminale du peptide Ch-18 : Ser - Arg - Ala .

2 cycles supplémentaires de dégradation de Edman, utilisée en méthode soustractive, ont permis d'identifier le résidu de proline en cinquième position :

	Pro	Lys	
4ème cycle	29,265	15,685	( Les résultats sont exprimés en nombre de nanomoles d'acides aminés )
5ème cycle	<u>20,859</u>	14,392	

2 séquences COOH-terminales sont donc possibles pour le peptide Ch-18 :

Ser - Pro - Lys                    ou                    Lys - Pro - Ser .

### Hydrolyse par la carboxypeptidase C

---

L'hydrolyse du peptide Ch-18 par la carboxypeptidase C pendant une heure à 30° C, libère 0,35 micromole de lysine et seulement 0,17 micromole de proline, par micromole de peptide, ainsi que des traces de sérine.

La libération plus rapide de la lysine nous permet de déduire sans équivoque la séquence COOH-terminale : Pro - Lys .

L'ensemble des données fournies par la dégradation de Edman et par l'hydrolyse par la carboxypeptidase C, permet d'établir la séquence complète du peptide Ch-18 :

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

le second résidu de sérine étant placé par différence.

°°

### Peptide Ch-20

---

Lys - Ala - Arg - Ala - Pro - Ser

Le peptide Ch-20, élué dans la fraction 20, est purifié par chromatographie préparative sur papier, pendant 16 heures, dans le système solvant Butanol / acide acétique / eau (70 : 60 : 75) (v : v).

### Composition

---

Ser	Pro	Ala	Lys	Arg
1,07	0,82	1,96	0,96	1,19

### Dégradation de Edman

---

4 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des dérivés PTH- libérés, ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub> - terminale

du peptide Ch-20 : Lys - Ala - Arg - Ala.

Le résidu de sérine est placé en position COOH-terminale, en raison de l'impossibilité pour la chymotrypsine d'hydrolyser une liaison prolyle.

°°

Peptide Ch-22

Ala - Ala - Arg - Pro - Arg

Peptide Ch-26

Ala - Arg - Pro - Arg

Le peptide Ch-22, élué dans la fraction 22, est purifié par chromatographie préparative sur papier.

Composition

Pro	,	Ala	,	Arg
1,00		2,00		1,96

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

DNS - Ala

Dégradation de Edman

1 cycle de dégradation de Edman, en couplage avec la méthode de dansylation, a permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub> - terminale du peptide Ch-22 :

Ala - Ala.

La séquence du peptide Ch-22 a été déduite de la séquence du peptide tryptique T<sub>46-B</sub> de l'histone H<sub>5</sub>, auquel il est identique :

Ala - Ala - Arg - Pro - Arg .

Le peptide Ch-26 , élué dans la fraction 26, est purifié par chromatographie préparative sur papier.

#### Composition

---

Pro	,	Ala	,	Arg
1,02		0,98		2,35

#### Dégradation de Edman

---

2 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des dérivés PTH- libérés, ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub> - terminale du peptide Ch-26 : Ala - Arg .

Le second résidu d'arginine est placé en position COOH-terminale, en raison de l'incapacité de la chymotrypsine d'hydrolyser une liaison prolyle.

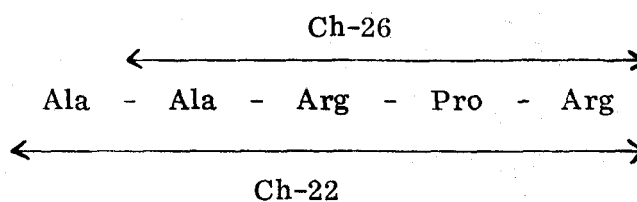
La séquence du peptide Ch-26 est donc :

Ala - Arg - Pro - Arg .

Le peptide Ch-26 recouvre la partie COOH-terminale du peptide Ch-22, et son obtention implique la coupure par la chymotrypsine d'une liaison

Ala - Ala ,

que nous ne pouvons expliquer :



∴

### Peptide Ch-23

---

Lys - Ala - Val - Arg

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

#### Composition

---

Ala	,	Val	,	Lys	,	Arg
1,12		0,95		0,98		0,96

#### Dégradation de Edman

---

4 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des dérivés PTH- libérés, ont permis d'établir la séquence complète du peptide Ch-23 : Lys - Ala - Val - Arg .

Le peptide Ch-23 est identique au peptide Tm-47-2 de l'hydrolysats tryptique de l'histone maléylée.

°°

### Peptide Ch-25

---

Lys - Ala - Arg

Le peptide Ch-25, élué dans la fraction 25, est purifié par chromatographie préparative sur papier.

#### Composition

---

Ala	,	Lys	,	Arg
1,02		0,90		1,09

### Dégradation de Edman

---

2 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des dérivés PTH- libérés, ont suffi pour établir la séquence complète du peptide Ch-25 : Lys - Ala - Arg , le résidu d'arginine étant placé par différence en position COOH-terminale.

Un peptide identique a été identifié dans l'hydrolysate tryptique du peptide peptique Px succinylé (voir Chapitre V).

°°

### Peptide Ch-27

( Lys )<sub>n</sub>

Le peptide Ch-27 est obtenu par purification de la fraction 27 en électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6 .

La composition en acides aminés du peptide Ch-27 fait apparaître uniquement de la lysine.

La zone d'élution de ce peptide, de la colonne de Chromobeads P (fraction 27), est en faveur d'une séquence constituée d'au moins 2 résidus de lysine.

°°

## II. HYDROLYSE CHYMOTRYPSIQUE DU FRAGMENT NB-4

---

Comme pour l'histone H<sub>5</sub>, l'hydrolyse chymotrypsique du fragment NB-4 est réalisée à 37° C en milieu tamponné à pH 8,0.

Les seuls changements résident dans la durée de l'hydrolyse et la concentration en enzyme (20 minutes ; rapport enzyme/substrat : 1/250).

Notre but était, en évitant les coupures secondaires par la chymotrypsine, d'obtenir un nombre restreint de longs peptides.

### A - FRACTIONNEMENT DES PEPTIDES

---

#### 1. Chromatographie de gel-filtration

---

Le diagramme de fractionnement de l'hydrolysate chymotrypsique du fragment NB-4, fractionné par chromatographie de gel-filtration sur colonne de Sephadex G-50 F, est présenté dans la Figure 8.

3 fractions ont été obtenues : fractions 1 S, 2 S et 3 S.

Le contrôle d'homogénéité de chacune de ces fractions est réalisé en électrochromatographie sur papier WHATMAN 3 MM.

Les fractions 1 S et 2 S, trop complexes, n'ont pu être étudiées.

La fraction 3 S, constituée par un mélange de petits peptides, est fractionnée par chromatographie d'échange d'ions sur résine Chromo-beads P.



CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION DE L'HYDROLYSAT CHYMOTRYPSIQUE DU FRAGMENT NB-4

SUR COLONNE DE SEPHADEX G-50 F (ELUANT : HCl 0,01 N)

D.O. 220 nm

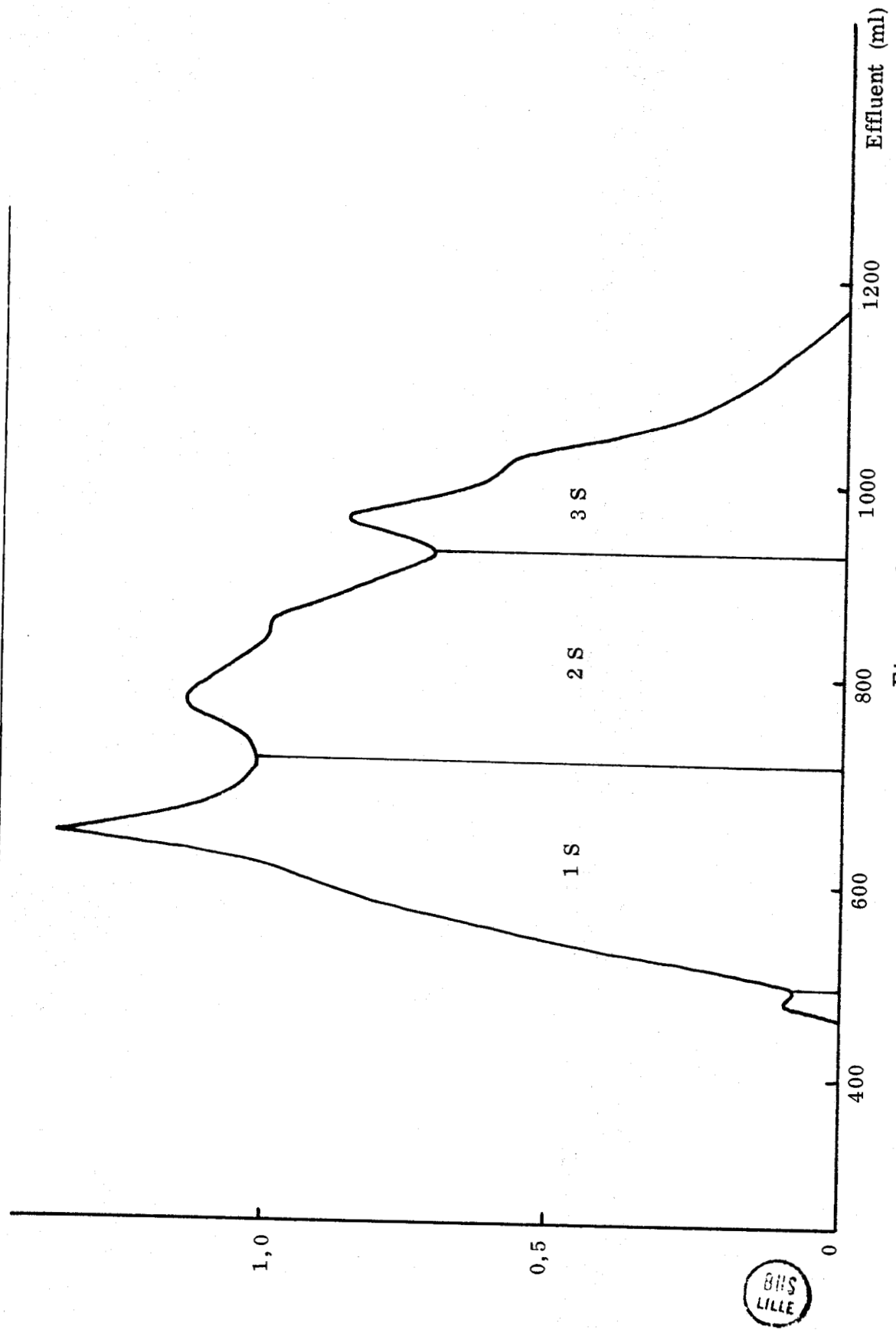


Figure 8

## 2. Chromatographie d'échange d'ions

Le diagramme d'élution des peptides chymotrypsiques du fragment NB-4 (fraction 3 S) , fractionnés par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Chromobeads P, est présenté dans la Figure 9, et montre la séparation des peptides en 6 fractions.

La fraction 3 correspond à l'ammoniaque.

### Nomenclature

Les fractions indiquées par des traits pleins sont numérotées suivant leur ordre d'élution de la colonne.

La séquence complète de l'histone H<sub>5</sub> n'étant pas encore totalement élucidée, nous désignerons les peptides chymotrypsiques du fragment NB-4 par le terme NB-4 -Ch- suivi du numéro de la fraction dans laquelle ils sont élués.

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

FRACTIONNES SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P

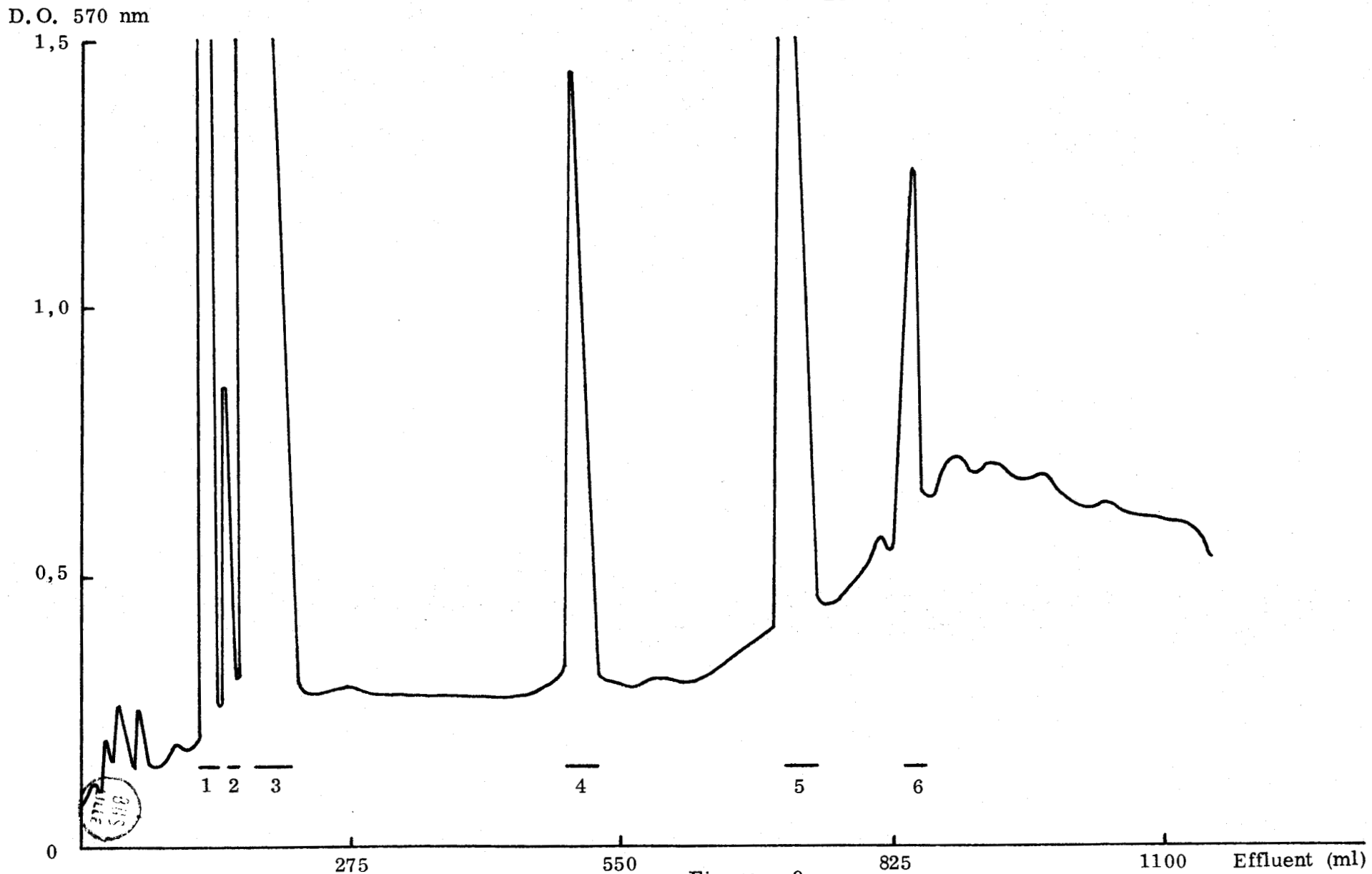


Figure 9

TABLEAU XV

ACIDES AMINES	NB-4 - Ch-1	NB-4 - Ch-2	NB-4 - Ch-4	NB-4 - Ch-5	NB-4 - Ch-6
Acide aspartique					
Thréonine			0,94 (1)	0,94 (1)	
Sérine			1,78 (2)	1,84 (2)	
Acide glutamique			1,11 (1)	1,01 (1)	
Proline					
Glycine	1,05 (1)	1,08 (1)	3,04 (3)	2,88 (3)	1,41 (1)
Alanine	1,87 (2)	1,91 (2)	1,12 (1)	1,10 (1)	
Valine	0,95 (1)	0,91 (1)	1,08 (1)	1,02 (1)	0,85 (1)
Isoleucine					
Leucine	0,99 (1)	1,88 (2)			
Phénylalanine			0,92 (1)	0,87 (1)	
Histidine					Non déterminé
Lysine			2,17 (2)	2,00 (2)	0,74 (1)
Arginine					
Nombre de résidus	5	6	12	12	4



COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES DU FRAGMENT NB-4,

FRACTIONNES SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P (°)

(°) Les valeurs sont exprimées en rapports molaires. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre arrondi de résidus.

Méthodes utilisées pour la détermination de la séquence des peptides :	Dansylation : — placé au-dessus du résidu d'acide aminé Dégradation de Edman : →
NB-4 - Ch-1	→ Ala - Ala - Gly - Val - Leu
NB-4 - Ch-2	→ Leu - Ala - Ala - Gly - Val - Leu
NB-4 - Ch-4	→ Lys - Glu - Thr - Lys - Gly - Val - Gly - Ala - Gly - Ser - Ser - Phe
NB-4 - Ch-5	→ Lys - Gln - Thr - Lys - Gly - Val - Gly - Ala - Gly - Ser - Ser - Phe
NB-4 - Ch-6	→ Lys - Val - Gly - His

SEQUENCES EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES DU FRAGMENT NB - 4 ,

FRACTIONNES SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P (°)



B - ETUDE DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES DU FRAGMENT NB-4

Peptide NB-4 -Ch-1 (résidus 77 à 81)

Ala - Ala - Gly - Val - Leu

Peptide NB-4 -Ch-2 (résidus 76 à 81)

Leu - Ala - Ala - Gly - Val - Leu

Le peptide NB-4 -Ch-1 est obtenu pur dans la fraction 1.

Composition

Gly	Ala	Val	Leu
1,05	1,87	0,95	0,99

Dégradation de Edman

3 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des dérivés PTH- libérés, ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide NB-4-Ch-1 :

Ala - Ala - Gly.

La position COOH-terminale du résidu de leucine découle de la spécificité de la chymotrypsine, et le résidu de valine est placé par différence :

Ala - Ala - Gly - Val - Leu.

Le peptide NB-4-Ch-1 est identique au peptide Ch-3-2-B obtenu par hydrolyse chymotrypsique de l'histone native.

Le peptide NB-4 -Ch-2 (résidus 76 à 81) est obtenu pur dans la fraction 2.

#### Composition

Gly	, Ala	, Val	, Leu
1,08	1,91	0,91	1,88

#### Dégradation de Edman

3 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des dérivés PTH- libérés, ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide NB-4 -Ch-2 : Leu - Ala - Ala.

La séquence du peptide NB-4-Ch-2 se déduit de celle du peptide NB-4-Ch-1.

Le peptide NB-4-Ch-2 est identique au peptide Ch-3-3 de l'hydrolysat chymotrypsique de l'histone native, et son obtention résulte d'une hydrolyse incomplète de la liaison Leu - Leu par la chymotrypsine.

76      77

∴

Peptide NB-4-Ch-5 (résidus 82 à 93)

Lys - Gln - Thr - Lys - Gly - Val - Gly - Ala - Gly - Ser - Ser - Phe

Peptide NB-4-Ch-4 (résidus 82 à 93)

Lys - Glu - Thr - Lys - Gly - Val - Gly - Ala - Gly - Ser - Ser - Phe

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

### Composition

---

Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Phe	Lys
0,94	1,84	1,01	2,88	1,10	1,02	0,87	2,00

### Dégradation de Edman

---

5 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des dérivés PTH- libérés, ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide NB-4-Ch-5 :

Lys - Gln - Thr - Lys - Gly.

Le résidu de phénylalanine est placé en position COOH-terminale en raison de la spécificité de la chymotrypsine.

Le peptide NB-4-Ch-5 est identique au peptide Ch-12 de l'hydrolysate chymotrypsique de la protéine.

Comme pour ce peptide, sa séquence complète a été déduite de la séquence du peptide tryptique Tm-14-A de la protéine maléylée, et des peptides Pr-1 et Pr-2 obtenus par hydrolyse de la protéine avec la protéase staphylococcique.

Le peptide NB-4-Ch-4 , élué dans la fraction 4, est purifié par électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6 .

### Composition

---

Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Phe	Lys
0,94	1,78	1,11	3,04	1,12	1,08	0,92	2,17

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

---

di - DNS - Lys

### Dégradation de Edman

---

2 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des



dérivés PTH- libérés, ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide NB-4-Ch-4 :

Lys - Glu .

Le peptide NB-4-Ch-4 possède la même composition en acides aminés et le même résidu en position NH<sub>2</sub>-terminale (lysine) que le peptide NB-4-Ch-5 .

Son obtention résulte d'une désamidation partielle du résidu de glutamine identifié en position 83 dans le peptide NB-4-Ch-5 .

La différence d'élution de ces 2 peptides s'explique de la même manière que pour les peptides chymotrypsiques Ch-12 et Ch-10-A-1 de la protéine : la désamidation du résidu de glutamine confère au peptide NB-4-Ch-4 un caractère plus acide et provoque son élution plus précoce de la colonne de Chromobeads P.

°°

Peptide NB-4 -Ch-6 (résidus 59 à 62)

Lys - Val - Gly - His .

Le peptide NB-4-Ch-6, élué dans la fraction 6, est purifié par électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6 .

Composition

Gly	,	Val	,	Lys
1,41		0,85		0,74

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

di - DNS - Lys

Le volume d'élution du peptide NB-4-Ch-6 suggère qu'il s'agit du peptide : Lys - Val - Gly - His , le résidu d'histidine n'apparaissant pas dans la composition en acides aminés par suite de sa bromation lors de l'action de la N-bromosuccinimide sur l'histone H<sub>5</sub> . En effet, le peptide NB-4-Ch-6, qui renferme un résidu de lysine, est élué dans la fraction 6, alors que le peptide NB-4-Ch-5, qui renferme 2 résidus de lysine (2 charges positives) est élué dans la fraction 5. Le peptide NB-4-Ch-6 renferme donc nécessairement une seconde charge positive, que lui confère un résidu d'histidine.

Cette hypothèse est confirmée par comparaison avec le diagramme d'élution des peptides chymotrypsiques de l'histone native.

Le peptide Ch-12, identique au peptide NB-4-Ch-5, est élué dans la fraction 12, tandis que le peptide Ch-15-2 ( Lys - Val - Gly - His ) est élué dans la fraction 15.

La comparaison des électrochromatogrammes des peptides Ch-15-2 et NB-4-Ch-6 fournit la preuve définitive de leur identité : ces 2 peptides sont situés au même endroit sur la carte peptidique et possèdent, tous deux, en électrophorèse à pH 3,6 , la même migration cathodique.

### III. D I S C U S S I O N

---

Les 3 résidus de tyrosine, le résidu de phénylalanine et les 8 résidus de leucine, présents dans l'histone H<sub>5</sub>, constituent 12 sites majeurs potentiels pour l'action de la chymotrypsine.

Théoriquement, l'hydrolyse de la protéine par la chymotrypsine devrait fournir 13 peptides.

