

50376  
1982  
117

50376  
1982  
117

N° d'ordre : 549

## THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE

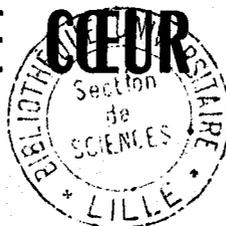
pour obtenir le titre de

DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

par

Xavier GRANDIER-VAZEILLE

# ÉTUDE DU POLYMORPHISME DE LA MOLÉCULE DE MYOSINE ET DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE LA CHAÎNE LÉGÈRE DE PLUS HAUT POIDS MOLÉCULAIRE DE LA MYOSINE DE VENTRICULE GAUCHE DE CŒUR DE PORC



Soutenue le 22 juin 1982 devant la Commission d'examen

J. MONTREUIL	Président-Rapporteur
G. BISERTE	Rapporteur
R. KASSAB	Rapporteur
J.-E. MOREL	Rapporteur
P. GUILBAULT	Examineur
H.-F. HILDEBRAND	Examineur

A MES PARENTS

A MA FAMILLE

A MES AMIS

# TABLE DES MATIERES

## CHAPITRE I : GENERALITES

A- INTRODUCTION	1
B- LES DIFFERENTS SYSTEMES CONTRACTILES	1
I- LES SYSTEMES MUSCULAIRES	1
1°) Le tissu musculaire strié	2
a) Le muscle strié normal	2
b) Pathologie du muscle strié	5
2°) Le muscle lisse	7
3°) Le myocarde	10
a) Le coeur au cours de l'évolution des espèces	10
b) Le myocarde normal	12
c) Les myopathies cardiaques	14
II- LES SYSTEMES NON MUSCULAIRES	16
C- LES DIFFERENTES PROTEINES CONTRACTILES ET LEUR POLYMORPHISME	16
I- LES FILAMENTS EPAIS	17
1°) La molécule de myosine	19
a) Représentation générale de la molécule	19
b) Particularités de la molécule de myosine	20
2°) La protéine-C	32
3°) Les protéines de la ligne M (les M-protéines)	32
II- LE FILAMENT FIN	33
1°) L'actine	35
2°) La tropomyosine	36
3°) Le complexe des troponines	37
a) La troponine -C (TN-C)	37
b) La troponine -I (TN-I)	39
c) La troponine -T (TN-T)	39
III- LES AUTRES PROTEINES CONTRACTILES	40
1°) L' $\alpha$ -actinine	40
2°) La paramyosine	41
3°) La filamine	42
4°) La titine	42

D- LA CONTRACTION MUSCULAIRE	42
I- LE PROCESSUS MECANIQUE	43
1°) Mécanisme selon HUXLEY	43
2°) Mécanisme selon ELLIOTT	43
3°) Mécanisme selon MOREL	44
II- LES PHENOMENES BIOCHIMIQUES	44
III- LA REGULATION DE LA CONTRACTION	46
CHAPITRE II : DIFFERENCES AU NIVEAU DES CHAINES LOURDES DES MYOSINES CARDIAQUES DE PORC	49
A- INTRODUCTION	53
B- ETUDE DES MYOSINES VENTRICULAIRES DROITES ET GAUCHES DE COEUR DE PORC	54
I- ACTIVITES ATP-ASIQUES	54
1°) L' activité ATP-asiq ue dépendante du calcium	55
2°) L'activité ATP-asiq ue dépendante du potassium	62
3°) L'activité ATP-asiq ue activée par l'actine	62
4°) Conclusion	66
II- FILAMENTS SYNTHETIQUES	68
III- ETUDE DES HYDROLYSATS ENZYMATIQUES DES MYOSINES	76
1°) Action de la chymotrypsine	76
a) Expérience en milieu non dissociant	76
b) Expérience en milieu dissociant	80
2°) Action de la pepsine	84
3°) Conclusion	87
IV- ETUDE DES HYDROLYSATS PAR DES AGENTS CHIMIQUES	87
1°) Action du bromure de cyanogène	88
a) Chromatographie de gel filtration sur colonne de séphadex G <sub>50</sub>	88
b) Electrophorèse en double dimension	90
2°) Action de l'acide 2-nitro 5-thiocyanatobenzoïque	93
3°) Conclusion	97
V- ANALYSE DES ISOENZYMES DE MYOSINES VENTRICULAIRES PAR ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN MILIEU NON DISSOCIANT	99
VI- ESSAIS DE SEPARATION DES ISOENZYMES DE MYOSINE CARDIAQUE	103
1°) La chromatographie liquide de gel filtration sur colonne de sépharose 2B	103

2°) La chromatographie d'affinité	105
3°) L'électrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide	107
4°) Conclusion	107
C- ETUDE DES MYOSINES EXTRAITES DES OREILLETES ET DES VENTRICULES DE COEUR DE PORC	108
I- ETUDE DES ACTIVITES ATP-ASIQUES	108
1°) L'activité ATP-asiq ue dépendante du calcium	108
2°) L'activité ATP-asiq ue activée par l'actine	109
II- ETUDE DES HYDROLYSATS OBTENUS APRES ACTION DU NTCBA	113
III- CONCLUSION	115
D- CONCLUSIONS DE NOTRE EXPERIMENTATION	115
I- LES MYOSINES VENTRICULAIRES	116
1°) L'étude des activités ATP-asiq ues	116
2°) Les filaments synthétiques	116
3°) L'étude des hydrolysats par les enzymes	116
4°) L'étude des hydrolysats par action d'agents chimiques	117
5°) L'étude par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu non dissociant	117
6°) Les essais de séparation des isoenzymes de myosine	117
II- LES MYOSINES AURICULAIRES	118
III- LES MYOSINES AURICULAIRES ET VENTRICULAIRES	118
1°) L'étude des activités ATP-asiq ues	118
2°) Les hydrolysats par le NTCBA	118
 CHAPITRE III : DIFFÉRENCES DANS LES COMPOSITIONS EN CHAINES LEGERES DE DIFFERENTES MYOSINES	 119
A- INTRODUCTION	121
B- ETUDE DE LA MYOSINE DE REFERENCE : LA MYOSINE DE MUSCLE SQUELETTIQUE	122
I- ETUDE DE LA MYOSINE DE MUSCLE SQUELETTIQUE NORMAL ADULTE DE DIFFERENTES ESPECES	124
1°) L'électrophorèse en présence de SDS à pH 8,4	124
2°) L'électrophorèse en présence de SDS à pH 7,0	127
3°) L'électrophorèse en présence d'urée 8M à pH 8,4	129
4°) Conclusion	131
II- ETUDE DES MYOSINES SQUELETTIQUES A DIFFERENTS STADES DE DIFFERENCIATION	135

1°) Electrophorèse en présence de SDS à pH 8,4	135
2°) Electrophorèse en présence d'urée 8M à pH 8,4	138
3°) Conclusion	138
C- ETUDE DES MYOSINES POUR NOTRE MODELE : LE PORC	142
I- LES MYOSINES DE MUSCLES ADULTES	142
1°) Electrophorèse en présence de SDS à pH 8,4	142
2°) Electrophorèse en présence de SDS à pH 7,0	145
3°) Electrophorèse en présence d'urée 8M à pH 8,4	145
II- LA MYOSINE DE MUSCLE FOETAL	149
1°) Electrophorèse en présence de SDS à pH 8,4	149
2°) Electrophorèse en présence d'urée 8M à pH 8,4	149
3°) Conclusion	154
D- ETUDE DES MYOSINES CARDIAQUES DES AMPHIBIENS, DES OISEAUX ET DES MAMMIFERES	154
1°) Electrophorèse en présence de SDS à pH 8,4	156
2°) Electrophorèse en présence de SDS à pH 7,0	160
3°) Conclusion	160
 CHAPITRE IV : ETUDE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE LA CHAÎNE LÈGÈRE DE PLUS HAUT POIDS MOLECULAIRE DE LA MYOSINE DU VENTRICULE GAUCHE DE COEUR DE PORC	165
 A- INTRODUCTION	171
B- PREPARATION, CARACTERISATION ET HYDROLYSE DES CHAINES LÈGERES DE MYOSINE DE VENTRICULE GAUCHE DE COEUR DE PORC	171
I- POINTS ISOELECTRIQUES DES SOUS-UNITES DES MYOSINES VENTRICULAIRES	171
II- PREPARATION DE LA CHAÎNE LÈGÈRE L <sub>27</sub>	173
1°) Chromatographie d'échange d'ions	173
2°) Précipitation dite "isoélectrique"	173
3°) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide préparative	174
4°) Critère de pureté des préparations	175
III- ETUDE DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINES ET DE L'ACIDE AMINE N-TERMINAL DES CHAINES LÈGERES	175
1°) Composition en acides aminés	175
2°) Détermination de l'acide aminé N-Terminal	175
IV- ETABLISSEMENT D'UN CRITERE DE PURETE SPECIFIQUE DE LA CHAÎNE L <sub>27</sub>	178
V- CONCLUSION	181

C- SEPARATION DES HYDROLYSATS DE LA CHAINE LEGERE, PAR LES TECHNIQUES CLASSIQUES, ET ETUDE DES PEPTIDES ISOLES	182
I- ETUDE DE L'HYDROLYSAT PAR LE BROMURE DE CYANOGENE DE LA CHAINE LEGERE L <sub>27</sub>	182
1°) Contrôle de l'hydrolyse	182
2°) Fractionnement	182
3°) Etude des différentes fractions	182
4°) Conclusion	187
II- ETUDE DES PEPTIDES TRYPSIQUES DE LA CHAINE LEGERE L <sub>27</sub>	187
1°) Contrôle du rendement de l'hydrolyse trypsique	187
2°) Fractionnement de l'hydrolysat trypsique	188
3°) Analyse des peptides tryptiques	188
4°) Etablissement d'une structure partielle de L <sub>27</sub> par homologie	188
5°) Localisation des peptides contenant les résidus de méthionine	192
6°) Conclusion	193
III- ETUDE DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES DE LA CHAINE LEGERE L <sub>27</sub>	194
1°) Fractionnement sur colonne de résine chromobeads P	194
2°) Fractionnement sur colonne de résine de DEAE tris- acryl M	196
3°) Conclusion	196
IV- ETUDE DES PEPTIDES APRES ACTION DE L'ENZYME STAPHY- LOCOCCUS AUREUS V <sub>8</sub> SUR LA CHAINE LEGERE L <sub>27</sub>	198
V- ETUDE DE L'HYDROLYSAT PAR L'ACIDE 2-NITRO 5-THIOCYANATO- BENZOIQUE DE LA CHAINE LEGERE L <sub>27</sub>	199
VI- CINETIQUE D'ACTION D'ENDOPEPTIDASES SUR LA CHAINE LEGERE L <sub>27</sub>	200
1°) Trypsine traitée par le TPCK à pH 8,78	201
2°) Chymotrypsine traitée par le TLCK à pH 8,78	201
3°) Staphylococcus auréus V <sub>8</sub> à pH 4,0	202
4°) Collagénase à pH 7,4	202
5°) Elastase à pH 8,8	202
6°) Protéase extraite du pancréas pH 8,78	202
7°) Autres endopeptidases	203
8°) Conclusion	203
VII- CONCLUSION	203

D- SEPARATION DES HYDROLYSATS PEPTIDIQUES DE LA CHAINE LEGERE	
L <sub>27</sub> PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)	206
I- INTRODUCTION	206
II- ETUDE DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES	207
1°) L'hydrolysate chymotrypsique total	207
2°) Apres fractionnement sur colonne de DEAE-triacryl M	209
3°) Conclusion	210
III- ETUDE DES PEPTIDES OBTENUS APRES ACTION DU BrCN	211
1°) Fractionnement de l'hydrolysate total	212
2°) Apres fractionnement de l'hydrolysate	216
3°) Conclusion	217
IV- ETUDE DES HYDROLYSATS TRYPSIQUES LIMITES A LA LIAISON	
ARGINYLE	218
1°) La maléilation	219
2°) La citraconylation	219
3°) Conclusion	220
V- ETUDE D'AUTRES TYPES D'HYDROLYSATS ENZYMATIQUES	222
1°) L'hydrolysate par la protéase de la glande sous-	
maxillaire de Souris (GSMS)	222
2°) L'hydrolysate apres action de la N-bromosuccinimide	
(NBS)	222
3°) L'hydrolysate par la collagénase	223
4°) Conclusion	224
E- LA STRUCTURE PRIMAIRE DE LA CHAINE LEGERE L <sub>27</sub>	224
I- INTRODUCTION	224
II- LES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES	225
1°) Les peptides chymotrypsiques obtenus à partir de	
l'hydrolysate total	225
2°) Les peptides chymotrypsiques obtenus apres fraction-	
nement sur DEAE-trisacryl M	225
III- LES PEPTIDES OBTENUS APRES ACTION DU BRCN	227
1°) Peptides obtenus apres préfractionnement, sur colonne	
HPLC semi-préparative, de l'hydrolysate total	227
2°) Peptides obtenus apres fractionnement sur colonne	
R-Phényl	228
3°) Conclusion	232
IV- LES PEPTIDES OBTENUS APRES ACTION DE LA TRYPSINE LI-	
MITEE AUX LIAISONS ARGILYLES	232
1°) Caractérisation des peptides	232

2°) Etude de la séquence en acides aminés de ces peptides tryptiques	235
3°) Conclusion	237
V- INTERET DE LA HPLC	237
VI- ENCHAINEMENT PEPTIDIQUE DE L <sub>27</sub>	238
VII- HOMOLOGIE DE STRUCTURE ENTRE LES CHAINES LEGERES "ALCALI", LA TN-C ET LA PARVALBUMINE	240
1°) Comparaison des chaines légères "alcali"	240
2°) Comparaison des chaines légères L <sub>27</sub> de muscle cardiaque de Porc et de Poulet à la TN-C de muscle squelettique de Lapin	242
3°) Conclusion	245
CHAPITRE V : DISCUSSION ET CONCLUSION	247
A- INTRODUCTION	249
B- LE POLYMORPHISME DES CHAINES LOURDES DE LA MYOSINE	249
C- LES DIFFERENTES FORMES DE CHAINES LEGERES DES MYOSINES	257
D- ETUDE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE LA CHAINE LEGERE DE PLUS HAUT POIDS MOLECULAIRE "L <sub>27</sub> " DE LA MYOSINE DE VENTRICLE GAUCHE DE COEUR DE PORC	265
E- CONCLUSION	272
CHAPITRE VI : BIBLIOGRAPHIE	273
CHAPITRE VII : APPENDICE TECHNIQUE	291

## AVANT-PROPOS

---

L'aboutissement de ce travail, effectué dans le cadre du Laboratoire associé n°268 du C.N.R.S. (Unité 16 I.N.S.E.R.M.), nous donne l'occasion de témoigner notre respectueuse gratitude à notre jury de thèse et notre profonde reconnaissance à tous ceux qui nous en ont permis la réalisation.

Nous remercions en particulier Monsieur le Professeur MONTREUIL d'avoir bien voulu juger l'ensemble de notre travail et d'accepter de présider le jury de cette thèse.

Nous sommes heureux de pouvoir exprimer toute notre reconnaissance, notre profond et respectueux attachement et notre entier dévouement à Monsieur le Professeur BISERTE qui nous a accueilli dans son laboratoire en 1973. Vous nous avez initiés à la Biochimie et depuis n'avez jamais cessé de nous faire bénéficier de votre compétence scientifique en dirigeant avec bienveillance ce travail. Vos nombreux conseils, votre aide et vos encouragements ont été pour une large part dans l'aboutissement de ce travail.

Nous voulons témoigner notre profonde gratitude à Monsieur le Professeur MOREL et à Monsieur KASSAB, maître de Recherche au C.N.R.S. pour les nombreuses discussions enrichissantes, les conseils prodigués et pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail en le jugeant.

Nous remercions Monsieur le Professeur GUILBAULT de l'intérêt qu'il nous a témoigné et de l'honneur qu'il nous fait en jugeant ce travail.

Nous adressons nos plus vifs remerciements à Monsieur le Docteur HILDEBRAND pour les conseils qu'il nous a prodigués, les nombreuses discussions intéressantes et l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

Je tiens à remercier très vivement mes collègues Monsieur TETAERT et Mademoiselle HEMON pour la part très active qu'ils ont pris dans ce travail. Vos conseils judicieux, votre grande patience pour m'initier à la Biochimie, le temps que vous n'avez pas ménagé et les encouragements amicaux m'ont été d'une aide très précieuse. Il m'est difficile de traduire ici ma profonde reconnaissance, l'admiration et l'amitié que je vous porte.

La réalisation technique de ce mémoire n'aurait pas été possible sans la participation efficace et bénévole de Mesdames BLANQUET et GARET, Mesdemoiselles LEVERT, MILLEVILLE, MOSTAERT et RICHARD et Monsieur MATHEU. Trouvez ici mes plus chaleureux remerciements.

Le Service commun des acides aminés de l'unité 16 I.N.S.E.R.M. a bien voulu effectuer, pour nos nombreux peptides, la détermination de la composition en acides aminés à haute sensibilité. Nous remercions toutes les personnes qui nous ont aidé.

Que toutes les personnes qui ont mis à notre disposition leur appareillage HPLC veuillent trouver ici tous mes remerciements.

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

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

PROFESSEURS HONORAIRES DES ANCIENNES FACULTES DE DROIT  
ET SCIENCES ECONOMIQUES, DES SCIENCES ET DES LETTRES

MM. ARNOULT, Mme BEAUJEU, BONTE, BROCHARD, CHAPPELON, CHAUDRON, CORDONNIER, CORSIN, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, GONTIER, HEIM DE BALSAC, HOCQUETTE, KAMPE DE FERIET, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SAVARD, SCHILTZ, WATERLOT, WIEMAN, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

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

MM. R. DEFRETIN, M. PARREAU, J. LOMBARD, M. MIGEON.

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. DURCHON Maurice	Biologie expérimentale
M. GABILLARD Robert	Electronique
M. HEUBEL Joseph	Chimie minérale
M. MONTREUIL Jean	Biochimie
M. PARREAU Michel	Analyse
M. TRIDOT Gabriel	Chimie appliquée
M. VIVIER Emile	Biologie cellulaire
M. WERTHEIMER Raymond	Physique atomique et moléculaire

PROFESSEURS - 1ère CLASSE

M. BACCHUS Pierre	Astronomie
M. BEAUFILS Jean Pierre	Chimie physique
M. BIAYS Pierre	Géographie
M. BILLARD Jean	Physique du solide
M. BOILLY Bénoni	Biologie
M. BONNOT Ernest	Biologie végétale

.../...

M. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie végétale
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DELATTRE Charles	Géologie générale
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. FOURET René	Physique du solide
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences économiques
M. GRUSON Laurent	Algèbre
M. GUILLAUME Jean	Microbiologie
M. HECTOR Joseph	Géométrie
M. LABLACHE COMBIER Alain	Chimie organique
M. LACOSTE Louis	Biologie végétale
M. LAVEINE Jean Pierre	Paléontologie
M. LEHMANN Daniel	Géométrie
Mme LENOBLE Jacqueline	Physique atomique et moléculaire
M. LHOMME Jean	Chimie organique biologique
M. LOMBARD Jacques	Sociologie
M. LOUCHEUX Claude	Chimie physique
M. LUCQUIN Michel	Chimie physique
M. MAILLET Pierre	Sciences économiques
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. POUZET Pierre	Analyse numérique
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème CLASSE

M. AL FAKIR Sabah	Algèbre
M. ALLAMANDO Etienne	Electronique et électrotechnique
M. ANCIAN Bernard	Spectrochimie
M. ANTOINE Philippe	Analyse
M. BART André	Biologie animale
Mme BATTIAU Yvonne	Géographie
M. BEGUIN Paul	Mécanique
M. BELLET Jean	Physique atomique et moléculaire
M. BERZIN Robert	Analyse
M. BKOUCHE Rudolphe	Algèbre
M. BODARD Marcel	Biologie végétale
M. BOIVIN Jean Claude	Chimie minérale
M. BONNELLE Jean Pierre	Catalyse
M. BOSCO Denis	Probabilités
M. BOUQUELET Stéphane	Biochimie structurale
M. BRASSELET Jean Paul	Géométrie et topologie
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. BRIDOUX Michel	Chimie physique

.../...

M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CHAPOTON Alain	Electronique
M. COQUERY Jean Marie	Psychophysiologie
Mme CORSIN Paule	Paléontologie
M. CORTOIS Jean	Physique nucléaire et corpusculaire
M. COUTURIER Daniel	Chimie organique
M. CRAMPON Norbert	Hydrogéologie et environnement
M. CROSNIER Yves	Electronique
Mlle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean Claude	Analyse
M. DEPREZ Gilbert	Physique du solide et cristallographie
M. DERIEUX Jean Claude	Microbiologie
Mlle DESSAUX Odile	Spectroscopie de la réactivité chimique
M. DEVRAINNE Pierre	Chimie minérale
M. DHAINAUT André	Biologie animale
Mme DHAINAUT Nicole	Biologie animale
M. DORMARD Serge	Sciences économiques
M. DOUKHAN Jean Claude	Physique du solide
M. DUBOIS Henri	Spectroscopie hertzienne
M. DUBRULLE Alain	Spectroscopie hertzienne
M. DUBUS Jean Paul	Spectrométrie des solides
M. DYMENT Arthur	Mécanique
Mme EVRARD Micheline	Chimie appliquée
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FONTAINE Jacques	Electronique, électrotechnique, automatique
M. FOURNET Bernard	Biochimie structurale
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démographie
M. GERVAIS Michel	Gestion
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie Physique
M. GREMY Jean Paul	Sociologie
M. GREVET Patrick	Sciences économiques
M. GUILBAULT Pierre	Physiologie animale
M. HENRY Jean Pierre	Génie mécanique
M. HERMAN Maurice	Physique spatiale
M. HOUDART René	Physique atomique et moléculaire
M. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne
M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LAURENT François	Automatique
Mme LECLERCQ Ginette	Catalyse
M. LEFEVRE Christian	Pétrologie
Mlle LEGRAND Denise	Algèbre
Mlle LEGRAND Solange	Algèbre

.../...

Mme LEHMANN Josiane	Analyse
M. LEMAIRE Jean	Spectroscopie hertzienne
M. LENTACKER Firmin	Géographie
M. LEROY Jean Marie	Chimie appliquée
M. LEROY Yves	Electronique, électrotechnique, automatique
M. LESENNE Jacques	Electrotechnique
M. LEVASSEUR Michel	Sciences économiques
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphé-
M. MAHIEU Jean Marie	Physique atomique et moléculaire. riques
M. MAIZIERES Christian	Automatique
Mlle MARQUET Simone	Probabilités
M. MESMACQUE Gérard	Génie mécanique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MESSERLIN Patrick	Sciences économiques
M. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. MONTEL Marc	Physique du solide
M. MONTUELLE Bernard	Biologie et biochimie appliquées
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. NICOLE Jacques	Chimie analytique
M. NOTELET Francis	Electronique, électrotechnique, automatique
M. PARSY Fernand	Mécanique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie physiologie végétales
M. PECQUE Marcel	Chimie organique
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
M. PETIT Francis	Chimie organique, minérale et analytique
M. PONSOLLE Louis	Chimie physique
M. PORCHET Maurice	Biologie animale
M. POVY Lucien	Automatique
M. RACZY Ladislas	Electronique
M. RAOULT Jean François	Géologie structurale
M. RICHARD Alain	Biologie animale
M. RIETSCH François	Physique des polymères
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROUSSEAU Jean Paul	Physiologie animale
M. ROY Jean Claude	Psychophysiologie
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
M. SIMON Michel	Sociologie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
M. THERY Pierre	Electronique, électrotechnique, automatique
M. TOULOTTE Jean Marc	Automatique
M. TURREL Georges	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. VANDORPE Bernard	Chimie minérale
M. VAST Pierre	Chimie inorganique
M. VERBERT André	Biochimie
M. VERNET Philippe	Génétiq
M. VILETTE Michel	Résistance des matériaux
M. WALLART Francis	Spectrochimie Infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique

.../...

M. WATERLOT Michel  
M. WERNER Georges  
M. WOSNIAK Michel  
Mme ZINN JUSTIN Nicole

Géologie générale  
Informatique fondamentale appliquée  
Hydrométallurgie  
Algèbre

## ABREVIATIONS UTILISEES DANS LE TEXTE

D : ASP :	Aspartique	
T : THR :	Thréonine	
S : SER :	Sérine	
E : GLU :	Acide glutamique	
P : PRO :	Proline	
G : GLY :	Glycocolle	
A : ALA :	Alanine	
C : CYS :	Cystéine	
V : VAL :	Valine	
M : MET :	Méthionine	
I : ILE :	Isoleucine	
L : LEU :	Leucine	
Y : TYR :	Tyrosine	
F : PHE :	Phénylalanine	
H : HIS :	Histidine	
K : LYS :	Lysine	
R : ARG :	Arginine	
N : ASN :	Asparagine	
Q : GLN :	Glutamine	
W : TRP :	Tryptophane	
Z :	Indéterminé	
B : GLX :	Acide Glutamique ou Glutamine	
		PTH : Phénylthiohydantoïnes dérivés d'acides aminés
		DNS : Dansylacide aminé
		MTCBA: Acide 2nitro5thiocyanatobenzoïque
		BrCN : Bromure de cyanogène
		ATP : Adénosine triphosphate
		HPLC: Chromatographie liquide haute performance

## **CHAPITRE I**

# **GENERALITES**

## A - INTRODUCTION

La motilité cellulaire est une propriété fondamentale. Par exemple, elle contrôle les mouvements variés des cellules, les mouvements pendulaires et ondulatoires des cils et des flagelles, les courants cytoplasmiques dans la cellule végétale, les mouvements amiboïdes, la déformation de la surface cellulaire d'une cellule en culture, la contraction des cellules musculaires et des cellules non musculaires. On admet que cette faculté se rattache aux modifications de la conformation ou de l'agencement des longues chaînes de protéines "contractiles" (myosine, actine, tropoline, tropomyosine, etc...) qui se trouvent dans le cytoplasme cellulaire.

## B - LES DIFFERENTS SYSTEMES CONTRACTILES

### I - LES SYSTEMES MUSCULAIRES

Chez les organismes pluricellulaires, la motilité revient essentiellement à des cellules spécialisées. Quelquefois celles-ci sont d'origine ectodermique (cellules myoépithéliales), mais le plus souvent elles dérivent du mésoderme embryonnaire. Dans le cas des vertébrés, ces cellules atteignent divers degrés de différenciation, ce qui permet de distinguer trois types fondamentaux de tissus musculaires relativement peu différenciés, les *cellules musculaires lisses* qui assurent les mouvements de certains organes de la sphère végétative, tels que l'estomac et l'utérus ; d'autres cellules de petite taille, mais *striées*

et associées à la manière d'un réseau, constituent le tissu contractile du coeur ; il existe enfin un tissu musculaire *strié* formé d'éléments indépendants très allongés (les fibres musculaires striées).

### 1°) LE TISSU MUSCULAIRE STRIE

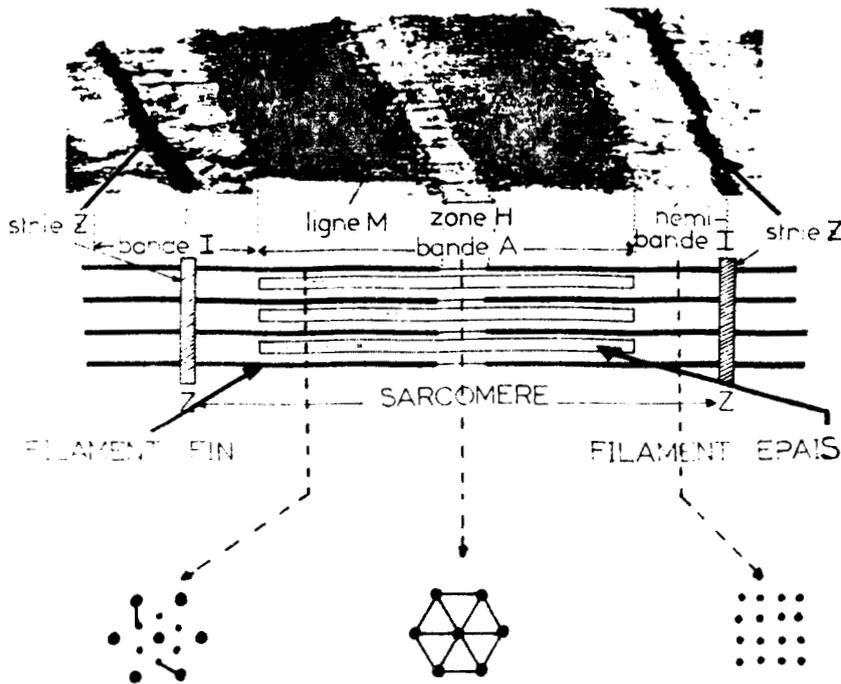
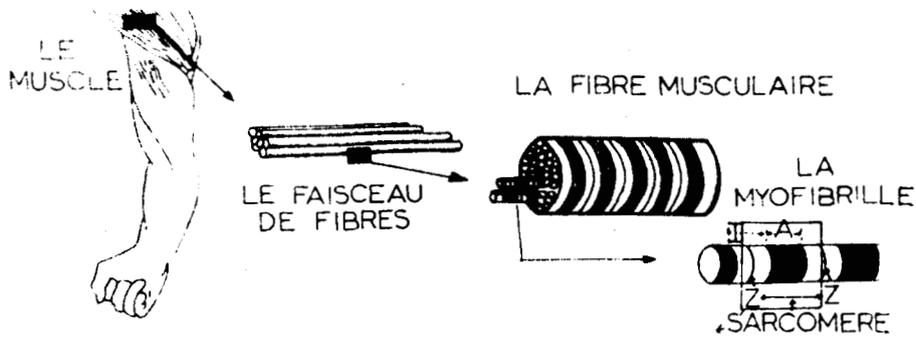
Qu'ils s'attachent sur le squelette (muscle "squelettique") ou sur ses dépendances cartilagineuses ou conjonctives (muscles "peauciers") les muscles sont aussi bien les agents de la locomotion que du maintien d'équilibre et de posture chez l'individu immobile. Selon la fonction, il existe le muscle strié *lent* (posture) et le muscle strié *rapide* (locomotion).

#### a) le muscle strié normal

Le muscle strié normal est formé d'éléments de plusieurs centimètres qui sont de véritables cellules géantes multinuclées, appelées les fibres musculaires dont l'organisation inframicroscopique est très complexe. La fibre musculaire a la propriété de se raccourcir sous l'influence d'un stimulus nerveux, comme en témoigne la connection étroite entre fibres musculaires et fibres nerveuses dites motrices.

#### α) organisation générale de la fibre musculaire striée

La fibre musculaire ou unité fonctionnelle du muscle (figure I-1) a une forme très allongée (5 à 35  $\mu\text{m}$ ) et un diamètre variable (10 à 100  $\mu$ ). Elle peut contenir jusqu'à plusieurs centaines de noyaux disposés sur sa périphérie et allongés selon le grand axe de la fibre. Comme toute cellule, elle comporte une membrane (le sarcolemme), un cytoplasme (le sarcoplasme), au sein duquel se reconnaissent de nombreux organites : mitochondries, appareil de Golgi, de nombreux grains de glycogène, etc... Deux particularités fondamentales individualisent cette cellule : la présence de myofibrilles, disposées parallèlement, étendues d'une extrémité à l'autre de la fibre, occupant sur une section transversale la presque totalité de la fibre ;



**Figure I-1 : LES NIVEAUX D'ORGANISATION DANS UN MUSCLE SOUELETTIQUE STRIE**

Dans le centre de la Figure, une micrographie électronique représente le sarcomère suivi de son schéma. Dans le bas de la Figure est représentée de façon schématique l'organisation spatiale des myofilaments : au niveau de la ligne M les filaments épais seuls présents sont disposés de façon hexagonale et réunis par un réseau régulier de ponts (M) ; au niveau de la bande A, les filaments épais et fins se chevauchent, des ponts sont visibles de place en place ; au niveau de la bande I, les filaments fins sont seuls présents



le développement et la disposition du système réticuloendoplasmique (figure I-1)

La cellule musculaire striée présente en outre des différenciations particulières aux points de contact avec les terminaisons nerveuses (jonction myoneurale) et à ses extrémités (jonction myotendineuse).

### β) Structure de la myofibrille

Dans la fibre musculaire non contractée, on note en microscopie optique, une alternance régulière de bandes claires isotropes (I) et de bandes sombres anisotropes (A). Chaque bande I est divisée en deux par une mince strie dense (Z). L'espace compris entre deux stries Z consécutives correspond au sarcomère qui est l'unité contractile (figure I-1). Chaque bande A comprend une zone médiane (H) plus claire que ses zones latérales ; la bande H ou bande de HENSEN comporte elle-même en son milieu une strie légèrement plus dense : la strie M. Cette striation est due à la structure particulière des myofibrilles. L'interprétation de cette striation a été élucidée par la microscopie électronique de la structure filamentaire des myofibrilles. Deux sortes de filaments sont visibles : des filaments épais (160 Å de diamètre) et des filaments fins (50 Å). Dans chaque sarcomère, les filaments épais occupent la partie centrale à l'emplacement de la bande A ; ils présentent en leur milieu un renflement marquant la strie M. Les filaments fins s'insèrent sur les stries Z, occupant les bandes I et pénètrent entre les filaments épais dans les parties latérales de la bande A ; leur absence dans la partie médiane de la bande A crée la zone plus claire H, latéralement leurs extrémités s'interpénètrent avec celles des filaments fins du sarcomère voisin, un double système de ponts unit ces extrémités à l'intérieur de la strie Z (figure I-1).

En section transversale, les filaments présentent un haut degré d'organisation spatiale. Les filaments épais sont disposés selon un arrangement hexagonal régulier de 450 Å de côté, au niveau des parties latérales des bandes A,

les filaments fins sont visibles. Le nombre et la disposition relative des filaments épais et fins varient selon les espèces et selon les muscles. Par exemple, dans les muscles de Mammifères, ils forment une couronne régulière de six filaments autour de chaque filament épais, chaque filament fin étant à égale distance des trois filaments épais voisins.

Entre les filaments épais et fins sont tendus des ponts. Longitudinalement, ces ponts sont disposés sur les filaments primaires tous les 60 à 70 Å et décalés selon une progression hélicoïdale d'environ 60 Å si bien que deux ponts parallèles consécutifs sont distants d'environ 400 Å. De la sorte, chaque filament fin est atteint par un pont tous les 130 à 140 Å.

#### b) Pathologie du muscle strié

Les maladies qui relèvent uniquement d'altération propre à la fibre musculaire striée sont des maladies "primitives". On en décrit deux groupes : les myopathies et les myosites.

##### a) Les myopathies

On désigne ces affections dégénératives sous le nom de dystrophies musculaires progressives et on a étendu le terme de myopathies à des maladies d'expression voisine comme les myotonies et les paralysies périodiques familiales.

#### - Les dystrophies musculaires progressives (DMP)

Ce groupe de maladies comprend un certain nombre d'affections caractérisées par une dégénérescence lente, progressive et inéluctable des fibres musculaires. L'examen clinique met en évidence des modifications de volume des muscles, spécialement ceux qui accusent un déficit : il s'agit habituellement d'atrophie mais parfois d'une pseudohypertrophie due à l'infiltration de la masse musculaire par du tissu fibreux ou de la graisse.

Le groupe des DMP comprend la "myopathie de DUCHENNE" qui est une maladie héréditaire transmise sur le mode récessif

lié au sexe et la "myopathie facio-scapulo-humérale" (la maladie de LANDOUZY-DEJERINE) qui est également une maladie héréditaire mais qui se transmet selon le mode autosomal. Les autres dystrophies musculaires sont moins bien définies et ce sont aussi des maladies familiales dont le mode de transmission est difficile à préciser (la dystrophie musculaire des ceintures, la myopathie oculaire et les myopathies distales).