En fait, l'hydrolyse de l'histone native par la chymotrypsine, pendant une heure, conduit à l'obtention de 28 peptides, malgré la résistance à l'hydrolyse de 2 liaisons leucyle :

Leu - Val	et	Leu - Gln .
4      5		66    67

Ce nombre important de peptides résulte de nombreuses hydrolyses partielles ou secondaires, voire même inhabituelles, qui témoignent du manque de spécificité de l'enzyme.

L'obtention des peptides Ch-2 et Ch-15-2 implique la coupure par la chymotrypsine,

d'une liaison méthionyle : Met - Ile (peptide Ch-2)

31	-	32
----	---	----

et d'une liaison histidinyle : His - Asn (peptide Ch-15-2) .

62	-	63
----	---	----

L'obtention des peptides Ch-15-1 et Ch-20, situés dans la partie COOH-terminale de la protéine, implique la coupure d'une liaison séryle.

Ces 3 liaisons (méthionyle, histidinyle et séryle) sont plutôt des sites mineurs pour l'hydrolyse chymotrypsique.

Un fait marquant est l'hydrolyse par la chymotrypsine, de nombreuses liaisons lysyle et arginyle, ce qui a contribué à multiplier le nombre de peptides. La plupart des peptides ainsi obtenus sont situés dans la partie COOH-terminale de l'histone, après le résidu de leucine en position 95, qui constitue dans la protéine, le dernier site majeur d'action de la chymotrypsine.

La coupure de telles liaisons est surprenante, en raison de l'emploi d'une chymotrypsine hautement purifiée ( $\alpha$ -chymotrypsine Worthington W.C.D.S.).

Ces résultats témoignent donc d'une forte activité "trypsin-like", inhérente à la chymotrypsine utilisée. Cette action, que nous ne pouvions prévoir, nous a fortement gênée dans l'étude de l'hydrolysate chymotrypsique de la protéine.

Plus surprenante encore, l'obtention des peptides Ch-26 et Ch-28 implique la coupure par la chymotrypsine, d'une liaison alanyle :

Ala - Ala (peptide Ch-26, partie COOH-terminale de la protéine) et  
 Ala - Ser (peptide Ch-28, résidus 7 à 18), que nous ne pouvons expliquer.  
 18      19

De nombreux peptides chymotrypsiques, très basiques, ont été adsorbés irréversiblement sur la résine cationique utilisée pour le fractionnement chromatographique de l'hydrolysate.

De longues séquences de la protéine ont ainsi échappé à nos investigations, en particulier les séquences 19-28 et 32-48, situées dans la partie NH<sub>2</sub>-terminale de l'histone.

Les peptides chymotrypsiques que nous n'avons pu replacer selon leur position dans la séquence, sont situés dans la partie COOH-terminale de la protéine, et nous ont permis d'établir des recoupements avec les peptides trypsiniques et thermolysiques de l'histone ou du fragment NB-4, ainsi qu'avec les peptides trypsiniques du peptide pepsique Px succinylé (voir Chapitre V).

## CHAPITRE V

---

---

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

---

---

PAR LA PEPSINE

- I - CHOIX DE LA METHODE
  
- II - ETUDE COMPARATIVE DES HYDROLYSATS TOTAUX DE L'HISTONE H<sub>5</sub> ET DE SON FRAGMENT NB-4 (Etude qualitative)
  
- III - HYDROLYSE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> ET DE SON FRAGMENT NB-4 PAR LA PEPSINE (Etude quantitative)
  
- IV - ETUDE DU PEPTIDE P<sub>x</sub>
  
- V - SEPARATION ET ETUDE DES PEPTIDES PEPSIQUES DE LA FRACTION NB-4-3 S
  
- VI - DISCUSSION

## I. CHOIX DE LA METHODE

---

La pepsine catalyse l'hydrolyse des liaisons peptidiques où sont engagés les groupes  $\alpha$ -aminés ou  $\alpha$ -carboxyliques de la phénylalanine, de la tyrosine, de la leucine, essentiellement, de l'acide glutamique et, à un degré moindre, de l'alanine.

Elle possède une spécificité plus large que celle de la chymotrypsine, tout en n'ayant pas cette activité "trypsin-like" qui nous a tant gênée dans l'étude de l'hydrolysate chymotrypsique.

Le choix de la pepsine peut donc paraître, au premier abord, d'un intérêt limité, si l'on considère sa spécificité primaire, comparable à celle de la chymotrypsine.

En fait, le résultat majeur de l'hydrolyse de l'histone H<sub>5</sub> ou de son fragment NB-4 par la pepsine, a été l'obtention d'un peptide de 92 résidus, correspondant exactement à la moitié COOH-terminale de la protéine, dont il nous reste à déterminer la séquence en acides aminés.

Quelques essais préliminaires d'hydrolyse, réalisés en utilisant des températures, des concentrations en enzyme et des temps différents, nous ont permis de déterminer les conditions optimales d'action de la pepsine sur l'histone H<sub>5</sub> et son fragment NB-4.

L'hydrolyse est effectuée pendant 2 heures à 37° C, en milieu acide formique à 5 %, en utilisant un rapport enzyme / substrat de 1 / 50 en poids.

## II. ETUDE COMPARATIVE DES HYDROLYSATS TOTAUX

---

### DE L'HISTONE H<sub>5</sub> ET DU FRAGMENT NB-4 (Etude qualitative)

---

L'étude comparative des hydrolysats peptiques totaux de l'histone H<sub>5</sub> et du fragment NB-4, a été réalisée par électrochromatographie et par électrophorèse en gel de polyacrylamide.

#### A - ELECTROCHROMATOGRAPHIE

---

Après lyophilisation, les hydrolysats totaux de l'histone H<sub>5</sub> et du fragment NB-4 sont repris par 2 ml d'acide acétique à 10 %. 50 µl de chacune des 2 solutions sont déposés sur papier Whatman 3 MM et soumis à une chromatographie suivie d'une électrophorèse.

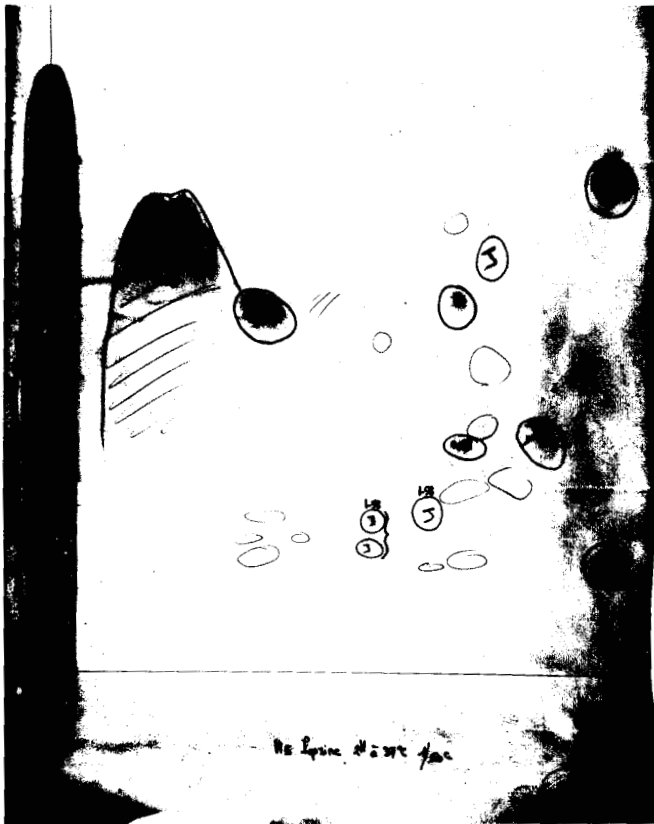
Les électrochromatogrammes, révélés avec le réactif ninhydrine-cadmium, sont présentés à la Figure 10.

Dans les 2 cas, il apparaît une importante traînée électrophorétique au niveau du dépôt. Nous pouvons supposer que cette traînée correspond respectivement à l'histone H<sub>5</sub> et au fragment NB-4 non hydrolysés. A moins qu'il ne s'agisse d'un peptide de poids moléculaire élevé, qui n'aurait donc pas migré en chromatographie.

La carte peptidique de l'hydrolysat total de l'histone H<sub>5</sub>, plus complexe que celle du fragment NB-4 (résidus 59 à 185), fait apparaître

ETUDE COMPARATIVE, EN ELECTROCHROMATOGRAPHIE, DES HYDROLYSATS

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



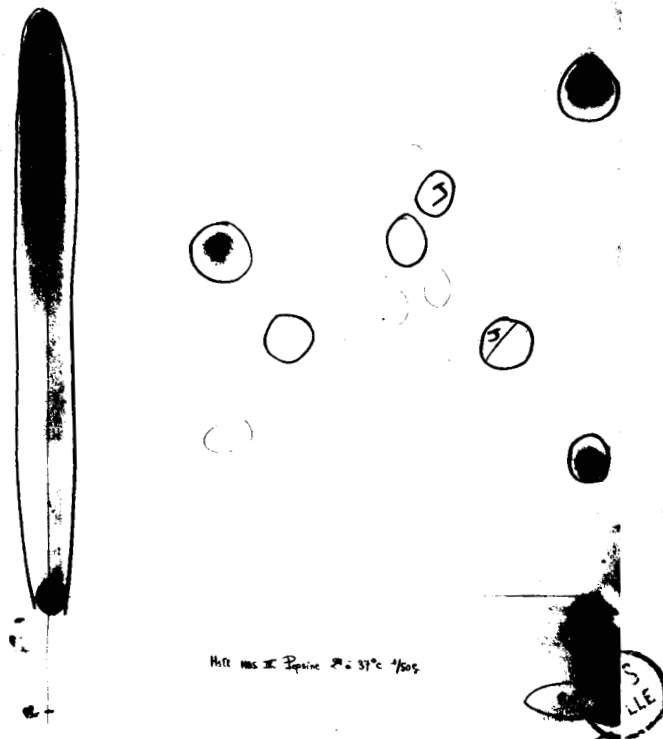
HYDROLYSAT PEPSIQUE TOTAL

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

LILLE

HYDROLYSAT PEPSIQUE TOTAL

DU FRAGMENT NB-4



LILLE



plusieurs taches supplémentaires. Celles-ci correspondent donc nécessairement à des peptides situés dans la partie 1-58 de la protéine.

## B - GELS DE POLYACRYLAMIDE

.....

La technique utilisée est celle de PANYIM et CHALKLEY (1969), à pH 2,7 en milieu urée 2,5 M, en utilisant une concentration de 17 % en acrylamide.

La migration est effectuée pendant 2 heures sous une intensité de 1,5 mA/tube et en présence de témoins internes (histone H<sub>5</sub> et fragment NB-4).

Les gels, colorés à l'Amido schwarz 10 B, puis décolorés, sont présentés à la Figure 11.

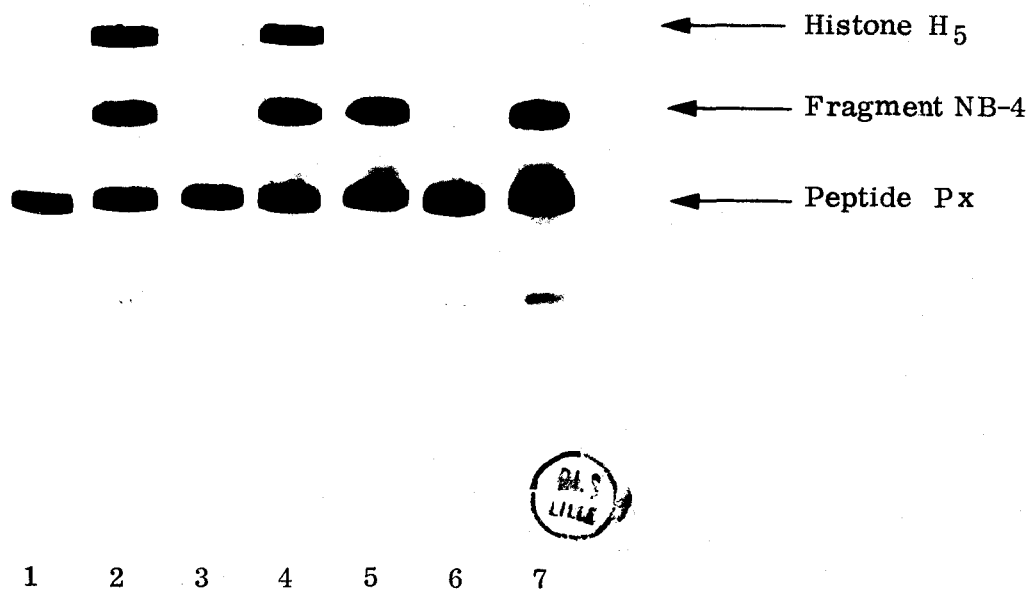
L'étude en gel de polyacrylamide montre que l'hydrolyse de l'histone H<sub>5</sub> et du fragment NB-4 par la pepsine, a été totale, puisqu'aucune bande n'apparaît au niveau des témoins internes.

Par contre, dans chacun des 2 hydrolysats, apparaît une bande intense de même mobilité électrophorétique, plus rapide que l'histone H<sub>5</sub> et le fragment NB-4.

Cette bande correspond donc à un peptide de haut poids moléculaire, localisé en carte peptidique par la traînée observée.

Le mélange des 2 hydrolysats (gel n° 6) donne exactement la même bande, d'intensité sensiblement double : il s'agit donc d'un seul et même peptide, identique pour les 2 hydrolysats.

ETUDE COMPARATIVE DES HYDROLYSATS PEPSIQUES TOTAUX DE L'HISTONE H<sub>5</sub>  
 ET DE SON FRAGMENT NB-4, EN ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE



1. Hydrolysat total de l'histone H<sub>5</sub>
2. Hydrolysat total de l'histone H<sub>5</sub> + témoins H<sub>5</sub> et NB-4
3. Hydrolysat total du fragment NB-4
4. Hydrolysat total du fragment NB-4 + témoins H<sub>5</sub> et NB-4
5. Hydrolysat total du fragment NB-4 + témoin NB-4
6. Hydrolysats totaux de l'histone H<sub>5</sub> et du fragment NB-4
7. Hydrolysats totaux de l'histone H<sub>5</sub> et du fragment NB-4 + témoin NB-4

Figure 11

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

---

PAR LA PEPSINE (Etude quantitative)

---

200 mg d'histone H<sub>5</sub> et 83,5 mg de fragment NB-4 ont été respectivement hydrolysés par la pepsine, pendant 2 heures, à 37° C, en milieu acide formique à 5 %. Cette méthode d'hydrolyse enzymatique par la pepsine a été abordée récemment dans notre laboratoire, et les données structurales fournies par l'étude des peptides des deux hydrolysats ne sont encore que partielles. Nous poursuivons actuellement l'étude des peptides peptiques de l'histone native.

Nous présenterons donc ici l'étude détaillée de l'hydrolysate peptique du fragment NB-4 et nous décrirons les résultats partiels de l'hydrolyse peptique de l'histone totale, dont nous envisageons d'achever rapidement l'étude.

#### A - FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS

---

Les diagrammes d'élution des peptides peptiques de l'histone H<sub>5</sub> et du fragment NB-4, fractionnés par chromatographie de gel-filtration sur colonne de Sephadex G-50 F, sont respectivement présentés dans les Figures 12 et 13.

6 fractions peptidiques ont été obtenues à partir de l'hydrolysate peptique de l'histone H<sub>5</sub> : fractions H<sub>5</sub>-1 S à H<sub>5</sub>-6 S.

CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION DE L'HYDROLYSAT  
 PEPSIQUE DE L'HISTONE H5 SUR  
 COLONNE DE SEPHADEX G-50 F.

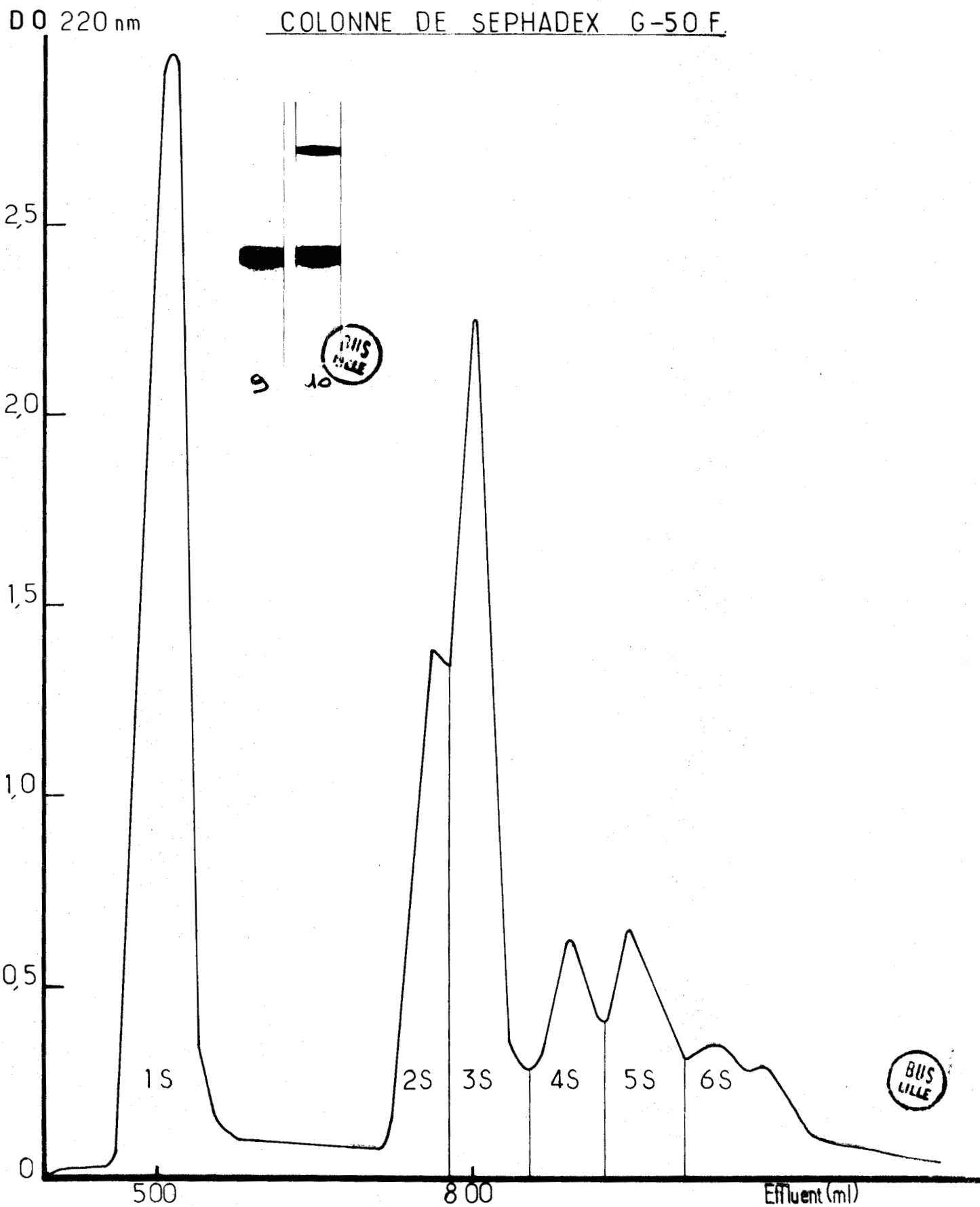


FIGURE 12

9 : Fraction H<sub>5</sub>-1S

10 : Fraction H<sub>5</sub>-1S + Témoin H<sub>5</sub>

CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION DE L'HYDROLYSAT  
PEPSIQUE DU FRAGMENT N13-4 SUR  
COLONNE DE SEPHADEX G-50F

DO 220nm

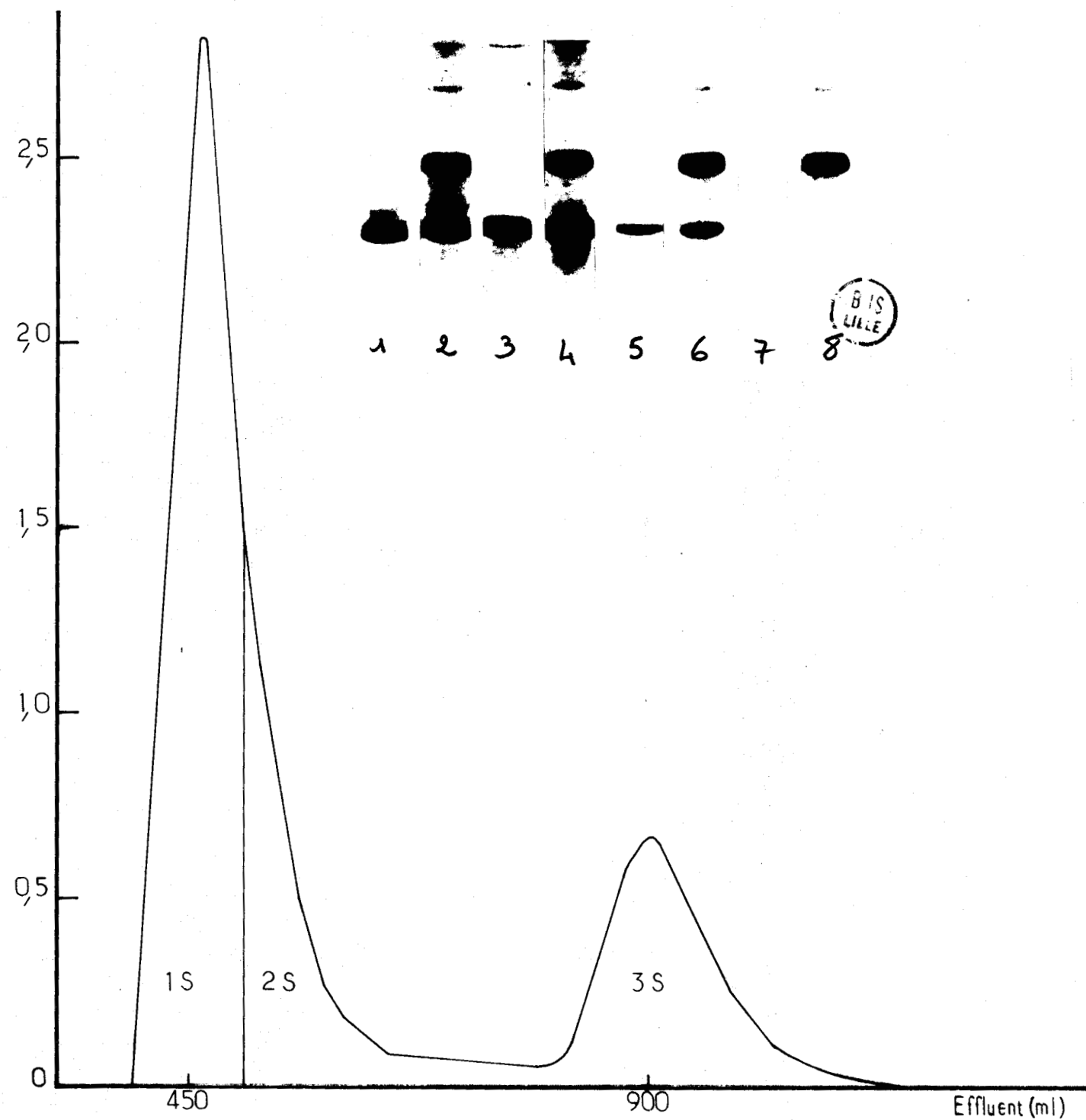


FIGURE 13

BIS  
LILLE

Seule la fraction H<sub>5</sub>-1 S a été étudiée. Les cinq autres fractions, très hétérogènes, seront prochainement fractionnées par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Chromobeads P.

2 fractions peptidiques ont été obtenues à partir de l'hydrolysats pepsique du fragment NB-4. Cependant, le premier pic n'étant pas parfaitement symétrique, nous avons préféré le diviser en deux parties, afin d'en contrôler l'homogénéité.

L'hydrolysats pepsique du fragment NB-4 fournit donc 3 fractions peptidiques : fractions NB-4-1 S, NB-4-2 S et NB-4-3 S.

## B - CONTRÔLE D'HOMOGENEITE DES FRACTIONS PEPTIDIQUES

Le contrôle d'homogénéité des fractions peptidiques des hydrolysats pepsiques de l'histone H<sub>5</sub> (fraction H<sub>5</sub>-1 S) et du fragment NB-4 (fractions NB-4-1 S, 2 S et 3 S) est effectué par électrochromatographie sur papier et par électrophorèse en gel de polyacrylamide selon la technique de PANYIM et CHALKLEY (1969).

### 1. Electrochromatographie

Les électrochromatogrammes des différentes fractions peptidiques, révélés avec le réactif à la ninhydrine-cadmium, sont présentés dans la Figure 14.

Les fractions NB-4-1 S, NB-4-2 S et H<sub>5</sub>-1 S donnent la même traînée électrophorétique et n'ont pas migré en chromatographie.

La fraction NB-4-3 S, par contre, est constituée par un mélange complexe de petits peptides, qui ont été ultérieurement fractionnés par chromatographie d'échange d'ions sur résine Chromobeads P. Les résultats de cette étude sont présentés au paragraphe V de ce Chapitre.



## 2. Electrophorèse en gel de polyacrylamide

Les résultats sont respectivement présentés dans les Figures 12 et 13.

L'électrophorèse en présence d'un témoin interne (fragment NB-4 ou histone H<sub>5</sub>), montre que les fractions NB-4-1S, NB-4-2S et H<sub>5</sub>-1S sont homogènes et possèdent la même mobilité électrophorétique (gels n° 3, 5 et 9).

Par contre, les petits peptides de la fraction NB-4-3S ont migré beaucoup plus rapidement et ne sont pas détectables sur le gel après coloration (gel n° 7).

### C - COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES FRACTIONS PEPTIDIQUES ..... HOMOGENES .....

La composition en acides aminés des fractions NB-4-1S, NB-4-2S et H<sub>5</sub>-1S, établie sur des hydrolysats de 24 heures et de 72 heures, est présentée dans le tableau XVII, en comparaison avec la composition en acides aminés du fragment NB-4.

L'identité des fractions NB-4-1S et NB-4-2S, que laissaient présager les résultats obtenus en électrochromatographie et en gel de polyacrylamide (Figures 14 et 13), est ainsi confirmée.

Cette identité s'étend à la fraction H<sub>5</sub>-1S, de composition en acides aminés identique.

Ces 3 fractions représentent un seul et même peptide de 92 résidus.

Par souci de simplification, pour la suite de notre exposé, nous appellerons ce peptide : P x.



ACIDES AMINES	PEPTIDE P <sub>x</sub>			NB-4
	NB-4-1S	NB-4-2S	H <sub>5</sub> -1S	
	(°)	(°)	(°)	
Acide aspartique	1,21 (1)	1,06 (1)	1,10 (1)	3
Thréonine .....	2,96 (3)	2,91 (3)	2,93 (3)	4
Sérine .....	10,58 (11)	10,88 (11)	10,73 (11)	14
Acide glutamique	-	-	-	2
Proline .....	8,97 (9)	8,58 (9)	9,14 (9)	9
Glycine .....	2,34 (2)	2,09 (2)	2,05 (2)	7
Alanine .....	16,87 (17)	16,38 (17)	16,83 (17)	21
Valine .....	3,11 (3)	2,89 (3)	2,92 (3)	6
Méthionine ....	-	-	-	-
Isoleucine .....	-	-	-	2
Leucine .....	1,16 (1)	0,96 (1)	0,93 (1)	6
Tyrosine .....	-	-	-	-
Phénylalanine ..	-	-	-	1
Histidine .....	-	-	-	1
Lysine .....	32,28 (32)	non déterminé	32,50 (32)	36
Arginine .....	13,19 (13)	13,15 (13)	13,15 (13)	15
Nombre de résidus	92	92	92	127
(°) Les valeurs sont exprimées en rapports molaires. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre arrondi de résidus.				

COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES DES FRACTIONS NB-4-1S, NB-4-2S ET H<sub>5</sub>-1S (PEPTIDE P<sub>x</sub>),

OBTENUES PAR CHROMATOGRAPHIE DE GEL-FILTRATION DES HYDROLYSATS PEPSIQUES

DE L'HISTONE H<sub>5</sub> ET DU FRAGMENT NB-4 SUR COLONNE DE SEPHADEX G-50 F



Le peptide Px se caractérise par sa richesse en résidus basiques, qui représentent 50 % du nombre total d'acides aminés.

Il ne contient pas de résidus aromatiques, et renferme un résidu d'acide aspartique, un résidu de leucine, deux résidus de glycine, et trois résidus de thréonine et de valine.

Ces acides aminés, en nombre restreint, constituent autant de marqueurs qui présentent un grand intérêt pour le recouvrement et l'alignement des peptides dans la séquence.

L'isolement du peptide Px, avec un rendement supérieur à 80 %, à partir de l'histone H<sub>5</sub> ou de son fragment NB-4, constitue une étape déterminante dans l'étude de la partie COOH-terminale de la protéine, dont la séquence reste à élucider.

#### IV. ETUDE DU PEPTIDE P x

---

La méthodologie que nous avons employée est celle utilisée pour l'étude des protéines.

##### A - CRITERES DE PURETE

---

Ils sont fondés sur l'électrochromatographie et l'électrophorèse en gel de polyacrylamide.

Les résultats ont été présentés dans les Figures 12, 13 et 14.

##### B - DETERMINATION DE L'ACIDE AMINE EN POSITION NH<sub>2</sub>-TERMINALE

---

La dansylation du peptide P x, selon le protocole de GRAY et HARTLEY (1963), a permis d'identifier un résidu d'arginine en position NH<sub>2</sub>-terminale

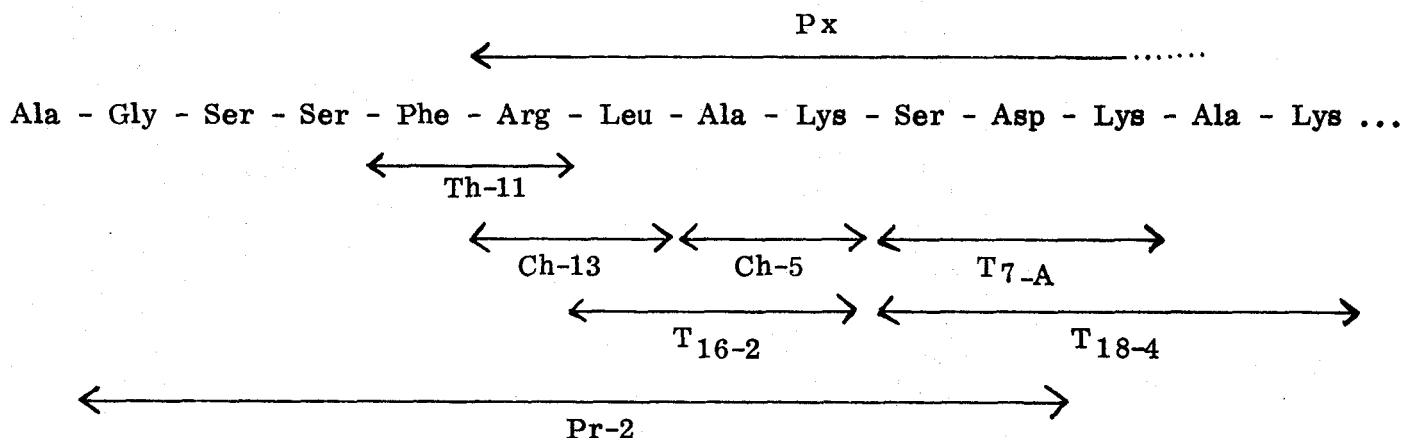
##### C - DETERMINATION DE LA SEQUENCE NH<sub>2</sub>-TERMINALE PAR DEGRADATION DE EDMAN

---

7 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des dérivés PTH- libérés, ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide P x :

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

Ces résultats confirment la séquence de cette partie de la protéine, adjacente au résidu de phénylalanine, établie par l'étude des peptides obtenus par hydrolyse de la protéine avec<sup>o</sup> la trypsine, la chymotrypsine, la thermolysine et la protéase staphylococcique :



Le peptide Px est donc situé immédiatement après le résidu de phénylalanine en position 93, et, par ses 92 résidus, il recouvre la séquence COOH-terminale de l'histone H<sub>5</sub>.

Son obtention résulte de l'hydrolyse de la liaison Phe - Arg par la pepsine.

Phe	-	Arg
93		94

#### D - DETERMINATION DE L'ACIDE AMINE EN POSITION COOH-TERMINALE

Une hydrolyse du peptide Px par la carboxypeptidase C, pendant 3 heures, à 30° C à pH 5,3, libère 1,33  $\mu$  mole de lysine par  $\mu$  mole de peptide (Tableau XVIII).

#### E - DETERMINATION DE LA SEQUENCE COOH-TERMINALE

La séquence COOH-terminale du peptide Px a été établie par une étude cinétique de l'hydrolyse par les carboxypeptidases A, B et C.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau XVIII.

- Une hydrolyse de 2 heures par la carboxypeptidase B libère 2,15  $\mu$  moles de lysine et 0,49  $\mu$  mole d'arginine, par  $\mu$  mole de peptide.
- Une cinétique d'hydrolyse du peptide Px, réalisée pendant 9 heures par la carboxypeptidase C, avec une concentration en enzyme supérieure à celle utilisée précédemment, donne les résultats suivants :
  - après 3 heures d'hydrolyse, il y a libération de 2,18  $\mu$  moles de lysine par  $\mu$  mole de peptide, ainsi que des traces de sérine, proline, alanine et arginine.
  - après 6 heures d'hydrolyse, il y a libération de 3  $\mu$  moles de lysine et environ 1  $\mu$  mole de chacun des 4 acides aminés précités, par  $\mu$  mole de peptide.
  - après 9 heures d'hydrolyse, une lysine supplémentaire apparaît (4,26  $\mu$  moles). Les taux de sérine, proline et arginine restent sensiblement voisins de 1, avec toutefois une augmentation prépondérante de l'alanine (1,51  $\mu$  mole).
- Une cinétique d'hydrolyse du peptide Px par les carboxypeptidases B et A, a été réalisée pendant 7 heures à 40° C à pH 8,0 .
  - une hydrolyse de 4 heures par la carboxypeptidase B libère 2,57  $\mu$  moles de lysine et 1,17  $\mu$  mole d'arginine par  $\mu$  mole de peptide.
  - après 4 heures d'hydrolyse par la carboxypeptidase B, le peptide Px est hydrolysé pendant 3 heures par la carboxypeptidase A. L'analyse des acides aminés fait apparaître la libération d'alanine et des traces de sérine.

La proline n'apparaît pas en raison de l'obstacle qu'elle constitue pour les carboxypeptidases A et B.

TABLEAU XVIII

ACIDES AMINES LIBERES	Cp C 3 heures (°°)	Cp B 2 heures	Cp C (°°)			Cp B 4 heures	Cp B + Cp A	
			3 heures	6 heures	9 heures		6 heures	7 heures
Sérine	5,482 (0,12)		13,401 (0,42)	28,027 (0,88)	39,646 (1,24)		9,855 (0,12)	19,257 (0,24)
Proline			13,688 (0,43)	28,300 (0,88)	40,313 (1,26)			
Alanine	6,845 (0,15)		11,339 (0,35)	29,134 (0,91)	48,370 (1,51)		90,767 (1,13)	117,708 (1,47)
Lysine	59,644 (1,33)	172,040 (2,15)	69,655 (2,18)	102,655 (3,21)	136,352 (4,26)	205,978 (2,57)	274,918 (3,44)	340,782 (4,26)
Arginine	8,999 (0,20)	38,930 (0,49)	10,067 (0,31)	22,410 (0,70)	36,703 (1,15)	93,887 (1,17)	139,358 (1,74)	231,122 (2,89)

(°) Les résultats sont exprimés en nanomoles d'acides aminés libérés. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de moles d'acides aminés libérés par mole de peptide Px.

(°°) Rapport enzyme / substrat : 1 / 100. (°°°) Rapport enzyme / substrat : 1 / 25



HYDROLYSE DU PEPTIDE Px PAR LES CARBOXYPEPTIDASES A, B ET C (°)

L'ensemble des résultats obtenus par hydrolyse du peptide Px par les carboxypeptidases A, B et C nous permet de proposer la séquence COOH-terminale suivante :

- (Pro, Ser, Lys, Ala) - Arg - Lys - Lys

### Discussion

Ces résultats sont en parfait accord avec les résultats obtenus par hydrolyse de l'histone H<sub>5</sub> ou de son fragment NB-4 par les carboxypeptidases A, B et C (voir Chapitre III). Ils témoignent donc de la position COOH-terminale du peptide Px dans la séquence de la protéine.

L'hydrolyse par les carboxypeptidases B et A des peptides Ac-3 (résidus 100 à 185) et Ac-2a (résidus 66 à 185), obtenus par coupure de la protéine en milieu acide acétique 0,25 N, confirme la séquence COOH-terminale que nous proposons.

L'ensemble de ces résultats est présenté dans le tableau XIX.

## F - ETUDE DE LA SEQUENCE EN ACIDES AMINES DU PEPTIDE Px

### 1. Choix des méthodes

Le peptide Px renfermant 92 résidus d'acides aminés, il était nécessaire de le couper en plusieurs peptides, afin d'en déterminer la séquence en acides aminés.

La grande richesse du peptide en résidus de lysine (32 sur 92 résidus) nous a incitée à bloquer les groupements  $\epsilon$ -aminés de la lysine par succinylation, avant de soumettre le peptide à l'hydrolyse trypsique.

Cette méthode de blocage avait pour but de limiter l'action de la trypsine aux seules liaisons arginyle, et de permettre l'obtention de peptides

TABLEAU XIX

P x (94-185) (Cp B + Cp A ; Cp C)	: .....	(Pro, Ser, Lys, Ala) - Arg - Lys - Lys (OH)
H <sub>5</sub> (1-185) (Cp B + Cp A ; Cp C)	: .....	(Pro - Ser) (Lys, Ala) - Arg - Lys - Lys (OH)
NB-4 (59-185) (Cp B + Cp A)	: .....	(Ser, Lys, Ala, Arg) - Lys - Lys (OH)
Ac-3 (100-185) (Cp B + Cp A)	: .....	(Lys, Ala) - Arg - Lys - Lys (OH)
Ac-2 a (66-185) (Cp B + Cp A)	: .....	(Lys, Ala) - Arg - Lys - Lys (OH)

SEQUENCE COOH-TERMINALE DE L'HISTONE H<sub>5</sub> ETABLIÉE PAR HYDROLYSE

AVEC LES CARBOXYPEPTIDASES A, B ET C





de caractère acide, facilement séparables sur colonne de résine Chromo-beads P.

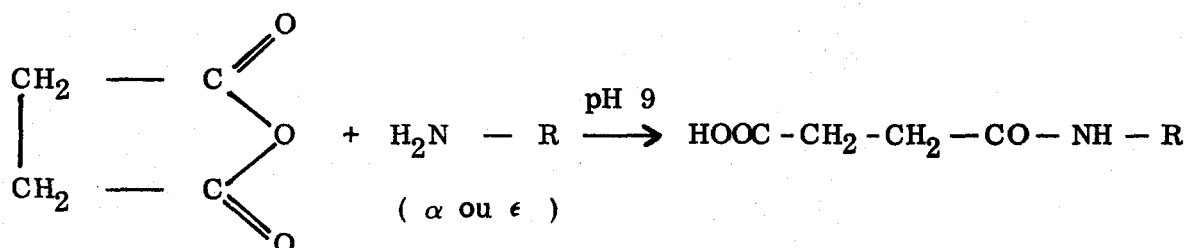
Le peptide Px renferme 13 résidus d'arginine. Théoriquement, l'hydrolyse trypsique du peptide succinylé devrait fournir 14 peptides. En fait, ce nombre théorique n'est que de 13, en raison du résidu d'arginine identifié en position NH<sub>2</sub>-terminale.

## 2. Principe de la succinylation

---

L'anhydride succinique réagit spécifiquement avec les groupes α- et ε- aminés libres des protéines (HABEEB et al., 1958).

Le schéma de la réaction est le suivant :



Contrairement à la maléylation, la réaction est irréversible, et le blocage est définitif.

Comme la maléylation, la succinylation accroît la solubilité des protéines en milieu alcalin.

Par les modifications de charges électriques qu'elle introduit dans la protéine, la succinylation provoque un déroulement de la structure spatiale de la protéine, et rend ainsi plus accessibles à la trypsine certains sites de coupure.

## 3. Succinylation du peptide Px

---

Nous avons utilisé la technique de HABEEB et al. (1958).

5 micromoles de peptide sont dissous dans 10 ml de tampon phosphate dipotassique K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,1 M pH 9,0.

24 micromoles d'anhydride succinique par micromole de groupements  $\text{NH}_2$  libres sont ajoutées lentement, à  $25^\circ \text{C}$  et sous agitation constante, en maintenant le pH à 9,0 à l'aide de soude 1 M.

Après stabilisation du pH à 9,0, la solution de peptide succinylé est dessalée par passage sur une colonne de Sephadex G-25 F (195 x 2,5 cm) équilibrée et éluée avec  $\text{NH}_4\text{OH}$  5 mM.

Le diagramme d'élution, obtenu par lecture de la densité optique à 230 nm, est présenté dans la Figure 15.

Seule, la fraction 1 S donne une réaction de Sakaguchi positive : elle correspond au peptide Px succinylé. Elle est alors rassemblée et évaporée à sec.

#### 4. Hydrolyse trypsique du peptide Px succinylé

---

Le peptide Px succinylé est hydrolysé à  $37^\circ \text{C}$  pendant 4 h 30 en milieu bicarbonate d'ammonium 0,1 M pH 8,0, avec la trypsine traitée par le TPCK (le TPCK ou L-1-tosylamido-2-phényl-éthyl-chlorométhyl-kétone est un inhibiteur de la chymotrypsine).

La TPCK-trypsine est ajoutée au temps 0 (0,5 mg) et après 2 heures d'hydrolyse (0,5 mg). Le rapport final enzyme / substrat est de 1/50 en poids.

L'arrêt de l'hydrolyse est obtenu en abaissant le pH à 3,5 à l'aide d'acide formique, et le mélange réactionnel est alors lyophilisé.

Nous avons soumis l'hydrolysate lyophilisé à une électrochromatographie sur papier.

Les électrochromatogrammes, colorés à la ninhydrine-cadmium et à la phénanthrène-quinone, sont présentés dans la Figure 16 et montrent l'apparition de 12 taches.

La tache 6, révélée à la ninhydrine, n'apparaît pas sur l'électrophorégramme révélé à la phénanthrène-quinone, tandis que les