- les myotonies

On désigne sous le nom de myotonies, des maladies héréditaires qui ont pour trait commun de se traduire par un trouble fonctionnel très particulier de la fibre musculaire qu'on remarque généralement au niveau des muscles de la main.

Dans la "myotonie dystrophique de STEINERT", outre les symptômes de la myotonie, elle se traduit par une diminution de la force musculaire avec amyotrophie au niveau des membres inférieurs et supérieurs, qui atteint aussi les muscles de la face, des paupières, ainsi que les muscles péribuccaux.

Dans la myotonie congénitale (maladie de THOMSEN), il n'y a pas de caractère évolutif progressif et elle ne comporte pas d'amyotrophie. C'est une maladie familiale rare qui est diffuse et intéresse généralement l'ensemble de la musculature.

- les paralysies périodiques familiales

On désigne ainsi plusieurs types d'actions familiales héréditaires transmises sur le mode dominant autosomique et qui se caractérisent cliniquement par des accès intermittents de paralysies musculaires étendues et biologiquement par des variations du taux de potassium dans le sang.

*β) les myosites*

Les myosites sont par définition des maladies inflammatoires du muscle. Elles forment un groupe très hétérogène d'affections difficiles à classer en raison de leur évolution, de leur manifestation et surtout de leur origine. Les unes peuvent en effet être rapportées à un agent pathogène connu et les autres ont une étiologie encore indéterminée. Elles forment le groupe des polymyosites et dermatomyosites.

*γ) Les tumeurs musculaires*

Comme autre pathologie du muscle strié, nous connaissons les tumeurs que l'on classe en rhabdomyomes (tumeurs bénignes) et en rhabdomyosarcomes (tumeurs malignes). Ces rhabdomyosarcomes se répartissent en différents types :

- Les rhabdomyosarcomes embryonnaires rencontrés le plus souvent chez les enfants et qui sont de loin le type le moins différencié.

- Le rhabdomyosarcome alvéolaire qui siège le plus souvent sur les membres et qui tient son originalité au fait que les cellules apparaissent groupées en alvéoles.

- Le rhabdomyosarcome polymorphe qui diffère des autres types par sa majorité de cellules volumineuses à cytoplasme abondant et à noyaux multiples. Les cellules sont habituellement arrangées de façon irrégulière et présentent souvent une striation transversale évidente.

2°) LE MUSCLE LISSE

L'absence de striation transversale régulière a permis de qualifier les muscles qui sont sous le contrôle du système neurovégétatif, de muscles lisses. Les cellules musculaires lisses sont presque toujours groupées en faisceaux et sont orientées parallèlement entre elles.

Elles sont imbriquées de telle sorte que la partie moyenne d'une cellule soit en rapport avec les extrémités des cellules voisines. Les cellules sont associées les unes aux autres par du tissu conjonctif contenant de la réticuline et du collagène.

La cellule musculaire lisse a des dimensions et une forme qui varient en fonction de sa localisation (tube digestif, artères, utérus). Elle est limitée par le sarcolemme et contient (i) un noyau unique et central (ii) les "myofibrilles" qui sont des filaments homogènes de 300 nm de diamètre (iii) le sarcoplasme, rare entre les myofibrilles et abondant autour du noyau, contient des dictyosomes, du glycogène, des mitochondries, etc...

Selon leur forme et leur origine, on peut classer les cellules musculaires lisses en cellules anastomosiques, en cellules rameuses et en cellules fusiformes. En particulier les cellules fusiformes à l'état relaxé sont très allongées avec leurs extrémités très effilées. Leur longueur varie énormément selon leur localisation (de 15  $\mu$  m dans les capillaires sanguins et 500  $\mu$  m dans la paroi utérine). A l'état contracté, ces cellules fusiformes deviennent ovoïdes et ont des contours plus ou moins découpés (figure I-2).

L'étude en microscopie électronique a permis de montrer qu'il n'était pas possible d'individualiser des groupes de myofilaments, ceux-ci étant dispersés dans toute la cellule en respectant toutefois le sarcoplasme axial et une zone sarcoplasmique périphérique. Les myofilaments dans la cellule lisse sont constitués de filaments épais (13,5 à 17,5 nm de diamètre), de filaments intermédiaires (de 10 nm de diamètre environ) et de filaments fins (de 3 à 8 nm de diamètre) qui se rejoignent dans les *corps denses*. La membrane plasmique de la cellule lisse offre un certain nombre de particularités structurales comme des invaginations (occupées fréquemment par du collagène) et des vésicules superficielles qui jouent un rôle dans le transport et le stockage des ions. Il existe entre chaque cellule des zones de jonction comme des desmosomes.

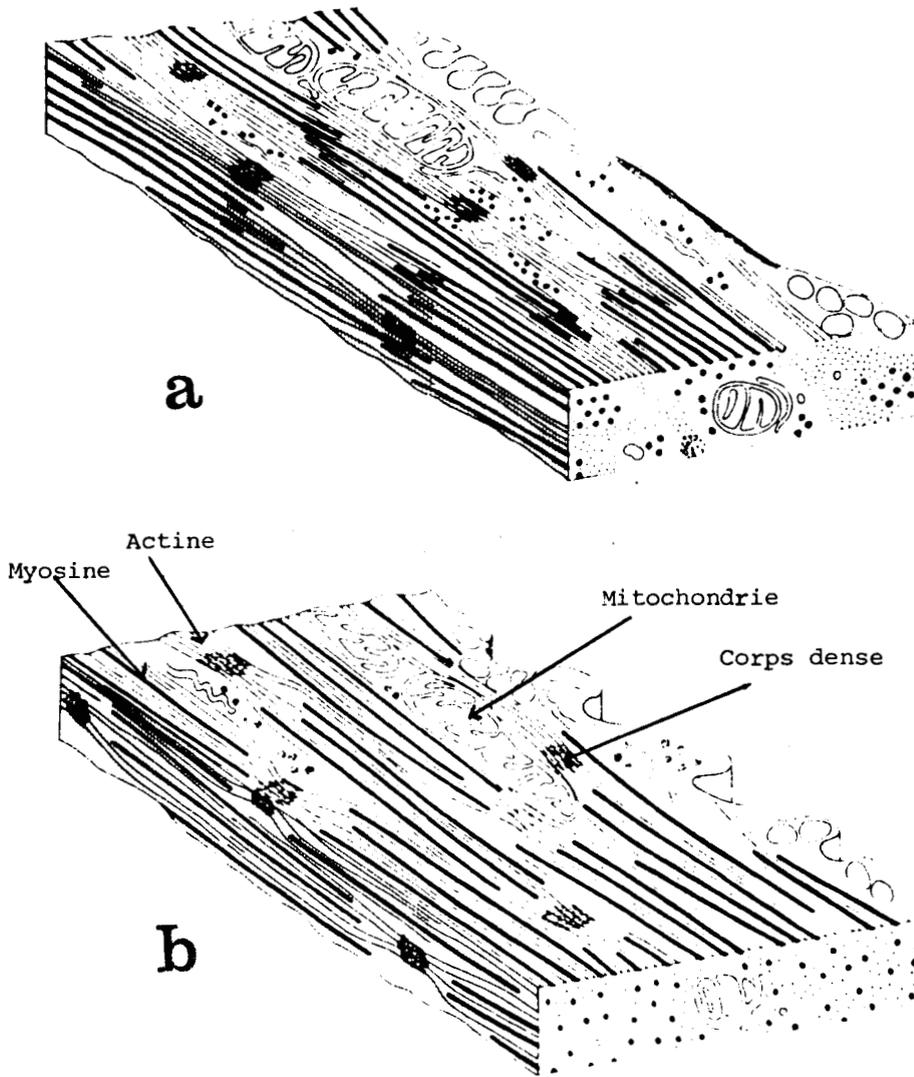


FIGURE I-2 : Schéma d'une coupe de muscle lisse  
d'après HEUMAN 1971

(a) Muscle au repos

les filaments épais ne sont pas observés en microscopie  
électronique

(b) Muscle contracté

Le réticulum sarcoplasme bien que différent de celui de la fibre musculaire striée offre un certain nombre de points communs tels (i) le réseau tridimensionnel de tubules dont le rôle serait d'accumuler le calcium (ii) les mitochondries disposées à la périphérie et dans le cytoplasme axial qui, dans la cellule lisse, assurerait la régulation de la concentration intercellulaire du calcium.

Le muscle lisse peut aussi présenter des tumeurs bénignes (léiomyomes) ou malignes (léiomyosarcomes). Ces tumeurs apparaissent en particulier dans l'estomac, dans le larynx et dans l'utérus. Dans les tumeurs de muscle lisse on distingue deux types de cellules, des cellules irrégulières et des cellules fusiformes (APPELMAN et HELWIG 1976).

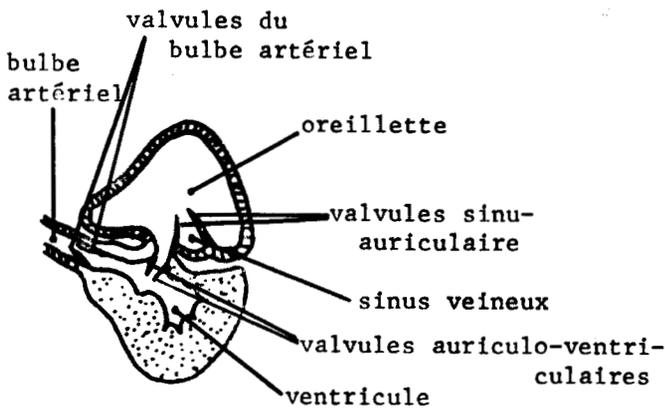
### 3°) LE MYOCARDE

#### a) *le coeur au cours de l'évolution des espèces*

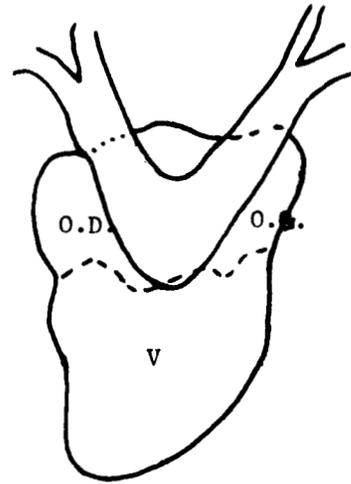
Au cours de l'évolution des espèces, le coeur s'est considérablement transformé. Ainsi chez les tous premiers Vertébrés, la Lamproie (classe des Agnathes) a un coeur situé ventralement et enfermé dans un péricarde cartilagineux. Le coeur est formé par repliement en S d'un vaisseau embryonnaire et il est cloisonné en trois chambres successives (figure I-3), en arrière le sinus veineux (à parois minces) collecte le sang des veines qui passe ensuite dans l'oreillette unique (dorsale et à parois peu épaisses) puis dans le ventricule ventral (à parois musculueuses munies de valvules à l'entrée et à la sortie) qui chasse le sang vers l'avant dans l'aorte ventrale légèrement dilatée à sa base en un bulbe artériel.

Le coeur de Grenouille (classe des Amphibiens) présente par contre deux oreillettes précédées d'un sinus veineux et un seul ventricule (figure I-3). La cavité du ventricule est rétrécie par de nombreuses saillies de la paroi empêchant le mélange complet du sang veineux et du sang artériel provenant des oreillettes. De plus le cône artériel montre une rangée de valvules à sa base et à son extrémité, ainsi qu'un repli spiral longitudinal (le septum spiral).

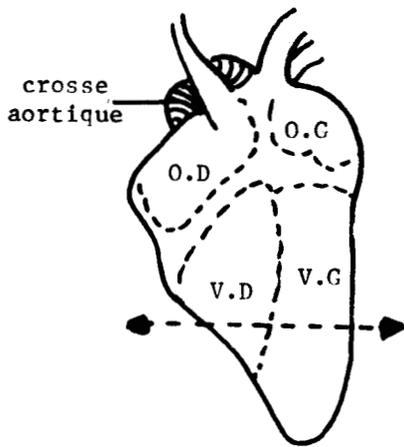
En conséquence, on admet généralement que la grande



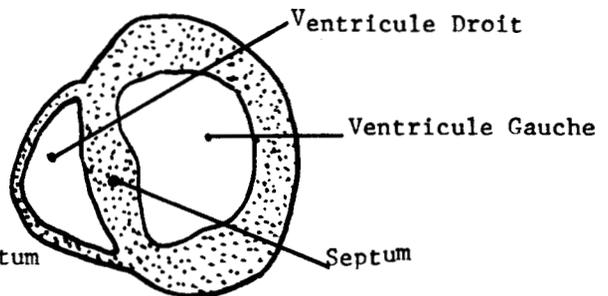
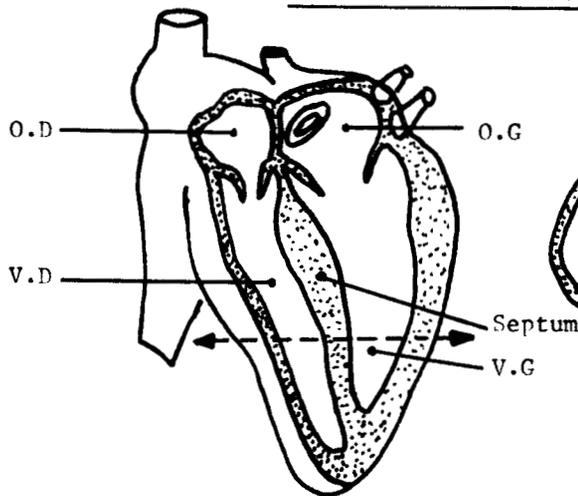
COUPE TRANSVERSALE DE  
COEUR DE LAMPROIE



SCHEMA DU COEUR DE GRENOUILLE



SCHEMA DU COEUR DE POULET ET SA COUPE TRANSVERSALE



SCHEMA DU COEUR DE PORC ET SA COUPE TRANSVERSALE

Figure I-3 : SCHEMAS DE COEUR DE DIFFERENTS VERTEBRES

( D' APRES BOUE, & CHANTOU 1978 )



circulation reçoit du sang artériel à peu près pur et les poumons du sang veineux.

Le coeur de Poulet (classe des Oiseaux) est plus puissant que celui des Reptiles de même taille et même d'un Mammifère. Il est complètement divisé en une partie gauche, artérielle et une partie droite veineuse et moins musclée. Une section transversale (figure I-3) montre un ventricule gauche à paroi musculeuse très épaisse avec une lumière en étoile et un ventricule droit à paroi bien plus mince avec une lumière en croissant. La pointe du coeur est entièrement formée par le ventricule gauche.

Le coeur de Porc (classe des Mammifères Ongulés) a une disposition générale analogue à celle du coeur d'Oiseau. Le coeur est subdivisé en deux parties, gauche et droite, complètement indépendantes, le coeur "gauche" ne recevant que du sang hématosé et le coeur "droit" que du sang carbonaté. La section transversale montre également un ventricule gauche à paroi plus épaisse et de plus, le ventricule droit à paroi plus mince semble être surajouté à la partie médiane (le septum) et au ventricule gauche (figure I-3).

*b) le myocarde normal*

Le myocarde est un muscle rouge dont les cellules en microscopie optique apparaissent striées transversalement car elles renferment des myofibrilles à zones claires et sombres. Les cellules myocardiques (figure I-4) sont généralement de plus faible diamètre que les cellules de muscle strié (10  $\mu$  environ) : elles sont allongées (50 à 200  $\mu$ ) et présentent des bifurcations à l'extrémité digitée desquelles un accollement a lieu avec les cellules voisines, formant des disques intercalaires. En certains points de ces disques l'accolement membranaire entre deux cellules devient extrêmement étroit (jonctions serrées) et l'on suppose que c'est à ce niveau que s'effectue le plus facilement la conduction intercellulaire.

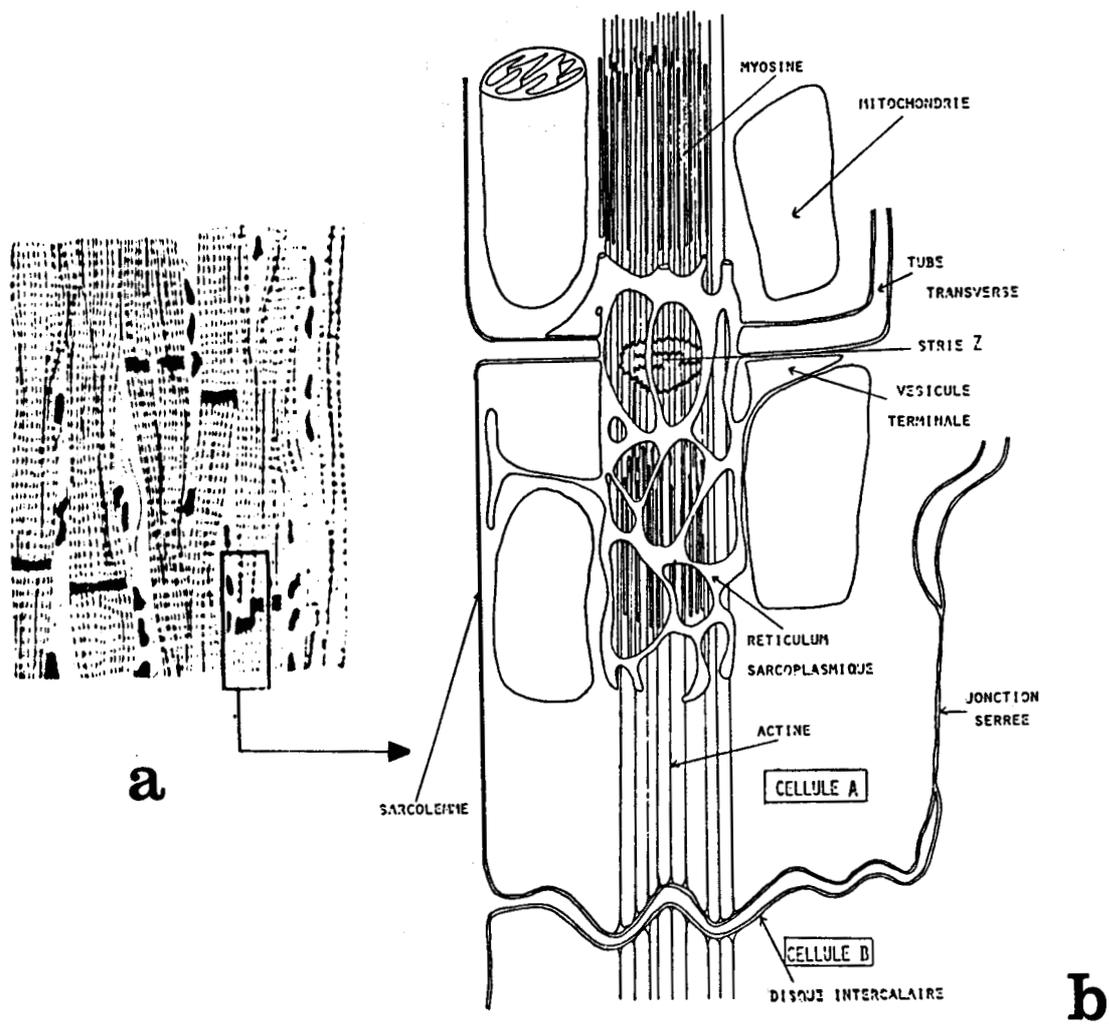


FIGURE I-4 : Aspect général du tissu myocardique (a)  
Diagramme de cellule cardiaque montrant  
les principaux éléments structuraux (b)  
D'après GILLOT 1980

BUS  
LILLE

La cellule myocardique entourée d'une membrane (sarcolemme) possède un cytoplasme (sarcoplasme) et contient en outre les myofibrilles, un seul noyau et divers types d'organites (mitochondries, etc...). Les myofibrilles sont entourées d'un réseau de fins canalicules qui constitue une sorte de gaine ajourée : le réticulum sarcoplasmique longitudinal (figure I-4). Ce réticulum ainsi que les mitochondries constituent des réservoirs intracellulaires de calcium.

Le sarcolemme s'invagine à intervalles réguliers au niveau de la région centrale des disques clairs. (niveau des stries Z) formant des tubes transverses qui pénètrent dans la profondeur cellulaire et y entrent en contact avec des vésicules dites terminales émanant du réticulum longitudinal, d'autres vésicules s'accolent au sarcolemme périphérique.

Nous notons également qu'à côté des cellules myocardiques, les cellules du tissu nodal sont plus petites plus irrégulières et moins riches en myofibrilles, la conduction y est lente. Les cellules du tissu conducteur sont aussi moins riches en myofibrilles que les cellules myocardiques mais sont beaucoup plus grosses (40  $\mu$ ) et groupées en faisceaux dans lesquels la conduction est beaucoup plus rapide que dans le reste du coeur.

#### *c) les myopathies cardiaques*

La pathologie du myocarde soulève de délicats problèmes, qui tiennent moins à l'expression de sa défaillance qu'à la difficulté de reconnaître la nature exacte de l'affection cardiaque responsable. Une telle identification apparaît cependant essentielle si l'on cherche à classer de façon plus précise les maladies du myocarde que l'on définira comme des atteintes du muscle que traduisent insuffisance cardiaque et hypertrophie, en l'absence de toute atteinte cardiaque ou artérielle antérieurement connue. Cette conception apparemment restrictive permet d'envisager deux groupes d'atteinte myocardique : les affections myocardiques proprement dites et les cardiopathies déterminant une atteinte secondaire.

a) *les affections myocardiques proprement dites*

Sous ce terme on regroupe les *myocardites* et les *myocardiopathies non obstructives dites secondaires*. Dans cette catégorie de myocardiopathies, il existe trois grandes étiologies ; les maladies du système et du tissu conducteur, les maladies neuromusculaires et les maladies de surcharge. Par exemple, dans la *myocardiopathie amyloïde* qui est une maladie de surcharge, il y a une augmentation de la pression capillaire pulmonaire, de la pression de remplissage du ventricule droit et une augmentation du volume cardiaque qui conduit à l'insuffisance cardiaque rapidement inéluctable et irrémédiable.

β) *les myocardiopathies déterminant une atteinte secondaire*

- Il existe les *myocardiopathies non obstructives primitives* (MCNO), c'est la découverte lors d'un examen radiologique d'un coeur en "ballon de jeu à XIII". L'essoufflement, les douleurs thoraciques amènent à constater chez le malade une tachycardie et un souffle d'insuffisance mitrale. On distingue cependant trois types anatomiques de MCNO primitives.

- Il existe les *myocardiopathies dites obstructives* (MCO) qui sont des sténoses des ventricules. Les troubles fonctionnels sont d'autant plus sévères qu'ils apparaissent directement liés à la sténose du ventricule gauche (essoufflement et tachycardie d'effort, angine de poitrine, syncopes).

- Il existe enfin les *cardiopathies ischémiques par athérosclérose coronaire*. L'athérosclérose, maladie de la paroi artérielle, porte dans 89 % des cas la responsabilité des cardiopathies ischémiques. En réduisant l'apport sanguin, elle détermine une oxygénation insuffisante ou quasi nulle du myocarde. L'évolution des lésions d'athérosclérose coronaire peut aboutir à l'occlusion par le développement des plaques d'athérome ou par thrombose.

- D'autre part, au niveau du muscle cardiaque on reconnaît l'existence de lésions, d'apparence tumorale, faites de volumineuses cellules dites "cellules araignées" en continuité avec des fibres normales. De plus les léiomyosarcomes observés par BEARMAN (1974) dans le coeur humain représentent des tumeurs malignes de muscle lisse.

## II - LES SYSTEMES NON MUSCULAIRES

Parmi les systèmes contractiles, il existe des systèmes qui n'ont pas d'organisation précise dans les muscles. Cependant des systèmes contractiles se retrouvent aussi bien dans le règne animal (les amibes, les leucocytes, le cerveau, les plaquettes sanguines, etc...) que dans le règne végétal (algues vertes, les myxomycètes) (WOHLFARTH-BOTTERMAN, 1964).

Parmi les cellules animales, les unes sont sans déplacement visible comme les cellules endothéliales (BECKER et NACHMAN 1973), les cellules myoépithéliales (TANNENBAUM et al 1969), les cellules de cerveau (WACHSBERGER et PEPE 1974) et les fibroblastes (ADELSTEIN et al 1972). D'autres cellules sont en mouvement et induisent des déplacements qui peuvent être lents mais qui sont nets. Parmi les cellules libres on peut citer les amibes (WOHLFARTH-BOTTERMAN 1964, KOMNICK et al 1973), les plaquettes dans les globules rouges (ADELSTEIN et al 1973), les leucocytes (STOSSEL et POLLARD 1973) et les macrophages (HARTWIG et STOSSEL 1975).

## C - LES DIFFERENTS PROTEINES CONTRACTILES ET LEUR POLYMORPHISME

La microscopie électronique a permis de distinguer que la myofibrille est constituée de faisceaux de deux types de myofilaments, les filaments épais et les filaments fins.

Des expériences d'extraction différentielle fractionnée et d'immunofluorescence ont permis de localiser la myosine comme étant la protéine principale des filaments épais et l'actine celle des filaments fins.

## I - LES FILAMENTS EPAIS

Les filaments épais de la fibre musculaire striée ont un diamètre de 13 nm et une longueur de 1.500 nm environ. Dans le cas du muscle lisse, les filaments épais ont une longueur variable, un diamètre de 10 à 35 nm et n'apparaissent généralement en microscopie électronique que lorsque le muscle est contracté.

Les filaments épais sont des filaments cylindriques aux extrémités coniques. Ils ont dans la partie médiane (ligne M) un épaississement de 60 à 70 nm qui paraît plus dense en microscopie électronique. De part et d'autre de la ligne M, les filaments épais sont décorés de projections latérales ou ponts (longs de 7 à 10 nm) régulièrement arrangés. Ils correspondent aux têtes globulaires des molécules de myosine. Dans un même plan transversal on trouve quatre molécules de myosine (PEPE et DRUCKER 1979) et chaque plan est séparé du suivant par 14,3 nm (HUXLEY et BROWN 1967). Ces ponts sont disposés selon une hélice dont le pas est de 42,9 nm (figure I-5).

Une coupe transversale de la partie médiane du filament épais révèle qu'en plus des molécules de myosine, des filaments de 5 à 6 nm (les filaments M) sont parallèles aux filaments épais de myosine auxquels ils sont reliés par des ponts de 4 nm de diamètre (ponts M). Il existe 3 à 5 ponts M le long de la ligne M qui sont distants les uns des autres de 20 nm. La principale fonction de toutes les protéines M est d'assurer la cohésion entre toutes les protéines du filament épais au niveau de la ligne M. La protéine C assure également un rôle de cohésion du filament épais.

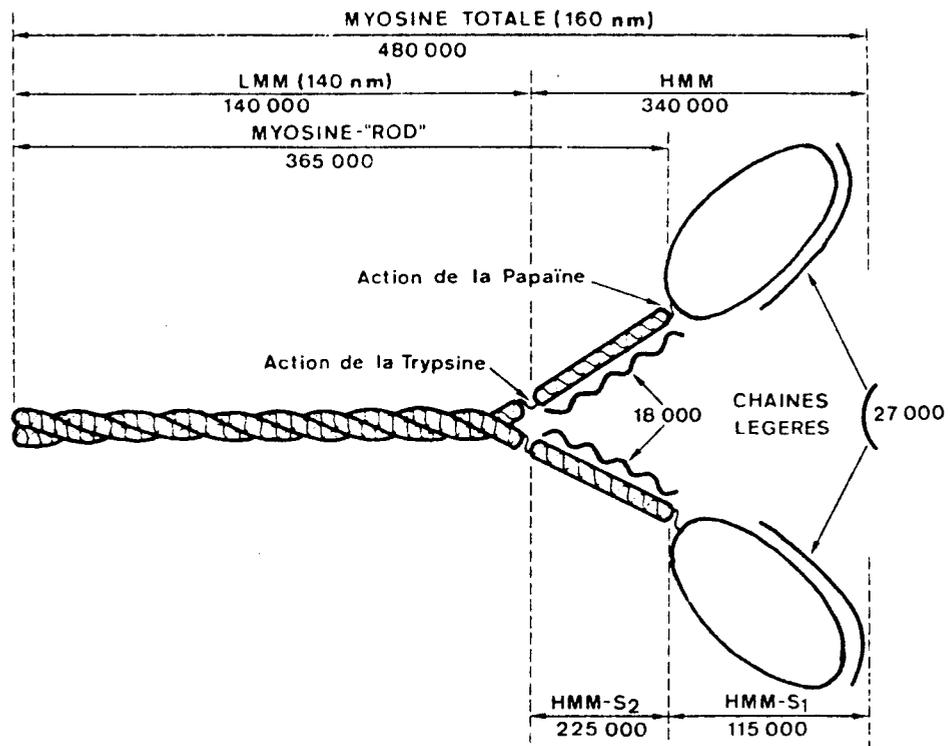
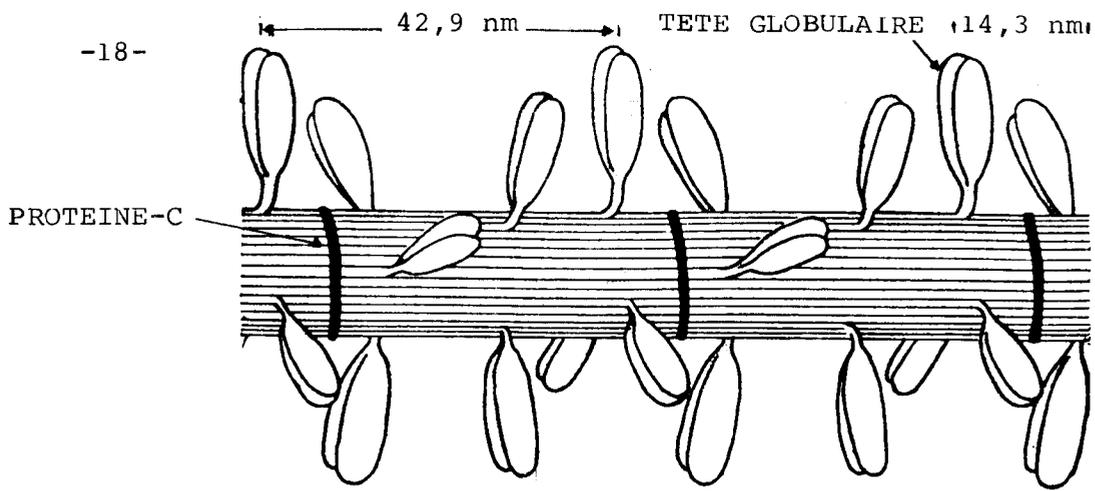


FIGURE I-5 :

- (a) Schéma du filament épais de Myosine
- (b) Schéma de la molécule de Myosine cardiaque et les différents sous-fragments obtenus après hydrolyse enzymatique limitée

## 1°) LA MOLECULE DE MYOSINE

Bien que classée parmi les protéines de structure, la myosine possède une activité enzymatique ATPasique. La myosine se retrouve aussi bien dans les cellules musculaires (où elle représente 10 % du poids du muscle et 55 à 60 % des protéines myofibrillaires) que dans les cellules non musculaires où elle ne représente que 0,5 % des protéines totales.

### *a) représentation générale de la molécule*

L'observation au microscope électronique de la molécule de myosine permet de la décrire comme une molécule asymétrique allongée comprenant une tête formée de deux parties globulaires de 9 nm, prolongée d'un bâtonnet dont les dimensions sont approximativement de 140 nm de long et de 2 nm de diamètre (figure I-5).

L'analyse biochimique montre qu'elle a un poids moléculaire élevé (d'environ 480.000 daltons) et qu'elle se compose généralement d'un dimère dont les chaînes polypeptidiques sont approximativement de 1.800 résidus d'acides aminés (les chaînes lourdes). A ces chaînes lourdes sont associées, de façon non covalente, des chaînes peptidiques de plus faible poids moléculaire, d'environ 20.000 daltons (les chaînes légères).

Chaque monomère de poids moléculaire de 200.000 daltons environ a du côté C-terminal (bâtonnet) une structure secondaire à 90 % d'hélice  $\alpha$  ; la partie N-terminale, sur laquelle sont associées les chaînes légères, a une configuration encore mal connue (figure I-5). Deux monomères sont associés par leur bâtonnet pour former une structure en double hélice.

Il est à noter que la myosine d'Amibe (*Acanthamoeba castellanii*) a la particularité de ne posséder qu'une seule chaîne lourde d'environ 125.000 daltons à laquelle sont associées de façon non covalente deux chaînes légères (POLLARD et KORN, 1973).

b) Particularités de la molécule de myosine

a) sensibilité à l'hydrolyse enzymatique

L'hydrolyse limitée par la trypsine permet de séparer spécifiquement la myosine en deux fragments (BARANY et al, 1964 ; TADA et al, 1969) les "méromyosines". Le premier fragment de plus faible poids moléculaire (P.M. = 140.00 daltons) appelé la *méromyosine légère* (LMM) a une longueur de 90 nm, elle est très hélicoïdale et précipite dans l'eau. Le second fragment de haut poids moléculaire (P.M. = 340.000 daltons) appelé *méromyosine lourde* (HMM) a la propriété d'être soluble dans l'eau (figure I-5). La comparaison des hydrolysats tryptiques limités des myosines cardiaques et celles de muscles squelettiques, met en évidence une vitesse d'hydrolyse plus grande pour la myosine de muscle squelettique (BARANY et al 1964 ; TADA et al 1969).

L'hydrolyse limitée de la myosine par la papaïne permet l'obtention de trois fragments : "*la myosine-Rod*" (P.M. = 365.000 daltons) et deux autres fragments probablement identiques (P.M. = 110.000 daltons) correspondant à la partie globulaire de la myosine appelée HMM-S<sub>1</sub>. L'action prolongée de la papaïne permet d'obtenir des sous-fragments de la HMM : les fragments HMM-S<sub>1</sub> de 110.000 daltons et les fragments HMM-S<sub>2</sub> de 60.000 daltons (figure I-5). Le HMM-S<sub>2</sub> est considéré comme une pièce d'articulation pour les ponts myosine-actine (LOWEY et al, 1969).

Si la vitesse d'hydrolyse par la trypsine est plus lente sur la myosine cardiaque, celle de la papaïne est identique pour la myosine cardiaque et celle du muscle squelettique.

β) Polymorphisme des sous-unités des myosines

La myosine peut être dissociée en sous-unités lourdes et légères sans qu'il y ait hydrolyse enzymatique (FREDERIKSEN et HOLZER, 1968 ; WEEDS et LOWEY, 1971).

En effet, l'utilisation d'agents dissociants (urée 8M ; chlorhydrate de guanidine 6M etc...) permet la séparation chaînes lourdes-chaînes légères indiquant que l'interaction entre ces sous-unités se fait par liaison non covalente. Différentes chaînes légères ont pu être indentifiées et isolées par chromatographie sur DEAE-cellulose (WEEDS et LOWEY, 1971 ; HORVATH et GAETJENS 1972), par précipitation à l'alcool (STONE 1970), par électrophorèse préparative (LEGER et FOCANT 1973 ; KERCKAERT 1978) ou par précipitation isoélectrique (HIRATSUKA 1980).

*γ) les sous-unités légères*

En 1967, il a été mis en évidence que le muscle squelettique de Lapin était hétérogène et possédait deux types de muscle : du muscle blanc (rapide) et du muscle rouge (lent). Les myosines extraites de ces deux types de muscles diffèrent par leur chaînes légères (LOCKER et HAGYARD, 1967). Depuis, grâce à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, la composition en chaînes légères des myosines extraites de différents types de muscles (tableau I-1) a pu être déterminée quantitativement et qualitativement (SARKAR et al 1971).