## DESSALAGE DU PEPTIDE Px SUCCINYLE PAR CHROMATOGRAPHIE

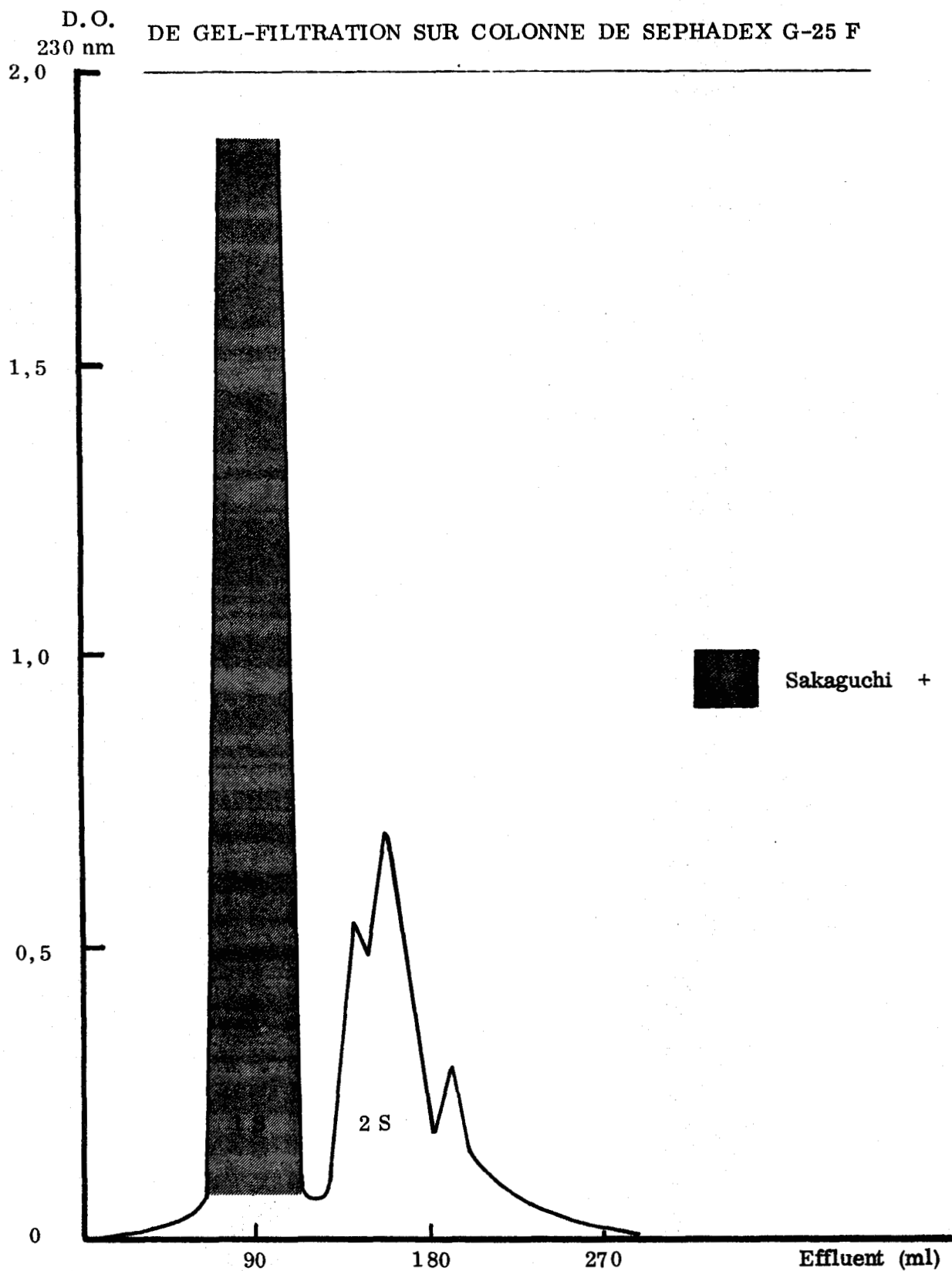
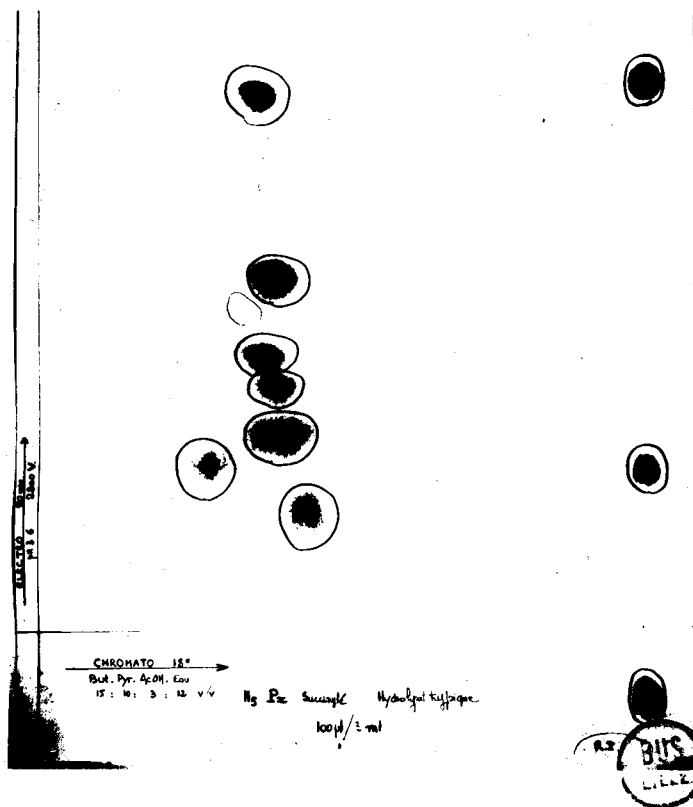
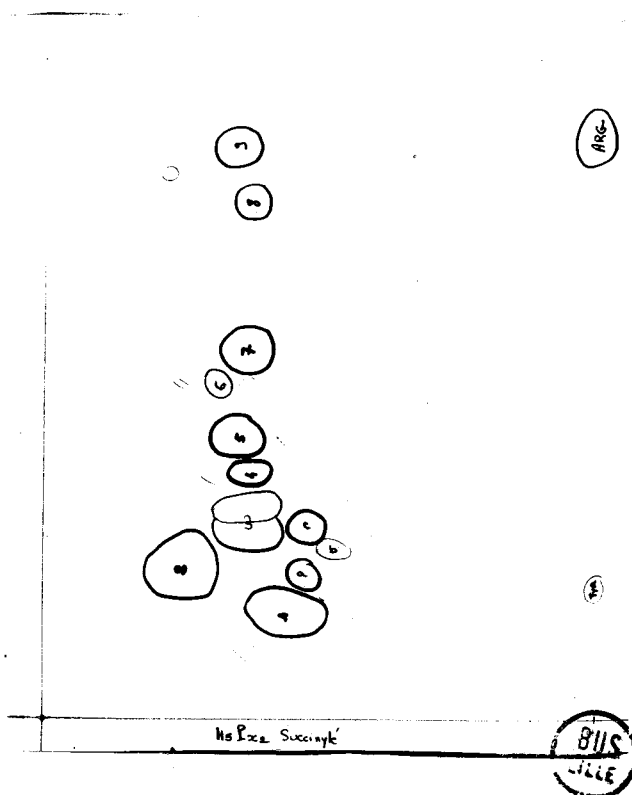


Figure 15

CARTES PEPTIDIQUES DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE DU PEPTIDE Px SUCCINYLE



.....  
COLORATION A LA  
.....  
NINHYDRINE-CADMIUM  
.....



.....  
COLORATION A LA  
.....  
PHENANTHRENE-  
.....  
QUINONE  
.....

taches a, b, c et 8 n'apparaissent qu'après coloration avec ce dernier réactif (la tache 8 donne une très faible coloration à la ninhydrine).

#### 5. Séparation des peptides trypsiques du peptide Px succinylé

---

Les peptides trypsiques du peptide Px succinylé ont été fractionnés par chromatographie d'échange d'ions sur résine Chromobeads P.

2 fractionnements ont ainsi été réalisés :

- un fractionnement des peptides trypsiques du peptide Px succinylé, préparé à partir du fragment NB-4.
- un fractionnement des peptides trypsiques du peptide Px succinylé, préparé à partir de l'histone H<sub>5</sub> totale.

La séparation et l'étude de ces différents peptides ne sont pas rigoureusement identiques, et font apparaître quelques différences.

Nous présenterons donc séparément ces 2 études en les différenciant l'une de l'autre, à l'aide de la nomenclature suivante :

- nous appellerons P x<sub>1</sub> , le peptide Px (92 résidus) obtenu par hydrolyse pepsique du fragment NB-4,
- nous appellerons P x<sub>2</sub> , le peptide Px (92 résidus) obtenu par hydrolyse pepsique de l'histone H<sub>5</sub> .

#### 6. Quelques problèmes liés à l'étude structurale des peptides obtenus par hydrolyse trypsique, après succinylation, des peptides Px<sub>1</sub> et Px<sub>2</sub>

---

Entreprise très récemment, l'étude des hydrolysats trypsiques des peptides Px<sub>1</sub> (préparé à partir du fragment NB-4) et Px<sub>2</sub> (préparé à partir de l'histone H<sub>5</sub>) succinylés, est encore incomplète actuellement.

Nous présenterons donc les résultats partiels de cette étude, que nous envisageons d'achever rapidement.

Cependant, la détermination de la séquence de ces peptides tryptiques nous a fait rencontrer de nombreuses difficultés, que nous ne pouvions prévoir.

Avant d'aborder l'étude de ces peptides, il est donc nécessaire de préciser certains points acquis au cours de cette étude.

#### a) Analyses d'acides aminés

-----

Le peptide Px (Px<sub>1</sub> ou Px<sub>2</sub>) renferme 3 résidus de valine, qui devaient théoriquement nous servir d'acides aminés marqueurs pour l'étude de la séquence de la partie COOH-terminale de la protéine, comme les 2 résidus de glycine et les 3 résidus de thréonine.

La plupart des diagrammes de composition en acides aminés des peptides tryptiques du peptide Px<sub>1</sub> ou Px<sub>2</sub> succinylé, font apparaître un pic dédoublé plus ou moins important, au temps d'éluion de la valine.

Ce pic, dont nous ne pouvons expliquer le dédoublement, nous a fortement gênée pour l'étude de nos peptides, ne sachant pas toujours s'il correspondait effectivement à de la valine.

#### b) Dansylation des peptides

-----

La dansylation des peptides, selon le protocole de GRAY et HARTLEY (1963), fait apparaître, pour certains d'entre eux, une tache au niveau du témoin DNS-Gly, après migration de 90 minutes dans le système solvant Benzène - Pyridine - Acide acétique (80 : 20 : 5 ; v : v : v).

La comparaison des compositions en acides aminés de ces peptides, dont la plupart ne renferment pas de glycine, ainsi que la connaissance des séquences situées au voisinage des deux derniers résidus de glycine de l'histone H<sub>5</sub> (Ser - Pro - Gly - Lys - Lys - Lys - Ala - Lys et Ala - Lys - Ser - Gly - Ala - Arg) nous ont conduite à admettre que le dérivé dansylé identifié au niveau du témoin DNS - Gly, correspond au dérivé dansylé de la lysine succinylée :  $\alpha$ -DNS-  $\epsilon$ -succinyl-Lysine.

c) Dégradation de Edman  
-----

L'identification des dérivés PTH- de nos peptides fait apparaître, dans de nombreux cas, une tache de migration nulle dans le système solvant E : acétate de butyle - eau-formamide - acide propionique (97 : 3 : 4 : 3 ; v / v).

La composition en acides aminés des peptides correspondants, et la comparaison avec les séquences des peptides chymotrypsiques, trypsiques et thermolysiques de la partie COOH-terminale de la protéine, nous ont amenée à identifier ce dérivé PTH-, localisé au niveau du dépôt, au dérivé PTH- de la lysine succinylée :  $\alpha$ -PTH-  $\epsilon$ -succinyl-lysine.

d) Hydrolyse des peptides par les carboxypeptidases A, B et C  
-----

Des études cinétiques de l'hydrolyse des peptides trypsiques du peptide Px (Px<sub>1</sub> ou Px<sub>2</sub>) succinylé montrent que l'action de ces trois exopeptidases est bloquée par la présence d'un résidu de lysine succinylé.

G - SEPARATION ET ETUDE DES PEPTIDES TRYPSIQUES DU  
.....  
PEPTIDE Px<sub>1</sub> SUCCINYLE (PREPARE A PARTIR DU FRAGMENT NB-4)  
.....

Le diagramme d'élution des peptides trypsiques du peptide Px<sub>1</sub> succinylé, fractionnés par chromatographie d'échange d'ions sur résine Chromobeads P, est présenté dans la Figure 17 et montre la séparation des peptides en 13 fractions.

Nomenclature

---

Les fractions peptidiques sont numérotées suivant leur ordre d'élution de la colonne : fractions 1 à 13.

La séquence de la partie COOH-terminale de l'histone H<sub>5</sub> n'étant pas totalement connue, nous désignerons les peptides trypsiques du peptide Px<sub>1</sub> succinylé par les lettres Px<sub>1</sub> - T<sub>S</sub> - , suivies d'un chiffre ou nombre corres-

DIAGRAMME D'ÉLUTION DES PEPTIDES TRYPSIQUES DU PEPTIDE Px-1 SUCCINYLYÉ (PRÉPARÉ A PARTIR DU FRAGMENT NB-4)

FRACTIONNÉS SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P

D.O. 570 nm

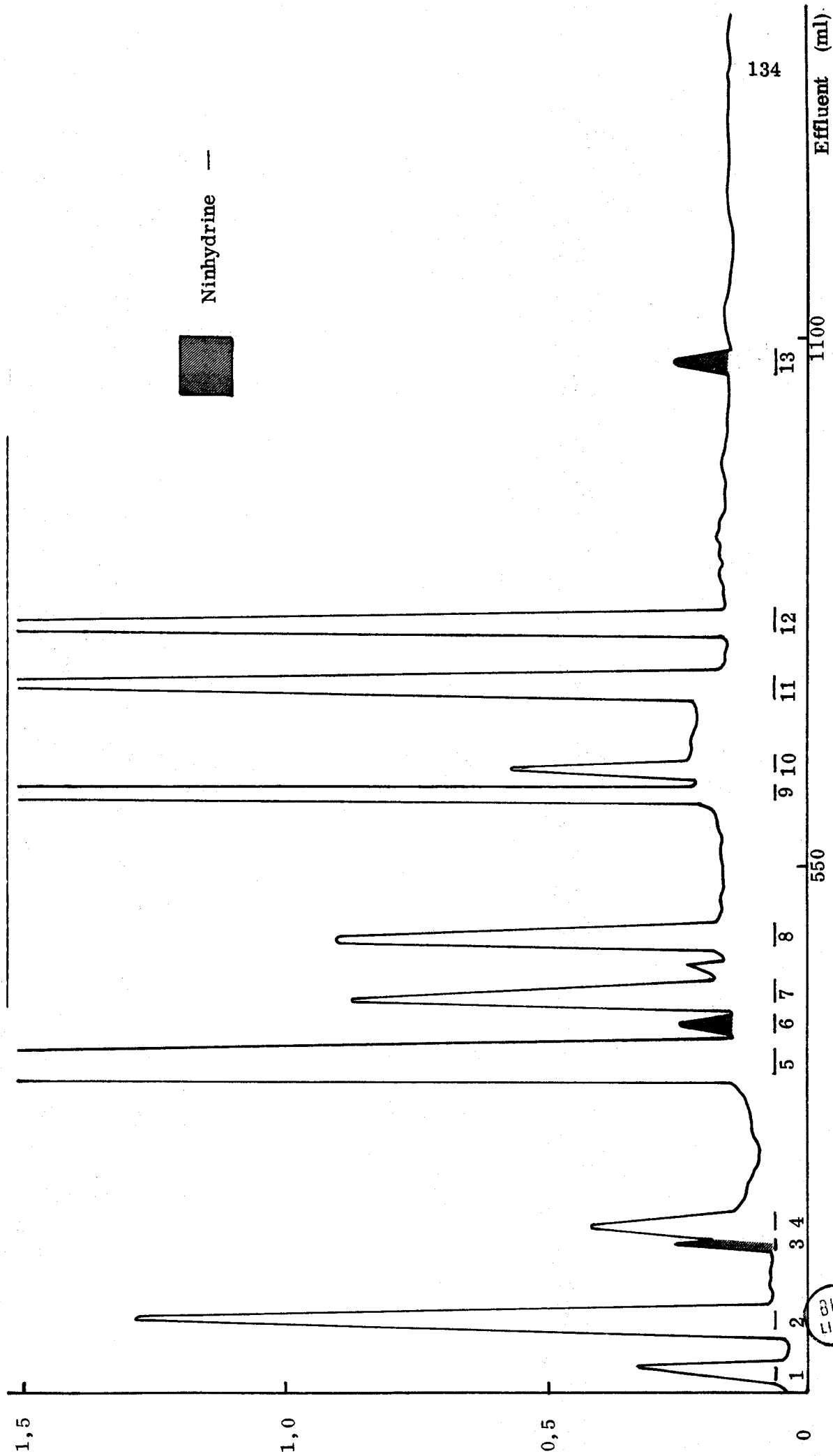


Figure 17



pendant à la fraction dans laquelle ils sont élués.

Le mode de purification est éventuellement indiqué par une lettre (électrophorèse préparative sur papier) ou un chiffre (chromatographie préparative sur papier).

Exemple : peptide  $Px_1$  - TS-2-A : peptide obtenu par purification en électrophorèse préparative sur papier, de la fraction 2 de l'hydrolysate trypsique du peptide  $Px_1$  succinylé.

La fraction 5 correspond à l'ammoniaque.

Toutes les autres fractions donnent une réaction de SAKAGUCHI positive.

Les fractions 3, 6 et 13 ne sont pas révélées avec la ninhydrine.

La composition et la séquence partielle en acides aminés des peptides tryptiques du peptide  $Px_1$  succinylé sont présentées dans les tableaux XX et XXI.

TABLEAU XX

ACIDES AMINES	Px1-TS-1	Px1-TS-2A	Px1-TS-2B	Px1-TS-3	Px1-TS-4	Px1-TS-7	Px1-TS-8	Px1-TS-9-A	Px1-TS-9-B	Px1-TS-10	Px1-11	Px1-TS-12	Px1-TS-13
Acide aspartique							0,93 (1)						
Thréonine	1,23 (1)	1,01 (1)			0,93 (1)								
Sérine	1,87 (2)	2,70 (3)	1,02 (1)	1,00 (1)	1,92 (2)	0,95 (1)	1,21 (1)	0,99 (1)	1,08 (1)	1,12 (1)			
Proline	2,97 (3)	3,39 (3)	1,00 (1)	1,10 (1)	1,96 (2)								0,90 (1)
Glycine		1,10 (1)							1,26 (1)				
Alanine	3,93 (4)	3,83 (4)			2,83 (3)	2,44 (3)	2,01 (2)		1,97 (2)	0,73 (1)		1,02 (1)	
Valine	Non Déterminé	1,17 (1)			1,17 (1)	0,87 (1)							
Leucine							0,77 (1)						
Lysine	4,89 (5)	8,06 (8)	3,04 (3)	2,06 (2)	6,13 (6)	4,24 (4)	2,63 (3)	1,90 (2)	1,09 (1)	2,24 (2)		1,14 (1)	
Arginine	1,12 (1)	2,00 (2)		1,00 (1)	1,05 (1)	1,00 (1)	1,06 (1)	1,10 (1)	0,95 (1)	1,00 (1)	Non Déterminé	1,00 (1)	1,00 (1)
Nombre de résidus	17	23	5	5	16	10	9	4	6	5	-	3	2



COMPOSITIONS EN ACIDES AMINÉS DES PEPTIDES TRYPSIQUES DU PEPTIDE Px1 SUCCINYLIÉ, PRÉPARÉ A PARTIR DU FRAGMENT NB-4 (\*)

(\*) Les résultats sont exprimés en rapports molaire. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre arrondi de résidus.

TABLEAU XXI

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 : →
- . Hydrolyse par les carboxypeptidases : ←

Px 1 - TS-1	$\overline{\text{Ala}}$ - (Thr, Ser <sub>2</sub> , Pro <sub>3</sub> , Ala <sub>3</sub> , Val, Lys <sub>5</sub> , Arg)
Px 1 - TS-2-A	$\overrightarrow{\text{Lys}}$ - $\overrightarrow{\text{Ser}}$ - $\overrightarrow{\text{Pro}}$ - $\overrightarrow{\text{Lys}}$ - $\overrightarrow{\text{Lys}}$ - (Thr, Ser <sub>2</sub> , Pro <sub>2</sub> , Gly, Ala <sub>4</sub> , Val, Lys <sub>5</sub> , Arg <sub>2</sub> )
Px 1 - TS-2-B	$\overrightarrow{\text{Lys}}$ - $\overrightarrow{\text{Ser}}$ - $\overrightarrow{\text{Pro}}$ - Lys - Lys
Px 1 - TS-3	$\overline{\text{Lys}}$ - (Ser, Pro, Lys, Arg)
Px 1 - TS-4	$\overrightarrow{\text{Ala}}$ - $\overrightarrow{\text{Ser}}$ - $\overrightarrow{\text{Pro}}$ - $\overrightarrow{\text{Lys}}$ - $\overrightarrow{\text{Lys}}$ - $\overrightarrow{\text{Ala}}$ - $\overrightarrow{\text{Lys}}$ - (Thr, Ser, Pro, Ala, Val, Lys <sub>3</sub> , Arg)
Px 1 - 6	$\alpha$ -succinyl - Arg
Px 1 - TS-7	$\overrightarrow{\text{Lys}}$ - $\overrightarrow{\text{Ala}}$ - $\overrightarrow{\text{Ser}}$ - $\overrightarrow{\text{Lys}}$ - $\overrightarrow{\text{Ala}}$ - $\overrightarrow{\text{Lys}}$ - $\overrightarrow{\text{Lys}}$ - $\overleftarrow{\text{Ala}}$ - $\overleftarrow{\text{Val}}$ - $\overleftarrow{\text{Arg}}$
Px 1 - TS-8	$\overrightarrow{\text{Leu}}$ - $\overrightarrow{\text{Ala}}$ - $\overrightarrow{\text{Lys}}$ - $\overrightarrow{\text{Ser}}$ - $\overrightarrow{\text{Asp}}$ - $\overrightarrow{\text{Lys}}$ - Ala - Lys - $\overleftarrow{\text{Arg}}$
Px 1 - TS-9-A	$\overrightarrow{\text{Lys}}$ - $\overrightarrow{\text{Lys}}$ - Ser - Arg
Px 1 - TS-9-B	$\overrightarrow{\text{Ala}}$ - $\overrightarrow{\text{Lys}}$ - $\overrightarrow{\text{Ser}}$ - $\overrightarrow{\text{Gly}}$ - Ala - Arg
Px 1 - TS-10	$\overline{\text{Lys}}$ - (Ser, Ala, Lys, Arg)
Px 1 - 11	Arg
Px 1 - TS-12	$\overrightarrow{\text{Lys}}$ - $\overrightarrow{\text{Ala}}$ - Arg
Px 1 - TS-13	$\overline{\text{Pro}}$ - Arg



SEQUENCES PARTIELLES EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES TRYPSIQUES DU PEPTIDE Px 1 SUCCINYLE

PREPARE A PARTIR DU FRAGMENT NB-4

Peptide Px<sub>1</sub>-Ts-1

Ala - (Thr, Ser<sub>2</sub>, Pro<sub>3</sub>, Ala<sub>3</sub>, Val, Lys<sub>5</sub>, Arg)

Le peptide Px<sub>1</sub>-Ts-1 est obtenu pur dans la fraction 1.

Composition

Thr	Ser	Pro	Ala	Val	Lys	Arg
1,23	1,87	2,97	3,93	non dé-	4,89	1,12
				terminée		

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

DNS - Ala

∴

Peptide Px<sub>1</sub>-Ts-2-A

Lys-Ser-Pro-Lys-Lys- (Thr, Ser<sub>2</sub>, Pro<sub>2</sub>, Gly, Ala<sub>4</sub>, Val, Lys<sub>5</sub>, Arg<sub>2</sub>)

Le peptide Px<sub>1</sub>-Ts-2-A est localisé dans la fraction 2 avec le peptide Px<sub>1</sub>-Ts-2-B, dont il est séparé par électrophorèse préparative sur papier à pH 1,9, pendant 60 minutes, sous une tension de 3000 volts.

Composition

Thr	Ser	Pro	Gly	Ala	Val	Lys	Arg
1,01	2,70	3,39	1,10	3,83	1,17	8,06	2,00

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

α-DNS- ε-succinyl-Lys

Dégradation de Edman

4 cycles de dégradation de Edman, en couplage avec la méthode de dansylation, ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide

Px<sub>1</sub>-Ts-2-A :

Lys - Ser - Pro - Lys - Lys

La présence de 2 résidus de proline et de 2 résidus d'arginine dans la partie COOH-terminale du peptide Px<sub>1</sub>-Ts-2-A, suggère l'existence d'au moins une liaison Arg - Pro inaccessible à l'action de la trypsine.

∴

Peptide Px<sub>1</sub>-Ts-2-B

Lys - Ser - Pro - Lys - Lys

Le peptide Px<sub>1</sub>-Ts-2-B est localisé dans la fraction 2 avec le peptide Px<sub>1</sub>-Ts-2-A, dont il est séparé par électrophorèse préparative sur papier à pH 1,9, pendant 60 minutes, sous une tension de 3000 volts.

Composition

Ser	,	Pro	,	Lys
1,02		1,00		3,04

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

∗ - DNS - ε - succinyl-Lys

Dégradation de Edman

3 cycles de dégradation de Edman, utilisée en méthode soustractive, ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide Px<sub>1</sub>-Ts-2-B :

Lys - Ser - Pro

Composition	Ser	,	Pro	,	Lys
	1,02		1,00		3,04

(Composition)	Ser	Pro	Lys
	1,02	1,00	3,04
1 <sup>er</sup> cycle	0,93	1,00	<u>2,66</u>
2ème cycle	<u>0,55</u>	1,00	2,61
3ème cycle	0,44	<u>0,44</u>	2,00

Les deux derniers résidus de lysine sont placés par différence en position COOH-terminale. La séquence du peptide  $Px_1$ -Ts-2-B est donc :

Lys - Ser - Pro - Lys - Lys

#### Hydrolyse par les carboxypeptidases B et A

---

Une hydrolyse de 4 heures à 40° C par la carboxypeptidase B ne libère aucun résidu d'acide aminé.

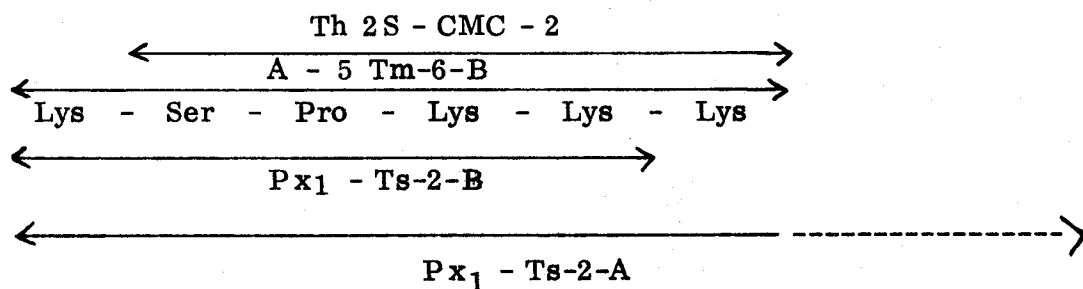
Il en est de même pour une hydrolyse de 4 heures à 40° C par la carboxypeptidase A.

Le résidu de lysine succinylé en position COOH-terminale est donc un obstacle à l'action des carboxypeptidases B et A.

Le peptide  $Px_1$ -Ts-2-B ne renferme pas d'arginine. Son obtention laisse supposer que la réaction de succinylation du peptide  $Px_1$  a été incomplète, permettant ainsi l'hydrolyse d'une liaison lysyle par la trypsine.

Le peptide  $Px_1$ -Ts-2-B recouvre la séquence  $NH_2$ -terminale du peptide  $Px_1$ -Ts-2-A.

L'étude des peptides tryptiques de l'histone maléylée et des peptides thermolysiques nous permet d'établir les recouvrements suivants :



Peptide Px<sub>1</sub>-Ts-3

Lys - (Ser , Pro , Lys , Arg )

Le peptide Px<sub>1</sub>-Ts-3 est obtenu pur dans la fraction 3.

Composition

Ser ,	Pro ,	Lys ,	Arg
1,00	1,10	2,06	1,00

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

α - DNS - ε - succinyl - Lys

°°

Peptide Px<sub>1</sub>-Ts-4

Ala-Ser-Pro-Lys-Lys-Ala-Lys- (Thr, Ser, Pro, Ala, Val, Lys<sub>3</sub>, Arg)

Le peptide Px<sub>1</sub>-Ts-4 est obtenu pur dans la fraction 4.

Composition

Thr ,	Ser ,	Pro ,	Ala ,	Val ,	Lys ,	Arg
0,93	1,92	1,96	2,83	1,17	6,13	1,05

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

DNS - Ala

Dégradation de Edman

6 cycles de dégradation de Edman, en couplage avec la méthode de dansylation, ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide Px<sub>1</sub>-Ts-4 :

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

°°

## Fraction P<sub>x</sub><sub>1</sub>-6

---

### α- succinyl - Arg

La fraction P<sub>x</sub><sub>1</sub>-6 , faiblement révélée à la ninhydrine, donne une réaction de SAKAGUCHI fortement positive.

### Composition

---

L'hydrolyse de la fraction P<sub>x</sub><sub>1</sub>-6 , pendant 24 heures, à 110° C, en milieu HCl 6 N, ne libère que de l'arginine.

L'analyse directe de cette fraction, sans hydrolyse préalable, ne fait apparaître aucun acide aminé.

Ces résultats nous ont amenée à conclure que la fraction P<sub>x</sub><sub>1</sub>-6 correspond à de l'arginine libre α-succinylée : la réaction à la ninhydrine est négative en raison du groupement succinyl fixé sur le groupe α-aminé du résidu d'arginine. Cet acide aminé α-NH<sub>2</sub>-substitué n'est donc pas détectable sur auto-analyseur sans hydrolyse préalable.

Cette hypothèse a été confirmée par une électrophorèse sur papier à pH 3,6 pendant 90 minutes, en déposant une aliquote de la fraction P<sub>x</sub><sub>1</sub>-6 avant et après hydrolyse.

Les électrophorégrammes, révélés à la ninhydrine-cadmium et à la phénanthrène-quinone, sont présentés dans la Figure 18.

La révélation à la ninhydrine-cadmium fait apparaître une tache de très faible intensité, tandis que la révélation à la phénanthrène-quinone donne une tache très intense de fluorescence bleutée, et de migration légèrement supérieure à celle de l'acide aminé témoin tyrosine.

La fraction P<sub>x</sub><sub>1</sub>-6 hydrolysée, par contre, migre au niveau du témoin arginine : l'hydrolyse acide a coupé le groupement succinyle et libéré de l'arginine libre.





Figure 18-A

(1) Fraction Px<sub>1</sub>-6 : Révélation avec le réactif à la phénanthrène-quinone.

(2) Fraction Px<sub>1</sub>-6 : Révélation avec le réactif à la ninhydrine-cadmium.

T : Témoins acide aspartique, tyrosine, arginine.

Figure 18-B

révélée avec le réactif à la phénanthrène-quinone.

(3) Fraction Px<sub>1</sub>-6, après hydrolyse de 24 h. à 110° C, en milieu HCl 6 N.

(4) Fraction Px<sub>1</sub>-6, sans hydrolyse.

T : Témoins acide aspartique, tyrosine, arginine.

Rf : Arg / Tyr : 0,31

Rf : Succ.Arg / Tyr : 0,81



L'arginine  $\alpha$ -succinylée provient du résidu d'arginine en position 94, situé en position  $\text{NH}_2$ -terminale du peptide  $\text{Px}_1$ .

Son obtention résulte de l'hydrolyse de la liaison Arg - Leu par la trypsine.

94 95

∴

### Peptide $\text{Px}_1$ -Ts-7

Lys - Ala - Ser - Lys - Ala - Lys - Lys - Ala - Val - Arg

Le peptide  $\text{Px}_1$ -Ts-7 est obtenu pur dans la fraction 7.

### Composition

Ser	Ala	Val	Lys	Arg
0,95	2,44	0,87	4,24	1,00

### Dansylamino-acide $\text{NH}_2$ -terminal

$\alpha$ - DNS -  $\epsilon$  - succinyl - Lys

### Dégradation de Edman

7 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des dérivés PTH- libérés, ont permis d'établir la séquence  $\text{NH}_2$ -terminale du peptide  $\text{Px}_1$ -Ts-7 :

Lys - Ala - Ser - Lys - Ala - Lys - Lys.

Le résidu d'arginine est placé en position  $\text{COOH}$ -terminale en raison de la spécificité limitée de la trypsine.

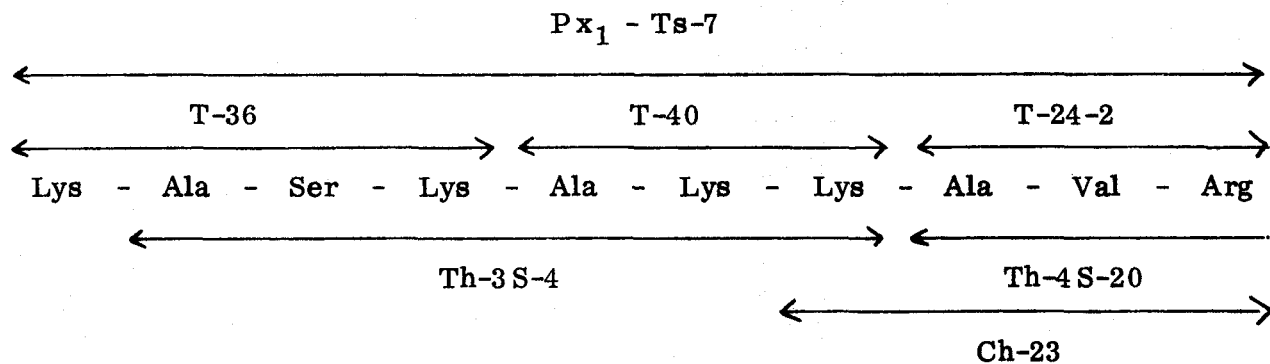
### Hydrolyse par les carboxypeptidases B et A

Une hydrolyse de 4 heures par la carboxypeptidase B libère 0,89  $\mu$ mole d'arginine par  $\mu$ mole de peptide. Après 4 heures d'hydrolyse par la carboxy-

peptidase B, le peptide  $Px_1$ -Ts-7 est hydrolysé pendant 4 heures par la carboxypeptidase A.

L'analyse des acides aminés fait apparaître la libération de 1,02  $\mu$ mole d'arginine, 0,11  $\mu$ mole de valine et 0,19  $\mu$ mole d'alanine par  $\mu$ mole de peptide, sous l'action conjuguée des deux carboxypeptidases.

La séquence complète du peptide  $Px_1$ -Ts-7 a été déduite des données structurales fournies par l'étude du peptide chymotrypsique Ch-23, des peptides thermolysiques Th-3S-4 et Th-4S-20 et des peptides tryptiques T-36, T-40 et T-24-2 :



°°

Peptide  $Px_1$ -Ts-8 (résidus 95 à 103)

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

Le peptide  $Px_1$ -Ts-8 est obtenu pur dans la fraction 8.

Composition

Asp	,	Ser	,	Ala	,	Leu	,	Lys	,	Arg
0,93		1,21		2,01		0,77		2,63		1,06

Dansylamino-acide  $NH_2$ -terminal

DNS - Leu

### Dégradation de Edman

---

6 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des dérivés PTH- libérés, ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide Px<sub>1</sub>-Ts-8 :

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

Le résidu d'arginine est placé en position COOH-terminale en raison de la spécificité limitée de la trypsine.

### Hydrolyse par les carboxypeptidases B et A

---

Une hydrolyse de 2 heures à 40° C par la carboxypeptidase B libère 0,94 μmole d'arginine par μmole de peptide.

Une hydrolyse de 4 heures par la carboxypeptidase B, dans les mêmes conditions, libère également 0,94 μmole d'arginine par μmole de peptide.

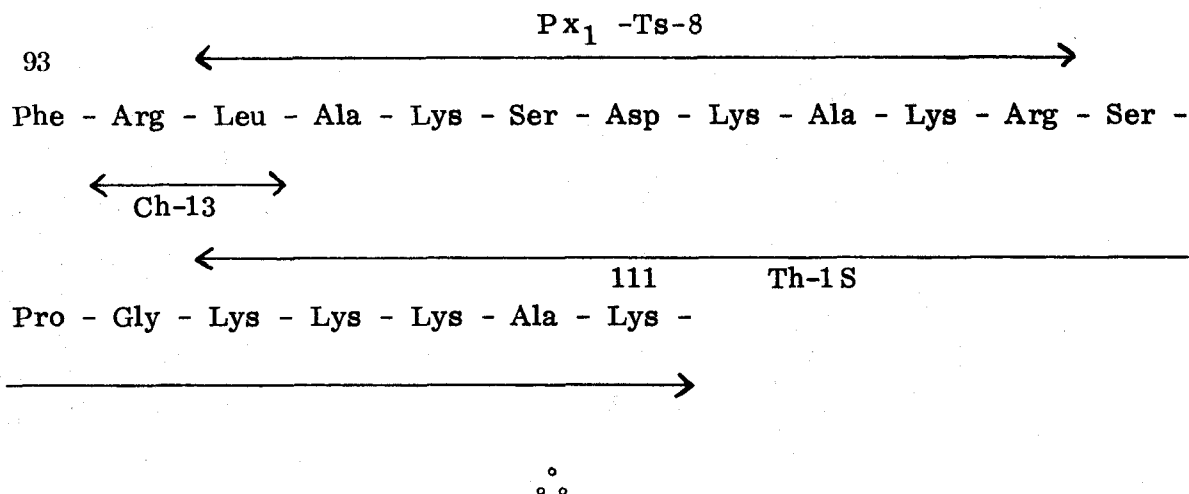
Après 4 heures d'hydrolyse par la carboxypeptidase B, l'addition de carboxypeptidase A ne libère aucun acide aminé neutre ou acide.

L'action des carboxypeptidases B et A est limitée par la présence d'un résidu de lysine ε-succinylée immédiatement avant le résidu d'arginine en position COOH-terminale.

La séquence complète du peptide Px<sub>1</sub>-Ts-8 a été déduite de la séquence des 111 premiers résidus d'acides aminés, établie par étude des peptides chymotrypsiques, tryptiques et thermolysiques de la protéine.

Le peptide Px<sub>1</sub>-Ts-8 renferme le dernier résidu de leucine et le dernier résidu d'acide aspartique présents dans la molécule d'histone.

Il est donc situé immédiatement après le résidu d'arginine en position 94, et recouvre la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide thermolysique Th-1 S :



### Peptide Px<sub>1</sub>-Ts-9-A

Lys - Lys - Ser - Arg

Le peptide Px<sub>1</sub>-Ts-9-A est localisé dans la fraction 9 avec le peptide Px<sub>1</sub>-Ts-9-B, dont il est séparé par électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6 pendant 90 minutes sous une tension de 3000 volts.

### Composition

Ser	,	Lys	,	Arg
0,99		1,90		1,10

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

α- DNS - ε- succinyl - Lys

### Dégradation de Edman

2 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des dérivés PTH- libérés, ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide Px<sub>1</sub>-Ts-9-A :

Lys - Lys.

Le résidu d'arginine est placé en position COOH-terminale en raison de la spécificité limitée de la trypsine, et le résidu de sérine est placé par différence :

Lys - Lys - Ser - Arg.

Le peptide  $Px_1$ -Ts-9-A est identique au peptide  $A_5$ -Tm-6-A.

∴

### Peptide $Px_1$ -Ts-9-B

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

Le peptide  $Px_1$ -Ts-9-B est localisé dans la fraction 9 avec le peptide  $Px_1$ -Ts-9-A, dont il est séparé par électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6, pendant 90 minutes, sous une tension de 3000 volts.

### Composition

Ser	Gly	Ala	Lys	Arg
1,08	1,26	1,97	1,09	0,95

### Dansylamino-acide $NH_2$ -terminal

DNS - Ala

### Dégradation de Edman

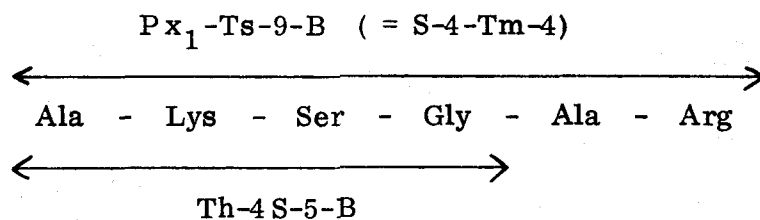
4 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des dérivés PTH- libérés, ont permis d'établir la séquence  $NH_2$ -terminale du peptide  $Px_1$ -Ts-9-B :

Ala - Lys - Ser - Gly.

Le résidu d'arginine est situé en position COOH-terminale en raison de la spécificité limitée de la trypsine, et le second résidu d'alanine est placé par différence :

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

Le peptide  $Px_1$ -Ts-9-B est identique au peptide tryptique S-4-Tm-4, et il recouvre la séquence du peptide thermolytique Th-4S-5-B :



∴

### Peptide Px<sub>1</sub>-Ts-10

Lys - (Ser, Ala, Lys, Arg)

Le peptide Px<sub>1</sub>-Ts-10 est obtenu pur dans la fraction 10.

#### Composition

Ser	,	Ala	,	Lys	,	Arg
1,12		0,73		2,24		1,00

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

α - DNS - ε - succinyl - Lys

∴

### Fraction Px<sub>1</sub>-11

Arg libre

La fraction Px<sub>1</sub>-11 donne une réaction fortement positive avec la ninhydrine et la phénanthrène-quinone.

#### Composition

L'analyse d'acides aminés, effectuée avant et après hydrolyse de la fraction Px<sub>1</sub>-11 en milieu HCl 6 N, ne fait apparaître que de l'arginine.

La fraction Px<sub>1</sub>-11 correspond donc à de l'arginine libre.



En électrophorèse sur papier à pH 3,6, la fraction  $Px_1-11$  possède la même mobilité électrophorétique que le témoin arginine (Figure 16, tache 9).

L'obtention d'arginine libre résulte de l'hydrolyse de la liaison Arg - Ser du peptide Th-4S-20 (Ala - Val - Arg - Arg - Ser) par la trypsine

◦◦

### Peptide $Px_1$ -Ts-12

Lys - Ala - Arg

Le peptide  $Px_1$ -Ts-12 est obtenu pur dans la fraction 12.

### Composition

Ala	,	Lys	,	Arg
1,02		1,14		1,00

### Dansylamino-acide $NH_2$ -terminal

$\alpha$ -DNS -  $\epsilon$  - succinyl - Lys

La séquence du peptide  $Px_1$ -Ts-12 est donc évidente : Lys - Ala - Arg.

### Dégradation de Edman

2 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des dérivés PTH- libérés, ont confirmé la séquence du peptide  $Px_1$ -Ts-12 : Lys - Ala - Arg, le résidu d'arginine étant placé par différence en position COOH-terminale.

◦◦

Peptide Px<sub>1</sub>-Ts-13

---

Pro - Arg

Le peptide Px<sub>1</sub>-Ts-13 est obtenu pur dans la fraction 13.

Composition

---

Pro	,	Arg
0,90		1,00

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

---

DNS - Pro

La séquence du peptide Px<sub>1</sub>-Ts-13 est donc : Pro - Arg.

L'obtention de ce peptide est surprenante, en raison de l'incapacité pour la trypsine d'hydrolyser une liaison Lys-Pro ou Arg-Pro.

Ce résultat est cependant confirmé par la réaction spécifique à l'isatine (isatine à 0,2 % dans l'acétone) : après électrophorèse sur papier WHATMAN 3 MM à pH 3,6 , en utilisant la proline comme témoin, l'électrophorégramme est trempé dans le réactif à l'isatine. Le peptide Px<sub>1</sub>-Ts-13 est localisé sur la feuille par l'apparition, à 70° C, d'une tache bleu foncé sur fond jaune, ce qui confirme la position NH<sub>2</sub>-terminale du résidu de proline.

L'obtention du peptide Px<sub>1</sub>-Ts-13 nous permet donc de penser qu'il existe dans l'environnement d'une liaison Arg - Pro ou Lys - Pro, une conformation spatiale particulière permettant l'hydrolyse de la liaison par la trypsine.

Le peptide Px<sub>1</sub>-Ts-13 n'a pu être repéré dans l'éluat de la colonne de Chromobeads P que par la réaction de SAKAGUCHI spécifique de l'arginine.

Le résidu de proline, en position NH<sub>2</sub>-terminale, absorbe à 440 nm, et n'est donc pas détectable à 570 nm par la réaction à la ninhydrine spécifique des groupements α-NH<sub>2</sub> libres.

## H - SÉPARATION ET ÉTUDE DES PEPTIDES TRYPSIQUES

### DU PEPTIDE $Px_2$ SUCCINYLIÉ (PRÉPARÉ A PARTIR DE L'HISTONE $H_5$ )

Le diagramme d'élution des peptides tryptiques du peptide  $Px_2$  succinylé, fractionnés par chromatographie d'échange d'ions sur résine Chromobeads P, est présenté dans la Figure 19, et montre la séparation des peptides en 15 fractions.

#### Nomenclature

---

Les fractions peptidiques sont numérotées suivant leur ordre d'élution de la colonne : fractions 1 à 15. Les peptides tryptiques du peptide  $Px_2$  succinylé seront désignés par le terme  $Px_2$ -Ts- suivi d'un chiffre ou nombre correspondant à la fraction dans laquelle ils sont élués.

Le mode de purification est éventuellement indiqué par une lettre (électrophorèse préparative sur papier) ou par un chiffre (chromatographie préparative sur papier).

La fraction 5 correspond à l'ammoniaque. Les fractions 3 et 14, non détectées dans l'éluat par la réaction à la ninhydrine, sont révélées par la réaction de SAKAGUCHI.

La composition en acides aminés et les séquences partielles des peptides tryptiques du peptide  $Px_2$  succinylé, sont respectivement présentées dans les tableaux XXII et XXIII.