La dénomination, le poids moléculaire des chaînes légères varient selon les auteurs. Ils dépendent du mode d'isolement utilisé, de l'existence ou non de forme phosphorylée et du gel de polyacrylamide choisi. Par exemple pour la myosine de muscle blanc de Lapin (myosine de référence) les chaînes légères d'environ 25.000 et 16.000 daltons, dissociées sélectivement par utilisation de conditions dénaturantes à pH alcalin, sont appelées les chaînes légères "alcalines". La chaîne légère de 18.000 daltons environ, sélectivement dissociée par action de l'acide 5-5'dithiobis 2-nitrobenzoïque (DTNB), a été appelée la chaîne légère "DTNB" ou chaîne légère-Nbs (WEEDS et LOWEY 1971) et comme elle possède une forme phosphorylée, elle est appelée aussi P-chaîne légère (FREASON ET PERRY 1975). D'autres auteurs nomment ces chaînes légères selon leur mobilité électrophorétique croissante  $LC_1$ ,  $LC_2$ ,  $LC_{2-p}$  et  $LC_3$  ou encore pour montrer leur appartenance à une myosine de muscle rapide  $LC_1^f$ ,  $LC_2^f$ ,  $LC_{2-p}^f$  et  $LC_3^f$ .

---

POIDS MOLECULAIRE DES CHAINES LEGERE

---

MUSCLE BLANC RAPIDE DE LAPIN (SARKAR <i>et al</i> 1971)	25.500	17.400	15.100
MUSCLE ROUGE LENT DE LAPIN (SARKAR <i>et al</i> 1971)	27.500	26.600	18.000
MUSCLE CARDIAQUE DE LAPIN (SARKAR <i>et al</i> 1971)	26.800	17.800	
MUSCLE LISSE D'UTERUS DE VACHE (TETAERT <i>et al</i> 1977)	20.000	17.000	

---

TABLEAU I-1 : Poids moléculaire des chaînes légères  
de myosine des principaux types de muscles



A toutes ces nomenclatures, nous avons préféré celle qui relie la chaîne légère à son poids moléculaire approximatif déterminé après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS à pH 8,4, car pour certaines myosines il n'existe pas de méthode sélective pour isoler chacune des chaînes légères ou encore il n'existe que deux chaînes légères ou bien il est difficile de préciser s'il s'agit de muscle rapide ou lent etc...

Pour chaque type de muscle, la myosine possède une composition en chaînes légères caractéristique comme le montre le tableau I-1 et, par exemple, la myosine de muscle cardiaque des Vertébrés possèdent deux types de chaînes légères de 27.000 et 18.000 daltons environ ( $L_{27}$  et  $L_{28}$ ). Une forme phosphorylée de  $L_{18}$  a pu être mise en évidence par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'urée 8M ( $L_{18-p}$ ).

Les différences dans les sous-unités légères des myosines sont également mises en évidence lors de la comparaison des myosines d'un même muscle pour des espèces différentes (WEEDS, 1975 ; MAITA et al 1980). A partir des différences observées dans la composition en chaînes légères des myosines est née la notion d'*isoenzymes de la myosine*. Cette notion d'isoenzymes devenait évidente pour la myosine de muscle rapide de Lapin possédant trois chaînes légères avec des rapports non stœchiométriques ( $L_{25} = 1,35$  ;  $L_{16} = 0,65$  et  $L_{18} = 2,0$ ). De plus, ceci suggérerait l'existence d'homodimères ( $L_{25}$  sur chacune des têtes globulaires) et d'hétérodimères ( $L_{25}$  sur l'une des têtes globulaires et  $L_{16}$  sur l'autre) (LOWEY et RISBY 1971 ; SARKAR 1972 ; WEEDS et TAYLOR 1975). Ces suggestions ont été confirmées

- par l'étude des activités ATPasiques d'activation par l'actine des sous-fragments HMM- $S_1$  qui possèdent soit  $L_{25}$  ou  $L_{16}$  (WAGNER et WEEDS, 1977) ;
- par la séparation des HMM- $S_1$  ( $L_{25}$ ) et HMM- $S_1$  ( $L_{16}$ ) par chromatographie d'affinité (TRAYER et al 1977) ;
- par l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de pyrophosphate de sodium 20 mM de la myosine "native" de muscle rapide de Poulet, qui

permet sa séparation en trois composants ; l'homodimère auquel est associé  $L_{25}$  ; l'homodimère auquel est associé  $L_{16}$  et l'hétérodimère avec  $L_{25}$  et  $L_{16}$  (HOH, 1978 ; D'ALBIS et al, 1979) ;

- par l'isolement après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu non dissociant et étude des myosines homodimères (LOWEY et al, 1979).

Tous ces résultats suggèrent, en particulier les différences de mobilité électrophorétique en milieu non dissociant, que la notion d'isoenzymes de la myosine attribuée aux chaînes légères devait l'être aussi aux chaînes lourdes (par exemple, la myosine lisse possédant deux chaînes légères ne présente qu'un seul composant après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu non dissociant).

δ) les sous unités lourdes

L'hétérogénéité des chaînes lourdes de myosine a été mise en évidence pour la première fois lors de l'étude de l'hydrolyse limitée par la trypsine de la myosine de muscle squelettique et de la myosine de muscle cardiaque. En effet, la vitesse d'hydrolyse par la trypsine de la myosine cardiaque de Lapin était lente et le rendement pour l'obtention de  $HMM-S_1$  et de  $HMM-S_2$  était plus faible que pour la myosine de muscle squelettique de Lapin (BARANY et al, 1969). Depuis, afin de caractériser les multiples formes de myosine dont les différences se situent au niveau des chaînes lourdes, quatre méthodes d'étude comparative ont été utilisées :

- l'étude de séquence de peptides et l'étude des cartes peptidiques obtenues après action d'agents chimiques ou après hydrolyse enzymatique sur les myosines, après électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide ;
- l'étude en microscopie électronique ;
- les études immunochimiques ;

- l'étude de gels d'acrylamide des myosines "natives" effectués en milieu non dissociant.

Par ces méthodes, des différences au niveau des chaînes lourdes de myosine extraites de différents muscles d'une même espèce (HUSZAR et ELZINGA, 1971 ; MASAKI, 1974 ; FLINK et MORKIN, 1977 ; D'ALBIS et al, 1979) , des différences au niveau des chaînes lourdes d'un même muscle pour des espèces différentes (HUSZAR et ELZINGA, 1972 ; LEGER et al, 1979) ou encore l'existence de plusieurs composants pour un seul muscle (HOH et al, 1976) ont été mises en évidence.

Cette notion d'isoenzymes de myosine dont les différences se situent au niveau des chaînes lourdes et des chaînes légères n'est pas une caractéristique des systèmes musculaires. En effet, les études sur l'Amibe *Acanthamoeba castellanii* (MARUTA et KORN, 1977 ; POLLARD et al, 1978) ont permis de mettre en évidence trois types de myosine :

- la myosine de type II possédant deux chaînes lourdes (PM = 170.000) et deux paires de chaînes légères (PM = 17.500 et 17.000)
- la myosine de type IA possédant une seule chaîne lourde (PM = 130.000) et deux chaînes légères (PM = 17.000 et 14.000)
- la myosine de type IB possédant une seule chaîne lourde (PM = 125.000) et deux chaînes légères (PM = 27.000 et 14.000).

Les trois myosines ont des chaînes lourdes différentes, des propriétés enzymatiques différentes et sont distinctes immunochimiquement.

ε) formation des filaments synthétiques

Une autre caractéristique de la myosine, montrée pour la première fois dans le cas de la myosine de muscle squelettique de Lapin, est de s'assembler spontanément *in vitro* en filaments synthétiques qui ressemblent fortement aux myofilaments épais natifs (HUXLEY 1963).

Les images de microscopie électronique en contraste négatif permettent d'obtenir de nombreux détails structuraux. C'est ainsi que dans des conditions proches de l'état physiologique les filaments synthétiques pouvaient être sous forme de *filaments bipolaires* qui pourraient rendre compte des mécanismes de glissement des filaments lors de la contraction musculaire (HUXLEY et HANSON 1954, MOREL et al 1975). Pour ces filaments, les têtes globulaires de la myosine sont sur la périphérie et sont symétriques par rapport au centre de symétrie du filament. Ces têtes globulaires correspondent aux ponts qui se forment entre le filament fin et le filament épais. Les filaments sont formés par assemblage tête-bêche anti-parallèle dans le milieu du filament et aux extrémités par un assemblage parallèle.

Les filaments synthétiques formés *in vitro* sont moins longs que les filaments épais *in vivo* et de plus leurs projections sont plus longues et plus irrégulières. Suivant la myosine étudiée les filaments synthétiques ont des formes et des dimensions différentes (longs pour la myosine de muscle squelettique, plus courts pour ceux de la myosine cardiaque, très courts pour la myosine de cellule non musculaire).

Dans des conditions particulières de tampon et suivant la vitesse de polymérisation il est possible d'obtenir des filaments synthétiques ayant les mêmes longueurs qu'à l'état physiologique (HUXLEY 1963 ; KAMINER et BELL 1966). L'accroissement de longueur s'accompagne d'une régularité plus importante des filaments et des projections.

Il y aurait pour les très longs filaments une périodicité de projections de 14,3 nm (MOOS et al 1975, MOREL et al 1979). Cette valeur serait en très bon accord avec la périodicité mesurée par diffraction aux rayons X et attribuée aux ponts entre filaments fins et filaments épais (HUXLEY et BROWN 1967).

De nombreux facteurs, tels l'ATP, le chlorure de calcium, le chlorure de magnésium, le pyrophosphate de sodium... influencent la formation de longs filaments bipolaires ayant le diamètre rencontré à l'état physiologique (PINSET-HARSTRON et TRUFFY 1979). Dans ce cas, ces projections se dirigent vers l'extrémité, il existe une zone centrale nue et de part et d'autre de cette zone centrale il y a inversion de polarité. Il est intéressant de noter que la chaîne légère phosphorylée aurait un rôle dans la formation des filaments (PINSET-HARSTROM et WHALEN 1979).

#### *ζ) composition en acides aminés des myosines*

La comparaison des compositions en acides aminés des myosines de muscle squelettique de Lapin, du muscle cardiaque de Boeuf montre qu'elles sont similaires à l'exception de l'existence d'un résidu de 3-méthyl histidine pour la myosine de muscle squelettique (HUSZAR et ELZINGA 1972). Les myosines de muscle squelettique et cardiaque contiennent des résidus de mono-et tri-méthyl lysine qui interviennent peut être au niveau du site actif de fixation à l'actine (HARDY et al, 1970).

Cependant les compositions exprimées en nombre de résidus pour 1.000 ne permettent pas de tirer de conclusions quant à des différences éventuelles entre les différentes myosines, surtout que les compositions ont été réalisées sur l'ensemble des différents composants des myosines.

η) L'activité ATPasique de la myosine

Parmi les propriétés de la myosine, l'une des plus importantes est sa capacité à hydrolyser l'ATP en ADP et phosphore inorganique avec libération simultanée d'un proton et d'énergie chimique directement utilisable et transformée en énergie mécanique par le système contractile. Cette activité ATPasique (APT phosphohydrolase EC 3.6.1.3.) est fortement modifiée *in vitro* à des forces ioniques élevées par la présence de cations divalents, par l'excès de substrat et par des constituants du sarcomère, comme les protéines du filament fin et particulièrement l'actine.

Les sites de fixation des nucléotides triphosphates (NTP) sont localisés au niveau des têtes globulaires de la molécule. Il existe deux sites de fixation des NTP dont le premier est le site actif et le second le site de relaxation (YOUNT et al 1972). Bien que de nombreux travaux aient été entrepris sur les sites de fixation de la myosine (ATP et actine), les résultats sont encore fragmentaires.

En fonction de la séquence en acides aminés d'un peptide de 92 résidus (nommé  $P_{10}$ ), isolé des chaînes lourdes de la myosine de muscle blanc de Lapin, il a été montré qu'il existe un résidu de  $N^T$ -méthyl histidine proche de deux groupements -SH (ELZINGA et COLLINS 1977). L'alkylation sélective de ces groupements -SH conduit à des changements caractéristiques des propriétés enzymatiques de la myosine. L'étude de la séquence en acides aminés du peptide  $P_{10}$  suggère que deux régions de fixation du  $Mg^{2+}$ -ATP ne seraient pas contiguës dans la structure primaire mais devraient être proches dans la structure tertiaire (ELZINGA et COLLINS 1977).

Des études théoriques, à partir du peptide  $P_{10}$ , ont permis de montrer que le complexe cyclique de  $Mg^{2+}$ -ATP s'insère parfaitement dans une région de seize résidus (figure I-6), et sept de ces résidus interagissent fortement avec le substrat (RAMIREZ et al. 1979).

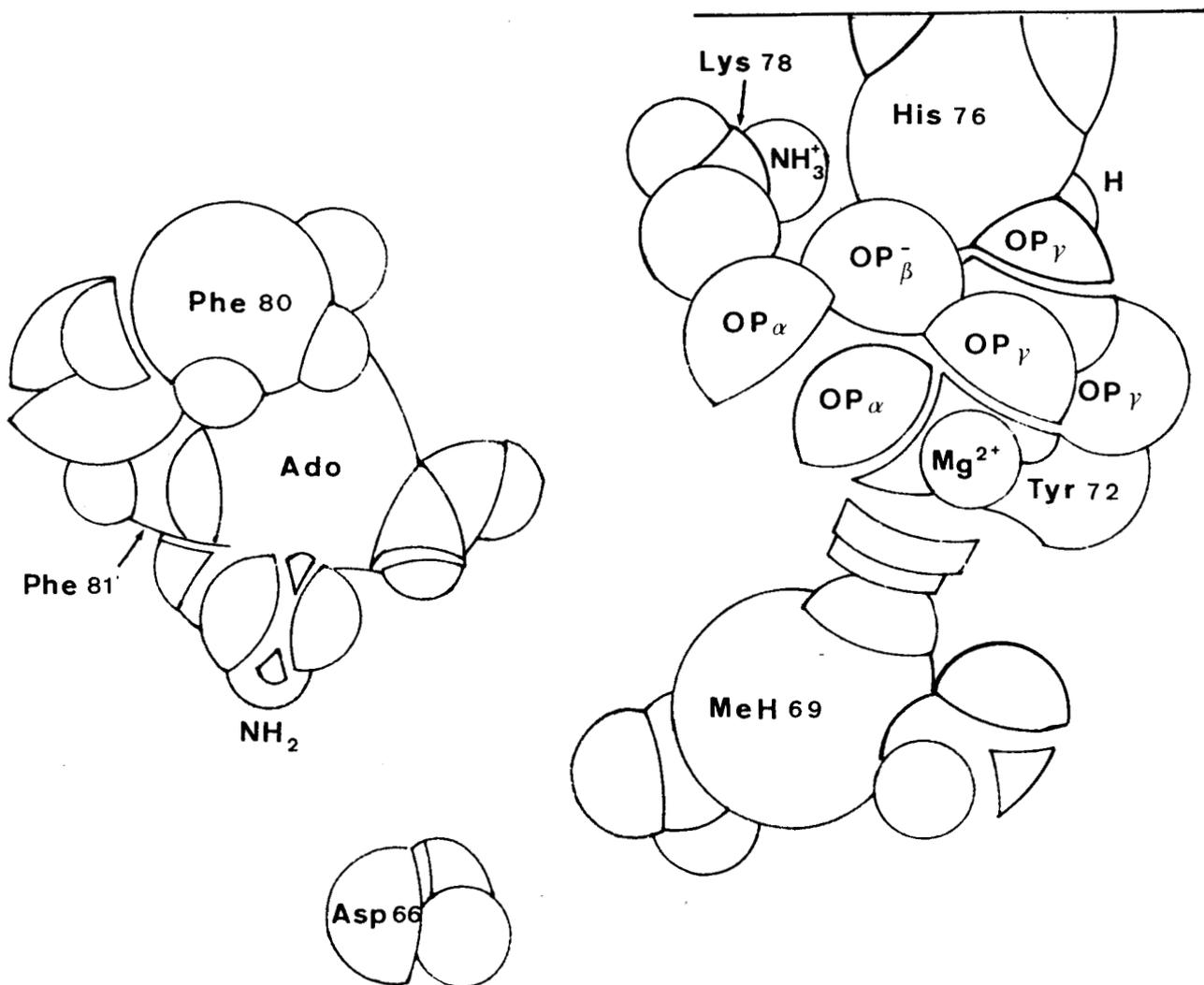


FIGURE I-6 : Schéma du site de liaison et du site catalytique de la myosine Mg-ATPase de muscle squelettique de Lapin: interaction des sept acides-aminés clefs du P<sub>10</sub> (ELZINGA et COLLINS 1977) et du Mg-ATP. Ado est l'adénosine MeH est la méthylhistidine D'après RAMIREZ et al 1979

La principale caractéristique de ce modèle repose sur le rôle important d'un résidu de N<sup>T</sup>-méthyl histidine présent en position 69 dans chaque chaîne lourde de myosine de muscle squelettique de Lapin. Dans le cas des myosines d'autres muscles ne contenant pas ce résidu méthylé, par exemple la myosine cardiaque, un résidu d'histidine en position 69 pourrait jouer le même rôle (RAMIREZ et al. 1979).

- L'activité ATPasique Ca<sup>2+</sup> dépendante est l'activité propre de la myosine. Le calcium a un effet activateur pour des concentrations comprises entre 1 et 10 nM. En deçà, le calcium est sans effet, au delà il est sans effet à faible force ionique et inhibe la myosine à force ionique élevée en solution KCl 0,6 M par exemple (GREEN et MOMMAERTS 1953).

- L'activité ATPasique Mg<sup>2+</sup> dépendante est faible quand la préparation est pure. A force ionique élevée, le Mg<sup>2+</sup> a un effet inhibiteur puissant, tandis que cet effet inhibiteur est moindre à faible force ionique. L'activité Mg<sup>2+</sup>-ATPase de la myosine est modifiée en présence de protéines du filament fin, l'actine principalement. Ainsi la présence d'actine et d'une faible quantité de calcium active l'activité ATPasique de la myosine. L'activité Mg<sup>2+</sup> est l'activité propre de l'actomyosine (SPUDICH ET WATT 1971).

- L'activité ATPasique dépendante des ions monovalents (Na<sup>+</sup> ; K<sup>+</sup> ; NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) sont des activités ATPasiques non spécifiques des protéines myofibrillaires. Ce sont les activités de différentes particules cellulaires (microsomes, mitochondries...). Sur les membranes on trouve en plus une activité ATPasique dépendante du magnésium (SWYNGHEDAUW et al 1973).

L'activité ATPasique varie d'un muscle à l'autre pour la même espèce et d'une espèce à l'autre pour un même muscle. Cette activité ATPasique de la myosine est généralement proportionnelle à la vitesse de raccourcissement du muscle (BARANY 1967) suggérant une signification physiologique des activités ATPasiques des différentes myosines.

Des questions restent néanmoins posées comme celle de savoir où est située l'activité ATPasique de la myosine et qu'elle est l'importance des sous-unités légères. Cependant il a pu être montré :

- qu'une relation étroite existe entre l'inactivation de l'activité ATPasique et la dissociation des chaînes lourdes-chaînes légères (DREIZEN et al 1970 ; DREIZEN et al 1972) ;
- que dans le cas de la myosine de muscle squelettique de Lapin, les sous-fragments qui sont caractérisés par la présence de l'une ou l'autre des chaînes légères L<sub>25</sub> ou L<sub>16</sub> ne diffèrent pas si l'on compare les activités ATPasiques Ca<sup>2+</sup> ou Mg<sup>2+</sup> dépendantes et ne diffèrent que si l'on compare les activités Mg<sup>2+</sup>-ATPases activités par l'actine (WAGNER et WEEDS 1977) ;
- que bien que les chaînes légères de la myosine auriculaire et de la myosine ventriculaire de coeur de Poulet aient respectivement le même poids moléculaire, il y ait de grandes différences dans les valeurs des mesures de l'activité ATPasique dépendante du calcium entre les deux myosines (DALLA-LIBERA et al 1979) ;
- que l'élimination de la forme phosphorylée de la chaîne légère de la myosine cardiaque ne provoque pas de modifications de l'activité ATPasique dépendante du calcium de la myosine cardiaque, mais une augmentation des activités Mg<sup>2+</sup>-ATPase et Mg<sup>2+</sup>-ATPase activée par l'actine. Ces valeurs redeviennent normales lorsque l'on réassocie la chaîne légère phosphorylée à la myosine, ce qui suggère que lors de l'élimination de la chaîne légère phosphorylée il y a un changement de conformation de la myosine cardiaque qui augmenterait l'interaction avec l'actine (MALHOTRA et al 1979).

## 2°) LA PROTEINE C

C'est une protéine dont la fonction structurale est peu précise. Elle représente 2 % des myofibrilles (OFFER et MOOS 1973). Ce qui la distingue des autres protéines myofibrillaires, ce sont ses propriétés physico-chimiques et structurales. C'est une protéine monocaténaire de 140.000 de poids moléculaire qui n'est ni complètement globulaire ni allongée comme le suggère sa viscosité intrinsèque. Son contenu en résidus de proline est beaucoup plus élevé que celui des autres protéines myofibrillaires. Des études en dichroïsme circulaire ont montré que son taux en hélice  $\alpha$  est nul et que sa structure secondaire est 50 % en structure  $\beta$  et 50 % en pelote statistique.

La protéine C ne possède pas d'activité ATPasique et n'affecte pas celle de la myosine. Par contre elle abaisse d'un facteur 2 l'activité ATPasique de la myosine activée par l'actine et cette inhibition est indépendante de la concentration en ions calcium (OFFER 1973). La protéine C ne fixe pas les ions calcium en présence de magnésium. Deux molécules de protéine C se trouvent toutes les trois paires de molécules de myosine et elles seraient responsables de la cohésion du filament épais et de la périodicité avec laquelle on retrouve les têtes globulaires de myosine (figure I-5).

## 3°) LES PROTEINES DE LA LIGNE M (LES M-PROTEINES)

La ligne M aurait pour rôle de maintenir les filaments épais dans leur propre alignement quand la distance interfila-mentaire augmente lors du raccourcissement longitudinal du sarcomère (KNAPPEIS et CARLSEN 1968). Des études de microscopie électronique et des protocoles de préparation, fondés sur des extractions par des tampons de force ionique élevée, ont permis de montrer que deux types de protéines constituent la ligne M. En particulier, à partir du muscle pectoral de Poulet, une M-protéine a pu être isolée et purifiée (MORIMOTO et HARRINGTON 1972). Cette protéine est un dimère de 88.000 de poids moléculaire et a été indentifiée comme étant une créatinekinase (TURNER et al 1973). En plus de sa fonction enzymatique cette M-protéine pourrait jouer un rôle de pontage

entre les molécules de myosine (WALLIMAN et al 1975).

Le second composant de la ligne M, qui adhérerait directement aux filaments épais, a été mis en évidence par plusieurs auteurs (EATON et PEPE 1972, MANI et KAY 1978). Cette M-protéine aurait une constante de sédimentation de l'ordre de 5S et un poids moléculaire d'environ 165.000 daltons. Elle est constituée d'une seule chaîne polypeptidique contenant notamment 13 % d'hélice  $\alpha$  et 35 % de structure  $\beta$  (LANDON et ORIOL 1975).

## II - LE FILAMENT FIN

Les myofilaments fins sont attachés de part et d'autre de la strie Z, leur conférant ainsi une polarité inverse. Ils ont chez les Vertébrés une longueur de  $1\mu\text{m}$  et un diamètre de 7nm. Au microscope électronique le filament fin se présente sous la forme de deux brins torsadés en hélice  $\alpha$  dont le pas est de 72 nm. Les brins sont constitués de 300 à 400 éléments globulaires de 5,5 nm de diamètre, les molécules d'actine G, qui sont polymérisés en chaîne.

Le marquage par des anticorps spécifiques (EBASHI et al 1969) a permis d'observer les faits suivants :

- un filament très fin s'étend sur toute la longueur de la double hélice d'actine et est logé dans la gorge (figure I-7). Ce filament, qui est constitué de tropomyosine, est long de 40nm pour un diamètre de 2 nm. Les filaments de tropomyosine s'étendent sur sept molécules de G-actine et s'associent bout à bout ;
- des molécules globulaires sont réparties avec une périodicité de 40 nm environ et ont un diamètre de 6,5 nm : les troponines. Ces troponines sont fixées au filament fin par les filaments de tropomyosine.

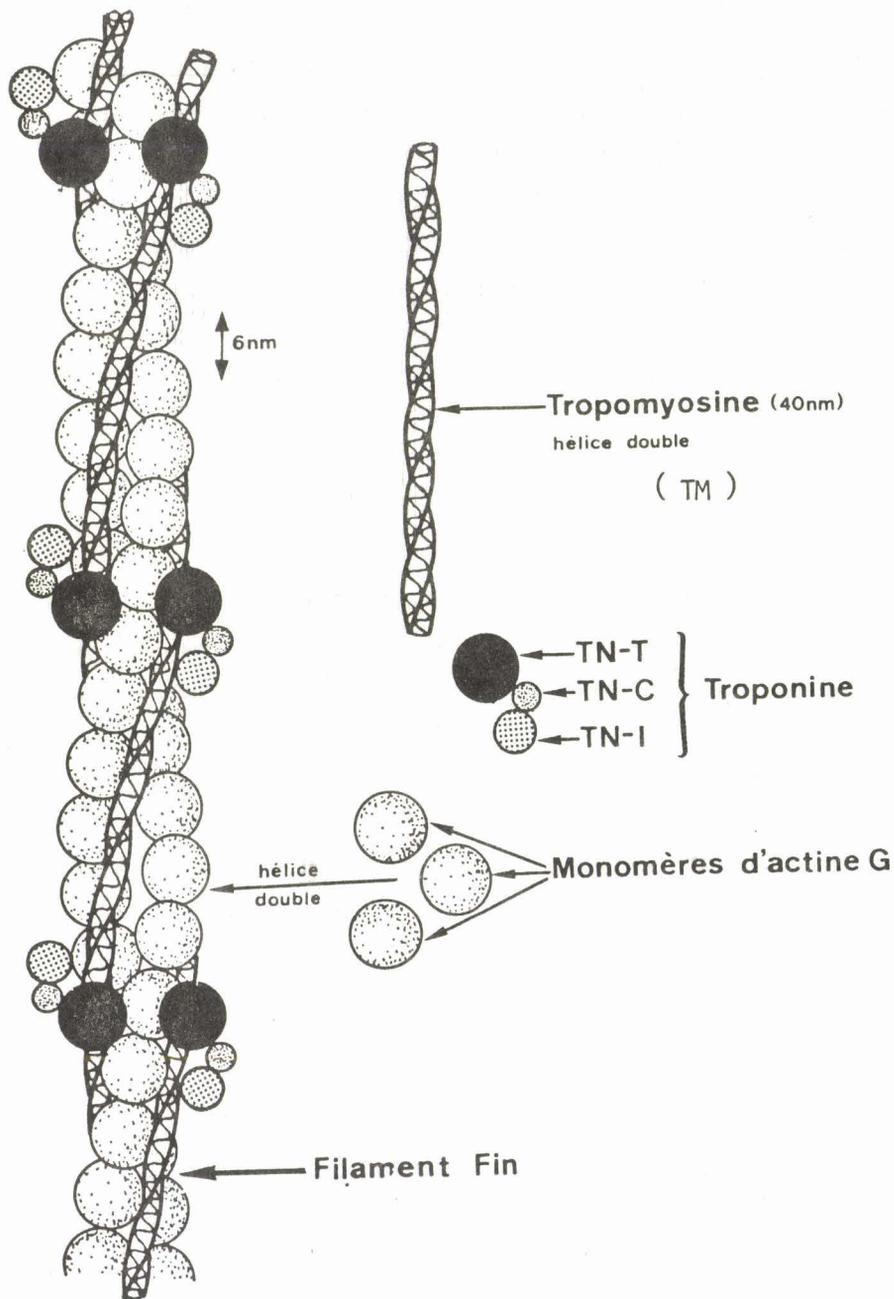


FIGURE I-7 : LES PROTEINES DU FILAMENT FIN D'APRES GILLIS 1975

- . LA F-ACTINE ( EN DOUBLE HELICE ) COMPOSEE DE MONOMERES DE G-ACTINE
- . LA TROPOMYOSINE ( TM )
- . LE COMPLEXE DES TROPONINES
  - LA TN-T FIXANT LA TROPOMYOSINE
  - LA TN-I INHIBANT LA CONTRACTION
  - LA TN-C FIXANT LE CALCIUM

BUS  
LILLE

## 1°) L'ACTINE

C'est la protéine la plus importante du filament fin et c'est une protéine ubiquitaire. Elle représente dans le muscle 25 % des protéines myofibrillaires (PORZIO et PEARSON 1977) et se rencontre sous deux formes :

- l'actine globulaire (*la G-actine*) est constituée d'une seule chaîne polypeptidique et a un poids moléculaire d'environ 43.000 daltons. Elle a la particularité d'être soluble dans l'eau et celle de fixer, avec une grande affinité, une molécule d'ATP (ou d'ADP).
- l'actine filamenteuse (*la F-ACTINE*) est un polymère de G-actine qui se forme facilement par augmentation de la concentration en KCl. Lors de la polymérisation, il y a hydrolyse d'ATP (fixé sur la G-actine) et l'ADP formé reste fixé sur l'actine.

L'actine est une protéine polymorphe. Des isoélectrofocalisations effectuées sur différentes actines (WHALEN et al 1976) ont montré que l'actine du muscle squelettique n'existe que sous forme (actine  $\alpha$ ), tandis que l'actine isolée de certaines cellules (par exemple les cellules non musculaires) existe sous deux formes différentes (actine  $\alpha$  et actine  $\beta$ ). Ces différentes actines ont le même poids moléculaires mais des points isoélectriques différents. De plus l'étude de l'actine isolée de fibroblastes d'embryons de Poulet a montré l'existence de trois formes (actine  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ).

L'étude des structures primaires d'actines a bien établi qu'il existe, chez les Mammifères supérieurs, six actines différentes : deux actines cytoplasmiques typiques des tissus non musculaires, deux actines de muscle lisse, une actine de type cardiaque et une actine squelettique (VANDERKHERKHOVE et WEBER 1978). A l'inverse de la myosine, il n'y aurait pas de spécificité d'espèces pour un même muscle (VANDEKHERKHOVE et WEBER 1979).

Il est à noter, pour l'actine de muscle squelettique, l'existence de résidus d'acides aminés méthylés dont un résidu de 3-méthyl histidine (ELZINGA 1970).

## 2) LA TROPOMYOSINE

La tropomyosine est une protéine fortement hélicoïdale (90 à 100 % d'hélice  $\alpha$ ) que l'on retrouve dans tous les tissus musculaires et dans de nombreuses cellules non musculaires (COHEN et COHEN 1972, CHAMLEY-CAMPBELL 1977). Isolée de tissus différents pour différentes espèces, la tropomyosine possède des propriétés physicochimiques et fonctionnelles très similaires. Pourtant deux formes majeures ont été mises en évidence dans le cas du muscle squelettique : une forme  $\alpha$  (PM = 36.000 daltons) qui contient un seul résidu de cystéine ; une forme  $\beta$  (PM = 32.000 daltons) qui contient deux résidus de cystéine. Les deux formes de tropomyosine ont une répartition très différente (80 à 85 % de la forme  $\alpha$  et le reste en forme  $\beta$ ).

Pour une même espèce, comme le Lapin, des différences sont observées selon le muscle étudié : si la tropomyosine de muscle squelettique existe sous deux formes majeures, celle isolée du muscle cardiaque n'existe que sous une seule forme (la forme  $\alpha$ ). Les formes  $\alpha$  de tropomyosine, isolées du muscle cardiaque et du muscle squelettique, ont la même composition en acides aminés, la même mobilité électrophorétique et la même structure N-terminale. Ceci indique qu'il n'y a donc pas de spécificité entre les deux muscles pour la tropomyosine  $\alpha$ . Les microhétérogénéités observées, pour la tropomyosine  $\alpha$  ainsi que pour la tropomyosine  $\beta$ , par isoélectrofocalisation (CUMMINS et PERRY 1973), sont attribuées aux formes phosphorylées des tropomyosines (LEWIS et SMILLIE 1980).

Par contre pour un même muscle il y a spécificité de répartition des formes  $\alpha$  et  $\beta$ . La tropomyosine du muscle cardiaque des petits Mammifères (Rat et Lapin) n'est présente que sous sa forme  $\alpha$  tandis que, chez les Mammifères supérieurs (Porc et Homme), la tropomyosine existe sous deux formes  $\alpha$  et  $\beta$  (LEGER et al 1976).

Il semble donc que la forme  $\alpha$  de la tropomyosine soit hautement conservée quelque soit le muscle et l'espèce comme l'ont montré les études des séquences totales en acides aminés (LEWIS et SMILLIE 1980).

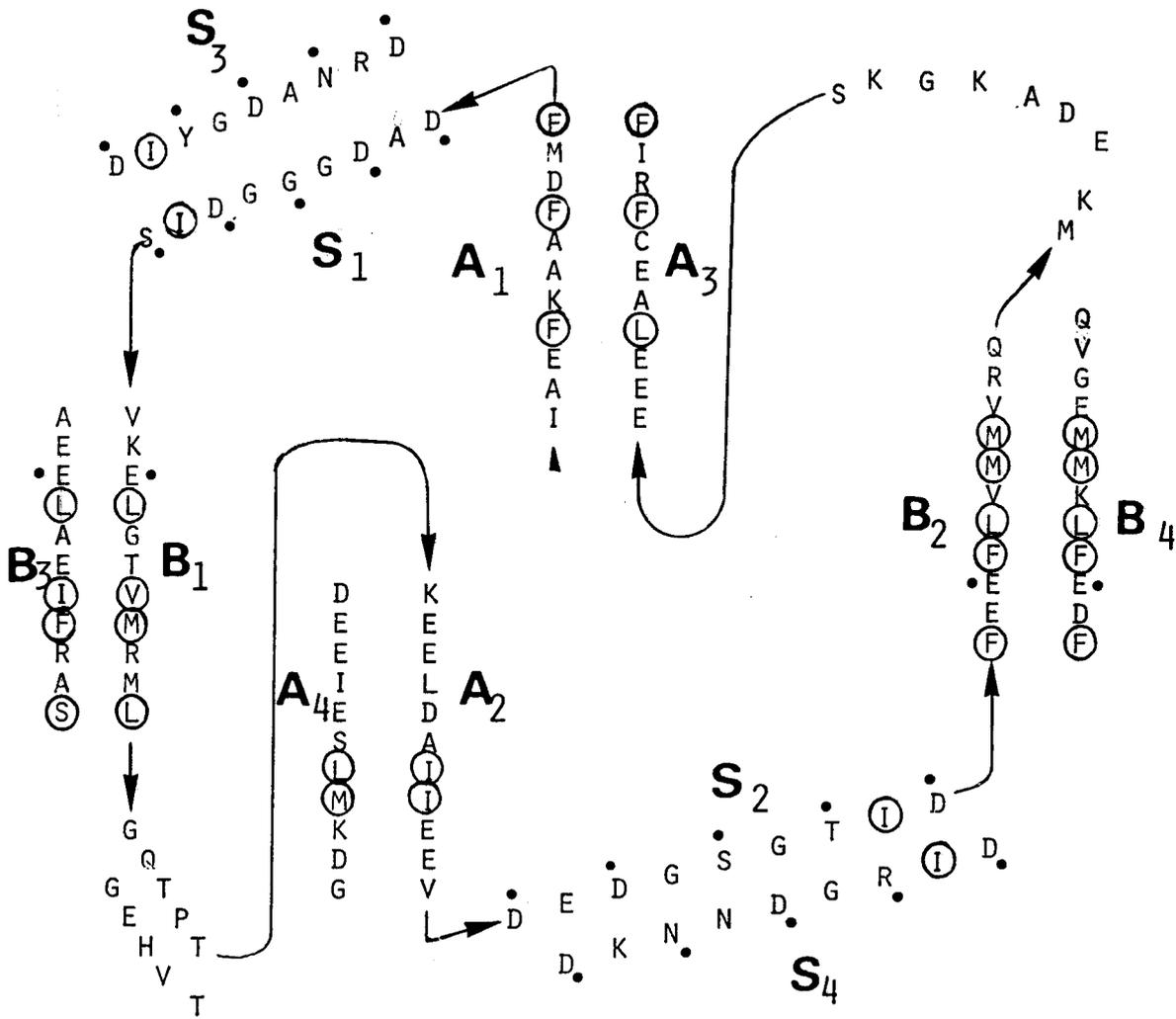
### 3°) LE COMPLEXE DES TROPONINES

Le complexe des troponines est responsable de la régulation de l'activité contractile du muscle en raison de sa sensibilité aux ions calcium et à l'action des phosphorylases. Reconnue comme la seule protéine myofibrillaire ayant des sites de liaison de forte affinité (YASUI et al 1968), elle est décrite comme une protéine globulaire de 85.000 de poids moléculaire (HARSTHORNE et DREIZEN 1973). Elle est hétérogène et composée de trois sous-unités : la troponine-I (TN-I) qui inhibe l'activité ATPasique de l'actomyosine, la troponine-T (TN-T) se liant à la tropomyosine, la troponine-C (TN-C) fixant le calcium (figure I-7).