La plupart de ces peptides sont identiques à ceux isolés de l'hydrolysate tryptique du peptide  $Px_1$  obtenu à partir du fragment NB-4. Par

FRACTIONNÉS SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P

D.O. 570 nm

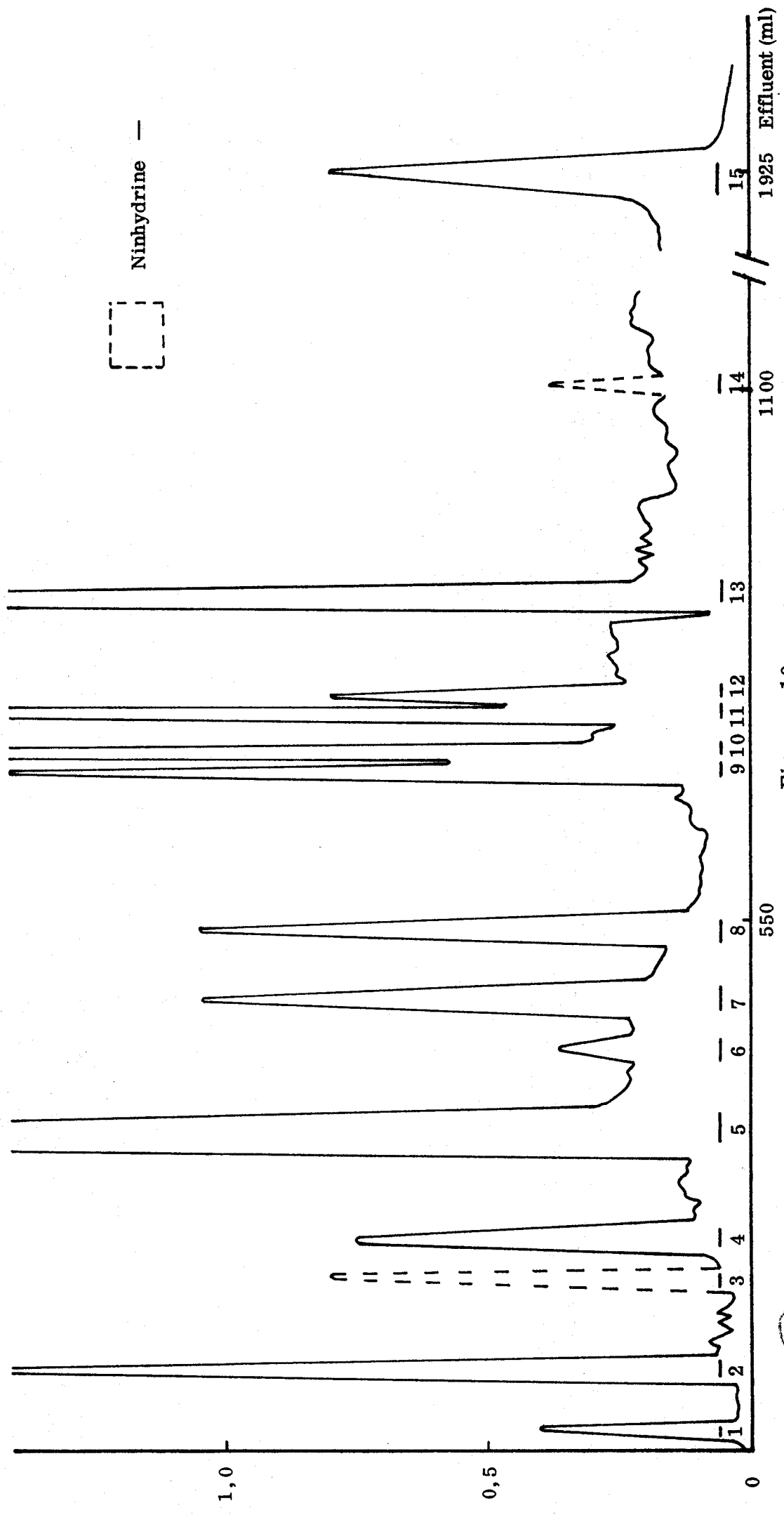


Figure 19

ACIDES AMINES	Px <sub>2</sub> -Ts-1	Px <sub>2</sub> -Ts-2	Px <sub>2</sub> -Ts-3	Px <sub>2</sub> -Ts-4	Px <sub>2</sub> -Ts-7	Px <sub>2</sub> -Ts-8	Px <sub>2</sub> -Ts-9	Px <sub>2</sub> -Ts-10-APx <sub>2</sub> -Ts-10-H	Px <sub>2</sub> -11	Px <sub>2</sub> -Ts-13	Px <sub>2</sub> -Ts-14	Px <sub>2</sub> -Ts-15
Acide aspartique						1,00 (1)						
Thréonine	1,16 (1)	1,01 (1)		0,98 (1)								
Sérine	1,75 (2)	3,24 (3)	1,04 (1)	2,00 (2)	1,07 (1)	1,06 (1)	1,04 (1)	1,02 (1)				
Proline	2,80 (3)	3,95 (4)	1,05 (1)	2,03 (2)							0,80 (1)	
Glycine		1,03 (1)					1,09 (1)					
Alanine	4,14 (4)	3,93 (4)		3,01 (3)	2,34 (3)	1,79 (2)	1,88 (2)			1,01 (1)		0,91 (1)
Valine	Non Déterminé	Non Déterminé		Non Déterminé	1,09 (1)							
Leucine						0,69 (1)						
Lysine	5,19 (5)	10,51 (10)	1,08 (1)	5,91 (6)	4,00 (4)	2,95 (3)	1,20 (1)	2,03 (2)		1,12 (1)		1,12 (1)
Arginine	0,96 (1)	2,00 (2)	1,00 (1)	1,08 (1)	1,06 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)	Non Déterminé	1,00 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)
Nombre de résidus	17	26	4	16	10	9	6	4	6	3	2	3

COMPOSITIONS EN ACIDES AMINÉS DES PÉPTIDES TRYPSIQUES DU PEPTIDE Px<sub>2</sub> SUCCINYLIÉ, PRÉPARÉ A PARTIR DE L'HISTONE H<sub>5</sub> (C)

(C) Les résultats sont exprimés en rapports molaires. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre arrondi de résidus.

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 : →
- . Hydrolyse par les carboxypeptidases : ←

Px 2 - TS-1	$\overline{\text{Ala}}$ - (Thr, Ser <sub>2</sub> , Pro <sub>3</sub> , Ala <sub>3</sub> , Val, Lys <sub>5</sub> , Arg)
Px 2 - TS-2	$\overrightarrow{\text{Lys}}$ - $\overrightarrow{\text{Ser}}$ - $\overrightarrow{\text{Pro}}$ - $\overrightarrow{\text{Lys}}$ - (Thr, Ser <sub>2</sub> , Pro <sub>3</sub> , Gly, Ala <sub>4</sub> , Val, Lys <sub>8</sub> , Arg <sub>2</sub> )
Px 2 - TS-3	(Ser, Pro, Lys, Arg)
Px 2 - TS-4	$\overrightarrow{\text{Ala}}$ - $\overrightarrow{\text{Ser}}$ - $\overrightarrow{\text{Pro}}$ - $\overrightarrow{\text{Lys}}$ - $\overrightarrow{\text{Lys}}$ - (Thr, Ser, Pro, Ala <sub>2</sub> , Val, Lys <sub>4</sub> , Arg)
Px 2 - 6	$\alpha$ -succinyl-Arg
Px 2 - TS-7	$\overline{\text{Lys}}$ - (Ala, Ser, Lys, Ala, Lys, Lys, Ala, Val) - Arg
Px 2 - TS-8	$\overline{\text{Leu}}$ - (Ala, Lys, Ser, Asp, Lys, Ala, Lys) - <u>Arg</u>
Px 2 - TS- 9 Px 2 - TS-10-B	$\overline{\text{Ala}}$ - (Lys, Ser, Gly, Ala) - Arg
Px 2 - TS-10-A	$\overline{\text{Lys}}$ - (Lys, Ser) - Arg
Px 2 - 11	Arg
Px 2 - TS-13	$\overline{\text{Lys}}$ - Ala - Arg
Px 2 - TS-14	$\overrightarrow{\text{Pro}}$ - Arg
Px 2 - TS-15	$\overline{\text{Ala}}$ - Lys - Arg



SEQUENCES PARTIELLES EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES TRYPSIQUES DU PEPTIDE Px 2 SUCCINYLE

PREPARE A PARTIR DE L'HISTONE H<sub>5</sub>

conséquent, l'étude structurale de ces peptides a été limitée, en général, à la composition en acides aminés et à l'identification du résidu NH<sub>2</sub>-terminal.

°°

### Peptide Px<sub>2</sub>-Ts-1

Ala - (Thr, Ser<sub>2</sub>, Pro<sub>3</sub>, Ala<sub>3</sub>, Val, Lys<sub>5</sub>, Arg)

Le peptide Px<sub>2</sub>-Ts-1 est obtenu pur dans la fraction 1.

#### Composition

Thr	Ser	Pro	Ala	Val	Lys	Arg
1,16	1,75	2,80	4,14	non déterminée	5,19	0,96

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

DNS - Ala

Le peptide Px<sub>2</sub>-Ts-1 est identique au peptide Px<sub>1</sub>-Ts-1 : tous deux possèdent la même composition en acides aminés et le même acide aminé en position NH<sub>2</sub>-terminale, ainsi que la même zone d'éluion de la colonne de Chromobeads P.

°°

### Peptide Px<sub>2</sub>-Ts-2

Lys - Ser - Pro - Lys -(Thr, Ser<sub>2</sub>, Pro<sub>3</sub>, Gly, Ala<sub>4</sub>, Val, Lys<sub>8</sub>, Arg<sub>2</sub>)

Le peptide Px<sub>2</sub>-Ts-2 est obtenu pur dans la fraction 2.

Composition

---

Thr	Ser	Pro	Gly	Ala	Val	Lys	Arg
1,01	3,24	3,95	1,03	3,93	non déterminée	10,51	2,00

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

---

$\alpha$ - DNS -  $\epsilon$  - succinyl - Lys

Dégradation de Edman

---

4 cycles de dégradation de Edman, utilisée en méthode soustractive, ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide Px<sub>2</sub>-Ts-2 :

Lys - Ser - Pro - Lys.

	Thr	Ser	Pro	Gly	Ala	Val	Lys	Arg
Composition	1,01	3,24	3,95	1,03	3,93	1,00	10,51	2,00
1er cycle :	0,95	3,09	3,65	0,91	3,88	1,00	<u>9,06</u>	2,00
2ème cycle :	1,05	<u>2,59</u>	3,56	1,13	3,87	1,00	8,94	2,00
3ème cycle :	1,03	2,56	<u>3,16</u>	1,11	3,90	1,00	9,03	2,00
4ème cycle :	1,03	2,35	2,92	1,13	3,86	1,00	<u>7,99</u>	2,00

Le peptide Px<sub>2</sub>-Ts-2 possède la même zone d'éluion de la colonne de Chromobeads P, et la même séquence NH<sub>2</sub>-terminale que le peptide Px<sub>1</sub>-Ts-2-A.

Mais il s'en distingue par le nombre de résidus de proline (4 au lieu de 3) et de lysine (10 au lieu de 8).

°°

Peptide Px<sub>2</sub>-Ts-3

( Ser , Pro , Lys , Arg)

Le peptide Px<sub>2</sub>-Ts-3 est obtenu pur dans la fraction 3. Il n'est détecté dans l'éluat de la colonne de Chromobeads P, que par la réaction de SAKAGUCHI.



Composition

---

Ser	,	Pro	,	Lys	,	Arg
1,04		1,05		1,08		1,00

∴

Peptide Px<sub>2</sub>-Ts-4

Ala - Ser - Pro - Lys - Lys - (Thr, Ser, Pro, Ala<sub>2</sub>, Val, Lys<sub>4</sub>, Arg)

Le peptide Px<sub>2</sub>-Ts-4 est obtenu pur dans la fraction 4.

Composition

---

Thr	,	Ser	,	Pro	,	Ala	,	Val	,	Lys	,	Arg
0,98		2,00		2,03		3,01		non		5,91		1,08
								déterminée				

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

---

DNS - Ala

Dégradation de Edman

---

5 cycles de dégradation de Edman, utilisée en méthode soustractive, ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide Px<sub>2</sub>-Ts-4 :

Ala - Ser - Pro - Lys - Lys.

Composition	Thr	Ser	Pro	Ala	Val	Lys	Arg
	0,98	2,00	2,03	3,01	1,00	5,91	1,08
1er cycle	0,93	1,92	1,75	<u>1,99</u>	1,00	5,79	1,00
2ème cycle	0,96	<u>1,52</u>	1,93	2,18	1,00	6,03	1,00
3ème cycle	0,93	1,35	<u>1,34</u>	2,08	1,00	5,82	1,00
4ème cycle	0,87	1,28	1,23	2,03	1,00	<u>5,20</u>	1,00
5ème cycle	0,89	1,29	1,34	2,00	1,00	<u>4,50</u>	1,00

Le peptide  $Px_2$ -Ts-4 correspond au peptide  $Px_1$ -Ts-4. Tous deux possèdent la même composition en acides aminés, la même séquence  $NH_2$ -terminale (Ala - Ser - Pro - Lys - Lys) et la même zone d'éluion de la colonne de Chromobeads P.

∴

### Fraction $Px_2$ - 6

$\alpha$  - succinyl - Arg

La fraction  $Px_2$ -6, faiblement détectée avec la ninhydrine, donne une réaction de SAKAGUCHI fortement positive.

Cette fraction est identique à la fraction  $Px_1$ -6 : en électrophorèse sur papier à pH 3,6 , elle possède la même mobilité électrophorétique.

L'hydrolyse de la fraction  $Px_2$ -6, pendant 24 heures à 110° C en milieu HCl 6 N, libère de l'arginine, alors que l'analyse directe, sans hydrolyse préalable, ne fait apparaître aucun acide aminé.

La fraction  $Px_2$ -6 correspond au résidu d'arginine en position 94, obtenu par hydrolyse de la liaison Arg - Leu par la trypsine.

94 95

∴

### Peptide $Px_2$ -Ts-7

Lys - (Ala, Ser, Lys, Ala, Lys, Lys, Ala, Val) - Arg

Le peptide  $Px_2$ -Ts-7 est obtenu pur dans la fraction 7.

#### Composition

Ser	Ala	Val	Lys	Arg
1,07	2,34	1,09	4,00	1,06

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

---

$\alpha$ - DNS -  $\epsilon$ - succinyl - Lys

Le résidu d'arginine est placé en position COOH-terminale en raison de la spécificité limitée de la trypsine.

Le peptide Px<sub>2</sub>-Ts-7 est identique au peptide Px<sub>1</sub>-Ts-7.

∴

Peptide Px<sub>2</sub>-Ts-8

---

Leu - ( Ala , Lys , Ser , Asp , Lys , Ala , Lys ) - Arg

Le peptide Px<sub>2</sub>-Ts-8 est obtenu pur dans la fraction 8.

Composition

---

Asp	Ser	Ala	Leu	Lys	Arg
1,00	1,06	1,79	0,69	2,95	1,00

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

---

DNS - Leu

Hydrolyse par les carboxypeptidases B et A

---

Une hydrolyse de 4 heures à 40° C par la carboxypeptidase B, libère 1,17  $\mu$ mole d'arginine par  $\mu$ mole de peptide.

L'addition de carboxypeptidase A, après 4 heures d'hydrolyse par la carboxypeptidase B, ne libère aucun acide aminé.

L'action de ces deux carboxypeptidases est bloquée par la présence d'un résidu de lysine  $\epsilon$ -succinylé , situé immédiatement avant le résidu d'arginine.

Le peptide Px<sub>2</sub>-Ts-8 est identique au peptide Px<sub>1</sub>-Ts-8.

°°

Peptides Px<sub>2</sub>-Ts-9 et Px<sub>2</sub>-Ts-10-B

Ala - ( Lys , Ser , Gly , Ala ) - Arg

Le peptide Px<sub>2</sub>-Ts-9 est obtenu pur dans la fraction 9.

Composition

Ser	Gly	Ala	Lys	Arg
1,04	1,09	1,88	1,20	1,00

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

DNS - Ala

Le résidu d'arginine est placé en position COOH-terminale en raison de la spécificité limitée de la trypsine.

Le peptide Px<sub>2</sub>-Ts-10-B est localisé dans la fraction 10 avec le peptide Px<sub>2</sub>-Ts-10-A, dont il est séparé par électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6.

Composition

Ser	Gly	Ala	Lys	Arg
1,02	1,12	1,96	0,99	1,00

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

DNS - Ala

Le résidu d'arginine est placé en position COOH-terminale en raison de la spécificité limitée de la trypsine.

Les peptides  $Px_2$ -Ts-9 et  $Px_2$ -Ts-10-B possèdent la même composition en acides aminés et le même résidu d'alanine en position  $NH_2$ -terminale.

Ils sont identiques au peptide  $Px_1$ -Ts-9-B.

Les peptides  $Px_2$ -Ts-9 et  $Px_2$ -Ts-10-B, identiques, sont élués dans deux fractions voisines, les fractions 9 et 10. Le peptide  $Px_2$ -Ts-10-B est un contaminant de la fraction 10.

°°

Peptide  $Px_2$ -Ts-10-A

Lys - ( Lys , Ser ) - Arg

Le peptide  $Px_2$ -Ts-10-A est localisé dans la fraction 10 avec le peptide  $Px_2$ -Ts-10-B, dont il est séparé par électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6 .

Composition

Ser	Lys	Arg
1,02	2,03	1,00

Dansylamino-acide  $NH_2$ -terminal

$\alpha$ - DNS -  $\xi$  - succinyl - Lys

Le résidu d'arginine est placé en position  $COOH$ -terminale en raison de la spécificité limitée de la trypsine.

Le peptide  $Px_2$ -Ts-10-A est identique au peptide  $Px_1$ -Ts-9-A.

°°

### Fraction Px<sub>2</sub> - 11

---

Arg

La fraction Px<sub>2</sub>-11 donne une réaction à la ninhydrine et une à la phénanthrène-quinone fortement positives.

#### Composition

---

L'analyse d'acides aminés, effectuée avant et après hydrolyse de la fraction Px<sub>2</sub>-11 en milieu HCl 6 N, fait apparaître de l'arginine dans les deux cas. En électrophorèse sur papier à pH 3,6, la fraction Px<sub>2</sub>-11 possède la même mobilité électrophorétique que le témoin arginine.

La fraction Px<sub>2</sub>-11 est identique à la fraction Px<sub>1</sub>-11.

°°

### Fraction Ts-12

---

La fraction Ts-12, hétérogène, n'a pu encore être étudiée.

°°

### Peptide Px<sub>2</sub>-Ts-13

---

Lys - Ala - Arg

Le peptide Px<sub>2</sub>-Ts-13 est obtenu pur dans la fraction 13.

#### Composition

---

Ala	,	Lys	,	Arg
1,01		1,12		1,00

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

---

$\alpha$ - DNS -  $\epsilon$  - succinyl - Lys

La séquence du peptide Px<sub>2</sub>-Ts-13 est donc : Lys - Ala - Arg.  
Ce peptide est identique au peptide Px<sub>1</sub>-Ts-12.

∴

Peptide Px<sub>2</sub>-Ts-14

---

Pro - Arg

Le peptide Px<sub>2</sub>-Ts-14 est obtenu pur dans la fraction 14.

Non détecté par la réaction à la ninhydrine, ce peptide n'a pu être repéré dans l'éluat de la colonne de Chromobeads P que par la réaction de SAKAGUCHI.

Composition

---

Pro	,	Arg
0,80		1,00

Dégradation de Edman

---

Un cycle de dégradation de Edman, utilisée en méthode soustractive, a permis d'identifier le résidu de proline en position NH<sub>2</sub>-terminale :

	Pro	,	Arg
Composition	0,80		1,00
1 <sup>er</sup> cycle	:	<u>0,15</u>	1,00

Le peptide Px<sub>2</sub>-Ts-14 est identique au peptide Px<sub>1</sub>-Ts-13.

∴

Peptide Px<sub>2</sub>-Ts-15

Ala - Lys - Arg

Le peptide Px<sub>2</sub>-Ts-15 est obtenu pur dans la fraction 15.

Composition

Ala	,	Lys	,	Arg
0,91		1,12		1,00

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

DNS - Ala

La séquence du peptide Px<sub>2</sub>-Ts-15 est donc : Ala - Lys - Arg ,  
le résidu d'arginine étant placé en position COOH-terminale en raison de la  
spécificité limitée de la trypsine.

◦◦



## V. SEPARATION ET ETUDE DES PEPTIDES PEPSIQUES

---

### DE LA FRACTION NB-4-3S

---

#### Rappel

---

Le fractionnement de l'hydrolysate pepsique du fragment NB-4, sur colonne de Sephadex G-50 F, conduit à l'obtention de 3 fractions peptidiques : les fractions NB-4-1S, NB-4-2S et NB-4-3S (voir Figure 13).

Nous avons montré que les fractions NB-4-1S et NB-4-2S correspondaient à un seul et même peptide de 92 résidus : le peptide  $Px_1$ . L'étude de ce peptide a été présentée dans le paragraphe IV de ce chapitre.

La fraction NB-4-3S est constituée par un mélange complexe de petits peptides, que nous avons séparés par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Chromobeads P.

Le diagramme d'élution des peptides pepsiques de la fraction NB-4-3S, fractionnés sur résine Chromobeads P, est présenté dans la Figure 20 et montre la séparation des peptides en 12 fractions.

#### Nomenclature

---

Les fractions peptidiques sont numérotées suivant leur ordre d'élution de la colonne : fractions 1 à 12.

Etant donné que la séquence en acides aminés de l'histone  $H_5$  n'est que partiellement connue, nous désignerons les peptides pepsiques de la fraction NB-4-3S par la lettre P, suivie d'un chiffre ou nombre correspondant à la fraction dans laquelle ils sont élués.

FRACTIONNÉS SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P

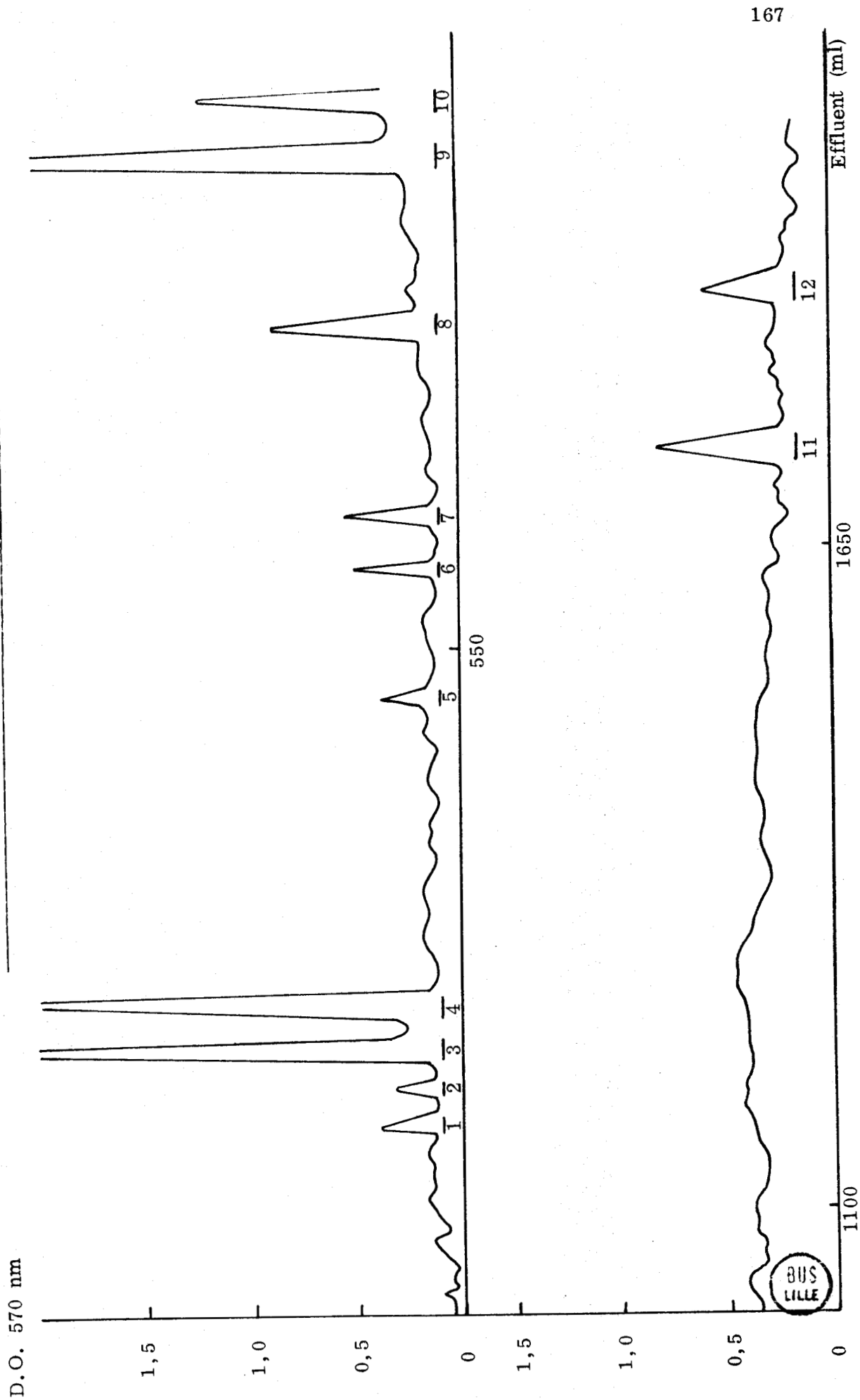


Figure 20

Une lettre suivant immédiatement ce chiffre ou ce nombre, indique que le peptide a été purifié par électrophorèse préparative sur papier.