#### a) la troponine-C (TN-C)

La TN-C a un poids moléculaire qui varie suivant le muscle étudié : 20.000 pour le muscle cardiaque et 18.000 pour le muscle squelettique (GREASER et GERGELY 1971). De nombreuses séquences en acides aminés de TN-C ont été totalement déterminées comme celle du muscle squelettique rapide de Lapin (COLLINS et al 1973) ou celle du muscle cardiaque de Boeuf (VAN EERD et TAKAHASHI 1976). Elles ont permis d'établir, par homologie avec les parvalbumines, la structure tridimensionnelle de cette protéine liant le calcium. Il existe quatre boucles liant le calcium et chacune est stabilisée par deux hélices  $\alpha$  (figure I-8). Des interactions entre les chaînes latérales spécifiques des hélices stabiliseraient la structure globale (WEEDS et MCLACHLAN 1974).

Dans le cas du muscle squelettique les sites I et II seraient des sites spécifiques du calcium tandis que les sites III et IV seraient des sites calcium-magnésium de forte affinité (LEAVIS et al 1978).



**FIGURE I-8 : STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE LA TN-C DE MUSCLE**

**SQUELETTIQUE DE LAPIN DEDUITE PAR HOMOLOGIE AVEC**

**LA PARVALBUMINE DE CARPE D'APRES WEEDS et Mc LACHLAN 1974**

Les symboles A et B correspondent aux hélices  $\alpha$  et les symboles S correspondent aux sites de fixation du calcium.

Les acides aminés ( en utilisation la notation d'une lettre IUPAC-IUB 1968 ) encadrés sont les acides aminés hydrophobes importants pour stabiliser la structure. Les acides aminés pointés(•) sont les acides aminés susceptibles de lier le calcium



Dans le cas du muscle cardiaque, le site I aurait perdu sa capacité à lier le calcium (VAN EERD et TAKAHASHI 1976). Parmi les trois autres sites un seul serait spécifique du calcium mais avec une faible activité, les deux autres seraient des sites calcium-magnésium de forte affinité (POTTER et al 1977, LEAVIS et KRAFT 1978).

Il est à noter que la structure tridimensionnelle des TN-C des parvalbumines et des chaînes légères alcalines sont similaires lorsqu'on compare entre elles leur structure primaire (WEEDS et McLACHLAN 1974).

b) *la troponine-I (TN-I)*

La TN-I apparaît sous de multiples formes moléculaires qui sont spécifiques des trois différents types de cellules musculaires striées (rapide, lent et cardiaque) (DHOOOT et al 1978). Par exemple, le poids moléculaire apparent est de 28.000 daltons pour la TN-I du muscle cardiaque et de 24.000 daltons pour le muscle strié rapide. Des différences de séquences en acides aminés ont été mises en évidence pour les TN-I de différents muscles squelettiques et cardiaques (GRAND et al 1976, WILKINSON ET GRAND 1978). Toutes les formes diffèrent selon la longueur de leur enchaînement polypeptidique.

Il a été établi que la région liant la TN-C est localisée dans la partie N-terminale de la molécule de TN-I (SYSKA et al 1976, MOIR et PERRY 1977) tandis que la région se fixant à l'actine est située dans une zone où il n'existe que très peu de mutations (position 123 à 146). Ce fait n'a rien de surprenant lorsque l'on considère la nature très conservatrice de la molécule d'actine (WILKINSON et GRAND 1978).

D'autre part, par des méthodes immunochimiques il a bien été établi qu'il existe trois formes de TN-I spécifiques du tissu étudié et non de l'espèce considérée (DHOOOT et al 1978).

c) *la troponine t (TN-T)*

De nombreuses études ont été faites pour mettre en évidence et caractériser les TN-T de différents muscles pour différentes espèces.

Toutes ces études montrent la grande hétérogénéité des TN-T quant au poids moléculaire apparent, par exemple : 37.000 daltons pour la TN-T du muscle squelettique de Lapin (GREASER et GERGELY 1973), 38.000 daltons pour le muscle cardiaque de Boeuf (CLARKE et al 1976), deux formes pour le muscle squelettique de Boeuf de 40.000 et 37.000 dalton (CLARKE et al 1976).

La comparaison des TN-T d'un même muscle pectoral pour deux espèces différentes (Lapin et Poulet) révèle que les chaînes peptidiques des TN-T ont une longueur et une composition en acides aminés similaires. Il n'en est pas de même si l'on compare les muscles différents d'une même espèce. Ainsi, la TN-T du muscle pectoral de Poulet possède 25 résidus d'acides aminés supplémentaire et une plus grande proportion d'histidine et d'arginine comparée à la TN-T du muscle squelettique rapide de Poulet. De plus, si la séquence des 6 premiers résidus de ces TN-T est identique, leur contenu en résidu de tyrosine est différent (2 résidus pour la TN-T de muscle rapide et un seul pour le muscle pectoral).

Deux formes de TN-T ont été isolées du muscle squelettique de Boeuf dont les poids moléculaires sont respectivement similaires à ceux du muscle squelettique rapide et du muscle cardiaque. Cependant le muscle squelettique de Boeuf étudié possède deux types de fibres musculaires (des fibres de muscle lent et des fibres de muscle rapide) et ceci suggère l'existence d'une forme de TN-T pour le muscle lent (CLARKE et al 1976). L'hypothèse de l'existence d'une forme de TN-T pour le muscle lent a d'ailleurs été confirmée en utilisant des antisérums monospécifiques des formes polymorphiques de TN-T.

### III - LES AUTRES PROTEINES CONTRACTILES

D'autres protéines myofibrillaires ont été caractérisées.

#### 1°) L' $\alpha$ -actinine

Cette protéine a été isolée pour la première fois comme un composant mineur du muscle squelettique de Lapin (EBASHI et EBASCHI 1965).

Depuis cette mise en évidence elle a été isolée d'autres muscles : muscle squelettique et cardiaque de Porc (ROBSON et ZEECKE 1973), muscle cardiaque de Boeuf, muscle pectoral de Poulet et muscle lisse de gésier de Poulet (SINGH et al 1977). Ces protéines ont toutes la particularité d'avoir leur extrémité N-terminale N-acétylée et de posséder un résidu de leucine en position C-terminale (SINGH et al 1977). Elles sont néanmoins différentes comme l'ont montré les études immunologiques et l'examen des cartes peptidiques après hydrolyse trypsique (BRETSCHER et al 1979).

L'étude de l' $\alpha$ -actinine du muscle squelettique de Lapin a montré que c'est un dimère de poids moléculaire élevé (200.000 daltons). Les deux chaînes polypeptidiques sont identiques ou similaires (SUZUKI et al 1976). Elles possèdent un fort pourcentage d'hélice  $\alpha$  (74 %) et apparaissent au microscope électronique comme un fin bâtonnet.

L' $\alpha$ -actinine peut se lier à la F-actine pour former des ponts régulièrement espacés (PODLUBNAYA et al 1975). La liaison  $\alpha$ -actinine-F-actine est déplacée par addition de tropomyosine (GOLL et al 1972). L'interaction actine-myosine est également modifiée par l' $\alpha$ -actinine en augmentant l'activité ATPasique magnésium dépendante de l'actomyosine reconstituée (SERAYDARIAN et al 1967).

L' $\alpha$ -actinine se trouve située près des extrémités des filaments d'actine dans les cellules musculaires : dans la strie Z du muscle strié (où l'on pense qu'elle serait engagée dans l'ancrage des filaments d'actine) et dans les corps denses du muscle lisse (qui sont aussi des points d'attache des filaments d'actine). La fonction physiologique de l' $\alpha$ -actinine reste cependant très peu connue.

## 2°) LA PARAMYOSINE

C'est une protéine du muscle lisse des Invertébrés, de 105.000 de poids moléculaire, qui a un rôle important dans le processus du "catch", tension prolongée du muscle des Invertébrés (SZENT-GYORGI et al 1971). La paramyosine a longtemps été considérée comme une protéine de structure mais des travaux récents montrent qu'elle interagit avec la

myosine (EPSTEIN et al 1976, HILDEBRAND et al 1979). Il y a compétition entre la fixation de la myosine à l'actine et la fixation de la myosine à la paramyosine. L'affinité apparente de la myosine pour la F-actine est remarquablement réduite lorsque la myosine et la paramyosine sont associées.

### 3°) *la FILAMINE*

Découverte récemment dans le muscle lisse de gésier de Poulet, cette protéine a été mise en évidence dans différents organes de Poulet tels le foie, le rein, le cerveau et également dans les cellules en culture d'autres espèces (Homme et Lapin) (WANG et al 1975). Elle n'a pas été retrouvée dans les cellules de muscle squelettique.

La filamine est une protéine constituée d'une seule chaîne polypeptidique de 250.000 de poids moléculaire qui a la capacité d'interagir avec l'actine mais dont la fonction physiologique reste mal connue.

### 4°) *LA TITINE*

Dernière née des recherches sur les protéines myofibrillaires, elle a été mise en évidence dans les myofibrilles du muscle pectoral de Poulet. Des anticorps spécifiques de cette protéine ont des réactions croisées avec des protéines similaires des myofibrilles cardiaques et de muscle squelettique de nombreux Vertébrés et Invertébrés (WANG et al 1979).

La titine est présente dans la ligne M, la strie Z et les jonctions entre la bande A et la bande I. Elle serait constituée d'au moins trois sous-unités : un doublet dont chaque chaîne aurait un poids moléculaire de 1.000.000 de daltons et une troisième chaîne de poids moléculaire moins important d'environ 500.000 daltons.

## D - LA CONTRACTION MUSCULAIRE

L'interaction des filaments épais de myosine et des filaments fins permet la contraction du muscle.

La contraction musculaire a fait l'objet de nombreux travaux, tant pour ce qui concerne le processus mécanique, les phénomènes biochimiques et la régulation de la contraction

## I - LE PROCESSUS MECANIQUE

Pour rendre compte de la déformation à volume constant de la cellule musculaire et du glissement entre les filaments fins et les filaments épais, quelques mécanismes ont été proposés (HUXLEY 1969, ELLIOTT et al 1970, MOREL et al 1975).

### 1°) MECANISME SELON HUXLEY

Le mécanisme qui a été proposé le premier et qui est généralement le mieux admis est celui d'HUXLEY (1969). Les têtes globulaires de myosine sont, dans un muscle relâché, le long des filaments épais du sarcomère. Lors de la contraction, des ponts actine-myosine se forment par l'intermédiaire des HMM-S<sub>1</sub> de la myosine, ceci étant possible du fait de la flexibilité de la jonction LMM et HMM-S<sub>2</sub>. Pour qu'il y ait raccourcissement du sarcomère, un changement de structure au niveau de HMM-S<sub>1</sub> est nécessaire, ce qui permet le pivotement de HMM-S<sub>1</sub> par rapport à son point de fixation avec HMM-S<sub>2</sub> entraînant le déplacement du filament fin de quelques nanomètres. Quand HMM-S<sub>1</sub> atteint son pivotement maximum, il se détache du filament d'actine et reprend sa position initiale dans le filament épais. Il est prêt pour un prochain cycle attachement-pivotement.

### 2°) MECANISME SELON ELLIOTT

Selon ELLIOTT, des forces électrostatiques interviennent dans le mécanisme. La contraction se produit par une augmentation des forces électrostatiques répulsives qui s'exercent entre les filaments fins et les filaments épais chargés négativement (ELLIOTT et al 1970). Comme le volume de la cellule musculaire est constant, durant la contraction une augmentation de la répulsion interfilamentaire induit une diminution de la longueur des fibres musculaires. Cependant, dans le mécanisme, le rôle des ponts actine-myosine ("cross-bridges") n'est pas élucidé.

### 3°) MECANISME SELON MOREL

Le plus récent des mécanismes est fondé sur l'hypothèse que la contraction pourrait résulter de la décroissance des forces attractives entre les filaments, au lieu d'une augmentation des forces répulsives. La stabilité du réseau filamentaire au repos est due à un équilibre entre les forces répulsives (électrostatiques), attractives (forces de type Van der Waals-London) et de forces supplémentaires dues aux ponts actine-myosine. En effet on trouve dans le muscle au repos des ponts actine-myosine dits "de repos" qui exercent sur les filaments fins une tension mécanique radiale.

Lors de la contraction les tensions exercées par les ponts actine-myosine seraient diminuées, car des ponts actine-myosine "énergétisés", n'exerçant pas de tension mécanique, seraient formés. Les forces de répulsion seraient automatiquement dominantes et il y aurait gonflement du muscle, donc diminution de longueur (figure I-9).

## II - LES PHENOMENES BIOCHIMIQUES

L'ATP est la seule force d'énergie utilisable par la cellule. L'énergie chimique, qui est transformée en énergie mécanique dans le muscle, provient de l'hydrolyse de l'ATP. Elle s'effectue au niveau des têtes globulaires de la myosine.

L'influx nerveux libère des ions calcium des citernes terminales sarcoplasmiques (atteignant une concentration de  $10^{-5}$  M). Après activation de la TN-C par le calcium l'activité ATPasique de la myosine est alors effective.

Selon l'hypothèse d'HUXLEY, la tête globulaire de la myosine serait "énergétisée" par l'ATP et réagirait avec un monomère d'actine. Il en résulte une modification conformationnelle de la tête globulaire de la myosine. L'ADP et le phosphore inorganique quittent ensuite le site de fixation de la myosine et sont remplacée par une autre molécule d'ATP, avec au préalable un pivotement de la tête globulaire et un glissement du filament d'actine. L'hydrolyse de l'ATP conduit à nouveau à la formation du complexe ADP + Pi et à la modification de la position de la

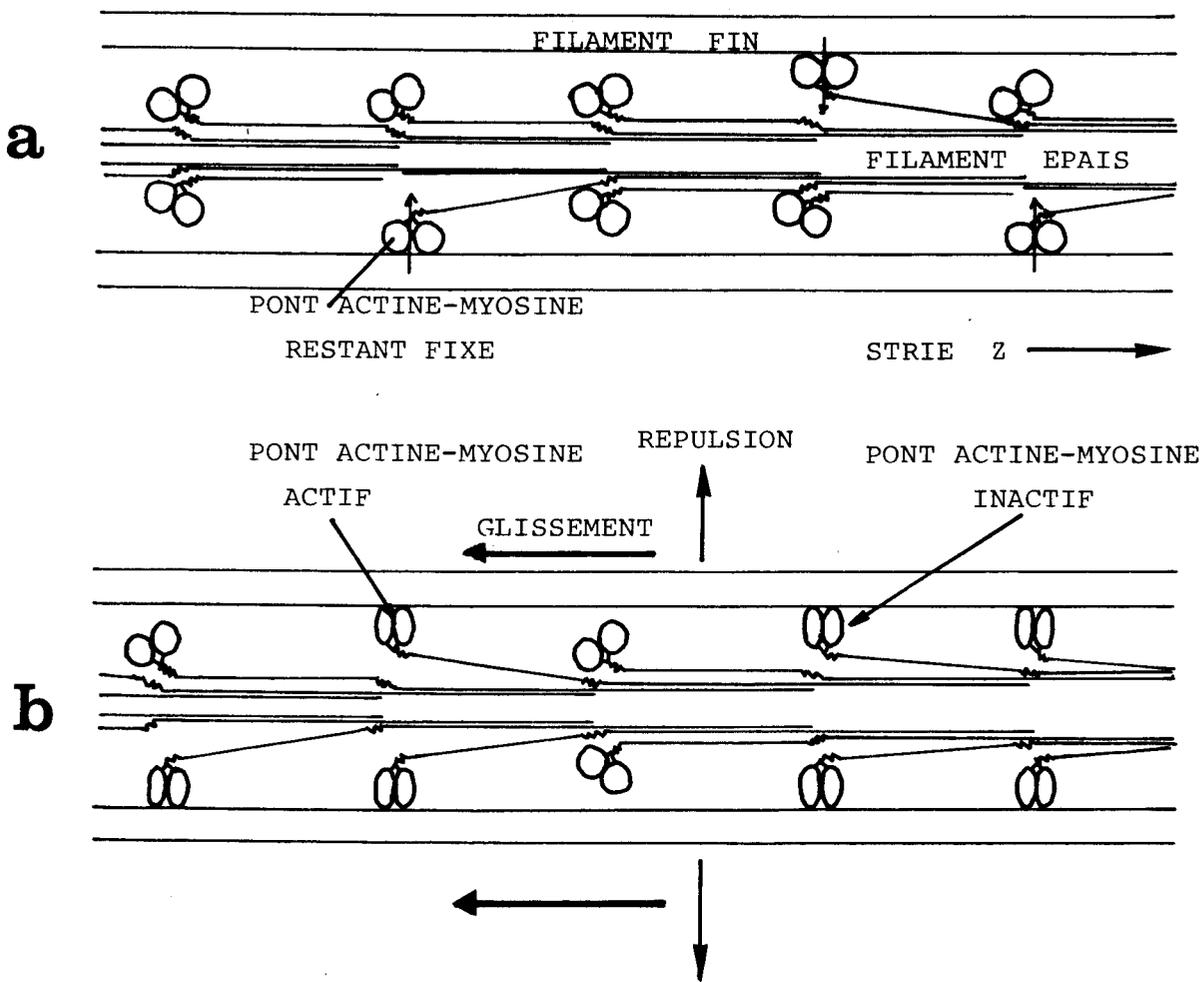


FIGURE I-9 : Mécanisme moléculaire possible du glissement des myofilaments d'après MOREL et PINSET-HARSTRÖM 1975

- (a) Le muscle est au repos. Des ponts Actine-Myosine restent fixés et exercent des tensions radiales.
- (b) Le muscle est contracté. Les ponts Actine-Myosine ne sont plus sous tension. Des ponts Actine-Myosine actifs sont en contact avec le filament fin et leur activité est augmentée par la présence d'Actine

tête globulaire de la myosine. Ainsi la myosine peut agir à nouveau avec un monomère d'actine (MANNHERZ et al 1973).

Selon MOREL (1975), quand est déclenchée la contraction par l'arrivée du calcium sur la TN-C, de nouveaux ponts actine-myosine se forment et il y a hydrolyse de l'ATP car la myosine est alors fortement activée par l'actine. L'énergie chimique est utilisée pour diminuer la cohésion des ponts actine-myosine et donc pour augmenter la répulsion des filaments fins et des filaments épais.

### III - LA REGULATION DE LA CONTRACTION

Pour que le calcium puisse jouer son rôle régulateur de la contraction des muscles squelettiques et cardiaques et qu'il y ait hydrolyse de l'ATP, la tropomyosine et le complexe des troponines sont indispensables. L'emplacement de la tropomyosine près du sillon de la double hélice de F-actine suggère un mécanisme possible de blocage ou de libération de sites actifs. La fixation du calcium sur la TN-C augmente l'affinité entre la TN-I et la TN-C et le calcium active la TN-I phosphorylase. Le complexe TN-I phosphorylée/TN-C "pousse" la tropomyosine dans le sillon de la double hélice de F-actine. La tête globulaire de la myosine peut alors se fixer à l'actine (figure I-10).

Ceci n'est pas un mécanisme universel. Par exemple les muscles de coquilles Saint Jacques n'ont pas de tropomyosine : la régulation par le  $Ca^{2+}$  se fait sur une chaîne légère contenue dans la tête de la myosine.

Cependant le calcium n'est pas le seul facteur qui contrôle la contraction. Des phosphorylases, des phosphatases, des phosphokinases (c-AMP dépendantes ou  $Ca^{2+}$  dépendantes), des calcioprotéines comme la calmoduline, des hormones etc... interviennent également dans le mécanisme de régulation de la contraction musculaire.

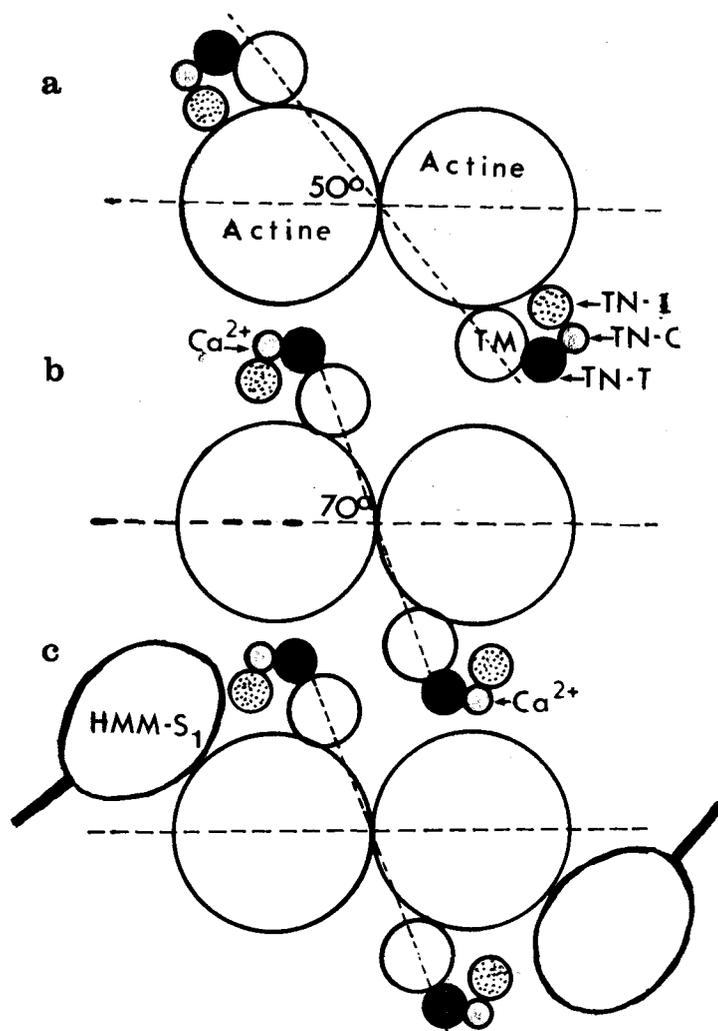


FIGURE I-10 Régulation de la contraction par glissement de la Tropomyosine ( TM) d'après GILLIS 1975  
(a) Le complexe TN-TM se trouve à la périphérie de l'Actine  
(b) Lors de l'arrivée du calcium sur la TN-C, le complexe se déplace vers le sillon des deux hélices d'Actine  
(c) La place est ainsi libérée permettant à la tête globulaire de la Myosine HMM-S<sub>1</sub> de venir se lier à l'Actine

CHAPITRE II

**DIFFERENCES AU NIVEAU  
DES CHAINES LOURDES  
DES MYOSINES CARDIAQUES  
DE PORC**

Ce chapitre a fait l'objet des publications suivantes :

- X. GRANDIER-VAZEILLE, D. TETAERT, H.F. HILDEBRAND and G. BISERTE

Differences between left and right ventricular myosins :  
existence of pig cardiac myosin isoenzymes ?

*VII<sup>th</sup> European Conference on muscle and cell motility*  
Warsaw (Poland) June 29-July 1, 1978, Proceedings 7,  
(54), p. 92.

- H.F. HILDEBRAND, I. KRIVOSIK, G. BISERTE, D. TETAERT  
and X. GRANDIER-VAZEILLE

Perineal rhabdomyosarcoma of a new born child : clinical  
and biochemical studies with emphasis on diagnostic  
interest"

*VII<sup>th</sup> European Conference on muscle and cell motility*,  
Warsaw (Poland), June 29-July 1, 1978, Proceeding 7,  
(59), p. 99.

- X. GRANDIER-VAZEILLE, D. TETAERT, B. HEMON and P. LEMAY

New evidences of pig cardiac myosin isoenzymes

*VIII<sup>th</sup> European Conference on muscle and cell motility*,  
Heidelberg (RFA), September 17-20, 1979, Proceedings 8,  
p. 110.

- H.F. HILDEBRAND, J.P. KERCKAERT and G. BISERTE  
(Unité INSERM N° 124 and IRCL LILLE)  
D. TETAERT and X. GRANDIER-VAZEILLE (U.16 INSERM LILLE)

Tumoral myosins of  $Ni_3S_2$  induced rhabdomyosarcomas in  
Rat and Rabbit : comparative studies with adult and fetal  
myosins of skeletal muscle.

*European Journal of Cell Biology*, 1980, 20, p. 240-248.

- X. GRANDIER-VAZEILLE, D. TETAERT, H.F. HILDEBRAND  
and G. BISERTE

Pig cardiac myosin isoenzymes

*European Journal of Cell Biology*, 1980, 21, p. 116-121.

## A - INTRODUCTION

Pour analyser les rhabdomyosarcomes (tumeur maligne du muscle strié) induits par le sous-sulfure de nickel ( $\text{Ni}_3\text{S}_2$ ) des études structurales avaient permis de montrer que malgré l'absence de contraction de la tumeur, les rhabdomyosarcomes renfermaient des protéines contractiles (Hildebrand et al., 1978). Nous avons été amené à étudier plus particulièrement la myosine extraite de la tumeur et de la comparer aux myosines extraites du même muscle normal à l'état foetal et à l'état adulte. Les myosines foetale et tumorale du muscle squelettique de Lapin possèdent une composition en chaînes légères similaire et forment des filaments synthétiques *in vitro* longs et fusiformes mais différent dans leur capacité à hydrolyser l'ATP. Ces résultats nous avaient permis d'envisager qu'entre les myosines tumorales et foetales des différences existaient au niveau de leur chaînes lourdes et plus particulièrement au niveau de leur tête globulaire renfermant des sites actifs.

Pour tenter de confirmer l'hypothèse de l'existence d'isoenzymes de myosine, nous avons étudié le muscle cardiaque, car ce muscle possède la particularité d'être composé de quatre parties distinctes qui effectuent un travail avec des puissances différentes. De plus, ce muscle a été considéré pendant de nombreuses années comme un tissu homogène.

Dans cette optique de travail, des études comparatives ont été faites entre les myosines extraites des ventricules droit et gauche, des oreillettes droite et gauche et les préparations ont été effectuées en parallèle

et à partir d'un même coeur. Les études ont été réalisées sur des préparations de myosines dans un grand état de pureté : les rapports de densité optique à 280 et 260 nm des préparations en solution doivent dans tous les cas être supérieurs ou égaux à 1,6 et les électrophorégrammes sur gel d'acrylamide des myosines ne doivent révéler aucun contaminant protéique (principalement les protéines du filament fin).

Toutes les études (mesure d'activité ATPasique, filaments synthétiques, hydrolyse par les enzymes ou les agents chimiques) ont été effectuées sur la même préparation et ont été reproduites ainsi pour huit préparations. Enfin, les étapes de la préparation et de purification des myosines sont conduites très rapidement afin que les mesures d'activité ATPasiques ou l'étude de la formation des filaments synthétiques puissent être réalisées 24 heures après la mort de l'animal.

## B - ÉTUDE DES MYOSINES VENTRICULAIRES DROITES ET GAUCHES DE COEUR DE PORC

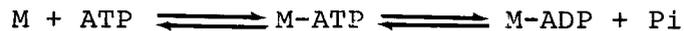
Pour comparer les chaînes lourdes des myosines extraites des deux ventricules de coeur de Porc, nous avons associé des études biochimiques à des études ultrastructurales.

### I - ACTIVITES ATP-ASIQUES

La myosine, décrite dans le chapitre des généralités, est une molécule dont la propriété fondamentale est d'hydrolyser l'ATP.

Elle a son site actif situé dans la tête globulaire des chaînes lourdes (partie N-terminale). Pour localiser des différences éventuelles dans les chaînes lourdes des myosines ventriculaires, il était intéressant dans un premier temps de comparer leurs parties N-terminales et donc leur capacités respectives à hydrolyser l'ATP.

L'activité ATPasique représente la vitesse de réaction d'hydrolyse de l'ATP selon le schéma suivant :



L'activité ATPasique est le nombre de moles d'ATP qui ont été hydrolysées par gramme de myosine et par unité de temps. On l'exprime quantitativement quelque soit la méthode de mesure (ATP non consommé §, ATP consommé §) en nanomoles de phosphate inorganique libéré (Pi), par minute et par milligramme de myosine (nmoles Pi x min<sup>-1</sup> x mg<sup>-1</sup>).

La représentation en coordonnées semi-logarithmiques des valeurs de l'activité ATPasique spécifique en fonction de la concentration des ions Ca<sup>2+</sup> révèle, pour les myosines ventriculaires comme pour la myosine squelettique des courbes sigmoïdes. Les myosines ventriculaires comme la myosine squelettique sont donc des enzymes de type allostérique. A la concentration de 10 mMoles en CaCl<sub>2</sub>, partie asymptotique de la courbe sigmoïde, tous les sites sont saturés et nous pouvons déterminer une vitesse maximale (V max) de la réaction enzymatique.

#### 1°) L'ACTIVITE ATP-ASIQUE DEPENDANTE DU CALCIUM

L'activité ATPasique dépendante du calcium a été étudiée selon deux conditions expérimentales.

a) dans les conditions expérimentales de Green et Mommaerts (1953) (AT VI-Ab\*)

Avant d'entreprendre les mesures de dosage de l'activité ATPasique dépendante du calcium pour les myosines cardiaques, nous avons effectué les mesures pour différents muscles normaux ou foetaux de différentes espèces (Lapin, Rat, Vache, Homme). Les valeurs obtenues par la méthode de dosage du phosphore inorganique libéré selon Fiske et Subbarow, sont résumées dans le Tableau II-1. Pour la myosine du muscle squelettique blanc de Lapin (myosine de référence), la valeur obtenue ( $546 \pm 48$  nmoles de  $P_i \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ ) est comparable à celle donnée par Leger et al., 1975, ( $567 \pm 150$  nmoles de  $P_i \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ ) pour le même muscle.

Dans le coeur de Porc, les dosages de cette activité ATPasique ont été effectués sur les préparations de myosines extraites à partir des ventricules droit et gauche, ainsi que du septum (partie médiane), qui en raison de son origine embryologique, serait du ventricule gauche. Les valeurs obtenues pour ces myosines sont données dans le Tableau II-2. Elles sont comparables pour la myosine du ventricule gauche ("myosine-V<sub>G</sub>") et celle du septum ("myosine-M"), mais elles sont inférieures à celles obtenues pour la myosine du ventricule droit ("myosine-V<sub>D</sub>"). Les valeurs données pour les myosines cardiaques ventriculaires sont la moyenne sur 8 préparations et la valeur pour chaque préparation étant elle-même une moyenne de 10 déterminations.

Pour trois préparations de myosines ventriculaires, nous avons comparé deux méthodes de mesure de l'activité ATPasique :

. méthode de l'ATP consommé par mesure du phos-

---

\* AT VI-Ab signifie voir Appendice Technique § VI -Ab

Myosines		nmoles Pi x min <sup>-1</sup> x mg <sup>-1</sup>
LAPIN	Muscle normal (MBL)	546 <sup>±</sup> 48
	Muscle foetal (MFL)	510 <sup>±</sup> 35
	Muscle tumoral (MTL)	30 <sup>±</sup> 10
RAT	Muscle normal (MNR)	450 <sup>±</sup> 60
	Muscle foetal (MFR)	471 <sup>±</sup> 21
	Muscle tumoral (MTR)	60 <sup>±</sup> 20
VACHE	Muscle lisse (MLV)	80 <sup>±</sup> 10
	Muscle foetal (MFV)	661 <sup>±</sup> 21
HUMAIN	Muscle foetal (MFH)	414 <sup>±</sup> 10
	Muscle tumoral (MTH)	90 <sup>±</sup> 8

TABLEAU II-1 : Activités ATPasiques spécifiques dépendantes du calcium de différentes myosines.

Hydrolyse de l'ATP pendant 5 minutes dans les conditions expérimentales de Green et Mommaerts (1953). Dosage de l'ATP hydrolysé par mesure colorimétrique du phosphate inorganique libéré (Pi), selon Fiske et Subbarow (1925).

MBL : muscle squelettique blanc de Lapin

MNR : muscle squelettique rouge de Rat

MLV : muscle lisse d'utérus de Vache



MYOSINE		nmoles de Pi x min <sup>-1</sup> x mg <sup>-1</sup>
COEUR	Ventricule gauche ("myosine-V <sub>G</sub> ")	144 <sup>+10</sup>
DE	Ventricule droit ("myosine-V <sub>D</sub> ")	233 <sup>+30</sup>
PORC	Septum ("myosine-M")	137 <sup>+21</sup>

TABLEAU II-2 : Activités ATPasiques spécifiques dépendantes du calcium des myosines ventriculaires de Porc. Hydrolyse de l'ATP pendant 5 minutes dans les conditions expérimentales de Green et Mommaerts (1953). Dosage de l'ATP hydrolysé par mesure colorimétrique du phosphore inorganique (Pi), selon Fiske et Subbarow (1925).

Méthode de dosage de l'ATP hydrolysé	nmoles de Pi x min <sup>-1</sup> x mg <sup>-1</sup>	
	"myosine V <sub>D</sub> "	"myosine V <sub>G</sub> "
Phosphate inorganique libéré (méthode colorimétrique)	223	144
Photons émis après hydrolyse de l'ATP non consommé (méthode de bioluminescence)	216	152

TABLEAU II-3 : Activités ATPasiques spécifiques dépendantes du calcium des myosines ventriculaires de Porc, obtenues après 5 minutes de réaction dans les conditions de Green et Mommaerts (1953). Dosage de l'ATP hydrolysé par mesure colorimétrique du phosphore inorganique libéré, selon Fiske et Subbarow (1925). Dosage de l'ATP hydrolysé par mesure des photons émis lors de la réaction de l'ATP non consommé avec le couple luciférine/luciférase (bioluminescence).



phore inorganique libéré

. méthode de l'ATP non consommé par mesure des photons émis lors de la réaction de bioluminescence (AT VI Bb)

Les valeurs obtenues par ces deux méthodes pour un même temps de réaction (5 minutes) sont similaires que ce soit pour la "myosine-V<sub>D</sub>" ou pour la "myosine-V<sub>G</sub>" (Tableau II-3).

La méthode de dosage par bioluminescence nous a de plus permis de tracer les courbes de l'ATP consommé, pour les deux myosines, en fonction du temps (Figure II-1). Ces courbes, non linéaires, révèlent que les vitesses d'hydrolyse sont différentes entre la "myosine-V<sub>D</sub>" et la "myosine-V<sub>G</sub>" et qu'elles diminuent en fonction du temps.

*β) Dans les conditions expérimentales modifiées de Pope et al., (1980) (AT-VI-Aa)*

Nous avons légèrement changé les conditions expérimentales précédentes en abaissant le pH à 8,0, la concentration en KCl à 0,4 M et en augmentant les temps de réaction. Dans ces conditions les valeurs des activités ATPasiques spécifiques de la "myosine-V<sub>D</sub>") et de la "myosine-V<sub>G</sub>" du coeur de Porc, par dosage du phosphore inorganique, bien qu'abaissées (temps de réaction plus longs) vérifient toujours que l'activité de la "myosine-V<sub>D</sub>" est supérieure à celle de la "myosine-V<sub>G</sub>" du coeur de porc (Tableau II-4).

Dans tout ce travail sur les mesures de l'activité ATPasique dépendante du calcium, les valeurs varient d'une préparation à l'autre comme en témoignent les erreurs absolues, mais dans tous les cas étudiés (11 pré-

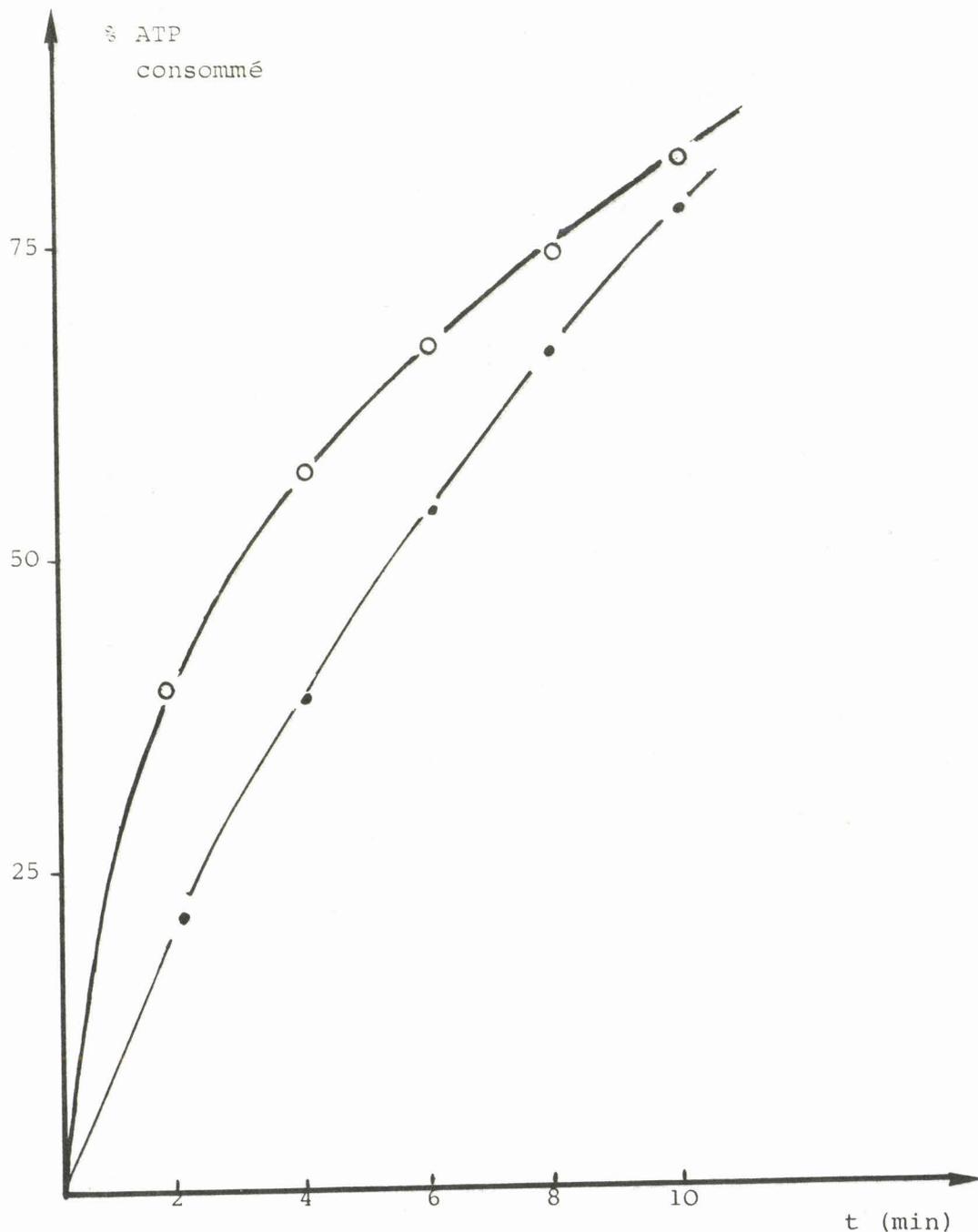


FIGURE II-1 : Vitesse d'hydrolyse de l'ATP par la "myosine-V<sub>G</sub>" (-•-•-) et la "myosine-V<sub>D</sub>" (-O-O-) activées par le calcium.

Cette vitesse d'hydrolyse est mesurée par dosage des photons émis (bioluminescence), lors de la réaction de l'ATP non consommé par la myosine, avec le système luciférine/luciférase.



	nombre de nanomoles de Pi x min <sup>-1</sup> x mg <sup>-1</sup>	
	"myosine V <sub>D</sub> "	"myosine V <sub>G</sub> "
Préparation A	67 <sup>±</sup> 5	40 <sup>±</sup> 5
Préparation B	77 <sup>±</sup> 6	48 <sup>±</sup> 5
Préparation C	127 <sup>±</sup> 10	101 <sup>±</sup> 12

TABLEAU II-4 : Activités ATPasiques spécifiques dépendantes du calcium des myosines ventriculaires de Coeur de Porc.

Hydrolyse de l'ATP pendant 11 minutes pour la préparation A, 10 minutes pour la préparation B et 7 minutes pour la préparation C, dans les conditions expérimentales de Pope et al. (1980) modifiées.

Dosage de l'ATP hydrolysé par mesure colorimétrique du phosphore inorganique libéré (Pi), selon Fiske et Subbarow (1925).



parations), nous avons toujours obtenu une valeur de l'activité  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasique de la "myosine- $V_D$ " supérieure à celle de la "myosine- $V_G$ ".

2°) L'ACTIVITE ATP-ASIQUE DEPENDANTE DU POTASSIUM  
( $\text{K}^+$  ATP-ASE)

Les valeurs de l'activité  $\text{K}^+$ -ATPase des myosines ventriculaires droite et gauche ont été déterminées sur deux préparations. A partir de la première préparation, les valeurs déterminées par la technique de bioluminescence montraient des activités  $\text{K}^+$ -ATPasiques similaires pour les deux myosines ventriculaires (233 nmoles  $\text{Pi min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ).

Les valeurs obtenues pour la deuxième préparation que ce soit par dosage du phosphore inorganique libéré ou des photons émis lors de la réaction de bioluminescence (Tableau II-5) sont similaires pour la "myosine- $V_D$ " et la "myosine- $V_G$ ". Ces résultats similaires pour les deux méthodes de dosage sont aussi en accord avec ceux obtenus lors de l'étude des courbes d'activité ATPasique de la myosine ventriculaire en fonction de la concentration en calcium.

3°) ACTIVITE ATP-ASIQUE ACTIVEE PAR L'ACTINE

Les activités ATPasiques dépendantes du calcium qui sont une mesure expérimentale pratique dans une étude comparative, ne sont pas physiologiquement significatives. *In vivo*, seules les activités ATPasiques de la myosine activée par l'actine sont importantes. Nous nous sommes donc attachés à comparer les myosines ventriculaires dans les conditions les plus physiologiques possibles.

myosine	nmoles de Pi x min <sup>-1</sup> x mg <sup>-1</sup>	
	Dosage du Pi libéré par Fiske et Subbarow	Dosage de l'ATP non consommé par bioluminescence
"myosine-V <sub>D</sub> "	20 <sup>+4</sup>	25 <sup>+10</sup>
"myosine-V <sub>G</sub> "	22 <sup>+5</sup>	24 <sup>+10</sup>

TABLEAU II-5 : Activités ATPasiques spécifiques dépendantes du potassium des myosines ventriculaires de coeur de Porc.

Hydrolyse de l'ATP pendant 5 minutes dans les conditions expérimentales de Green et Mommaerts (1953) (pour l'activité ATP asiques Ca<sup>2+</sup> dépendante) en remplaçant le CaCl<sub>2</sub> 10 mM par l'EDTA 1 mM.

Dosage de l'ATP hydrolysé par mesure colorimétrique du phosphore inorganique libéré (Pi) selon Fiske et Subbarow (1925) et par mesure de l'ATP non consommé par mesure des photons libérés lors de la réaction de bioluminescence de la luciférine.

Des études préliminaires nous ont permis de montrer que :

. l'actine globulaire (actine-G) de muscle squelettique de Porc à des concentrations de 2,2 et 4,4  $\mu$ moles n'avait aucun effet sur l'activité ATPasique de la myosine.

. les essais effectués avec différentes actines (du ventricule, de l'oreillette du coeur et du muscle squelettique de Porc) n'ont pas permis de tirer de conclusions quant au pouvoir activateur de ces différentes actines. En effet à 2  $\mu$ moles, l'activité ATPasique de la myosine de muscle squelettique de Porc ("myosine-S") semblerait plus augmentée par la F-actine de muscle squelettique que par la F-actine isolée à partir des ventricules alors que le pouvoir d'activation de ces deux actines serait similaire dans une zone de concentration voisine de 17  $\mu$ moles correspondant aux points de changement de pente des courbes biphasiques obtenues par Pope et al., (1980) (Tableau II-6).

L'étude comparative des myosines ventriculaires du coeur de Porc a été effectuée en présence des différentes actines à plusieurs concentrations. Si les valeurs obtenues pour les actines des différents muscles ne sont pas comparables entre elles, par contre pour une même concentration et quelque soit l'actine-F choisie, les valeurs obtenues entre les myosines ventriculaires droite et gauche peuvent être comparées. Pour les différentes conditions étudiées les valeurs de l'activité ATPasique des "myosine-V<sub>G</sub>" sont toujours supérieures à celles des "myosine-V<sub>D</sub>" (Tableau II-6 et II-7).

Les résultats donnés par Pope et al., (1980) sur la myosine cardiaque de Rat nous avaient permis de choisir les 3 concentrations (2 ; 20 et 40  $\mu$ moles) qui représentent

	nmoles Pi x min <sup>-1</sup> x mg <sup>-1</sup>					
	Actine ventriculaire de coeur de porc			Actine squelettique de porc		
myosine de porc préparation A	2 uM	20 uM	40 uM	2 uM	14 uM	29 uM
"myosine-V <sub>D</sub> "	84	185	59	88	124	108
"myosine-V <sub>G</sub> "	107	167	105	124	199	149
"myosine-S"	373	903	656	626	861	911

TABLEAU II-6 : Activités ATPasiques spécifiques des myosines activées par l'actine.

Hydrolyse de l'ATP pendant 11 minutes dans les conditions expérimentales de Pope et al. (1980).

Dosage de l'ATP hydrolysé par mesure colorimétrique du phosphore inorganique libéré selon Fiske et Subbarow (1925).

	nmoles de Pi x min <sup>-1</sup> x mg <sup>-1</sup>	
	Actine cardiaque de porc (5 uM)	
myosine de porc préparation B	ventricule	oreillette
"myosine V <sub>D</sub> "	28	48
"myosine V <sub>G</sub> "	33	71
"myosine S"	343	500

TABLEAU II-7 : Activités ATPasiques spécifiques des myosines activées par l'actine.

Hydrolyse de l'ATP pendant 11 minutes dans les conditions expérimentales de Pope et al. (1980).

Dosage de l'ATP hydrolysé par mesure colorimétrique du phosphore inorganique libéré selon Fiske et Sabbarow (1925).

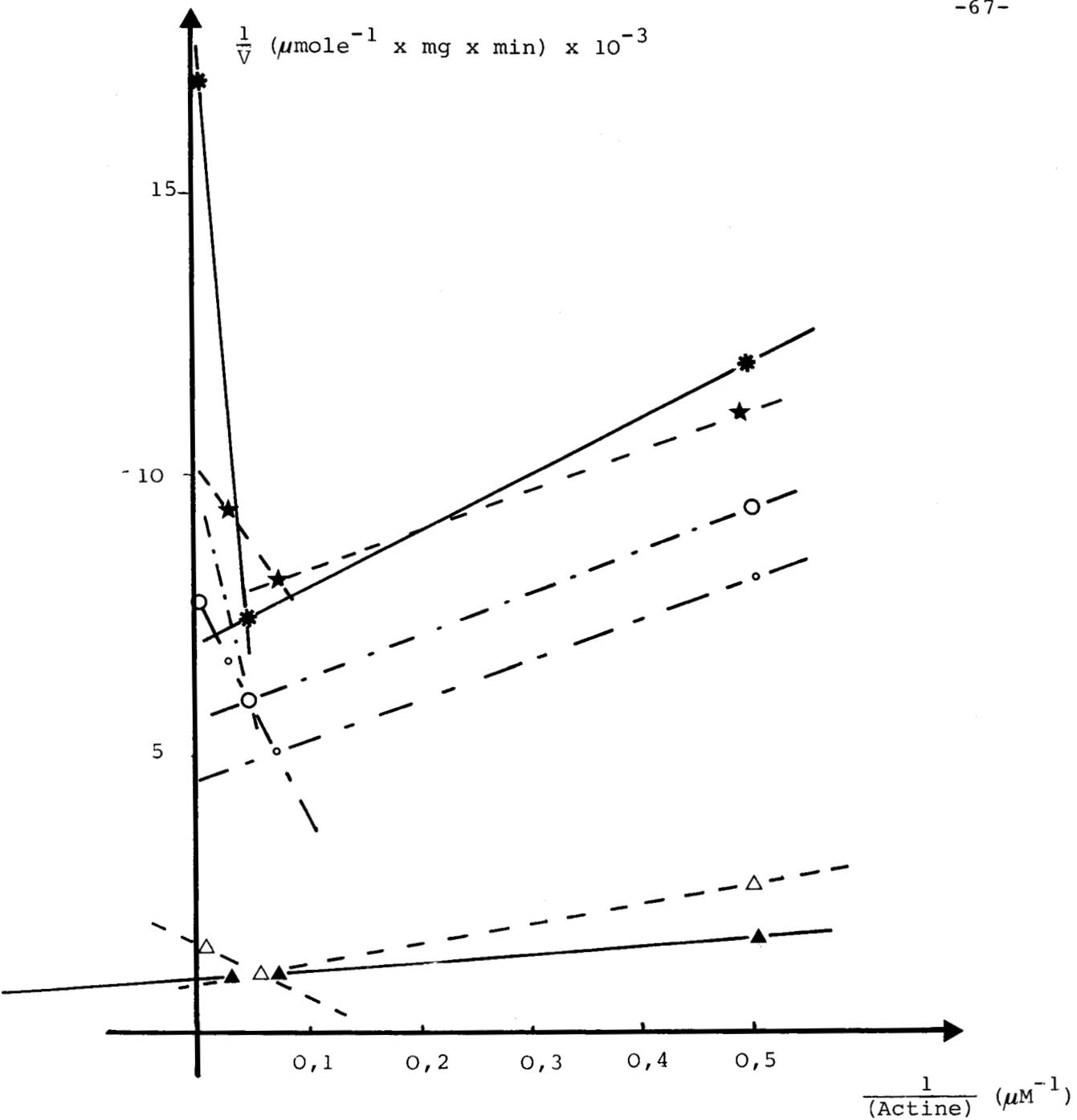
des points caractéristiques de leurs courbes d'activité ATPasique. Les résultats que nous avons obtenus pour les différentes myosines du coeur de Porc activées par l'actine squelettique et l'actine cardiaque ont été rassemblés pour une représentation selon Lineweaver et Burk (Figure II-2). A partir de ces points, on ne peut tirer aucune conclusion quant au " $V_m$ " et au " $K_m$ " des différentes myosines, sauf peut-être pour la "myosine-S" de Porc dont les trois points sont alignés. Nous pouvons noter cependant que les courbes obtenues pour les myosines cardiaques ventriculaires, auriculaires et la myosine squelettique sont biphasiques.

#### 4°) CONCLUSION

*Pour les myosines rapidement préparées et avec un degré de pureté élevé nous pouvons noter :*

- pour les activités ATPasiques dépendantes du calcium, dans tous les cas étudiés, la capacité à hydrolyser l'ATP est supérieure pour la "myosine- $V_D$ " par rapport à la "myosine- $V_G$ ". La méthode de dosage par bioluminescence a révélé que la capacité à hydrolyser l'ATP n'est pas une fonction linéaire du temps. Ceci est confirmé par les mesures des activités ATPasiques des myosines ventriculaires par méthode de dosage du phosphore inorganique à différents temps de réaction. D'autre part, ces mesures confirment également que la partie septum du coeur et le ventricule gauche sont de même origine.

- pour les activités ATPasiques dépendantes du potassium, même si des différences significatives ont été observées d'une préparation à l'autre, les valeurs des activités ATPasiques des myosines ventriculaires obtenues pour une même préparation sont identiques aux erreurs de mesures près.



**FIGURE II-2** : Courbes de l'activité ATPasique spécifique des différentes myosines activées par l'actine (squelettique et cardiaque), dans la représentation de Lineweaver et Burk (1934).

Hydrolyse de l'ATP pendant 11 minutes dans les conditions expérimentales de Pope *et al.* (1980) modifiées (KCl = 30 mM).

- \*-\* "myosine- $V_D$ " activée par l'actine cardiaque
- ★-★ "myosine- $V_D$ " activée par l'actine squelettique
- "myosine- $V_G$ " activée par l'actine cardiaque
- "myosine- $V_G$ " activée par l'actine squelettique
- △-△ "myosine-S" activée par l'actine cardiaque
- ▲-▲ "myosine-S" activée par l'actine squelettique

- pour les activités ATPasiques activées par l'actine, l'actine-G n'a aucun effet sur les activités ATPasiques des myosines ventriculaires. Quelque soit la concentration et l'actine utilisée, la capacité à hydrolyser l'ATP de la "myosine-V<sub>G</sub>" est supérieure à celle de la "myosine-V<sub>D</sub>".

## II- FILAMENTS SYNTHETIQUES

Une autre caractéristique de la molécule de myosine est de former des filaments synthétiques c'est-à-dire des filaments qui se reconstituent *in vitro* par diminution de la force ionique. La formation des filaments est due à un phénomène d'association, les molécules de myosine pouvant être "tête-bêche" ou "tête-queue" (Figure II-3). Dans le premier cas d'association si les parties C-terminales des molécules de myosines sont différentes, les longueurs des filaments formés doivent aussi être différentes.

Pour comparer les parties C-terminales des molécules de "myosine-V<sub>D</sub>" et de "myosine-V<sub>G</sub>" (respectivement des préparations de myosine isolée du ventricule droit et du ventricule gauche du coeur de Porc), nous avons étudié la formation des filaments synthétiques pour ces myosines. Les myosines utilisées pour cette étude sont des aliquots des préparations sur lesquelles nous avons effectué des mesures d'activité ATPasique. Les filaments synthétiques sont formés à partir des préparations de myosine dans les mêmes concentrations et par des dilutions identiques avec le même tampon (AT VII-A). Les filaments synthétiques obtenus pour la "myosine-V<sub>D</sub>" comme pour la "myosine-V<sub>G</sub>" du coeur de Porc sont bipolaires (Figure II-4). La partie médiane des filaments est



ASSOCIATION "TETE-QUEUE"



ASSOCIATION "TETE-BECHE"

FIGURE II-3 : Les deux modes d'association possible de molécules de myosines, les sites d'interaction se trouvant sur la LMM (Pepe (1967) ; Harrington et al. (1972)).

In vitro la formation et la détermination de la longueur des filaments est le résultat d'une compétition des sites d'interaction.

Si l'interaction initiale favorise l'association "tête-bêche", lors de la dilution lente la position des têtes globulaires de la myosine associée "tête-bêche" impose aux autres molécules de myosines de s'associer "tête-queue" conduisant à l'allongement du filament jusqu'à épuisement des molécules de myosine libres présentes.

Lors de la dilution rapide la majeure partie des molécules s'associent "tête-bêche" et les filaments formés sont plus courts et plus homogènes dans leur longueur (Pepe (1967) ; Harrington et al. (1973)).



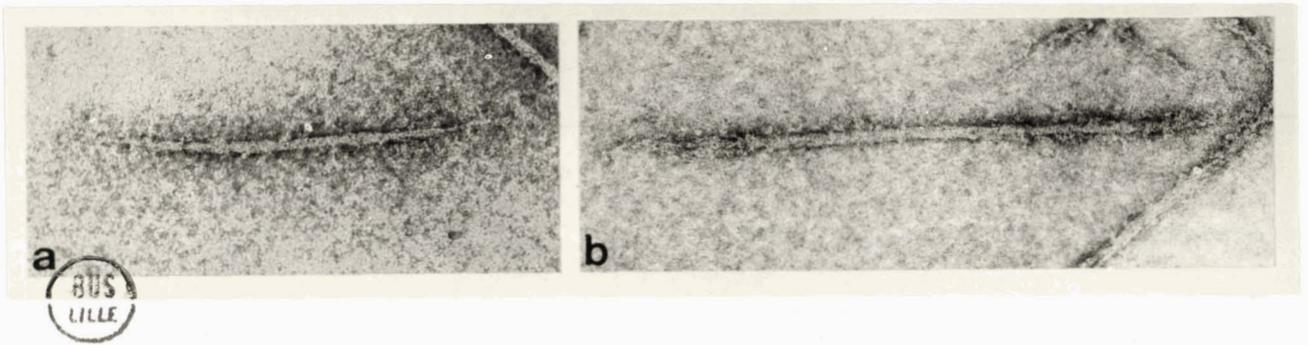


FIGURE II-4 : Filaments synthétiques de la myosine cardiaque de Porc précipitée par dilution rapide, à partir d'une solution de myosine (à une concentration de 1 mg/ml) dans le tampon Tris/Cl 50 mM pH 7,5 ; KCl 0,5 M, pour obtenir une concentration en KCl de 0,1 M ;  $MgCl_2$  0,01 M (le pH est conservé à 7,5) pour la

(a) "myosine- $V_D$ "

(b) "myosine- $V_G$ "

(Grossissement par 120 000)



FIGURE II-5 : Schéma moléculaire de filament synthétique court bipolaire formé par dilution rapide. La partie médiane est lisse et les deux extrémités élargies en éventail représentent l'ensemble des têtes globulaires dirigées dans le même sens.

(représentation selon Pollard (1975))

lisse et les deux extrémités s'élargissent en éventail. Les extrémités renflées du filament représentent l'ensemble des têtes globulaires (HMM-S<sub>1</sub>) dirigées dans le même sens, les molécules de myosine cardiaque étant assemblées tête-bêche (Figure II-5).

Une observation de la longueur des filaments synthétiques de myosines cardiaques révèle la présence de filaments beaucoup plus courts pour la "myosine-V<sub>D</sub>" par rapport à ceux de la "myosine-V<sub>G</sub>" (Figure II-6). Une étude statistique des longueurs a donc été entreprise sur environ 400 filaments pour la "myosine-V<sub>D</sub>" ainsi que pour la "myosine-V<sub>G</sub>". Un calcul d'erreur effectué sur la mesure des longueurs donne une erreur relative  $\frac{\Delta L}{L}$  de l'ordre de 11%. Pour les filaments les plus courts, l'erreur absolue étant de 30 nm, nous avons pour une étude de la fréquence des longueurs des filaments choisi une largeur de classe supérieure à  $2 \Delta L$  soit 100 nm. Cette étude nous a permis de tracer les courbes de distribution représentées sur la Figure II-7. Ces courbes mettent en évidence que les filaments sont répartis en cinq familles, les maxima des pics de chaque famille étant distants de 160 nm. L'intégration des différents pics permet de quantifier le nombre de filaments dans chaque famille (Tableau II-8).

Nous pouvons noter que :

- 94 % des filaments sont répartis dans les quatre premières familles.

- la proportion des filaments courts de longueur moyenne  $280 \pm 30$  nm est plus forte pour la "myosine-V<sub>D</sub>" (50,3 %) que pour la "myosine-V<sub>G</sub>"

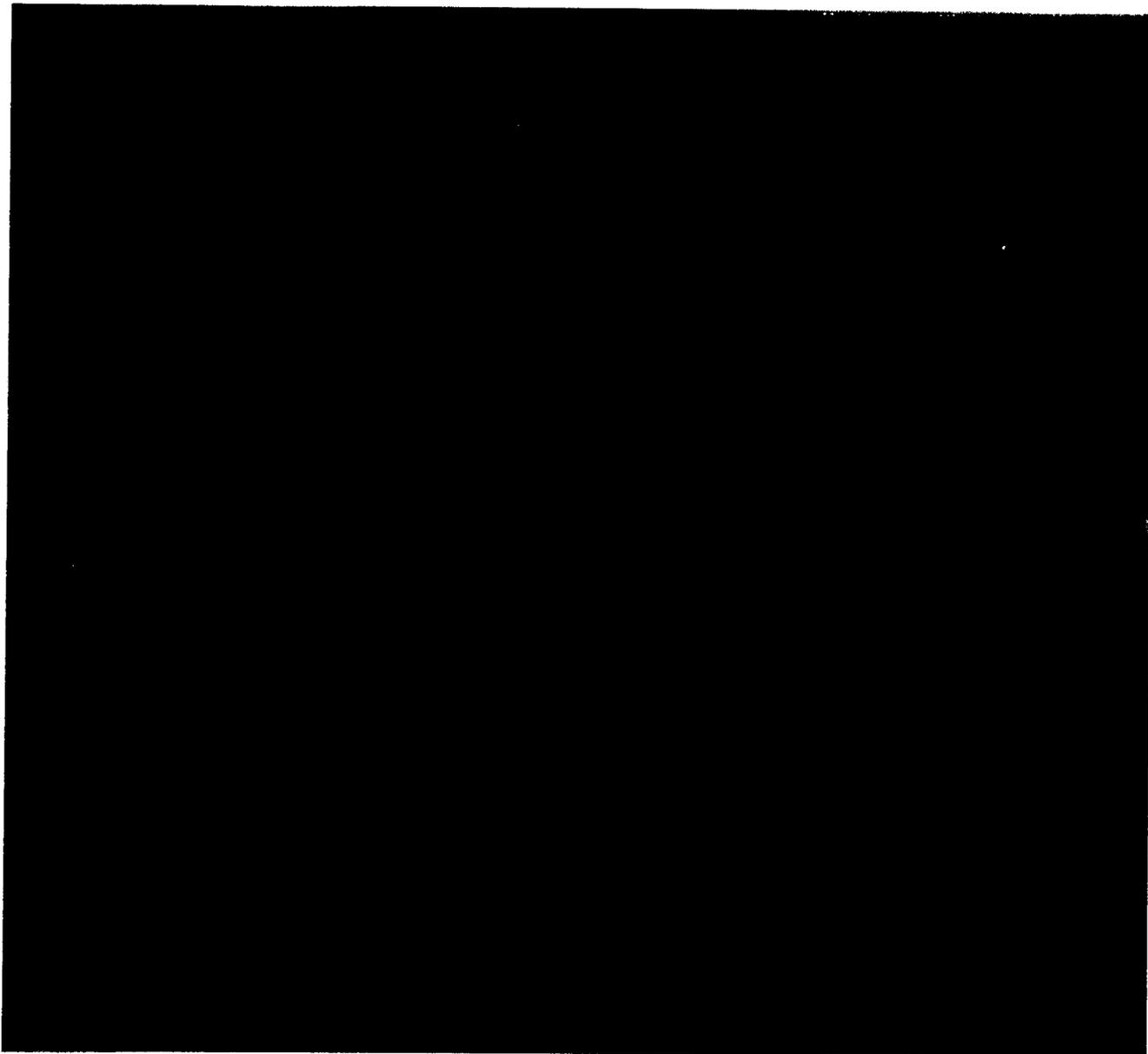


FIGURE II-6 : Microscopie électronique en contraste négatif, des filaments synthétiques de myosine ventriculaire de Coeur de Porc formés par dilution rapide.

- (a) filaments de "myosine- $V_D$ "
- (b) filaments de "myosine- $V_G$ "

On note la présence de filaments très courts (►) pour la "myosine- $V_D$ ".

(grossissement pour les deux figures : x 120 000)

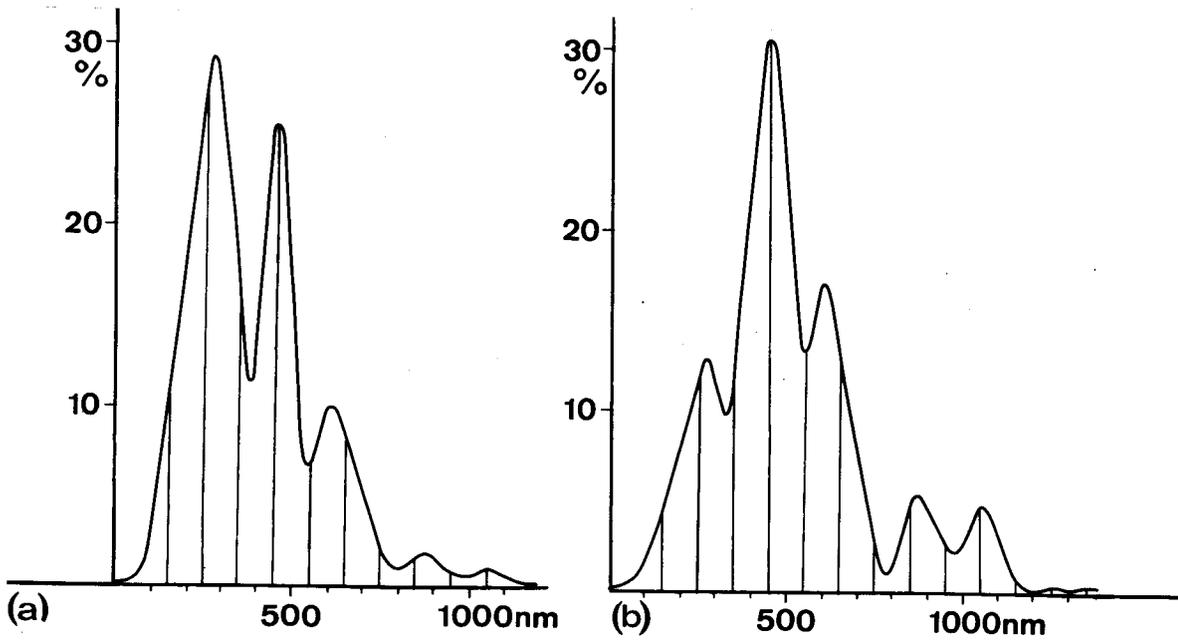


FIGURE II-7 : Distribution en fréquence de la longueur de 400 filaments synthétiques de myosine pour une largeur de classe de 100 nm.

(a) filaments de la "myosine- $V_D$ "

(b) filaments de la "myosine- $V_G$ "

En abscisse : longueur en nanomètres des filaments

En ordonnée : nombre de filaments, ramenés à 100 qui ont une longueur comprise entre 100 n et 100 (n+1)

$0 < n \leq 12$  pour la "myosine- $V_D$ "

$0 < n \leq 15$  pour la "myosine- $V_G$ "

myosine	Longueur du filament correspondant au maximum du pic dans la courbe de répartition					
	280 nm	450 nm	600 nm	860 nm	1060 nm	1350 nm
"myosine-V <sub>D</sub> "	50,2	27,5	19,5	1,7	1	0
"myosine-V <sub>G</sub> "	20,9	40,4	27,3	5,9	5	0,6

TABLEAU II-8 : Pourcentage de filaments synthétiques ayant une longueur moyenne égale à la valeur du maximum d'un pic de la courbe de répartition.  
 Le nombre de filaments ayant une longueur moyenne correspondante au maximum d'un pic, est calculé par intégration du pic. Les courbes de répartition sont tracées, à partir de 400 filaments, en prenant une largeur de classe de 100 nm.

- le maximum de la distribution pour la "myosine-V<sub>G</sub>" correspond à des filaments de longueur moyenne de 450<sup>±</sup>30 nm (40,4 %).

Ces études ont été effectuées sur cinq préparations des myosines. Elles nous ont permis de constater que si les préparations de "myosine-V<sub>D</sub>" et de "myosine-V<sub>G</sub>" étaient telles que le rapport de densité optique 280/260 nm est inférieur à 1,5, ou que les myosines n'étaient pas rapidement préparées et analysées, ces différences, entre les myosines ventriculaires) n'étaient plus mises en évidences.

L'étude d'une préparation de la myosine extraite du septum révèle des résultats analogues à ceux obtenus pour la "myosine-V<sub>G</sub>". L'étude des filaments synthétiques et les valeurs de l'activité Ca<sup>2+</sup>-ATPasique montrent bien que la myosine du septum et du ventricule gauche sont de même origine.

#### EN CONCLUSION

- Pour la "myosine-V<sub>D</sub>" comme pour la "myosine-V<sub>G</sub>" les filaments synthétiques reconstitués sont bipolaires.

- L'étude de la longueur des filaments révèle une répartition différente avec beaucoup plus de filaments plus courts pour la "myosine-V<sub>D</sub>".

*L'étude d'une préparation révèle pour les filaments de la "myosine-M" des résultats similaires à ceux obtenus pour la "myosine-V<sub>G</sub>", ce qui confirme que ces parties du coeur sont de même origine.*

### III - ETUDE DES HYDROLYSATS ENZYMATIQUES DES MYOSINES

Pour préparer les têtes globulaires des myosines (HMM-S<sub>1</sub>), nous avons soumis les myosines ventriculaires droites et gauches à l'action d'endopeptidases. (Elastase; pronase, thermolysine, pepsine et chymotrypsine) dans différentes conditions de température, de temps d'hydrolyse et de rapport enzyme - substrat. Parmi tous ces essais, nous avons sélectionné les actions de la chymotrypsine et de la pepsine car les hydrolyses ont été effectuées en parallèle sur les deux préparations de myosines ventriculaires isolées d'un même coeur. Pour cette étude les myosines préparées sont identiques du point de vue pureté à celles décrites pour les expérimentations précédentes.