Exemple : peptide P-5-A : peptide pepsique de la fraction NB-4-3S, obtenu par purification de la fraction 5 en électrophorèse préparative sur papier.

La composition et la séquence en acides aminés de chaque peptide sont présentées respectivement dans les tableaux XXIV et XXV.

°°

Peptide P-5-B (résidus 59 à 66)

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

Peptide P-7 (résidus 59 à 61)

Lys - Val - Gly

Peptide P-10 (résidus 59 à 62)

Lys - Val - Gly - His

Peptide P-1 (résidus 63 à 66)

Asn - Ala - Asp - Leu

Le peptide P-5-B est localisé dans la fraction 5 avec le peptide P-5-A, dont il est séparé en électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6 .

ACIDES AMINES	P - 1	P - 2	P - 3	P - 4	P - 5-A	P - 5-B	P - 6	P - 7	P - 8	P - 9	P - 10	P - 11	P - 12	P x	Nombre total de résidus	NB-4
Acide aspartique	1,80 (2)					2,00 (2)								1,10 (1)	3 <sup>(*)</sup>	3
Thréonine									0,92 (1)	0,67 (1)				2,93 (3)	4	4
Sérine									1,62 (2)	1,58 (2)		0,90 (1)	0,87 (1)	10,73 (11)	14	14
Acide glutamique		1,06 (1)					1,05 (1)		1,03 (1)	1,39 (1)					2	2
Proline														9,14 (9)	9	9
Glycine			1,05 (1)	0,99 (1)	1,84 (2)	1,27 (1)		1,16 (1)	2,89 (3)	3,42 (3)	1,14 (1)			2,05 (2)	7	7
Alanine	1,09 (1)		0,93 (1)			1,01 (1)			1,03 (1)	1,15 (1)		1,99 (2)	1,05 (1)	16,83 (17)	21	21
Valine			0,99 (1)	0,95 (1)	1,14 (1)	0,95 (1)		0,86 (1)	0,96 (1)	1,10 (1)	0,84 (1)			2,92 (3)	6	6
Isoleucine		0,96 (1)					0,84 (1)					1,00 (1)	1,01 (1)		2	2
Leucine	1,11 (1)	1,03 (1)	1,02 (1)	1,06 (1)		0,93 (1)	0,98 (1)					2,11 (2)	2,15 (2)	0,93 (1)	6	6
Phénylalanine									0,75 (1)	0,91 (1)					1	1
Histidine						Bromée (1)					Bromée (1)				1	1
Lysine		0,96 (1)			1,02 (1)	0,89 (1)	1,14 (1)	0,98 (1)	2,08 (2)	1,88 (2)	1,02 (1)			32,56 (32)	36	36
Arginine												2,01 (2)	1,92 (2)	13,15 (13)	15	15
Nombre de résidus	4	4	4	3	4	8	4	3	12	12	4	8	7	92	127	127

## COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES PEPSIQUES DU FRAGMENT NB-4 (\*)



(\*) Les valeurs sont exprimées en rapports molaire. Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre arrondi de résidus.  
 (°) Nombre total de résidus alignés dans la séquence du fragment NB-4, sans tenir compte des recouvrements des peptides.

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 : —→
- . Hydrolyse par les carboxypeptidases : ←

P - 1	résidus 63 à 66	$\overrightarrow{\text{Asn}} - \overrightarrow{\text{Ala}} - \overrightarrow{\text{Asp}} - \text{Leu}$
P - 2	résidus 67 à 70	$\overleftarrow{\text{Glu}} - \text{Ile} - \text{Lys} - \text{Leu}$
P - 3	résidus 78 à 81	$\overrightarrow{\text{Ala}} - \overrightarrow{\text{Gly}} - \text{Val} - \text{Leu}$
P - 4	résidus 79 à 81	$\overrightarrow{\text{Gly}} - \overrightarrow{\text{Val}} - \text{Leu}$
P - 5-A	résidus 85 à 88	$\overrightarrow{\text{Lys}} - \overrightarrow{\text{Gly}} - \overrightarrow{\text{Val}} - \text{Gly}$
P - 5-B	résidus 59 à 66	$\overrightarrow{\text{Lys}} - \overrightarrow{\text{Val}} - \overrightarrow{\text{Gly}} - \text{His} - \text{Asn} - \text{Ala} - \text{Asp} - \text{Leu}$
P - 6	résidus 67 à 70	$\overrightarrow{\text{Gln}} - \overrightarrow{\text{Ile}} - \overrightarrow{\text{Lys}} - \text{Leu}$
P - 7	résidus 59 à 61	$\overrightarrow{\text{Lys}} - \overrightarrow{\text{Val}} - \text{Gly}$
P - 8	résidus 82 à 93	$\overleftarrow{\text{Lys}} - \text{Glu} - \text{Thr} - \text{Lys} - \text{Gly} - \text{Val} - \text{Gly} - \text{Ala} - \text{Gly} - \text{Ser} - \text{Ser} - \text{Phe}$
P - 9	résidus 82 à 93	$\overleftarrow{\text{Lys}} - \text{Gln} - \text{Thr} - \text{Lys} - \text{Gly} - \text{Val} - \text{Gly} - \text{Ala} - \text{Gly} - \text{Ser} - \text{Ser} - \text{Phe}$
P - 10	résidus 59 à 62	$\overrightarrow{\text{Lys}} - \overrightarrow{\text{Val}} - \overrightarrow{\text{Gly}} - \text{His}$
P - 11	résidus 71 à 78	$\overrightarrow{\text{Ser}} - \overrightarrow{\text{Ile}} - \overrightarrow{\text{Arg}} - \overrightarrow{\text{Arg}} - \overrightarrow{\text{Leu}} - \text{Leu} - \text{Ala} - \text{Ala}$
P - 12	résidus 71 à 77	$\overrightarrow{\text{Ser}} - \overrightarrow{\text{Ile}} - \overrightarrow{\text{Arg}} - \overrightarrow{\text{Arg}} - \overrightarrow{\text{Leu}} - \overrightarrow{\text{Leu}} - \text{Ala}$
Px	résidus 94 à 185	$\overrightarrow{\text{Arg}} - \overrightarrow{\text{Leu}} - \overrightarrow{\text{Ala}} - \overrightarrow{\text{Lys}} - \overrightarrow{\text{Ser}} - \overrightarrow{\text{Asp}} - \overrightarrow{\text{Lys}} - \overrightarrow{\text{Ala}} - \overrightarrow{\text{Lys}} - \overrightarrow{\text{Arg}} - (\text{Thr}_3, \text{Ser}_{10}, \text{Pro}_9, \text{Gly}_2, \text{Ala}_{14}, \text{Val}_3, \text{Lys}_{26}, \text{Arg}_{10}) - \text{Ala} - \text{Lys} - \text{Arg} - \text{Lys} - \text{Lys} - \text{OH}$ $\leftarrow \leftarrow \leftarrow \leftarrow \leftarrow$



### Composition

---

Asp	Gly	Ala	Val	Leu	Lys
2,00	1,27	1,01	0,95	0,93	0,89

L'absence d'histidine dans la composition en acides aminés du peptide P-5-B s'explique par une destruction de ce résidu. L'hydrolyse pepsique a été réalisée sur le fragment NB-4 obtenu par coupure de l'histone H<sub>5</sub> par la N-bromosuccinimide. Dans les conditions utilisées (large excès de N-bromosuccinimide), les résidus d'histidine sont bromés et donc partiellement détruits.

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

---

di - DNS - Lys

### Dégradation de Edman

---

2 cycles de dégradation de Edman, en couplage avec la méthode de dansylation, ont permis d'établir la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide P-5-B : Lys - Val - Gly.

La position COOH-terminale du résidu de leucine découle de la spécificité de la pepsine.

Le peptide P-7 est obtenu pur dans la fraction 7.

### Composition

---

Gly	Val	Lys
1,16	0,86	0,98

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

---

di - DNS - Lys

### Dégradation de Edman

---

2 cycles de dégradation de Edman, avec identification directe des

dérivés PTH- libérés, ont suffi pour déterminer la séquence du peptide P-7 :  
Lys - Val - Gly.

Le peptide P-7 recouvre la séquence  $\text{NH}_2$ -terminale du peptide P-5-B,  
et par conséquent celle du fragment NB-4.

Le peptide P-10 est obtenu pur dans la fraction 10.

Composition

Gly	,	Val	,	Lys
1,14		0,84		1,02

Dansylamino-acide  $\text{NH}_2$ -terminal

di - DNS - Lys

Dégradation de Edman

2 cycles de dégradation de Edman, en couplage avec la méthode de dansylation, ont permis d'établir la séquence  $\text{NH}_2$ -terminale du peptide P-10 :  
Lys - Val - Gly .

Le peptide P-10 possède la même composition en acides aminés que le peptide P-7. Cependant il s'en distingue par sa migration électrophorétique plus cathodique.

Cette différence de comportement en électrophorèse ne peut s'expliquer que par la présence d'un résidu d'histidine (résidu 62) en position  $\text{COOH}$ -terminale du peptide P-10.

Ce résidu d'histidine, bromé lors de la coupure de l'histone  $\text{H}_5$  par la N-bromosuccinimide, n'apparaît pas dans la composition en acides aminés du peptide P-10.

Le peptide P-1 est obtenu pur dans la fraction 1.

Composition

Asp	,	Ala	,	Leu
1,80		1,09		1,11





Peptide P-6 (résidus 67 à 70)

Gln - Ile - Lys - Leu

Peptide P-2 (résidus 67 à 70)

Glu - Ile - Lys - Leu

Le peptide P-6 est obtenu pur dans la fraction 6.

Composition

Glu	,	Ile	,	Leu	,	Lys
1,05		0,84		0,98		1,14

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

DNS - Glu

Dégradation de Edman

2 cycles de dégradation de Edman, en couplage avec la méthode de dansylation, ont suffi pour établir la séquence du peptide P-6.

Le peptide P-2 est obtenu pur dans la fraction 2.

Composition

Glu	,	Ile	,	Leu	,	Lys
1,06		0,96		1,03		0,96

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

DNS - Glu

Discussion

Les peptides P-2 et P-6, élués respectivement dans les fractions 2 et 6, possèdent la même composition en acides aminés, et le même dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal : DNS - Glu.

L'obtention du peptide P-2 résulte d'une désamidation partielle du résidu de glutamine en position 67, au cours de l'hydrolyse pepsique du fragment NB-4. Cette désamidation fait apparaître un résidu d'acide glutamique en position 67, ce qui confère au peptide P-2 un caractère plus acide et



Le peptide P-12 est obtenu pur dans la fraction 12.

-----  
Composition

Ser	, Ala	, Ile	, Leu	, Arg
0,87	1,05	1,01	2,15	1,92

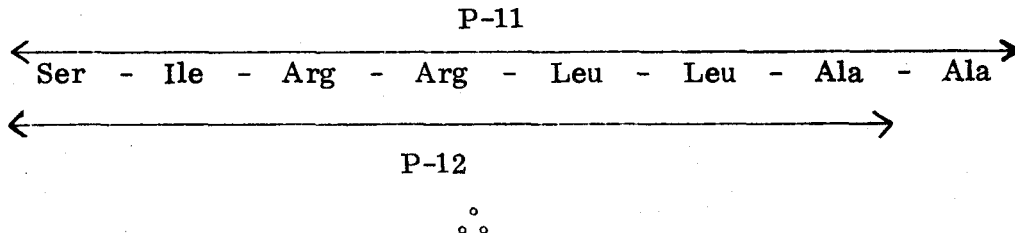
-----  
Dansylamino-acide NH<sub>2</sub>-terminal

DNS - Ser

-----  
Dégradation de Edman

5 cycles de dégradation de Edman, en couplage avec la méthode de dansylation, ont permis d'établir la séquence complète du peptide P-12 : Ser - Ile - Arg - Arg - Leu - Leu - Ala, le résidu d'alanine étant placé par différence.

Le peptide P-12 recouvre la séquence NH<sub>2</sub>-terminale du peptide P-11, et son obtention implique la coupure d'une liaison alanyl par la pepsine : Ala - Ala (résidus 77 et 78).



Peptide P-3 (résidus 78 à 81)

===== Ala - Gly - Val - Leu

Peptide P-4 (résidus 79 à 81)

===== Gly - Val - Leu

Le peptide P-3 est obtenu par purification de la fraction 3 par électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6 .

-----  
Composition

Gly	, Ala	, Val	, Leu
1,05	0,93	0,99	1,02

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

DNS - Ala



Peptide P-9 (résidus 82 à 93)

---

Lys - Gln - Thr - Lys - Gly - Val - Gly - Ala - Gly - Ser - Ser - Phe

Peptide P-8 (résidus 82 à 93)

---

Lys - Glu - Thr - Lys - Gly - Val - Gly - Ala - Gly - Ser - Ser - Phe

Peptide P-5-A (résidus 85 à 88)

---

Lys - Gly - Val - Gly

Le peptide P-9, élué dans la fraction 9, est purifié par électrophorèse préparative sur papier à pH 3,6 .

Composition

Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Phe	Lys
0,67	1,58	1,39	3,42	1,15	1,10	0,91	1,88

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

di - DNS - Lys

Le peptide P-8 est obtenu pur dans la fraction 8.

Composition

Thr	Ser	Glu	Gly	Ala	Val	Phe	Lys
0,92	1,62	1,03	2,89	1,03	0,96	0,75	2,08

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

di - DNS - Lys

Les peptides P-8 et P-9 renferment l'unique résidu de phénylalanine présent dans la molécule d'histone H<sub>5</sub> .

Ils ont la même composition en acides aminés, et un résidu de lysine en position NH<sub>2</sub>-terminale.

Leur séquence en acides aminés a été déduite de la séquence des peptides chymotrypsiques Ch-10-A-1 et Ch-12, auxquels ils correspondent.



## VI. D I S C U S S I O N

Le résidu de phénylalanine, les trois résidus de tyrosine et les huit résidus de leucine, présents dans l'histone H<sub>5</sub>, constituent autant de sites potentiels majeurs pour l'action de la pepsine. La spécificité de cette endopeptidase s'est révélée beaucoup plus étroite que celle de la chymotrypsine.

L'étude des peptides pepsiques du fragment NB-4 (résidus 59 à 185) nous a permis d'en recouvrir totalement la séquence (Tableau XXVI). La plupart des sites majeurs de clivage par la pepsine ont été identifiés. Cependant, les liaisons Leu-Leu, Leu-Ala et Leu-Ala ont résisté à l'action de l'enzyme.

75	76	76	77	95	96
----	----	----	----	----	----

L'obtention des peptides P-5-B, P-6 et P-4 résulte de l'hydrolyse par la pepsine d'une liaison leucyle :

Leu-Gln,	Leu-Ser	et	Leu-Lys.
66	67	70	71
			81
			82

L'obtention des peptides P-12 et P-11 résulte de l'hydrolyse par la pepsine des liaisons Ala-Ala et Ala-Gly.

77	78	78	79
----	----	----	----

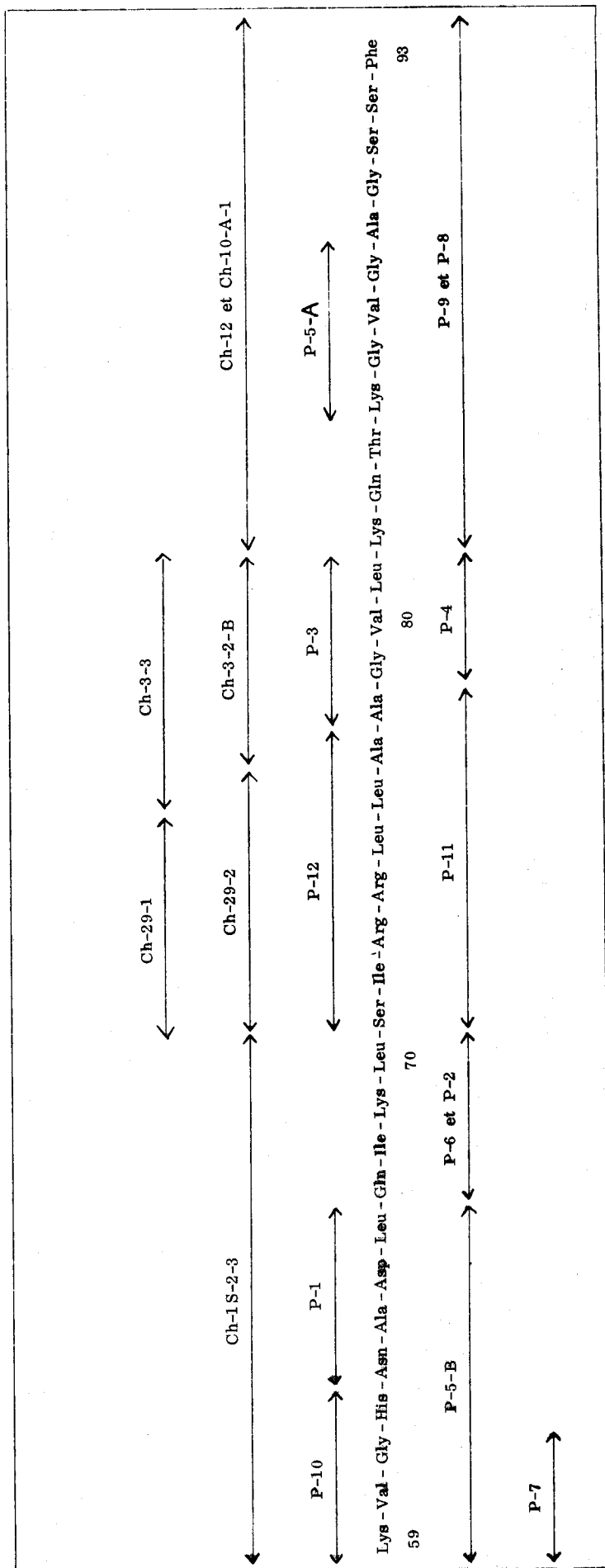
Quatre autres liaisons ont été coupées : les liaisons Gly-His, His-Asn, Thr-Lys et Gly-Ala.

62	63	84	85	88	89	61	62
----	----	----	----	----	----	----	----

Ces liaisons sont plutôt des sites mineurs pour l'action de la pepsine.

°°

Mais, le résultat essentiel de la méthode d'hydrolyse par la pepsine, est l'obtention du peptide Px de 92 résidus (résidus 94 à 185), qui



SEQUENCE PARTIELLE DE 35 RESIDUS D'ACIDES AMINES ETABLIE PAR ETUDE DES PEPTIDES PEPSIQUES DU FRAGMENT NB-4,

FRACTIONNES SUR COLONNE DE CHROMOBEADS P





recouvre la partie COOH-terminale de la protéine.

Ce peptide est obtenu avec un rendement supérieur à 80 %, à partir de l'histone native ou de son fragment NB-4. Son isolement constitue une étape déterminante dans l'étude de la partie COOH-terminale de l'histone H<sub>5</sub>.

L'hydrolyse trypsique du peptide Px, après blocage des résidus de lysine par succinylation, a fourni un certain nombre de longs peptides qui ont permis d'établir des recoupements avec les peptides tryptiques et thermolysiques de la protéine.

L'avantage de la succinylation résidait dans l'obtention d'un nombre restreint de peptides, de caractère acide, facilement séparables sur résine Chromobeads P.

Toutefois, cette méthode possède quelques inconvénients, qui nous ont fortement gênée dans l'étude des peptides.

Les trois résidus de valine, présents dans le peptide Px, n'ont pu être identifiés avec certitude.

L'action des carboxypeptidases A, B et C est limitée par la présence d'un résidu de lysine  $\epsilon$ -succinylé.

Par contre, nous avons mis en évidence le dérivé dansylé et le dérivé PTH- de l'  $\epsilon$ -succinyl-lysine, ainsi que l'  $\alpha$ -succinyl-arginine.

Les deux fractionnements par chromatographie d'échange d'ions, réalisés sur l'hydrolysate trypsique du peptide Px succinylé, préparé à partir du fragment NB-4 ou de l'histone H<sub>5</sub>, ne sont pas rigoureusement identiques. L'étude des peptides témoigne d'une succinylation incomplète, qui se traduit par la coupure de liaisons lysyle par la trypsine.

Très surprenante, enfin, est l'obtention du peptide Pro-Arg (peptides  $Px_1$ -Ts-13 et  $Px_2$ -Ts-14), après hydrolyse trypsique. Un peptide identique a également été identifié dans l'hydrolysate trypsique de la protéine maléylée. Ce résultat suggère l'existence d'une conformation spatiale particulière dans cette région, qui faciliterait l'action de l'enzyme.

◦◦

En conclusion, l'hydrolyse pepsique se révèle d'un très grand intérêt pour la détermination de la séquence de la partie COOH-terminale de l'histone  $H_5$  (résidus 112 à 185). La coupure de l'unique liaison phénylalanyle présente dans la molécule (Phe - Arg)<sub>93 94</sub>, libère un peptide de 92 résidus, le peptide Px, situé en position COOH-terminale de la protéine, qui constituera désormais notre matériel de base.

Les résultats partiels fournis par l'hydrolyse trypsique de ce peptide, après succinylation, confirment ceux obtenus par hydrolyse trypsique de la protéine maléylée. Certains de ces résultats n'ont pas encore pu être exploités totalement. Citons en particulier, les longs peptides  $Px_1$ -Ts-2-A,  $Px_1$ -Ts-4 et  $Px_2$ -Ts-2, qui renferment des résidus d'alanine, de thréonine et de valine, accessibles à l'action de la thermolysine.

Cependant, ces résultats ne peuvent être que très limités, en raison de la présence de résidus d'  $\epsilon$ -succinyl-lysine, et de la succinylation incomplète du peptide Px.

Si la trypsine et la thermolysine possèdent souvent le même site de coupure (Lys-Ala ; Arg-Ala), une hydrolyse très courte du peptide Px par la thermolysine devrait nous permettre d'obtenir de longs peptides et d'établir ainsi les recoupements nécessaires à la détermination de la séquence complète de l'histone  $H_5$ . C'est dans ce but, que nous envisageons également d'utiliser la thrombine, qui pourrait couper les liaisons Lys-Pro (CHAPMAN *et al.*, 1976), et l'élastase, spécifique des liaisons hydrophobes.

CONCLUSION

---

## C O N C L U S I O N

---

L'ensemble des résultats obtenus par hydrolyse de l'histone H<sub>5</sub> ou de son fragment NB-4 par la chymotrypsine, la trypaine, 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 XXVII ),
- et d'autre part, de déterminer la séquence de l'ensemble des peptides constituant la partie COOH-terminale (résidus 112 à 185) de la molécule ( Tableaux XXVIII<sub>a</sub> et XXVIII<sub>b</sub> ).

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> avec le bromure de cyanogène, a été établie par la dégradation automatique de Edman en phase liquide, à l'aide d'un séquenceur SOCOSI.

Les peptides tryptiques S-2-Tm, S-4-Tm-14-A, S-4-Tm-3, S-5-Tm-11, S-5-Tm-5-A, le peptide chymotryptique Ch-10-A-2 et la dégradation automatique de Edman, permettent de porter la connaissance de la séquence au résidu 53.

La séquence  $\text{NH}_2$ -terminale de 12 résidus du fragment NB-4 a été déterminée par la dégradation de Edman. Le peptide chymotrypsique Ch-1S-2-3 recouvre parfaitement cette séquence.

Le peptide chymotrypsique 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 a été déduite de la comparaison des compositions en acides aminés des fragments CN-2 et NB-4, et des données structurales fournies par les peptides trypsiques T-32-A et T-50-2.

Les peptides Ac-2, T-28-A, Th-4S-4-2 et Ch-29-2 ont permis de faire la jonction entre le fragment peptidique correspondant aux 70 premiers résidus et la séquence contenant l'unique résidu de phénylalanine ainsi que le dernier résidu d'acide aspartique de l'histone.

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-Tm-8-A, T-33 et T-14-D.

\* Outre la séquence des 111 premiers résidus, nous avons déterminé d'importantes séquences peptidiques, appartenant à la partie COOH-terminale (résidus 112 à 185) de la protéine (Tableaux XXVIII<sub>a</sub> et XXVIII<sub>b</sub>), parmi lesquelles une séquence de 21 résidus, une séquence de 14 résidus, une séquence de 11 résidus, une séquence de 9 résidus, et deux séquences de 6 résidus.

La partie  $\text{NH}_2$ -terminale de l'histone H<sub>5</sub> (résidus 1 à 99) est de caractère hydrophobe, tandis que la partie COOH-terminale (résidus 100 à 185) possède un caractère basique très marqué, lié à la présence de 43 résidus basiques sur un total de 86 résidus d'acides aminés.

Les peptides Ac-1 a (résidus 1 à 99) et Ac-3 (résidus 100 à 185), obtenus par hydrolyse de l'histone H<sub>5</sub> avec l'acide acétique 0,25 N, correspondent respectivement à la partie hydrophobe et à la partie basique de la molécule.



Les études en RMN réalisées sur ces peptides montrent que la partie NH<sub>2</sub>-terminale hydrophobe possède une structure globulaire, tandis que la partie COOH-terminale basique possède une structure en "Random-coil".

La séquence partielle de l'histone H<sub>5</sub> ( Tableau XXIX ) fait ressortir la présence de nombreux doublets basiques : 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, de nombreuses homologues de séquences : citons en particulier la séquence 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 les séquences situées dans la partie basique de ces deux histones, où apparaissent des séquences répétitives de type Ser - Pro - Lys - Lys et Ala - Lys - Lys - Pro (Tableau XXX).

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

∴

En ce qui concerne notre travail, le peptide pepsique Px (résidus 94 à 185) constituera désormais notre matériel de base pour la détermination de la séquence complète de l'histone H<sub>5</sub>.

Si la trypsine et la thermolysine possèdent souvent le même site de coupure, l'hydrolyse en temps limité du peptide Px par la thermolysine devrait permettre l'obtention de longs peptides.

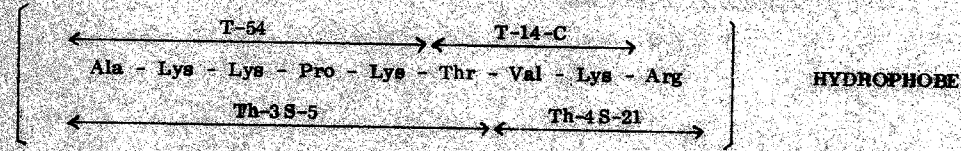
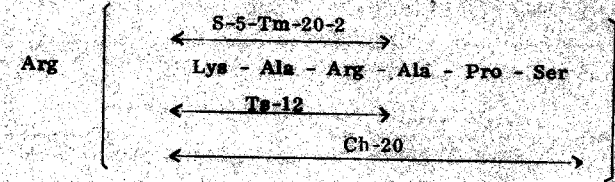
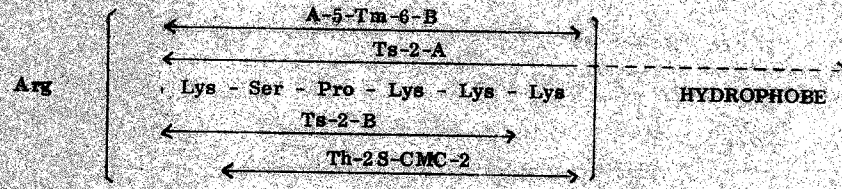
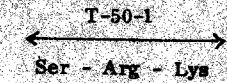
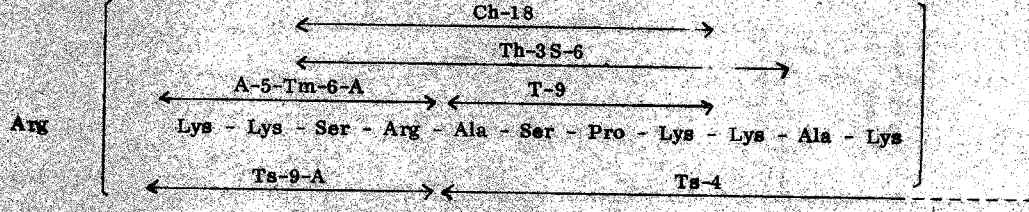
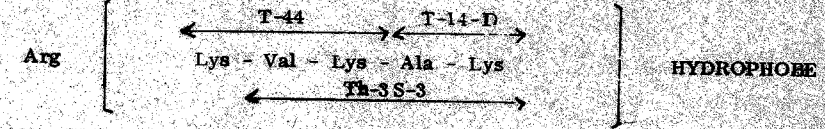
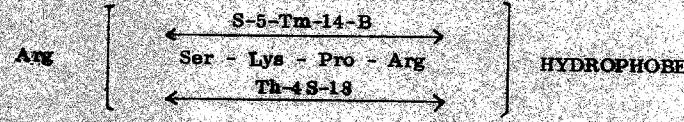
Enfin, l'utilisation de la thrombine, qui pourrait couper les liaisons Lys - Pro, ainsi que l'ont signalé CHAPMAN et al. (1976), et de l'élastase, spécifique des liaisons hydrophobes, devrait nous fournir les peptides nécessaires aux recouvrements des séquences partielles déjà connues.

---

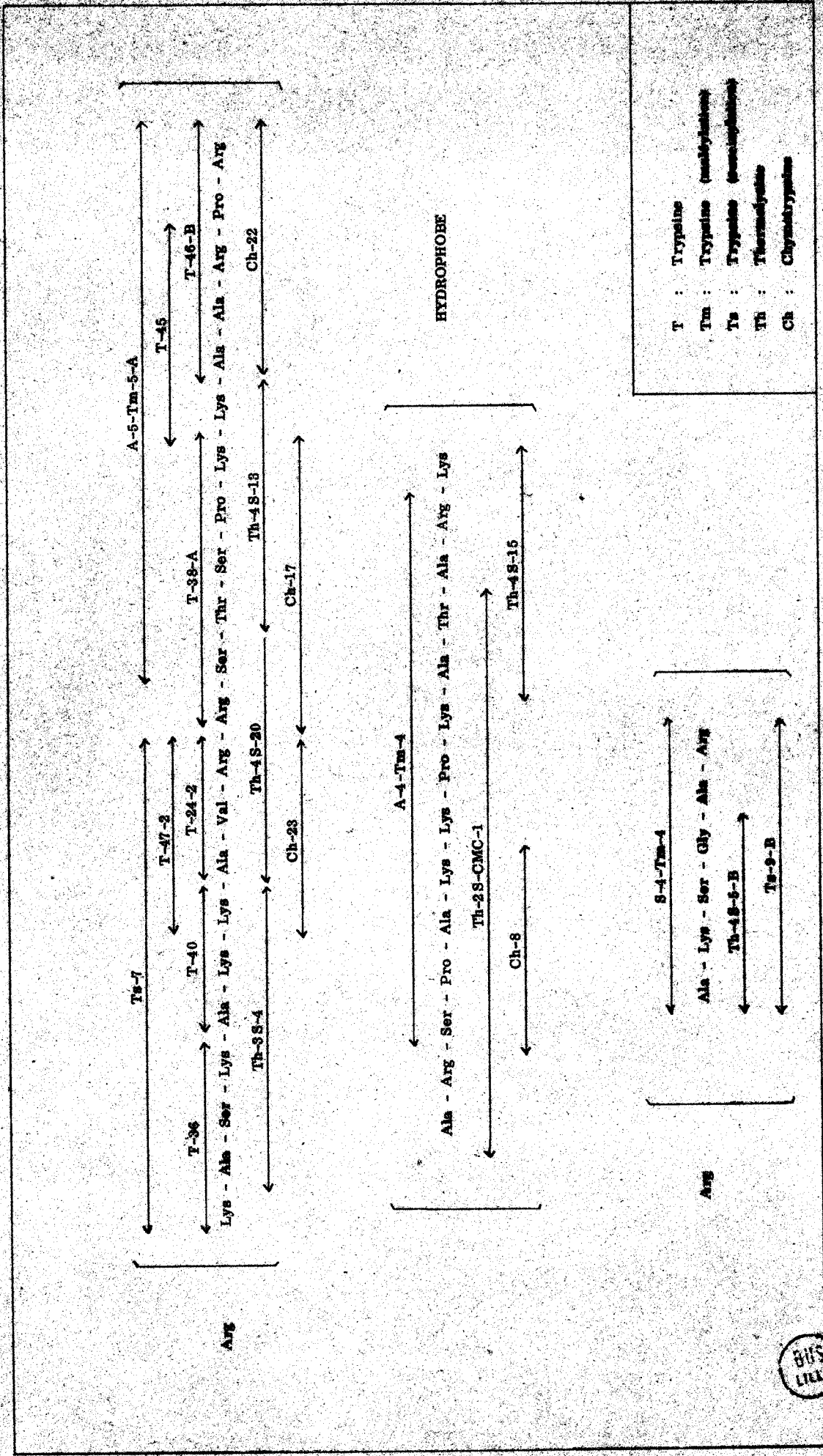




SHS  
1111



- T : Trypsine
- Tm : Trypsine (maléylation)
- Ts : Trypsine (succinylation)
- Th : Thermolysine
- Ch : Chymotrypsine



SEQUENCES PEPTIDIQUES DE L'HISTONE H5, LOCALISEES DANS LA PARTIE COOH-TERMINALE DE LA MOLECULE



Thr - Glu - Ser - Leu - Val - Leu - Ser - Pro - Ala - Pro - Ala - Lys - Pro - Lys - <sup>Gln</sup>Arg - Val - Lys - Ala - Ser - Arg - Arg - Ser - Ala - Ser - His - Pro - Thr - Tyr - Ser - Glu - Met - Ile - Ala -  
 1 10 20 30

Ala - Ala - Ile - Arg - Ala - Glu - Lys - Ser - Arg - Gly - Gly - Ser - Ser - Arg - Gln - Ser - Ile - Gln - Lys - Tyr - Ile - Lys - Ser - His - Tyr - Lys - Val - Gly - His - Asn - Ala - Asp - Leu - Gln -  
 40 50 60

Ile - Lys - Leu - Ser - Ile - Arg - Arg - Leu - Leu - Ala - Ala - Gly - Val - Leu - Lys - Gln - Thr - Lys - Gly - Val - Gly - Ala - Gly - Ser - Ser - Phe - Arg - Leu - Ala - Lys - Ser - Asp - Lys -  
 70 80 90 93 99 100

Ala - Lys - Arg - Ser - Pro - Gly - Lys - Lys - Lys - Ala - Lys - (Ala - Lys - Lys - Pro) Lys - Thr - Val - Lys - Arg) (Ala - Lys - Ser - Gly - Ala - Arg) (Ala - Arg - Ser - Pro) Ala - Lys -  
 110

Lys - Pro - Lys - Ala - Thr - Ala - Arg - Lys) (Ala - Ser - Lys - Ala - Lys - Lys - Ala - Val - Arg - Arg - Ser - Thr) Ser - Pro - Lys - Lys - Ala - Ala - Arg - Pro - Arg) (Lys) Ser - Pro -

Lys - Lys - Lys) (Val - Lys - Ala - Lys) (Ser - Arg - Lys) (Lys - Lys - Ser - Arg - Ala) Ser - Pro - Lys - Lys) (Ser - Lys - Pro - Arg) [Pro, Ser, Lys, Ala] - Arg - Lys - Lys (OH)



H 1	Tyr - Asp - Val - Gly - Lys - Asn - Asn - Ser - Arg - Ile - Lys - Leu - Gly - Leu - Lys - Ser - Leu - Val - Ser - Lys -	75	90
H 5	Tyr - Lys - Val - Gly - His - Asn - Ala - Asp - Leu - Gln - Ile - Lys - Leu - Ser - Ile - Arg - Arg - Leu - Leu - Ala - Ala -	58	60
H 1	Gly - Thr - Leu - Val - Gln - Thr - Lys - Gly - Thr - Gly - Ala - Ser - Gly - Ser - Phe - Lys - Leu -	100	109 110
H 5	Gly - Val - Leu - Lys - Gln - Thr - Lys - Gly - Val - Gly - Ala - Gly - Ser - Ser - Phe - Arg - Leu - Ala - Lys - Ser -	80	90 98
H 1	Asp - Lys - Lys - Ala		
H 5	Asp - Lys - Ala	100	



HOMOLOGUES DE SEQUENCES AU VOISINAGE DES RESIDUS AROMATIQUES,

ENTRE L'HISTONE H 1 DE THYMUS DE LAPIN (RTL-3) ET L'HISTONE H 5 D'ERYTHROCYTE DE POULET



## BIBLIOGRAPHIE

1. BELLAIR, J.T., and MAURITZEN, C.M. (1964)  
The fractionation of  $\alpha$ -histones from chicken erythrocyte nuclei.  
II. Fractions obtained by exclusion chromatography.  
Austral. J. Biol. Sci., 17, 1001-1015.
2. CHAMPAGNE, M., MAZEN, A., et WILHELM, X. (1968)  
Histones d'érythrocytes de Poulets. I. Fractionnement des histones  
totales et isolement d'une histone spécifique.  
Bull. Soc. Chim. Biol., 50, 1261-1272.
3. CHAPMAN, G.E., HARTMAN, P.G., and BRADBURY, E.M. (1976)  
Studies on the role and mode of operation of the very lysine rich  
histone H<sub>1</sub> in Eukaryote Chromatin. The isolation of the globular  
and non-globular regions of the histone H<sub>1</sub> molecule.  
Eur. J. Biochem., 61, 69-75.
4. DE LANGE, R.J., FAMBROUGH, D.M., SMITH, E.L., and  
BONNER, J. (1969-a)  
Calf and pea histone IV. II. The complete amino acid sequence of  
calf thymus histone IV : presence of  $\epsilon$ -N-acetyl lysine.  
J. Biol. Chem., 244, 319-334.
5. DE LANGE, R.J., FAMBROUGH, D.M., SMITH, E.L., and  
BONNER, J. (1969-b)  
Calf and pea histone IV. III. Complete amino acid sequence of pea  
seedling histone IV. Comparison with the homologous calf thymus histone.  
J. Biol. Chem., 244, 5669-5679.

6. DE LANGE, R.J., HOOPER, J.A., and SMITH, E.L. (1972)  
Complete amino acid sequence of calf thymus histone III.  
Proc. Natl. Acad. Sci. US, 69, 882-884.
7. EASLEY, C.W., ZEGERS, B.J.M., and DE VIJLDER, M. (1969)  
Application of specialized techniques for specific staining of peptide maps on various media.  
Biochim. Biophys. Acta, 175, 211-213.
8. EDMAN, P. (1956)  
On the mechanism of the phenyl isothiocyanate degradation of peptides.  
Acta Chem. Scand., 10, 761-768.
9. EDMAN, P., and SJÖQUIST, J. (1956)  
Identification and semi-quantitative determination of phenylthiohydantoins.  
Acta Chem. Scand., 10, 1507-1509.
10. GAREL, A., BURCKARD, J., MAZEN, A., et CHAMPAGNE, M. (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.
11. GAREL, A., MAZEN, A., and CHAMPAGNE, M.,  
and SAUTIERE, P., KMIECIK, D., LOY, O., and BISERTE, G. (1975)  
Chicken erythrocyte histone H<sub>5</sub> ; I. Amino-terminal sequence (70 residues).  
Febs Letters, 50, 195-199.
12. GRAY, W.R., and HARTLEY, B.S. (1963-a)  
A fluorescent end-group reagent for proteins and peptides.  
Biochem. J., 89, 59 P-60 P.
13. GRAY, W.R., and HARTLEY, B.S. (1963-b)  
The Structure of a chymotrypsic peptide from *Pseudomonas* cytochrome C-551.  
Biochem. J., 89, 379-380.

14. GREENAWAY, P.J. (1971)  
Studies of the primary structure of chicken erythrocyte histone Fraction V.  
Biochem. J., 124, 319-325.
15. GREENAWAY, P.J. and MURRAY, K. (1971)  
Heterogeneity and polymorphism in chicken erythrocyte histone Fraction V.  
Nature New Biology, 229, 233-238.
16. GROS, C., and LABOUESSE, B. (1969)  
Study of the dansylation reaction of amino acids, peptides and proteins.  
Eur. J. Biochem., 7, 463-470.
17. HABEEB, A.F.S.A., CASSIDY, H.G., and SINGER, S.J. (1958)  
Molecular structural effects produced in Proteins by reaction with succinic Anhydride.  
Biochim. Biophys. Acta, 29, 587-593.
18. HIRS, C.H.W., MOORE, S., and STEIN, W.H. (1960)  
The sequence of the amino-acid residues in performic acid-oxidized Ribonuclease.  
J. Biol. Chem., 235, 633-647.
19. HNILICA, L.S. (1964)  
The specificity of histones in chicken erythrocytes.  
Experientia, 20, 13-14.
20. IWAI, K., ISHIKAWA, K., and HAYASHI, H. (1970)  
Amino acid sequence of slightly lysine-rich histone.  
Nature, 226, 1056-1058.
21. JEPPSSON, J.O., and SJÖQUIST, J. (1967)  
Thin-Layer Chromatography of PTH Amino-Acids.  
Anal. Biochem., 18, 264-269.

22. JOHNS, E.W., PHILLIPS, D.M.P., SIMSON, P., and BUTLER, J.A.V. (1960)  
Improved fractionation of arginine-rich histones from calf thymus.  
Biochem. J., 77, 631-636.
23. JOHNS, E.W. (1964)  
Preparative methods for histone fractions from calf thymus.  
Biochem. J., 92, 55-59.
24. JOHNS, E.W. (1967)  
A method for the selective extraction of histone fractions F-2 a<sub>1</sub> and F-2 a<sub>2</sub> from calf thymus deoxyribonucleoprotein at pH 7.  
Biochem. J., 105, 611-614.
25. JOHNS, E.W., and DIGGLE, J.H. (1969)  
A method for the large scale preparation of the avian erythrocyte specific histone F-2 c.  
European J. Biochem., 11, 495-498.
26. JONES, G.M.T., RALL, S.C., and COLE, R.D. (1974)  
Extension of the amino-acid sequence of a lysine-rich histone.  
J. Biol. Chem., 249, 2548-2553.
27. LIU, T.Y., STEIN, W.H., MOORE, S., and ELLIOTT, S.D. (1965)  
The sequence of amino acid residues around the sulfhydryl group at the active site of streptococcal proteinase.  
J. Biol. Chem., 240, 1143-1149.
28. MAZEN, A., et CHAMPAGNE, M. (1972)  
Histones d'érythrocytes de Poulets. IV. Etude quantitative des histones au cours de la maturation de l'érythrocyte.  
Biochimie, 54, 1273-1279.



29. MURRAY, K., VIDALI, G., and NEELIN, J.M. (1968)  
The stepwise removal of histones from chicken erythrocyte nucleoprotein.  
Biochem. J., 107, 207-215.
30. NEELIN, J.M., CALLAHAN, P.X., LAMB, D.C., and MURRAY, K. (1964)  
Histones of Chicken erythrocyte nuclei.  
Can. J. Biochem., 42, 1743-1752.
31. OLINS, A.L., and OLINS, D.E. (1973)  
Spheroid chromatin units (  $\gamma$  bodies).  
J. Cell. Biol., 59, 252-a.
32. OLINS, A.L., and OLINS, D.E. (1974)  
Spheroid chromatin units (  $\gamma$  bodies).  
Science (Wash. D.C.) 183, 330-332.
33. OUDET, P., GROSS-BELLARD, M. and CHAMBON, P. (1974)  
Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit.  
Cell., 4, 281-300.
34. PANYIM, S., and CHALKLEY, R. (1969)  
High resolution acrylamide gel electrophoresis of histones.  
Arch. Biochem. Biophys., 130, 337-346.
35. RAMACHANDRAN, L.K., and WITKOP, B. (1967)  
N-Bromosuccinimide cleavage of peptides.  
Methods in Enzymology (HIRS, C.H.W.ed.), Vol. 11, 283-299  
Academic press, New York.
36. RASMUSSEN, P.S., MURRAY, K., and LUCK, J.M. (1962)  
On the complexity of calf thymus histone.  
Biochemistry, 1, 79-89.

37. SAUTIERE, P., MOSCHETTO, Y., DAUTREVAUX, M., and BISERTE, G. (1970)  
Structural analysis of the glycine-rich, arginine-rich histone from calf thymus : the tryptic peptides.  
Eur. J. Biochem., 12, 222-226.
38. SAUTIERE, P., TYROU, D., LAINE, B., MIZON, J., 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.
39. SAUTIERE, P., TYROU, D., LAINE, B., MIZON, J., RUFFIN, P., and BISERTE, G. (1974)  
Covalent structure of the calf thymus ALK-histone.  
Eur. J. Biochem., 41, 563-576.
40. SAUTIERE, P., KMIECIK, D., LOY, O., BRIAND, G., and BISERTE, G. (1975)  
Chicken erythrocyte histone H<sub>5</sub> ; II. Amino acid sequence adjacent to the phenylalanine residue.  
Febs. Letters , 50, 200-203.
41. SAUTIERE, P., BRIAND, G., KMIECIK, D., LOY, O., BISERTE, G., and GAREL, A., CHAMPAGNE, M. (1976)  
Chicken erythrocyte histone H<sub>5</sub> ; III. Sequence of the amino-terminal half of the molecule (111 residues).  
Febs Letters , 63, 164-166.
42. STEHELIN, D., et DURANTON, H. (1969)  
Dérivés dansylés des acides aminés. Chromatographie monodimensionnelle et simultanée de plusieurs échantillons sur une même couche mince.  
J. Chromatog., 43, 93-102.
43. YAMADA, S., and ITANO, H.A. (1966)  
Phenanthrene quinone as an analytical reagent for arginine and other mono-substituted guanidines.  
Biochim. Biophys. Acta , 130, 538-540.

44. YEOMAN, L.C., OLSON, M.O.J., SUGANO, N, JORDAN, J.J.,  
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.