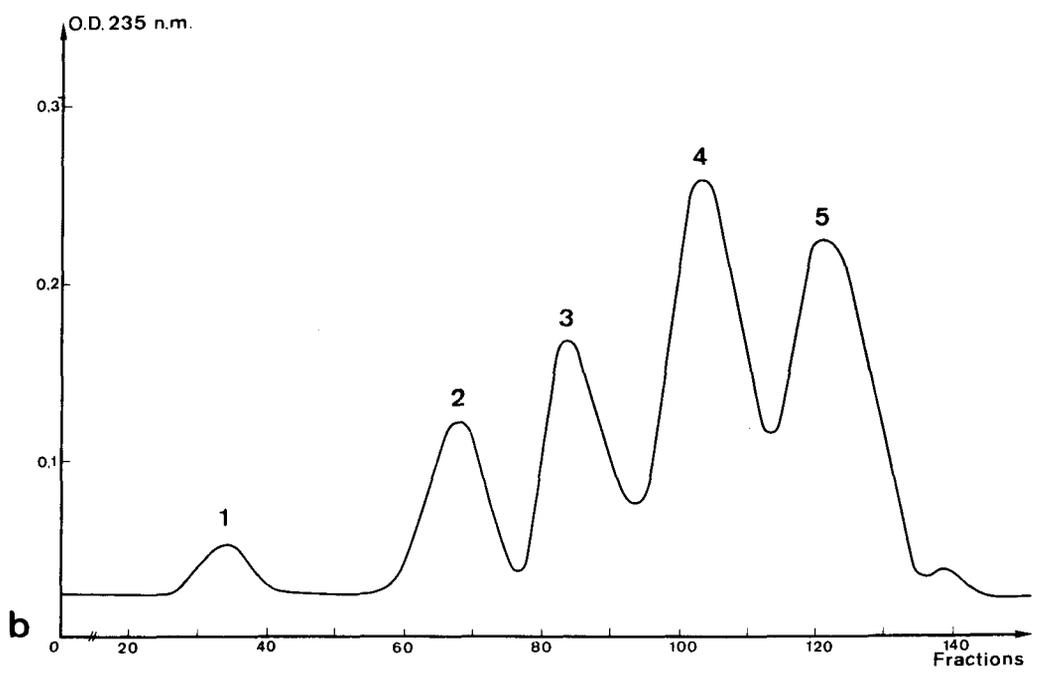
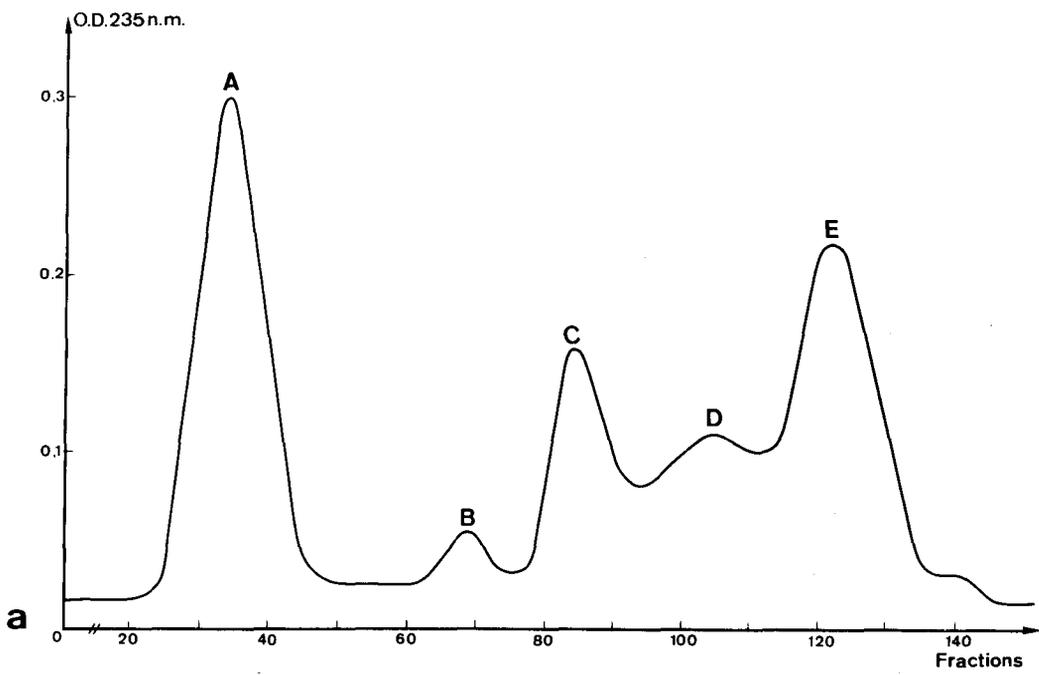
#### 1°) ACTION DE LA CHYMOTRYPSINE

Les expériences étant faites dans le but de préparer le sous-fragment HMM-S<sub>1</sub> des myosines ventriculaires, l'action de la chymotrypsine a été limitée à 5 minutes.

##### a) Expérience en milieu non dissociant :

α) *Chromatographie de gel filtration sur colonne de Sépharose 4B (AT X-H) :*

Seule la fraction soluble de l'hydrolysat qui précipite par relargage au sulfate d'ammonium entre 0-67 % de saturation a été analysée. Les profils d'élution pour la "myosine-V<sub>D</sub>" et la "myosine-V<sub>G</sub>" (Figure II-8) ne montrent pas de différences dans les valeurs de Kav (définition AT X A) des différents pics. Les valeurs sont de 0 ; 0,33 ; 0,57 ; 0,77 et 1,00 pour les pics A à E de l'hydrolysat chymotrypsique de la "myosine-V<sub>D</sub>" et pour les pics 1 à 5 de l'hydrolysat chymotrypsique de la "myosine-V<sub>G</sub>".



**FIGURE II-8** : Profil d'élution, de la fraction précipitable (entre 0 et 67 % de saturation en sulfate d'ammonium) de l'hydrolysât limité par la chymotrypsine de la myosine ventriculaire de Porc, obtenu par chromatographie de gel filtration sur colonne de sépharose 4B en tampon Tris/HCl 15 mM de pH 7,5 ; KCl 0,5 M ; EDTA 1 mM ; DTT 2,5 mM ; azide de sodium 200 mg/l et à 4°C.

(a) : "myosine- $V_D$ " ; (b) "myosine- $V_G$ "  
 Colonne (100 x 3,5 cm) ; débit 19,2 ml/h ; fraction  $\approx$  3,8 ml. Profil d'élution établi par spectrophotométrie à 235 nm.



Toutefois, bien que des valeurs de  $K_{av}$  des pics A à E et 1 à 5 soient identiques, il n'en est pas de même quant aux valeurs des densités optiques lues à 235 nm. Par exemple :

. le pic A ( $K_{av} = 0$ ) est beaucoup plus important que le pic 1.

. les pics B et D ( $K_{av} = 0,33$  et  $0,77$  respectivement) sont toujours plus petits que leurs homologues 2 et 4.

. les pics C et E ( $K_{av} = 0,57$  et  $1,00$ ) sont approximativement identiques aux pics 3 et 5 respectivement.

β) *Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS :*

La composition en polypeptides des différents pics a été étudiée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (Figure II-9). Les électrophorégrammes montrent nettement que la répartition en polypeptides analogues est très souvent différente pour des pics analogues.

L'exemple de la comparaison de deux fractions "homologues" est caractéristique.

. pic D de l'hydrolysate de la "myosine- $V_D$ " et pic 4 de l'hydrolysate de la "myosine-V " : absence totale pour la fraction D de la bande polypeptidique dont la migration électrophorétique correspond à un poids moléculaire de 100.000 daltons. Il n'en est pas de même si l'on compare les bandes polypeptidiques dont les mobilités électrophorétiques correspondent à des poids moléculaires

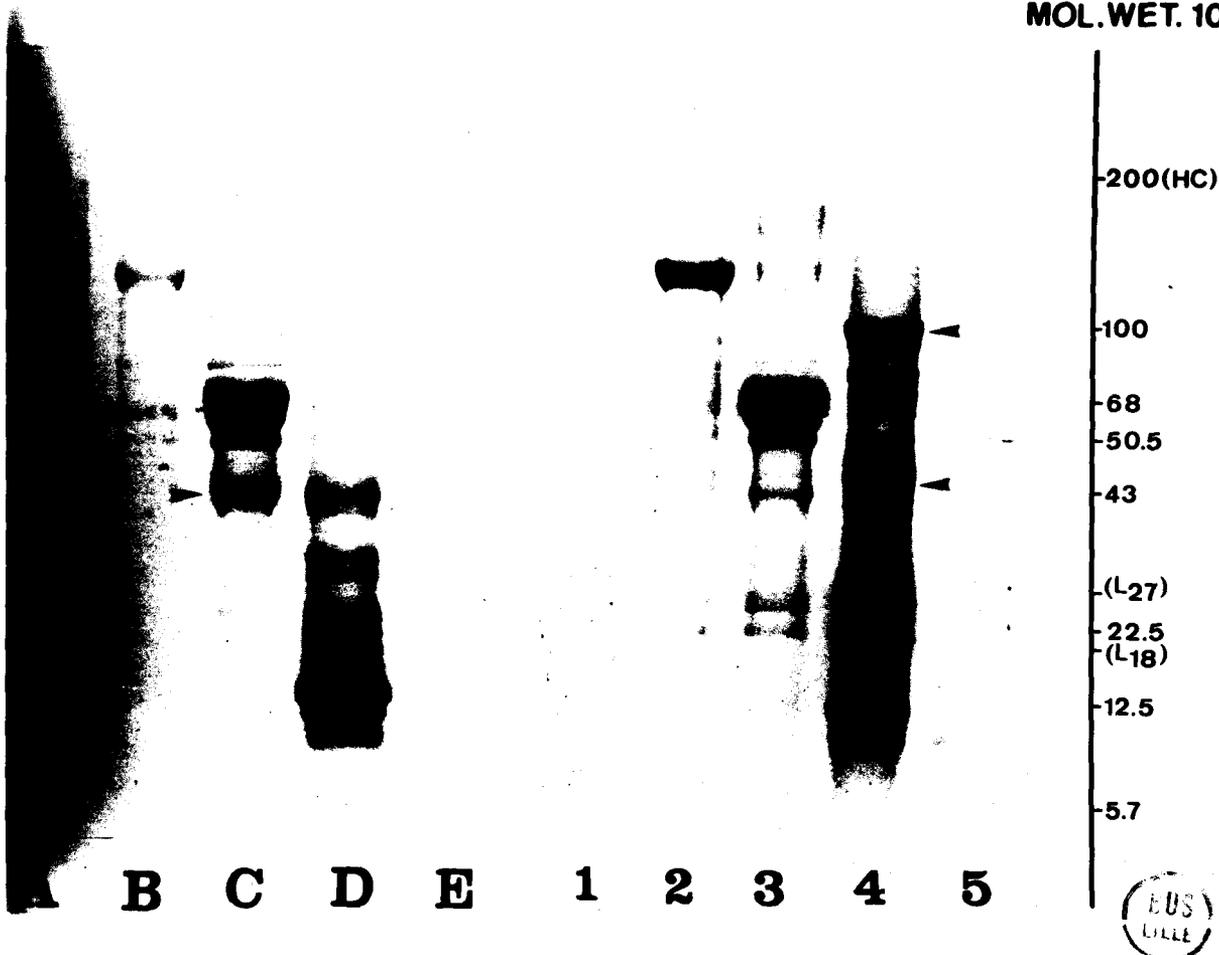


FIGURE II-9 : Electrophorèse en gel gradient (5-30 %) de polyacrylamide à pH 8,4 en présence de SDS.

A, B, C, D, E : représentent les fractions isolées, par chromatographie de gel filtration sur colonne de sépharose 4B, de la fraction soluble (0-67 % de saturation en sulfate d'ammonium) de l'hydrolysat limité, de la "myosine- $V_D$ ". par la chymotrypsine.

1, 2, 3, 4, 5: représentent les fractions isolées dans les mêmes conditions de la fraction soluble (0-67 % de saturation en sulfate d'ammonium) de l'hydrolysat limité de la "myosine- $V_G$ " par la chymotrypsine.

HC : correspond aux chaînes lourdes de la myosine (200 000 daltons).

HMM- $S_1$  : correspond à la partie des chaînes lourdes contenant la tête globulaire (115 000 daltons).

$L_{27}$  : correspond à la chaîne légère de plus haut poids moléculaire de la myosine ventriculaire de Porc (27 000 daltons).

$L_{18}$  : correspond à la chaîne légère de plus faible poids moléculaire de la myosine ventriculaire de Porc (18 000 daltons).

► : correspond à quelques uns des peptides différents, soit dans la présence, soit dans la concentration relative, entre les fractions éluées à un même  $K_{av}$  de la "myosine- $V_D$ " et de la "myosine- $V_G$ ".

de 43.000 et 25.000 daltons.

. pic B de l'hydrolysate de la "myosine-V<sub>D</sub>" et pic 2 de l'hydrolysate de la "myosine-V<sub>G</sub>" : présence dans les deux pics homologues d'une bande polypeptidique correspondant à un poids moléculaire d'environ 110.000 daltons ainsi que des bandes correspondant à 65.000 daltons environ. Si l'on compare l'intensité de ces différentes bandes protéiques, nous pouvons noter que si la bande de 110.000 daltons est beaucoup plus intense pour le pic 2, la bande de 65.000 daltons est plus intense pour le pic B.

A partir du profil d'élution et de l'électrophorégramme nous notons :

. que le rendement de production du sous-fragment HMM-S<sub>1</sub> (poids moléculaire de 110.000 daltons) est environ deux fois plus faible pour la "myosine-V<sub>D</sub>" que pour la "myosine-V<sub>G</sub>".

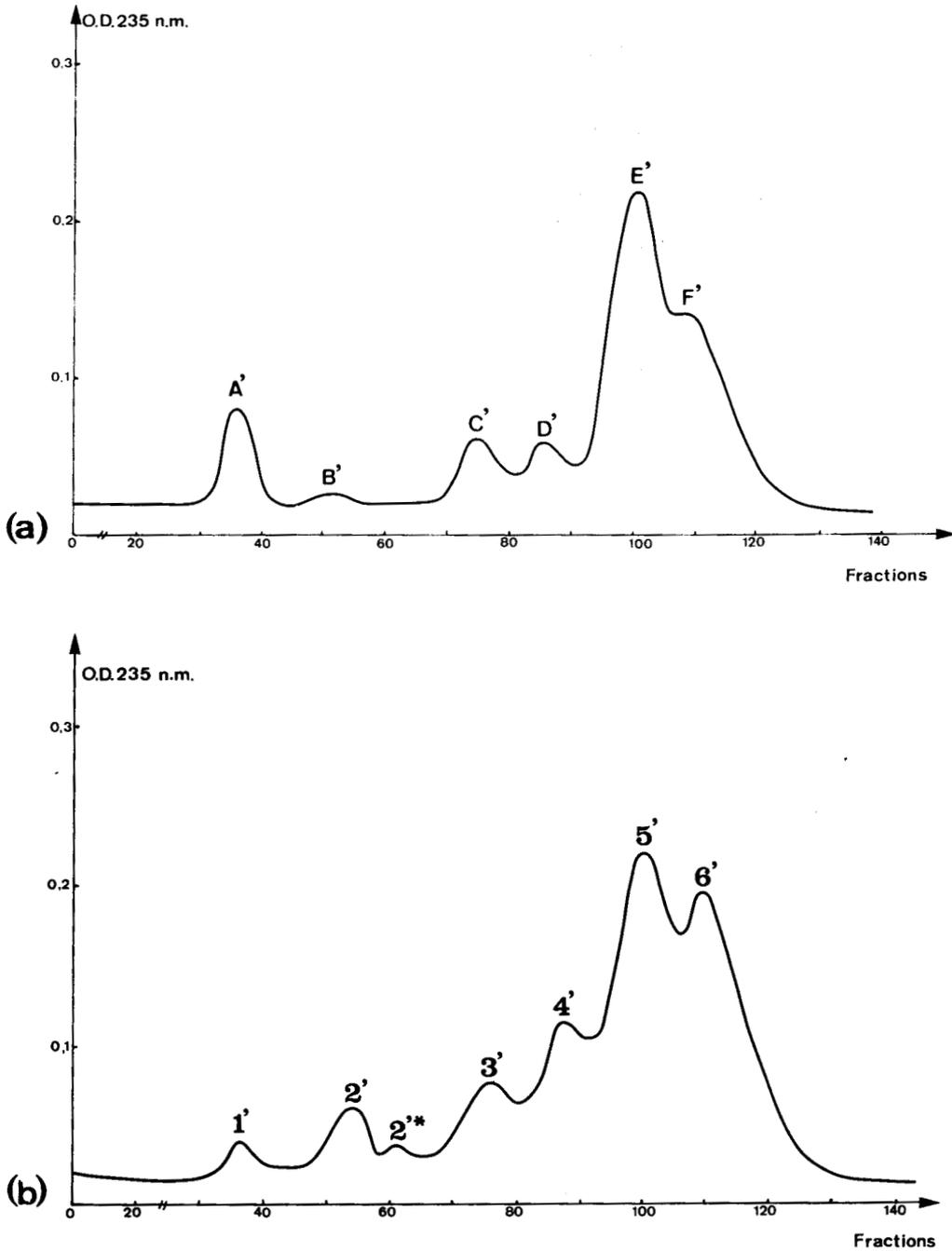
. que, si certains polypeptides sont présents pour les deux hydrolysats, ils ne le sont pas dans la même proportion.

b) Expérience en milieu dissociant :

α) Séparation par chromatographie de gel filtration sur Sēpharose 4B en présence d'urée 4 M :

Les profils d'élution représentés sur la Figure II-10 montrent :

. que l'hydrolysate chymotrypsique de la "myosine-V<sub>D</sub>" (schéma a de la Figure II-10) peut être séparé en six pics



**FIGURE II-10** : Profil d'élution, (de la fraction précipitable entre 0 et 67 % de saturation en sulfate d'ammonium) de l'hydrolysate limité par la chymotrypsine de la myosine ventriculaire de Porc, obtenu par chromatographie de gel filtration sur colonne de sêpharose 4B en tampon Tris/HCl 15 mM de pH 7,5, urêe 4 M ; KCl 0,5 M ; EDTA 1 mM ; DTT 2,5 mM ; azide de sodium 200 mg/ml et à 4°C.

(a) : "myosine- $V_D$ " ; (b) "myosine- $V_G$ "  
 Colonne (100 x 3,5 cm) ; débit 19,2 ml/h ; fraction 13,8 ml. Profil d'élution établi par spectrophotométrie à 235 nm.



(A' à F') dont les valeurs de Kav sont respectivement de 0; 0,27; 0,50; 0,66; 0,77 et 0,86

. que l'hydrolysate chymotrypsique de la "myosine-V<sub>G</sub>" (schéma b de la Figure II-10- peut être séparé en 7 pics (1'; 2' et 2'<sup>\*</sup>; 3'; 4'; 5' et 6') dont les valeurs de Kav sont respectivement 0; 0,20; 0,30; 0,50; 0,66; 0,77 et 0,86.

Toutefois, comme nous l'avons noté pour la chromatographie en milieu non dissociant, les profils d'élution obtenus par mesure de la densité optique à 235 nm montrent des différences caractéristiques, comme par exemple :

. à Kav = 0, le pic A' ("myosine-V<sub>D</sub>") est beaucoup plus important que le pic 1' ("myosine-V<sub>G</sub>").

. à Kav = 0,86, les pics F' ("myosine-V<sub>D</sub>") et 6' ("myosine-V<sub>G</sub>") ne sont pas dans le même rapport que les pics voisins (E' et 5') élués à Kav = 1.

β) *Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS :*

Comme précédemment, les fractions obtenues après élution des hydrolysats de la colonne de Sépharose 4B, ont été étudiées en électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (Figure II-11).

Certes, la présence de sels (urée 4 M) ne permet pas une excellente migration électrophorétique. Cependant, il est possible de retrouver des différences significatives comme dans le cas des fractionnements par gel filtration en l'absence d'urée 4 M. Par exemple :

. à Kav = 0,5, les pics C' pour l'hydrolysate de

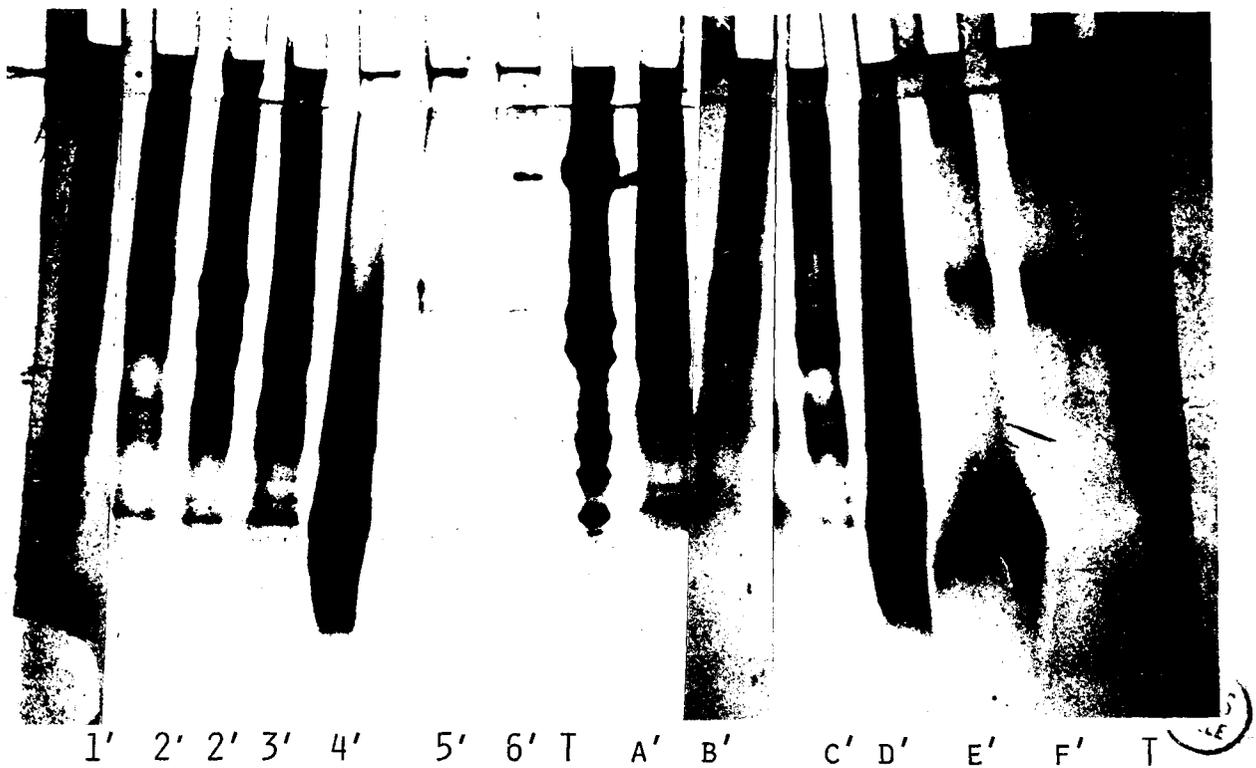


FIGURE II-11 *Electrophorèse sur gel en gradient de polyacrylamide ( 5 à 30% ) en présence de SDS à pH 8,4*  
A' , B' , C' , D' , E' et F' représentent les fractions isolées par chromatographie de gel filtration sur colonne de Sépharose 4 B en présence d'agent dissociant ( urée 4 M ) de la fraction soluble de l'hydrolysate obtenu après action limitée de la chymotrypsine sur la "myosine-V<sub>D</sub>".  
1' , 2' , 2' , 3' , 4' , 5' et 6' représentent les fractions isolées dans les mêmes conditions de la fraction soluble de la "myosine-V<sub>G</sub>".  
T est le témoin de migration qui est un extrait brut de préparation d'actomyosine de muscle utérin de Truie . Notons que ce témoin permet de définir le poids moléculaire des nombreux polypeptides obtenus à partir des myosines cardiaques.  
➤ indique les peptides qui sont différents dans les fractions de même Kav ( Absence ou présence en quantités différentes.

la "myosine-V<sub>D</sub>" et 3' pour l'hydrolysats de la "myosine-V<sub>G</sub>" montrent que les bandes polypeptidiques présentes ne sont pas dans les mêmes rapports d'intensité.

. à Kav = 0,66, les compositions en bandes polypeptidiques des pics D' ("myosine-V<sub>D</sub>") et 4' ("myosine-V<sub>G</sub>") sont différentes. Il y a absence d'une bande polypeptidique de 30.000 daltons environ pour le pic D'.

*L'hydrolyse par la chymotrypsine, effectuée sur huit préparations différentes de myosines ventriculaires (préparation nous ayant déjà permis les études de mesure d'activité ATPasique et des filaments synthétiques), nous a permis de noter dans tous les cas des différences entre les "myosine-V<sub>D</sub>" et "myosine-V<sub>G</sub>".*

## 2°) ACTION DE LA PEPSINE

Il était intéressant de comparer la susceptibilité d'hydrolyse des chaînes lourdes des myosines ventriculaires par des enzymes de spécificité plus large. Dans ce but les préparations de myosines ventriculaires ont été soumises à l'action de la pepsine (AT IX-H). Seule, la fraction soluble des hydrolysats qui précipite par relargage au sulfate d'ammonium entre 0-67 % de saturation a été étudiée.

α) Chromatographie de gel filtration sur colonne de Sépharose 4 B :

Les parties solubles des hydrolysats des "myosine-V<sub>D</sub>" et "myosine-V<sub>G</sub>" ont été chromatographiées par gel filtration sur colonne de Sépharose 4 B dans les conditions décrites (AT X-H).

Les profils d'élution obtenus, représentés Figure II-12 montrent les différences obtenues dans les valeurs de  $K_{av}$  des fractionnements des hydrolysats :

. la "myosine- $V_D$ " qui comporte cinq pics (A à E) dont les valeurs de  $K_{av}$  sont 0,03; 0,33; 0,58; 0,87 et 1,0.

. de la "myosine- $V_G$ " qui comporte cinq pics (1, 2, 3, 3\* et 4) dont les valeurs de  $K_{av}$  sont 0,03; 0,33; 0,47; 0,58 et 0,87.

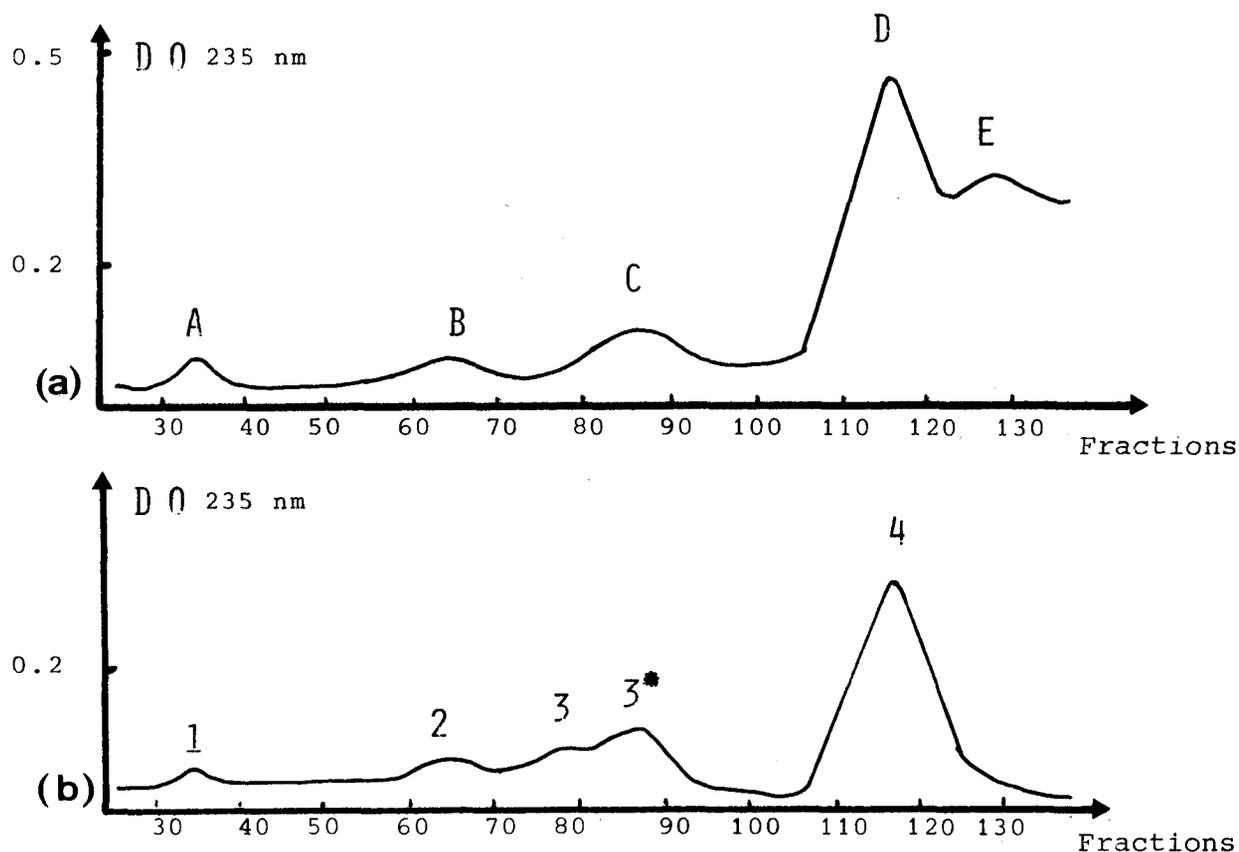
Si l'on compare pour un même  $K_{av}$ , les valeurs des densités optiques lues à 235 nm, nous notons également des différences comme par exemple :

. à  $K_{av} = 0,03$ , le pic A est plus important que le pic 1.

. à  $K_{av} = 0,58$ , le pic 3 est plus important que le pic C.

*β) L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS :*

Les fractions obtenues après chromatographie sur colonne de Sépharose 4 B ont été étudiées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS à pH 8,4. Seules, les fractions D et 4 avaient été obtenues en quantité suffisante pour leur étude comparative sur gel. L'électrophorégramme montre pour la fraction 4 la présence d'une bande de 30.000 daltons environ qui n'est pas observée pour la fraction D.



**FIGURE II-12** Profil d'élution de la chromatographie de gel filtration sur colonne de Sēpharose 4 B des fractions solubles des hydrolysats obtenus après action limitée de la pepsine des myosines ventriculaires de Porc. La chromatographie est effectuée en tampon KCl 0,5 M ; EDTA 1 mM ; NaN<sub>3</sub> 3mM ; Tris-HCl 15 mM de pH 7,5 sur colonne ( 100 x 3,5 cm ) à un débit de 19,2 ml et les fractions recueillies sont de 3,8 ml. Le fractionnement est réalisé à 4°C et les courbes d'élution sont établies par spectrophotométrie à 235 nm.

(a) L'hydrolysate de la "myosine-V<sub>D</sub>"  
 (b) L'hydrolysate de la "myosine-V<sub>G</sub>"



### 3°) CONCLUSION

Les résultats que nous avons obtenus sur les "myosine- $V_D$ " et "myosine- $V_G$ " hydrolysées par la chymotrypsine ou par la pepsine pendant des temps très courts, ont permis de montrer que les parties solubles des hydrolysats sont différentes :

- . dans le nombre de polypeptides formés
- . dans la concentration relative des différents polypeptides présents.

Nous avons pu en outre montrer que la quantité de HMM- $S_1$  obtenue à partir de la "myosine- $V_G$ " était supérieure d'un facteur 2 par rapport à celle obtenue pour la "myosine- $V_D$ ".

### IV - ETUDE DES HYDROLYSATS PAR DES AGENTS CHIMIQUES

Pour confirmer les différences obtenues au niveau des chaînes lourdes des myosines ventriculaires, deux types d'agents chimiques spécifiques ont été utilisés : le bromure de cyanogène (BrCN) et l'acide 2-nitro 5-thiocyanatobenzoïque (NTCBA). Les résidus de méthionine et de cystéine sont des acides aminés dit "rares", souvent bien répartis le long de l'axe polypeptidique des protéines. La coupure chimique par des agents très spécifiques au niveau des résidus de méthionine ou de cystéine devrait donc permettre d'obtenir, à partir des chaînes lourdes des myosines ventriculaires, des polypeptides de taille moléculaire facilement identifiable par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

### 1°) ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE

Cet agent chimique coupe spécifiquement la liaison peptidique du côté C-terminal des résidus de méthionine (AT VIII-A). Dans nos expériences, il a été utilisé dans les mêmes conditions (concentration de protéine, quantité de BrCN, température et temps d'hydrolyse) et parallèlement sur la "myosine-V<sub>D</sub>" et sur la "myosine-V<sub>G</sub>" dont les résidus de cystéines ont été préalablement réduits et alkylés par l'iodoacétamide (AT VII-A-b). Les hydrolysats obtenus sont caractérisés par deux techniques différentes.

a) Par chromatographie de gel filtration sur colonne de Sephadex G 50 en tampon propionate de sodium 1 M, Tris HCl 50 mM de pH 9,5 (AT X-G) :

Les profils d'élution obtenus à partir des hydrolysats par le BrCN des "myosine-V<sub>D</sub>" et "myosine-V<sub>G</sub>" sont légèrement différents (Figure II-13) :

- sept pics (A et G) sont obtenus pour le fractionnement de l'hydrolysate de la "myosine-V<sub>D</sub>".

. huit pics (1 à 8) sont obtenus pour le fractionnement de l'hydrolysate de la "myosine-V<sub>G</sub>".

Si les pic A, B, C, D, E et F du fractionnement de l'hydrolysate de la "myosine-V<sub>D</sub>" sont comparables, pour leur temps de rétention et leur densité optique, à leurs homologues 1, 2, 3, 4, 5 et 6 du fractionnement de l'hydrolysate de la "myosine-V<sub>G</sub>", il n'en est pas de même pour les autres pics. En effet, les pics 7 et 8 de la "myosine-V<sub>G</sub>" n'ont pas d'homologues dans le fractionnement de l'hydrolysate de la "myosine-V<sub>D</sub>".

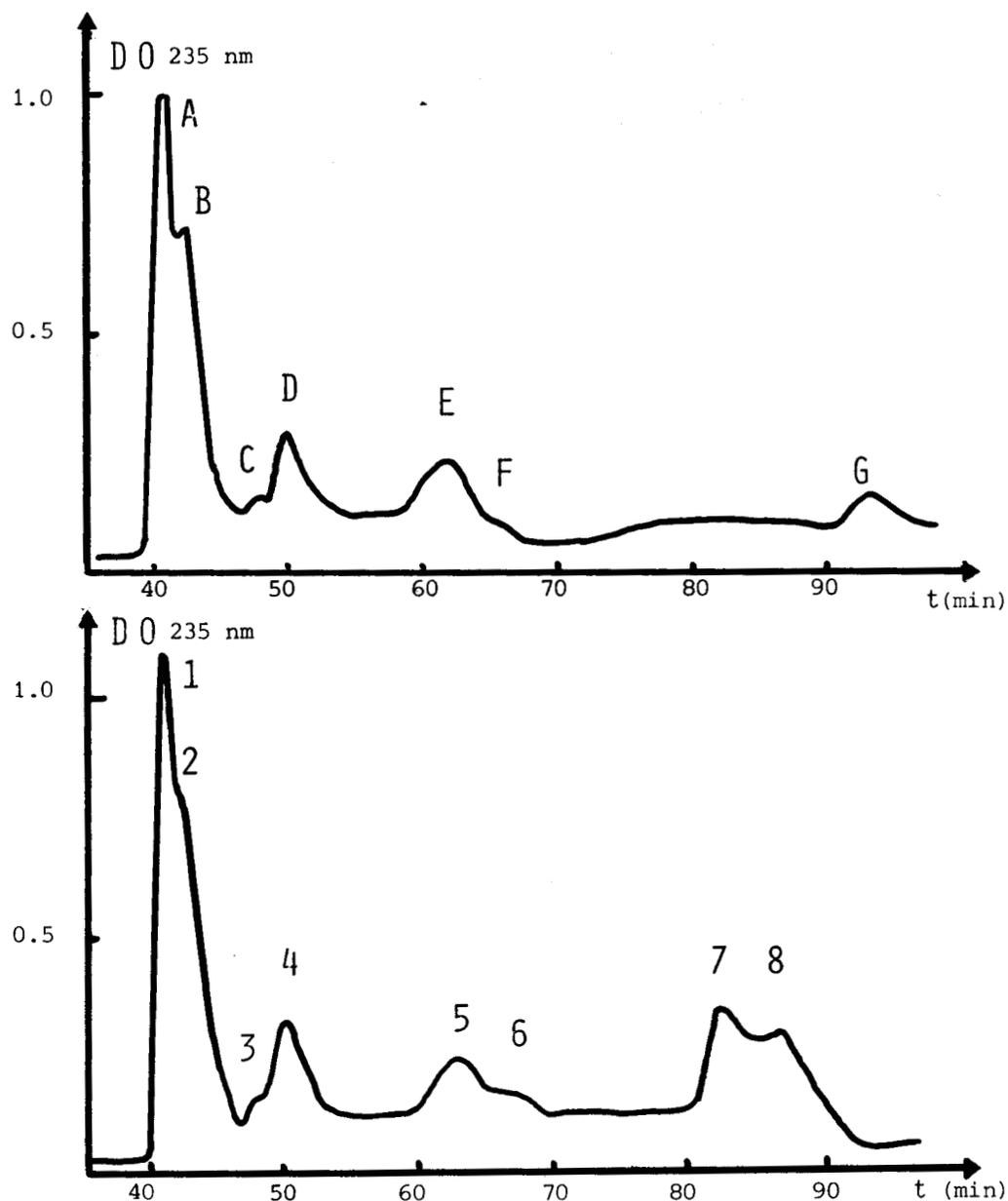


FIGURE II-13 : Profil d'élution par chromatographie de gel filtration sur colonne de séphadex G50 de l'hydrolysate par le BrCN de la myosine ventriculaire de Porc.

(a) "myosine- $V_D$ "

(b) "myosine- $V_G$ "

Tampon d'élution : Tris/HCl 50 mM pH 9,5 ; propionate de sodium 1 M

Colonne (125 x 2,5 cm) ; débit 25,2 ml/h ; fraction  $\approx$  5 ml.

Profil d'élution par spectrophotométrie à 235 nm.



b) Par électrophorèse en double dimension

Cette technique a été choisie pour deux raisons : elle permet une étude comparative des électrophorégrammes des deux hydrolysats migrant en parallèle dans les deux dimensions ; elle permet une étude de l'hydrolysats total. Pour les deux hydrolysats par le BrCN, deux types d'électrophorèse en double dimension ont été utilisés.

*α) Isoélectrofocalisation/Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (AT IV-A)*

Les électrophorégrammes des hydrolysats totaux par le BrCN des "myosine-V<sub>D</sub>" et "myosine-V<sub>G</sub>" (Figure II-14) montrent des différences malgré le faible pouvoir de séparation, des peptides, par isoélectrofocalisation dû à la présence de sels et à l'alkylation préalable des myosines. Ces différences sont dues soit à la présence de peptides supplémentaires (flèches les indiquant sur la Figure) soit à des concentrations relatives différentes entre les deux électrophorégrammes pour des peptides ayant les mêmes mobilités électrophorétiques.

*β) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'urée 8 M/Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS à pH 8,4*

Comme dans le cas précédent, les électrophorégrammes (Figure II-15) révèlent des différences : il existe beaucoup plus de peptides de plus haut poids moléculaire pour la "myosine-V<sub>D</sub>" (par exemple, les peptides indiqués par des flèches sur l'électrophorégramme). Pour les peptides de même mobilité électrophorétique les rapports de concentration sont différents.

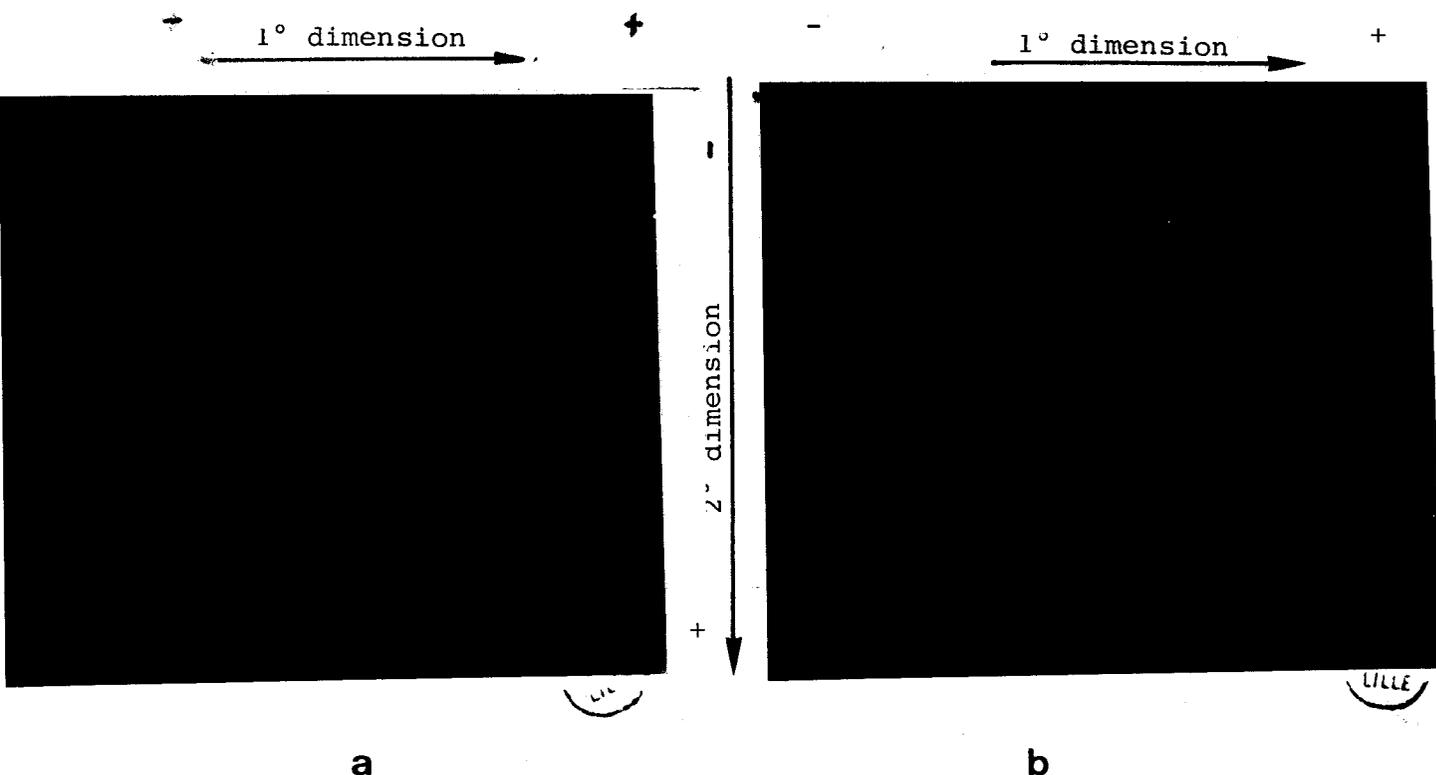


FIGURE II-14

*Electrophorèse en double dimension des hydrolysats obtenus après action du BrCN des myosines ventriculaires préalablement alkylée par l'iodoacétamide.*

*1° dimension Isoélectrofocalisation sur gel de polyacrylamide à 6 % en tube selon le protocole de O' FARELL 1975 .*

*2° dimension Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en plaque ( 15% ) en présence de SDS à pH 8,4 ( migration de l'anode vers la cathode ).*

*► indiquent les polypeptides différents*

*(a) Hydrolysats de la "myosine-V<sub>D</sub>"*

*(b) Hydrolysats de la "myosine-V<sub>G</sub>"*

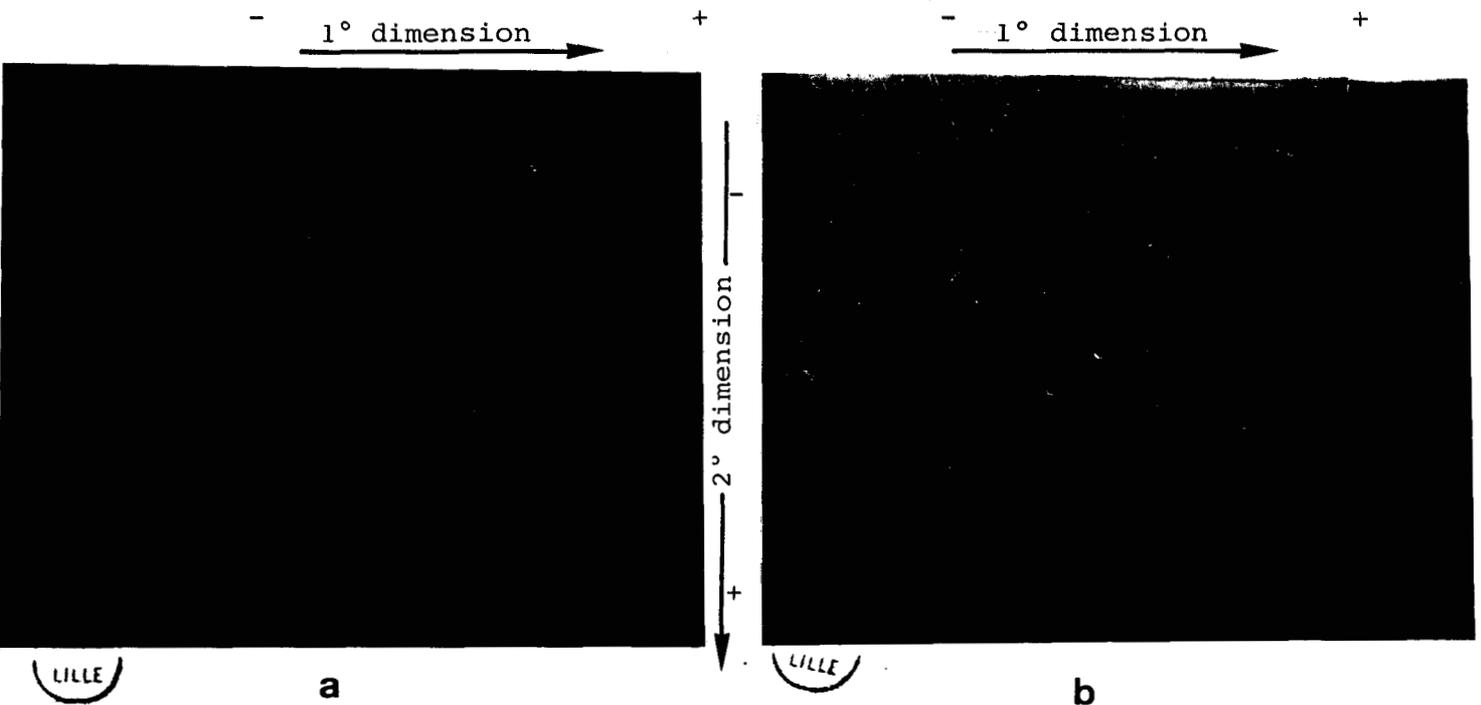


FIGURE II-15

*Electrophorèse en double dimension  
des hydrolysats obtenus après action du BrCN  
des myosines ventriculaires préalablement alkylée  
par l'iodoacétamide.*

*1° dimension Electrophorèse sur gel de polyacrylamide  
( 20% ) en tube en présence d'urée 8 M à pH 8,4  
( migration de l'anode vers la cathode )*

*2° dimension Electrophorèse sur gel de polyacrylamide  
( 15% ) en plaque en présence de SDS à pH 8,4.  
( migration de l'anode vers la cathode )*

*► indiquent les polypeptides différents.*

*(a) Hydrolysats de la "myosine-V<sub>D</sub>"*

*(b) Hydrolysats de la "myosine-V<sub>G</sub>"*

2°) ACTION DE L'ACIDE 2-NITRO 5-THIOCYANATO BENZOÏQUES. (NTCBA) :

Le NTCBA hydrolyse préférentiellement les liaisons peptidiques du côté N-terminal des résidus de cystéine (AT VIII-B). Cet agent chimique a été utilisé sur la "myosine-V<sub>D</sub>" et la "myosine-V<sub>G</sub>" dont les résidus de cystéine avaient été préalablement réduits en milieu dissociant (AT VII-B-a).

Pour un meilleur rendement de l'hydrolyse des myosines, une réduction des résidus de cystéine est nécessaire. Nous avons donc dans un premier temps déterminé pour les myosines ventriculaires les meilleures conditions de réduction. Après diverses combinaisons (Tableau II-9), l'hydrolyse complète, que nous suivons par la quantité de chaînes lourdes présentes dans l'hydrolysate, a été obtenue en utilisant soit le  $\beta$ -mercaptoéthanol (à une concentration de 2 nmoles par gramme de myosine) en présence de SDS 10 % (P/V) comme agent dissociant, soit le D, L-dithiothreitol (1 nmole par gramme de myosine) en présence d'urée 8 M (Figure II-16).

Dans tout notre travail comparatif, nous avons effectué les hydrolyses des "myosine-V<sub>D</sub>" et "myosine-V<sub>G</sub>" préalablement réduites par le DTT (1 nmole/g de myosine) en présence d'urée 8 M. Les hydrolysats des "myosine-V<sub>D</sub>" et "myosine-V<sub>G</sub>" sont analysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide :

a) *Electrophorèse monodimensionnelle en présence de SDS à pH 8,3*

L'électrophorégramme (Figure II-17) entre les hydrolysats des "myosine-V<sub>D</sub>" et "myosine-V<sub>G</sub>" montre, bien

AGENT REDUCTEUR en nanomole par gramme de myosine	AGENT DISSOCIANT	
	SDS en % ( p/v )	UREE en mole par litre
$\beta$ -mercaptoéthanol ( ME )	5 % 2nM/g	8 M 2nM/g
$\beta$ -mercaptoéthanol ( ME )	10 % 2nM/g	
DL-Dithiothréitol ( DTT )	5 % 1nM/g	8 M 1nM/g
DL-Dithiothréitol ( DTT )	10 % 1nM/g	

Tableau II-9

*Différentes combinaisons de dissociation et de réduction de la myosine en solution dans le tampon KCl 0,5 M ; EDTA 3mM ; Tris-HCl 0,1 M de pH 8,2 pour effectuer l'hydrolyse par le NTCBA*



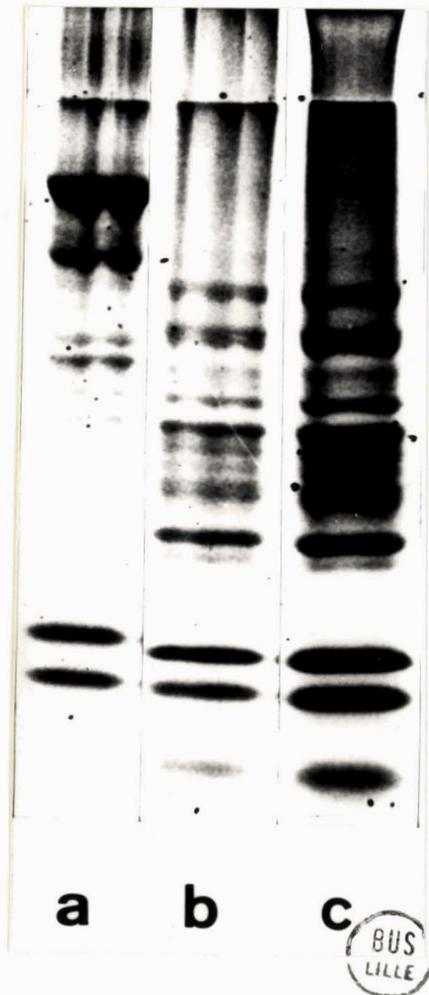


FIGURE II-16

Electrophorèse sur gel gradient de polyacrylamide ( 5 - 30% ) en présence de SDS à pH 8,4 de l'hydrolysât obtenu après action du N.T.C.B.A.

de la "myosine- $V_D$ " préalablement réduite par :

(a) le  $\beta$ -mercaptoéthanol ( 2 nM/ g de myosine ) en présence d'urée 8 M .

(b) le  $\beta$ -mercaptoéthanol ( 2 nM/g de myosine ) en présence de SDS 10% .

(c) le DL-Dithiothréitol ( 1 nM/g de myosine ) en présence d'urée 8 M .

Notons que dans les conditions (b) et (c) , les chaînes lourdes de la "myosine- $V_D$ " sont totalement hydrolysées.



FIGURE II-17      Electrophorèse sur gel gradient de polyacrylamide ( 5 - 30% ) en plaque en présence de SDS à pH 8,4 des hydrolysats obtenus après action du N.T.C.B.A. des myosines ventriculaires préalablement réduites par le DL-Dithiothréitol ( 1 mM/g de myosine ) en présence d'urée 8 M .  
(a) Hydrolysate de la "myosine-V<sub>D</sub>"  
(b) Hydrolysate de la "myosine-V<sub>G</sub>"

Les flèches indiquent les polypeptides différents ( ▶ ) soit en proportion ( ➡ ) soit par la présence entre les hydrolysats des deux myosines ventriculaires.

qu'il y ait de nombreux peptides possédant les mêmes mobilités électrophorétiques, qu'il existe de nombreuses différences :

- . beaucoup plus de peptides de haut poids moléculaire pour la "myosine-V<sub>D</sub>".

- . des peptides de mobilités électrophorétiques identiques n'ont pas l'intensité de coloration dans le même rapport.

*β) Electrophorèse en double dimension : gel de polyacrylamide en présence d'urée 8 M/gel de polyacrylamide en présence de SDS*

Pour une meilleure résolution des bandes protéiques, ces hydrolysats ont été séparés en parallèle par électrophorèse en double dimension (AT IV-B). Les électrophorégrammes (Figure II-18) révèlent les différences déjà observées sur le gel de polyacrylamide après électrophorèse monodimensionnelle en présence de SDS :

- . des polypeptides de plus haut poids moléculaire pour la "myosine-V<sub>D</sub>" (indiqués par les flèches)

- . des concentrations relatives différentes entre les différents polypeptides des deux hydrolysats.

### 3°) CONCLUSION

L'étude des hydrolysats des "myosine-V<sub>D</sub>" et "myosine-V<sub>G</sub>" après action du bromure de cyanogène nous a permis de montrer des différences. Ces différences sont telles que nous avons plus de peptides de plus haut poids moléculaire pour la "myosine-V<sub>D</sub>" et que les peptides de même mobilité électrophorétique ne sont pas présents

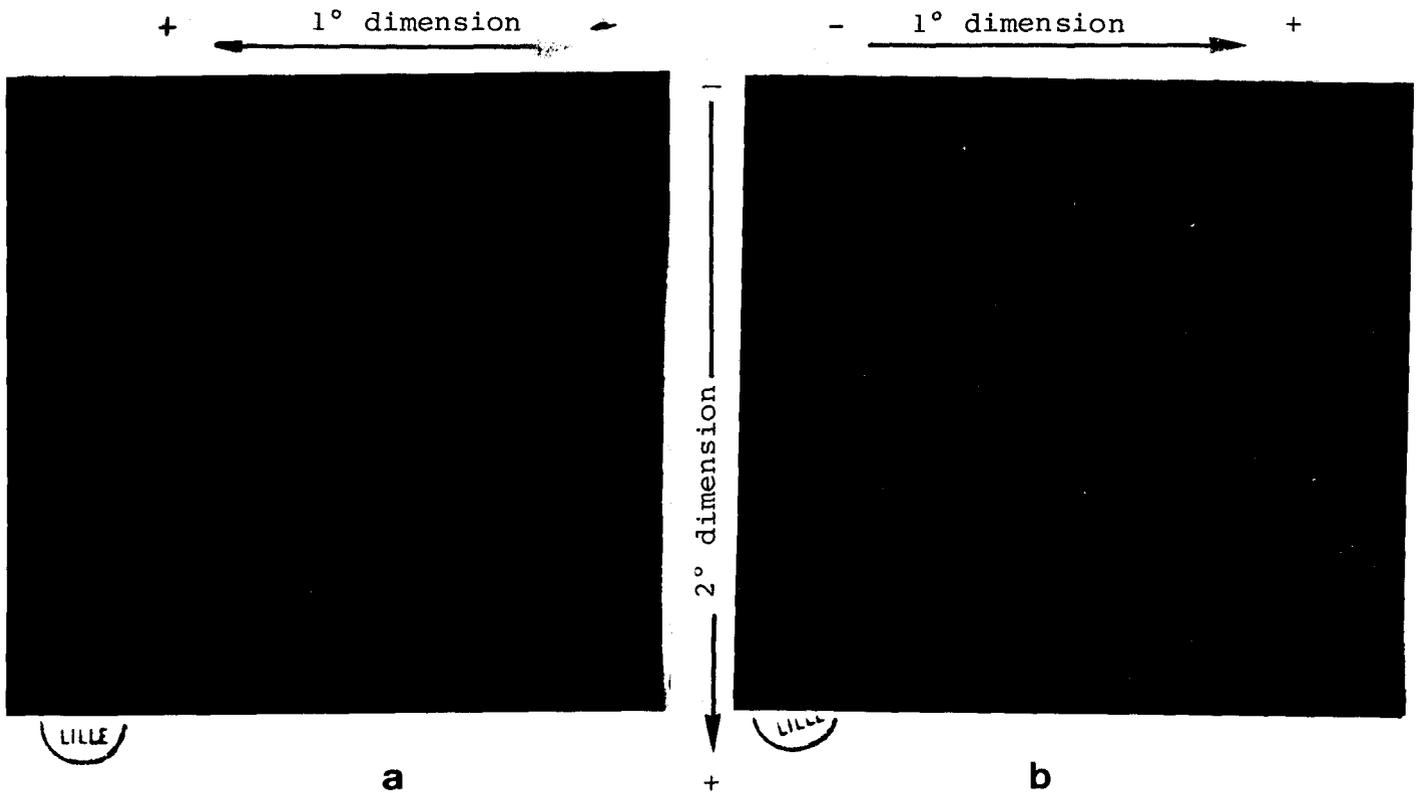


FIGURE II-18 Electrophorèse en double dimension des hydrolysats obtenus après action du N.T.C.B.A. des myosines ventriculaires préalablement réduites par le DL-Dithiothréitol ( 1 nM/g de myosine ) en présence d'urée 8 M .

- 1° dimension Electrophorèse sur gel de polyacrylamide ( 20% ) en tube en présence d'urée 8 M à pH 8,4

- 2° dimension Electrophorèse sur gel de polyacrylamide ( 15% ) en plaque en présence de SDS à pH 8,4 .

(a) Hydrolysats de la "myosine-V<sub>D</sub>"

(b) Hydrolysats de la "myosine-V<sub>G</sub>"

► indiquent les polypeptides différents ( soit par la présence soit en proportion

+ → - indique le sens de la migration de l'anode vers la cathode

T ; est le Témoin myosine indiquant les poids moléculaires de 200.000 ; 20.000 et 18.000 environ

*dans les mêmes rapports de concentration.*

*Des résultats analogues ont été obtenus en utilisant le NTCBA comme autre agent d'hydrolyse.*

#### V - ANALYSE DES ISOENZYMES DE MYOSINES VENTRICULAIRES PAR ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN MILIEU NON DISSOCIANT

La technique d'électrophorèse en milieu non dissociant (AT III-c) permet la migration électrophorétique de la myosine à l'état natif (sans dissociation préalable chaînes lourdes - chaînes légères). Elle exige l'utilisation de gels de polyacrylamide de faible réticulation, une température des tampons de migration voisine de 0° C et l'utilisation de tampon de force ionique élevée (le pyrophosphate de sodium à 40 mM). Toutes ces conditions la rende d'un emploi malaisé. Toutefois elle a permis de montrer par exemple :

. que les myosines extraites de différents muscles avaient des mobilités électrophorétiques différentes (D'Albis et Gratzer, 1973).

. que les myosines des muscles lents et rapides de Poulet pouvaient être séparées respectivement en deux et trois formes électrophorétiques (Hoh et al., 1977).

Nous avons appliqué cette technique à nos myosines ventriculaires en y apportant quelques modifications :

. nous utilisons des gels de polyacrylamide en plaque (14 x 8 x 0,25) au lieu de gel en tubes, ce qui permet des dépôts plus importants.



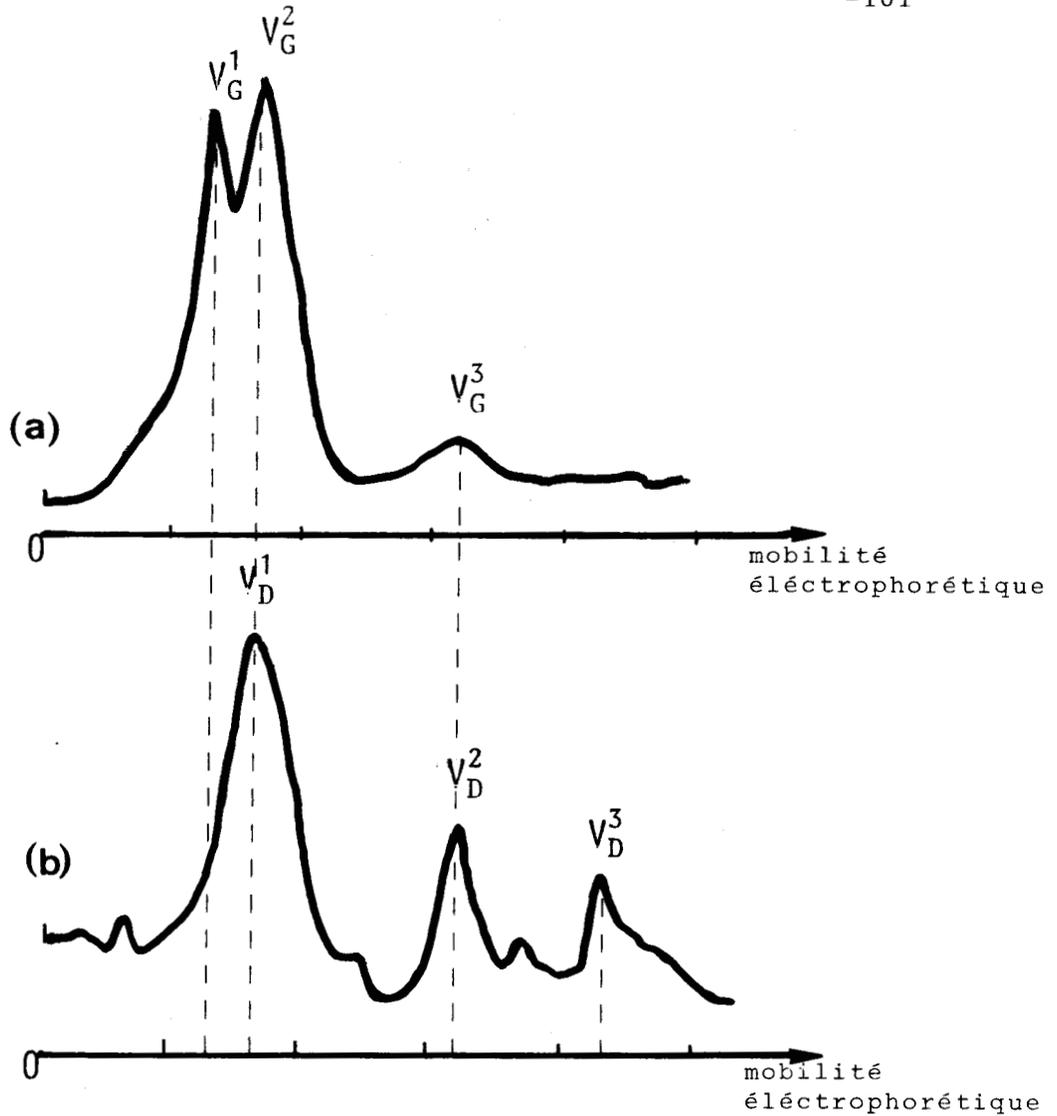
. nous ne faisons migrer que les préparations de myosines purifiées (vérifiant les critères déjà énoncés), celles-ci étant préalablement centrifugées, au lieu de déposer des extraits bruts de myosine.

Les profils densitométriques des électrophorogrammes de la "myosine- $V_D$ " et de la "myosine- $V_G$ " (Figure II-19) révèlent que si les myosines ventriculaires possèdent trois composants ( $V_D^1$  ;  $V_D^2$  ;  $V_D^3$  pour la "myosine- $V_D$ " et  $V_G^1$  ;  $V_G^2$  ;  $V_G^3$  pour la "myosine- $V_G$ "), les mobilités électrophorétiques et la proportion relative de ces composants diffèrent entre la "myosine- $V_D$ " et la "myosine- $V_G$ " (Tableau II-10). Par exemple si les bandes  $V_D^1$  et  $V_G^2$  ont sensiblement la même mobilité électrophorétique, elles sont dans un rapport  $V_D^1 / V_G^2 = 1,25$ . De même, les bandes  $V_D^2$  et  $V_G^3$  qui ont la même mobilité électrophorétique sont dans un rapport  $V_D^2 / V_G^3 = 3,55$ .

Les bandes protéiques de plus faible mobilité électrophorétique ne peuvent pas être attribuées à des agrégats de myosine. En effet, les myosines déposées sont "fraîchement" préparées et sont de plus centrifugées pendant deux heures à 106.000 g. Les bandes protéiques de plus grande mobilité électrophorétique ne peuvent être pour leur part attribuées à des contaminants car les myosines déposées identiques du point de vue pureté vérifient les critères précédemment décrits.

#### EN CONCLUSION

*Les myosines ventriculaires ("myosine- $V_D$ " et "myosine- $V_G$ ") de Porc adulte migrent en électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu non dissociant sous la forme de trois bandes protéiques dont les mobilités*



**FIGURE II-19** Enregistrement densitométrique des électrophorogrammes des myosines ventriculaires " natives " obtenus après électrophorèse sur gel de polyacrylamide ( 3% ) sur plaque en tampon glycérol 10% (p/v) ; DTT 5mM ; pyrophosphate de sodium 20 mM de pH 8,8  
 (a) Préparation de la "myosine- $V_G$ "  
 (b) Préparation de la "myosine- $V_D$ "

$V_G^1$  ;  $V_G^2$  et  $V_G^3$  sont les composants de la "myosine- $V_G$ " dont les mobilités électrophorétiques sont respectivement de 2,35 ; 3,1 et 6 cm

$V_D^1$  ;  $V_D^2$  et  $V_D^3$  sont les composants de la "myosine- $V_D$ " dont les mobilités électrophorétiques sont respectivement de 3,1 ; 6 et 8,1 cm .



MYOSINE	% DU COMPOSANT DE MYOSINE DE MOBILITÉ ÉLECTROPHORÉTIQUE			
	2,35cm	3,1cm	6cm	8,1cm
"MYOSINE-V <sub>D</sub> "	0	V <sub>D</sub> <sup>1</sup> =65,9	V <sub>D</sub> <sup>2</sup> =18,8	V <sub>D</sub> <sup>3</sup> =15,3
"MYOSINE-V <sub>G</sub> "	V <sub>G</sub> <sup>1</sup> =42	V <sub>G</sub> <sup>2</sup> =52,7	V <sub>G</sub> <sup>3</sup> =5,3	0

TABLEAU II-10

*Pourcentage des différents composants de myosine dont les mobilités électrophorétiques sont mesurées au maximum des pics .  
Ce pourcentage est déterminé par intergration automatique.*



électrophorétiques peuvent être résumées :

$$v_G^1 < v_D^1 = v_G^2 < v_D^2 = v_G^3 < v_D^3$$

et dont les concentrations mesurées par intégration (S) des pics peuvent être résumées par

$$s v_G^3 < s v_D^3 < s v_D^2 < s v_G^1 < s v_G^2 < s v_D^1$$

## VI - ESSAIS DE SEPARATION DES ISOENZYMES DE MYOSINE CARDIAQUE

En fonction des résultats précédents, la myosine ventriculaire est composée de plusieurs variants. Il était intéressant de pouvoir séparer ces différents variants, de les obtenir dans un grand état de pureté, de les analyser et de les comparer entre eux.

La chromatographie liquide par gel filtration, la chromatographie liquide d'affinité et l'électrophorèse préparative ont été envisagées en vue de leur séparation.

### 1°) LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE DE GEL FILTRATION SUR COLONNE DE SEPHAROSE 2 B :

A partir des préparations de "myosine-V<sub>D</sub>" et de "myosine-V<sub>G</sub>", des chromatographies de gel filtration sur colonne de Sépharose 2 B ont été effectuées (AT X-I). Les profils d'éluion obtenus (Figure II-20) ne sont pas identiques mais compte tenu de la faible séparation des pics, les fractions collectées ne sont pas homogènes. Le con-

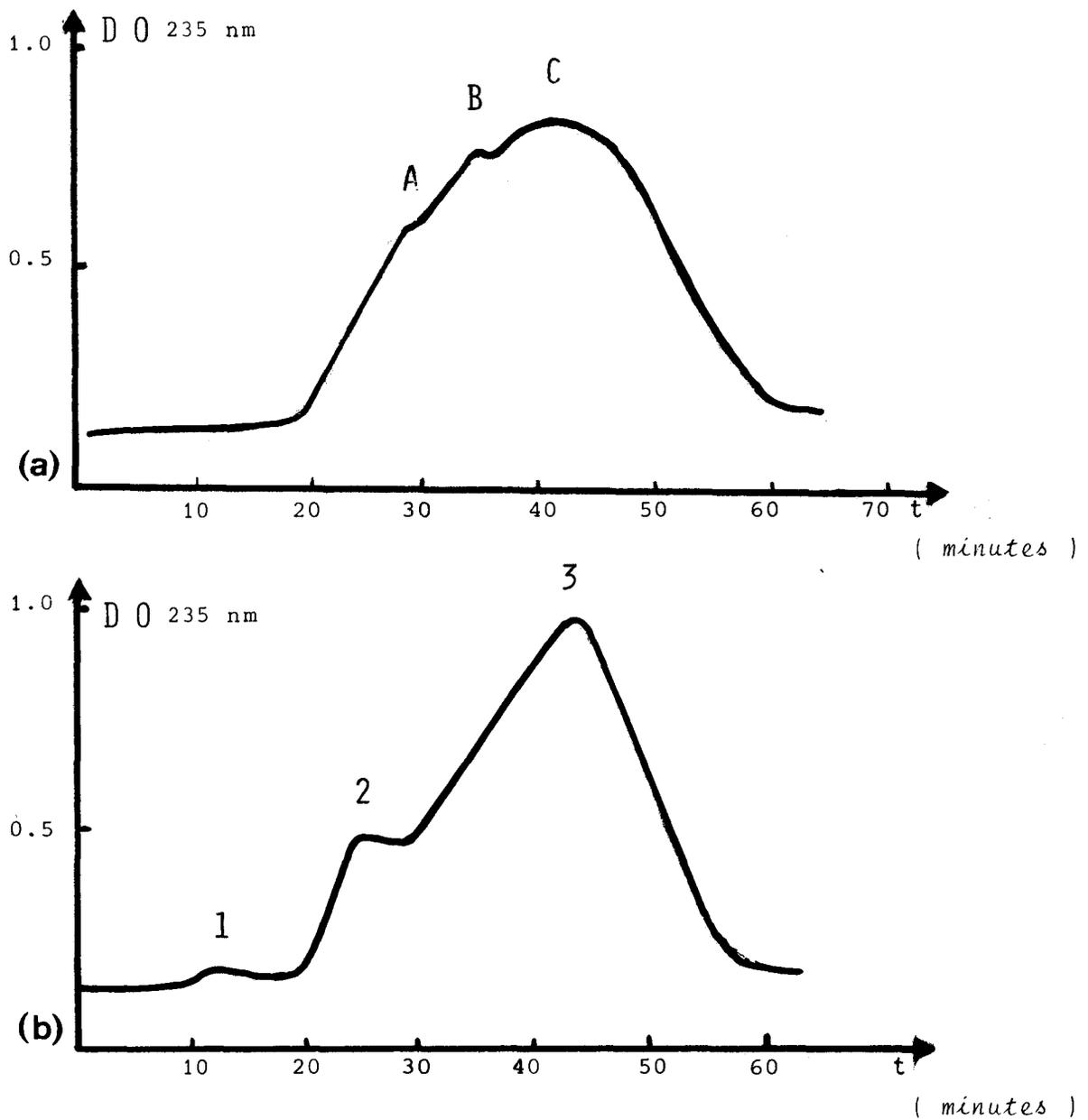


FIGURE II-20 Profil d'élution de la chromatographie de gel filtration sur colonne de Sépharose 2 B ( 100 x 2,5 cm) en tampon KCl 0,5 M ; DTT 2,5mM ; Tris-HCl 15 mM de pH 7,5 des myosines ventriculaires. Les fractions recueillies sont de 3,8 ml environ et le débit est de 19,2 ml .  
(a) La préparation de "myosine-V<sub>D</sub>"  
(b) La préparation de "myosine-V<sub>G</sub>"

Les courbes d'élution sont établies par spectrophotométrie à 235 nm.



trôle de ces fractions a été fait par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS à pH 8,4. Les électrophorégrammes révèlent que les fractions sont toutes similaires. Elles contiennent des bandes protéiques correspondant aux chaînes lourdes et aux chaînes légères de la myosine ventriculaire.

## 2°) LA CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

Les myosines ventriculaires possédant des sites de fixation du calcium, nous avons essayé de séparer les différents variants par chromatographie d'affinité sur colonne d'époxy-Sépharose 4 B activée en utilisant le calcium comme chélateur (AT XI). Les profils d'élution (Figure II-21) révèlent qu'une forte partie de myosine n'est pas retenue. Pour éluer la faible quantité de myosine retenue sur la colonne, il faut employer de l'EDTA 50 mM.

Après passage de l'EDTA, la "myosine- $V_G$ " est éluee sous la forme d'un grand pic (noté 1 sur la Figure) avec un épaulement (2) dans la partie descendante, tandis que la "myosine- $V_D$ " est éluee sous la forme d'un grand pic (C) avec deux épaulements dans la partie ascendante (A et B). La comparaison des temps de rétention des différents pics permet de montrer que le pic 2 de la "myosine- $V_G$ " et le pic C de la "myosine- $V_D$ " sont élues à des temps de rétention similaires. De même pour le pic 1 de la "myosine- $V_G$ " et le pic B de la "myosine- $V_D$ ".

En raison de la faible capacité de la colonne et du chélateur choisi (le Ca d'électronégativité faible), il ne nous a pas été possible de séparer qualitativement et quantitativement ces différentes fractions et de les rechromatographier. Seule, une électrophorèse sur gel de

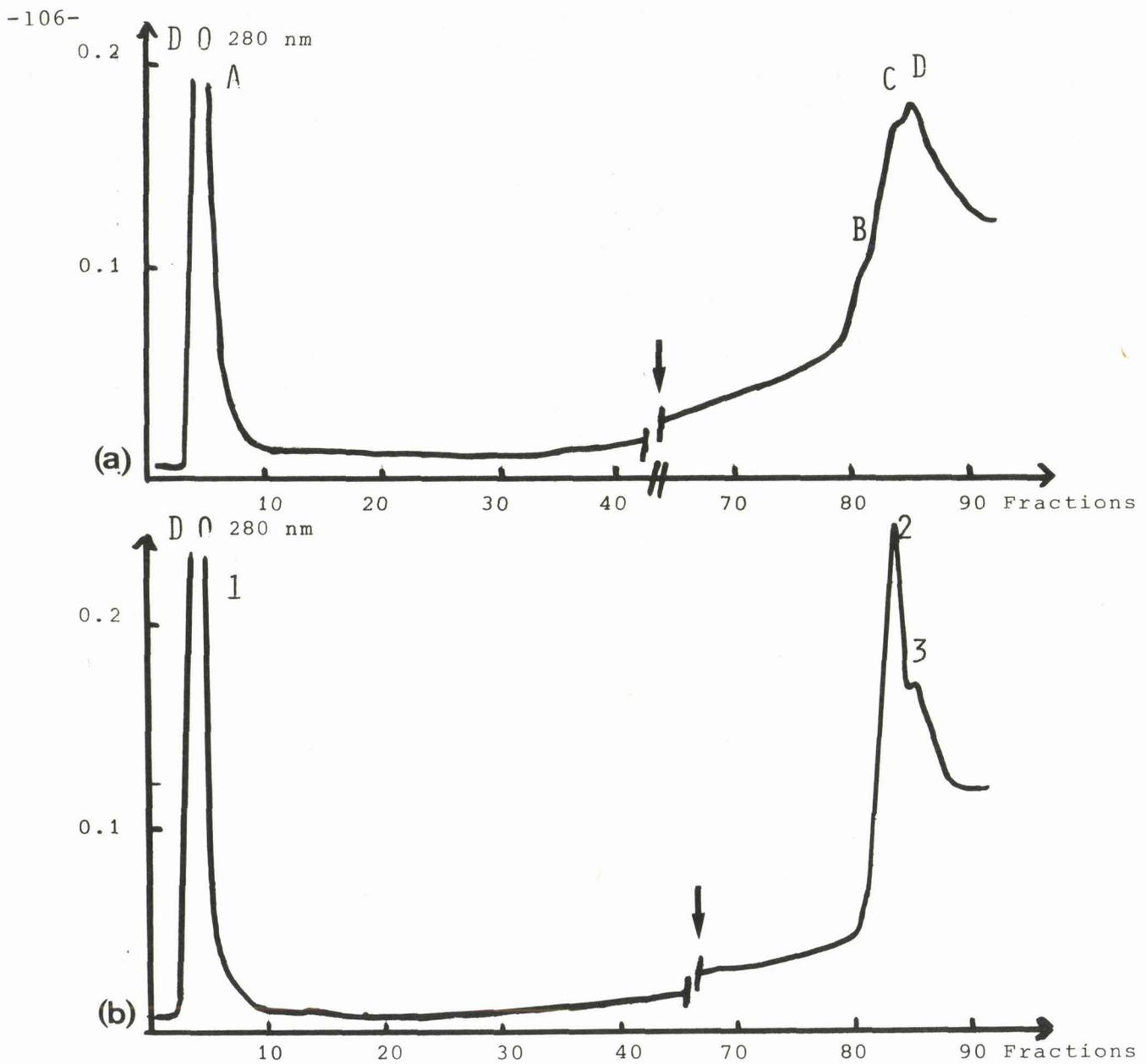


FIGURE II-21

Profil d'éluion de la chromatographie sur colonne d'époxy-Sépharose 4 B activée par le calcium des myosines ventriculaires de coeur de Porc.

La chromatographie est effectuée en tampon KCl 0,6 M Tris-HCl de pH 8,0 sur colonne ( 30 x 0,9 cm ) à un débit de 25,2 ml/h et les fractions recueillies sont de 2 ml. Le fractionnement est réalisé avec un gradient de pH décroissant ( de pH 8,0 à pH 6,5 ) à 4°C. Les fractions retenues sont éluées par le tampon de pH 6,5 contenant 50 mM d'EDTA ( ↓ )

(a) La préparation de la "myosine- $V_D$ "

(b) La préparation de la "myosine- $V_G$ "

Les courbes d'éluion sont établies par spectrophotométrie à 280 nm

de polyacrylamide a pu être effectuée et a révélé

. que les différentes fractions étaient composées de chaînes lourdes et des deux chaînes légères

. que les mobilités électrophorétiques des bandes protéiques homologues des différentes fractions étaient identiques.

### 3°) L'ELECTROPHORESE PREPARATIVE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE :

Comme nous l'avons montré précédemment, par la technique d'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu non dissociant, nous pouvons séparer en une seule étape les différents composants des myosines ventriculaires. Cependant les quantités isolées par électrophorèse préparative sont faibles. Pour obtenir une quantité suffisante de chaque composant et pour des études ultérieures nous avons multiplié les dépôts. Actuellement, après fixation, coloration et séparation des composants protéiques, nous tentons de mettre au point un protocole d'élution des protéines.

### 4°) CONCLUSION

*Les différentes techniques employées nous ont permis de montrer des différences entre les "myosine-V<sub>D</sub>" et "myosine-V<sub>G</sub>". Si les techniques chromatographiques permettent de séparer ces myosines ventriculaires en plusieurs fractions et de les isoler, ces fractions sont néanmoins hétérogènes et doivent être purifiées.*

*Par contre les techniques électrophorétiques ont*

permis une bonne séparation des différents composants protéiques des myosines ventriculaires, mais ces composants n'ont pas été isolés quantitativement jusqu'à présent.

## C - ÉTUDE DES MYOSINES EXTRAITES DES OREILLETES ET DES VENTRICULES DE COEUR DE PORC

### I - ÉTUDE DES ACTIVITES ATP-ASIQUES

Deux types de mesures d'activité ATPasique ont été effectués :

. L'activité dépendante du calcium, ne faisant intervenir que peu de paramètres, permet une étude comparative simple, avec une bonne reproductivité.

. L'activité ATPasique des myosines activées par l'actine, plus proche des conditions physiologiques, fait intervenir un paramètre supplémentaire : la concentration en F-actine. Ce paramètre variant avec le temps est mal maîtrisé. En effet, la réaction  $F\text{-actine} \rightleftharpoons G\text{-actine}$  est une réaction d'équilibre. Dans ces conditions, les activités ATPasiques ne sont reproductibles que pour une même série (même concentration d'actine par exemple).

#### 1°) L'ACTIVITE ATP-ASIQUE DEPENDANTE DU CALCIUM

Les mesures ont été faites dans les conditions décrites (AT VI-A-b) à pH 8,0. Pour trois préparations, nous avons toujours obtenu des valeurs de l'activité  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasique légèrement supérieure pour la préparation

de myosine extraite de l'oreillette droite "myosine-O<sub>D</sub>" par rapport à celle de l'oreillette gauche "myosine-O<sub>G</sub>" (Tableau II-11). Si les différences sont peu significatives quand on compare les valeurs de mesure de l'activité ATPasique des myosines des oreillettes entre elles, il n'en est pas de même lorsqu'on compare les valeurs des myosines des oreillettes à celles des ventricules : la valeur des activités  $Ca^{2+}$ -ATPasique des myosines extraites des oreillettes est plus de trois fois supérieure à celles des myosines extraites des ventricules (Tableau II-11).

Les résultats résumés dans le Tableau II-11 révèlent que, dans le cas des myosines ventriculaires, la capacité à hydrolyser l'ATP des myosines auriculaires n'est pas une fonction linéaire du temps.

## 2°) L'ACTIVITE ATP-ASIQUE ACTIVEE PAR L'ACTINE

Nous avons étudié les activités ATPasiques des myosines ventriculaires et des myosines auriculaires droite et gauche activées par différentes actines à plusieurs concentrations (actine extraite du muscle squelettique de Porc ; actine extraite des ventricules de coeur de Porc et celle extraite des oreillettes de coeur de Porc). Les valeurs obtenues pour les différentes myosines sont représentées dans le Tableau II-12. Elles permettent d'observer que quelque soit la concentration et l'actine utilisée ces résultats sont homogènes. Comme dans le cas des myosines ventriculaires (décrites précédemment) les valeurs des activités ATPasiques des "myosine-O<sub>D</sub>" et "myosine-O<sub>G</sub>" en présence d'actine, sont inversées par rapport à celles obtenues en présence de calcium (Tableau II-11).

	nombre de nanomoles de $\text{Pi} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$			
	"myosine- $\text{O}_D$ "	"myosine- $\text{O}_G$ "	"myosine- $\text{V}_D$ "	"myosine- $\text{V}_G$ "
Préparation A (hydrolyse 11 min)	354	N.D	67	40
Préparation B (hydrolyse 10 min)	357	331	77	48
Préparation C (hydrolyse 7 min)	427	360	127	101

TABLEAU II-11      *Activités ATPasiques spécifiques dépendantes du calcium des myosines auriculaires et ventriculaires de coeur de Porc*

*L'hydrolyse de l'ATP est effectuée pendant des temps différents pour les différentes préparations dans les conditions expérimentales de POPE et al. 1980*  
*Le dosage de l'ATP hydrolysé est réalisé par mesure colorimétrique du phosphore inorganique libéré ( Pi ) selon la méthode de FISKE et SUBBAROW 1925 .*



	nanomoles de Pi x min <sup>-1</sup> x mg <sup>-1</sup>		
	Actine Ventriculaire		
Myosine de Porc Préparation A	2 µM	20 µM	40 µM
"myosine-O <sub>D</sub> "	178	291	289
"myosine-V <sub>D</sub> "	84	135	59
"myosine-V <sub>G</sub> "	107	167	105

	nanomoles de Pi x min <sup>-1</sup> x mg <sup>-1</sup>		
	Actine Squelettique		
Myosine de Porc Préparation B	2 µM	5 µM	10 µM
"myosine-O <sub>D</sub> "	27	25	20
"myosine-O <sub>G</sub> "	72	42	45
"myosine-V <sub>D</sub> "	48	N.D	20
"myosine-S"	373	903	656

	nanomoles de Pi x min <sup>-1</sup> x mg <sup>-1</sup>	
	Actine Cardiaque 5 µM	
Myosine de Porc Préparation C	Ventriculaire	Auriculaire
"myosine-O <sub>D</sub> "	88	140
"myosine-O <sub>G</sub> "	241	309
"myosine-V <sub>D</sub> "	28	48
"myosine-V <sub>G</sub> "	33	71
"myosine-S"	343	500

TABLEAU II-12

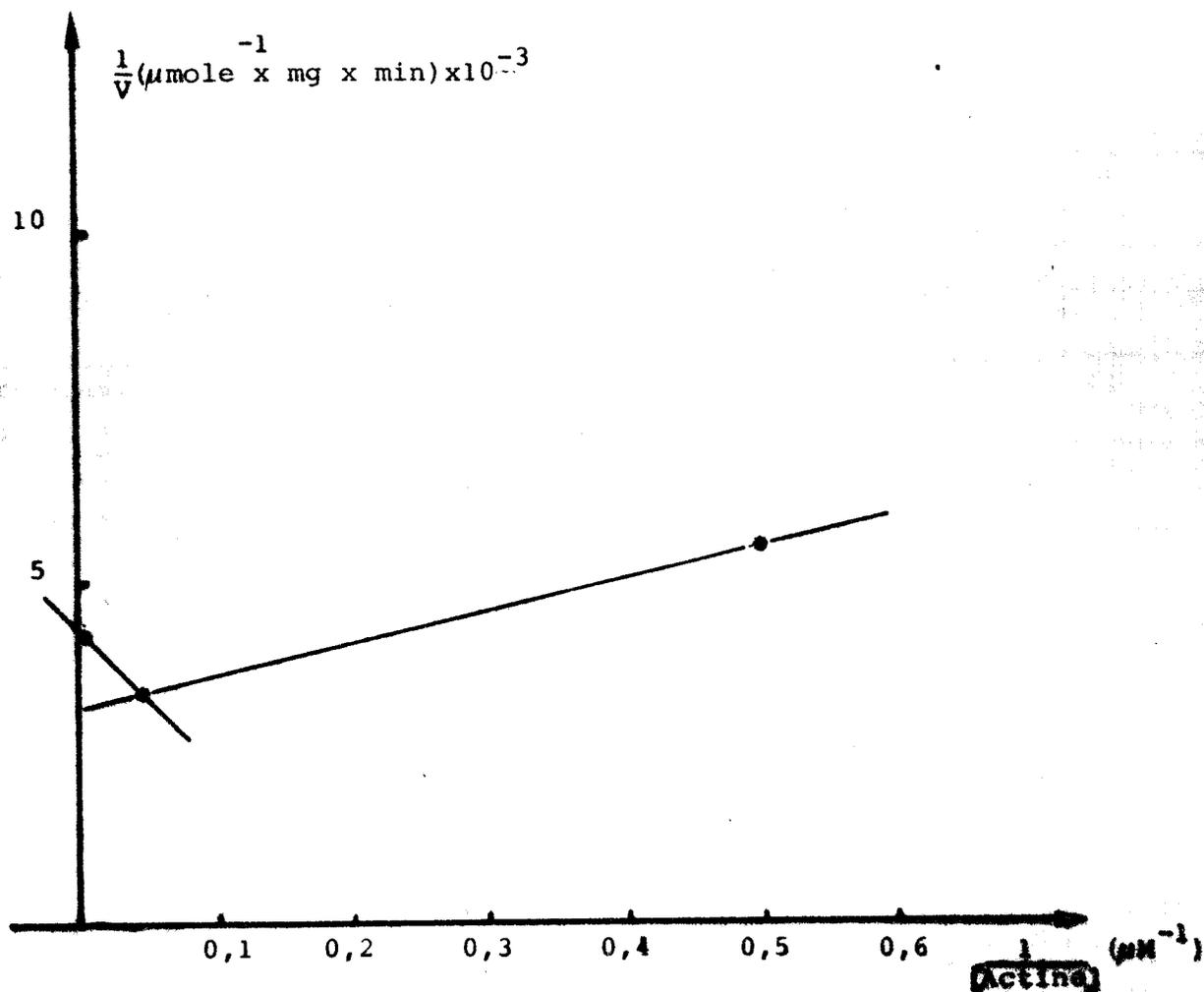
Activités ATPasiques spécifiques des myosines activées par l'actine. L'hydrolyse de l'ATP est effectuée selon les conditions expérimentales de POPE et al. 1980. Le dosage de l'ATP hydrolysé est réalisé par mesure colorimétrique du phosphore inorganique libéré (Pi) selon FISKE et SUBBAROW 1925

(a) activation par l'actine ventriculaire de Porc.

(b) activation par l'actine de muscle squelettique de Porc

(c) activation par l'actine ventriculaire et auriculaire de Porc.

L'activation par l'actine (a) et (b) est effectuée par différentes concentrations d'actine.



**FIGURE II-22**

Courbe de l'activité ATP-ase spécifique de la "myosine-0<sub>D</sub>" activée par l'actine cardiaque dans la représentation selon LINEWEAVER et BURK 1934. L'hydrolyse de l'ATP est effectuée pendant 11 mn dans les conditions de POPE et al. 1980 modifiée ( en présence de KCl 30 mM)

La comparaison des activités ATPasiques des myosines auriculaires et ventriculaires montrent qu'en présence d'actine, il y a diminution des différences observées en présence de calcium. Les activités ATPasiques obtenues pour l'actine cardiaque à différentes concentrations, rassemblées dans une représentation selon Lineweaver et Burk (Figure II-22) ne permettent pas de tirer de conclusion quant au " $v_m$ " et au " $K_m$ " mais montrent que la courbe obtenue est biphasique.

## II- ETUDE DES HYDROLYSATS OBTENUS APRES ACTION DU N.T.C.B.A.

A partir des myosines préparées pour effectuer les mesures d'activité ATPasique, nous avons comparé la sensibilité à l'hydrolyse par le NTCBA des chaînes lourdes des myosines extraites de l'oreillette et celles extraites des ventricules. Les préparations de myosines dont les résidus de cytéine étaient préalablement réduits par le DTT en présence d'urée 8 M ont été soumises à l'action du NTCBA.

Les hydrolysats obtenus ont été étudiés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS à pH 8,4. L'électrophorégramme des hydrolysats de myosine de ventricule droit et d'oreillette gauche (Figure II-23) met en évidence que si certains peptides ont une mobilité électrophorétique similaire il existe de nombreuses différences. En particulier, nous notons la présence de peptides de plus haut poids moléculaire pour la myosine extraite de l'oreillette gauche (indiqués par des flèches sur la Figure II-23).

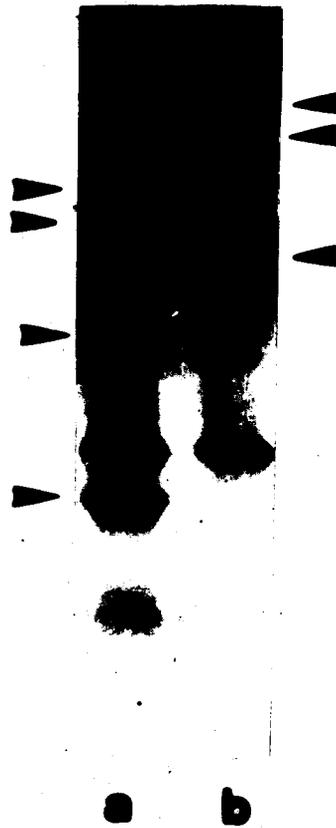


FIGURE II-23

Electrophorèse sur gel de polyacrylamide ( gradient de 5 - 30% ) en plaque en présence de SDS à pH 8,4 des hydrolysats obtenus après action du N.T.C.B.A. des myosines préalablement réduites par le DL-Dithiothréitol ( 1 nM/g de myosine ) en présence d'urée 8 M .

- (a) Hydrolysats de la "myosine- $V_D$ "
- (b) Hydrolysats de la "myosine- $O_G$ "

► indiquent les polypeptides différents ( soit par la présence, soit dans les proportions ) entre les hydrolysats des deux myosines.

III - CONCLUSION

Les résultats obtenus entre les myosines extraites des oreillettes et des ventricules de coeur de Porc révèlent :

. que les activités ATPasiques dépendantes du calcium sont différentes et peuvent être résumées par :

$$O_D > O_G \gg V_D > V_G$$

. qu'en présence d'actine ces différences sont inversées pour les myosines ventriculaires ainsi que pour les myosines auriculaires. Ces résultats se résument ainsi :

$$O_G > O_D \gg V_G > V_D$$

. que les hydrolysats par le NTCBA de la "myosine-O<sub>G</sub>" et de la "myosine-O<sub>D</sub>" sont différents. S'il existe des peptides qui ont la même mobilité électrophorétique, nous notons la présence de peptides de plus haut poids moléculaire pour la "myosine-O<sub>D</sub>".

D - CONCLUSIONS DE NOTRE EXPERIMENTATION

Cette étude comparative entre les chaînes lourdes des myosines extraites des ventricules (droit et gauche) et des oreillettes (droite et gauche) isolées d'un même coeur de Porc adulte ont permis de montrer

des différences si on compare :

- . les myosines ventriculaires entre elles
- . les myosines auriculaires entre elles
- . les myosines ventriculaires et auriculaires entre elles.

Il est à souligner que les différentes expériences ont été effectuées sur des préparations de myosines ayant un degré de pureté élevé et que celles ci ont été rapidement faites.

## I - LES MYOSINES VENTRICULAIRES

### 1°) L'ETUDE DES ACTIVITES ATP-ASIQUES

Elle a permis de montrer que les activités dépendantes du potassium étaient similaires pour la "myosine- $V_D$ " et la "myosine- $V_G$ ". L'activité ATPasique de la "myosine- $V_D$ " est plus activée par le calcium que la "myosine- $V_G$ " tandis qu'en présence d'actine l'activité ATPasique de la "myosine- $V_G$ " est la plus activée.

### 2°) LES FILAMENTS SYNTHETIQUES

Les filaments synthétiques reconstitués sont bipolaires pour la "myosine- $V_D$ " comme pour la "myosine- $V_G$ ". L'étude de la longueur de ces filaments montre beaucoup plus de filaments plus courts pour la "myosine- $V_D$ " par rapport à ceux observés pour la "myosine- $V_G$ ".

### 3°) L'ETUDE DES HYDROLYSATS PAR LES ENZYMES

Cette étude a permis de montrer que les parties

solubles des hydrolysats sont différentes dans le nombre de polypeptides formés et dans la concentration relative des polypeptides présents. Nous pouvons noter aussi la présence du fragment HMM-S<sub>1</sub> en concentration supérieure pour la "myosine-V<sub>G</sub>".

#### 4°) L'ETUDE DES HYDROLYSATS PAR ACTION D'AGENTS CHIMIQUES

Cette étude a permis de montrer des différences dans les hydrolysats étudiés. Nous avons observé plus de polypeptides de plus haut poids moléculaire pour la "myosine-V<sub>D</sub>" et des concentrations relatives différentes dans les polypeptides présents que ce soit après action du BrCN ou du NTCBA.

#### 5°) L'ETUDE PAR ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN MILIEU NON DISSOCIANT

Les "myosine-V<sub>D</sub>" et "myosine-V<sub>G</sub>" se séparent par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu non dissociant en donnant trois bandes protéiques. Deux des composants protéiques ont des mobilités électrophorétiques similaires.

#### 6°) LES ESSAIS DE SEPARATION DES ISOENZYMES DE MYOSINE

Les différentes techniques employées (gel filtration, sur colonne de Sépharose 2 B, chromatographie d'affinité sur colonne d'époxy-Sépharose 4 B, électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu non dissociant) nous ont permis de montrer des différences entre les "myosine-V<sub>D</sub>" et "myosine-V<sub>G</sub>", mais les procédés ne sont pas assez sélectifs pour isoler quantitativement ces isoenzymes dans un état de pureté suffisant.

## II - LES MYOSINES AURICULAIRES

Les études des activités ATPasiques des myosines extraites des oreillettes ont montré que la "myosine- $O_D$ " est plus activée par le calcium que la "myosine- $O_G$ ". Par contre en présence d'actine, l'activité ATPasique de la "myosine- $O_G$ " est plus importante que celle de la "myosine- $O_D$ ".

## III - LES MYOSINES VENTRICULAIRES ET AURICULAIRES

1°) L'ETUDE DES ACTIVITES ATP-ASIQUES montre que les myosines auriculaires sont plus activées par le calcium et par l'actine que les myosines ventriculaires. La différence observée en présence de calcium est largement diminuée en présence d'actine.

2°) LES HYDROLYSATS PAR LE NTCBA de la "myosine- $O_G$ " et de la "myosine- $V_D$ " sont différents. S'il existe des polypeptides de poids moléculaire similaire, nous notons la présence de polypeptides de plus haut poids moléculaire seulement pour la "myosine- $O_G$ ".

CHAPITRE III

**DIFFERENCES  
DANS LES COMPOSITIONS  
EN CHAINES LEGERES  
DE DIFFERENTES MYOSINES**

Ce chapitre a fait l'objet des publications suivantes :

- H.F. HILDEBRAND, J.P. KERCKAERT, G. BISERTE  
D. TETAERT and X. GRANDIER-VAZEILLE  
Comparative ultrastructural and biochemical studies of  
adult, fetal and tumoral myosins of Rat and Rabbit skeletal  
muscle.  
*VIth European Conference on Muscle and Cell Motility*,  
Saclay (France), September 29-30, 1977, 6, p. 6.
  
- H.F. HILDEBRAND, J.P. KERCKAERT, G. BISERTE  
X. GRANDIER-VAZEILLE and D. TETAERT  
Myosin of Ni<sub>3</sub>S<sub>2</sub> rhabdomyosarcoma : a new onco-fetal iso-  
enzyme.  
*VIth International Research Groups for Carcino-embryonic  
Proteins Meeting (I.R.C.P.)*, Marburg (RFA), September  
17-21, 1978.
  
- H.F. HILDEBRAND, J.P. KERCKAERT, G. BISERTE  
X. GRANDIER-VAZEILLE and D. TETAERT  
Myosin of Ni<sub>3</sub>S<sub>2</sub> induced rhabdomyosarcomas : a new onco-  
fetal isoenzyme.  
*Carcino-embryonic Proteins* (F.W. Lehmann, ed.), Elsevier/  
North-Holland Biochemical Press, 2, 1979, pp. 717-722.
  
- H.F. HILDEBRAND, I. KRIVOSIC, X. GRANDIER-VAZEILLE,  
D. TETAERT and G. BISERTE  
Perineal rhabdomyosarcoma of a new-born child : patholo-  
gical and biochemical studies with emphasis on contrac-  
tile proteins.  
*Journal of Clinical Pathology*, 1980, 33, 823-829.
  
- X. GRANDIER-VAZEILLE, D. TETAERT, B. HEMON and G. BISERTE  
Phylogenetic studies of cardiac myosins from amphibia to  
mammalian.  
*Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*.  
En préparation.

## A - INTRODUCTION

Cette partie du travail est consacrée à la comparaison des sous-unités de plus faible poids moléculaire de myosines : *les chaînes légères*. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide est la technique qui permet le mieux de comparer la composition en chaînes légères des différentes myosines :

. L'utilisation à un même pH (tampon Tris-glycocolle de pH 8,4) de deux agents dissociants (urée 8 M et SDS 1 %) permet la séparation des sous-unités de la myosine soit selon leur poids moléculaire (en présence de SDS), soit selon leur poids moléculaire et selon leur charge (en présence d'urée 8 M).

. L'utilisation du même agent dissociant (SDS 1 %) dans des conditions de tampon de pH différent (tampon Tris-glycocolle de pH 8,4 et tampon Tris-acide borique de pH 7,0) peut permettre une meilleure séparation des sous-unités de la myosine de poids moléculaire voisin.

Pour tous les muscles et quelle que soit l'espèce, les électrophorégrammes des préparations de myosine (électrophorèses effectuées en présence de SDS) révèlent la présence :

. d'une bande fortement colorée au bleu de Coomassie R qui correspond aux *chaînes lourdes* de la myosine (HC  $\approx$  200 000 daltons) ;

. de bandes protéiques moins fortement colorées, de mobilité importante et de poids moléculaire compris entre 30 000 et 15 000, dont le nombre et la mobilité varient suivant le muscle et l'espèce. Elles correspondent aux *chaînes légères*.

. d'autres bandes protéiques qui sont parfois faiblement détectables. Il s'agit de contaminants myofibrillaires, dont le poids moléculaire est résumé dans le Tableau III-1, et de nucléotides.

Les électrophorèses en présence d'urée 8 M à pH 8,4 permettent de mettre en évidence les chaînes légères ; les chaînes lourdes de la myosine ne pénètrent pas dans le gel et l'actine et la tropomyosine ont une faible mobilité électrophorétique. Cette électrophorèse est utilisée principalement pour mettre en évidence l'existence de forme phosphorylée de chaîne légère de la myosine.

Dans ce travail, nous avons comparé les chaînes légères des myosines de différents muscles de plusieurs espèces, en utilisant chaque fois que possible les trois systèmes d'électrophorèse.

## B - ÉTUDE DE LA MYOSINE DE RÉFÉRENCE : LA MYOSINE DE MUSCLE SQUELETTIQUE

La myosine la mieux connue, car la plus facile à isoler avec de bons rendements d'un muscle homogène, est celle extraite du muscle blanc squelettique de Lapin. Cette myosine nous a déjà servi de référence pour les études des tumeurs musculaires chimio-induites par le sous-sulfure de nickel (Hildebrand *et al.*, 1979) et des rhabdomyosarcomes spontanés chez l'enfant (Hildebrand *et al.*, 1980). Nous avons comparé les compositions en chaînes légères des myosines squelettiques normales adultes pour différentes espèces ainsi que la composition en chaînes légères du muscle squelettique à trois stades de différenciation.

TABLEAU III-1. Identification des protéines myofibrillaires du muscle squelettique du Lapin par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (Greaser et al., 1973 ; Porzio et Pearson, 1977).

Protéines	Poids Moléculaires
Chaînes lourdes de la myosine	200 000
M <sub>α</sub> -protéine	195 000
M <sub>β</sub> -protéine	180 000
C-protéine	140 000
α-actinine	102 000
β-actinine	70 000
Actine	45 000
Troponine T	37 000
Tropomyosine	34-36 000
Chaîne légère-1	25 000
Troponine-I	24 000
Troponine-C	20 000
Chaîne légère-2	18 000
Chaîne légère-3	16 000



I - ETUDE DE LA MYOSINE DE MUSCLE SQUELETTIQUE NORMAL  
ADULTE DE DIFFERENTES ESPECES

Nous avons étudié les myosines de muscle squelettique de sept espèces allant des Batraciens aux Mammifères supérieurs en passant par les Oiseaux et les Rongeurs.

1°) L'ELECTROPHORESE EN PRESENCE DE SDS A pH 8,4

*α) Chez le Lapin*

La myosine de muscle blanc squelettique de Lapin possède trois chaînes légères dont les mobilités électrophorétiques correspondent à des poids moléculaires d'environ 25 000, 18 000 et 16 000 notées respectivement  $L_{25}^S$ ,  $L_{18}^S$  et  $L_{16}^S$  (Figure III-le).

*β) Chez la Grenouille*

La myosine de muscle squelettique de Grenouille possède trois chaînes légères qui ont des poids moléculaires identiques à ceux de la myosine de muscle squelettique de Lapin (25 000, 18 000 et 16 000) (Figure III-lb).

*γ) Chez le Poulet*

La myosine de muscle squelettique de Poulet possède trois chaînes légères (Figure III-lc). La chaîne légère de plus faible poids moléculaire et celle de plus haut poids moléculaire sont respectivement identiques aux chaînes légères  $L_{25}^S$  et  $L_{16}^S$  de la myosine de muscle squelettique de Lapin. La troisième chaîne légère a une mobilité électrophorétique légèrement supérieure à celle de la chaîne légère  $L_{18}^S$  de la myosine squelettique de Lapin.

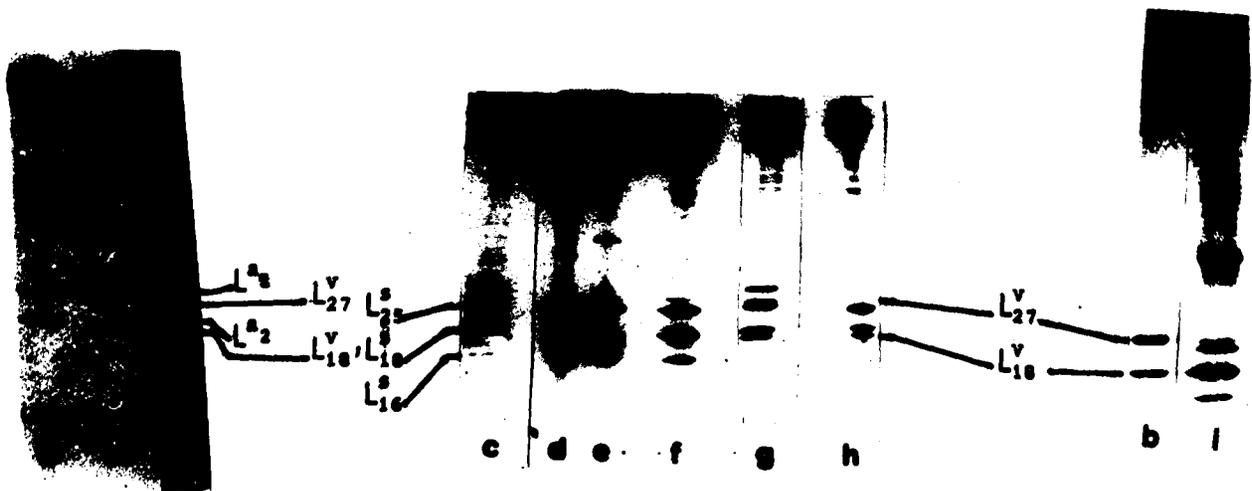


Figure III-1 : Electrophorèse sur gel gradient de polyacrylamide (5-30%), en plaque, en présence de SDS à pH 8,4.

- (a) "myosine- $O_G$ " de coeur de Porc adulte
- (b) "myosine- $V_G$ " de coeur de Porc adulte
- (c) "myosine-S" de Porc adulte jeune
- (d) "myosine-S" de Rat adulte
- (e) "myosine-S" de Poulet adulte
- (f) "myosine-S" de Lapin adulte
- (g) "myosine-S" de Porc adulte âgé
- (h) "myosine-S" d'Homme adulte
- (i) "myosine-S" de Grenouille adulte

δ) Chez le Rat

Dans les mêmes conditions d'électrophorèse, la myosine de muscle squelettique de Rat possède également trois chaînes légères ( Figure III-1c ). La seule différence obtenue avec la myosine de muscle squelettique de Lapin réside dans la mobilité électrophorétique de la chaîne légère de plus haut poids moléculaire qui est légèrement supérieure à "  $L_{25}^S$  de Lapin ". Nous la notons  $L_{24}^S$  . Les deux autres chaînes légères ont un poids moléculaire identique à celui de "  $L_{18}^S$  et  $L_{16}^S$  de Lapin ". Ces résultats montrent que le muscle squelettique de Rat est du muscle rouge ( muscle lent ) avec des chaînes légères de poids moléculaire caractéristiques.

ε) Chez le Porc

La myosine de muscle squelettique de Porc possède trois chaînes légères (Figure III-1a). La chaîne légère de plus faible poids moléculaire est identique à  $L_{18}^S$  de Lapin. Les deux autres chaînes légères ont des mobilités électrophorétiques inférieures à celle de plus haut poids moléculaire de la myosine de muscle squelettique de Lapin ( $L_{25}^S$ ). La composition en chaînes légères de cette myosine de muscle squelettique de Porc est remarquable. Elle possède trois chaînes légères dont les mobilités électrophorétiques ne correspondent ni à la myosine de muscle blanc squelettique, ni à celle de muscle rouge de Lapin et de Rat.

ζ) Chez l'Homme

La myosine de muscle squelettique humain possède trois chaînes légères (Figure III-1g). Les chaînes légères de plus haut poids moléculaire et de plus faible poids moléculaire ont des mobilités électrophorétiques respectivement identiques aux chaînes légères  $L_{25}^S$  et  $L_{18}^S$  de la myosine de muscle squelettique de Lapin. La chaîne légère de poids moléculaire intermédiaire a une mobilité électrophorétique supérieure à la chaîne légère  $L_{24}^S$  de la myosine de muscle squelettique de Rat et inférieure à la chaîne légère  $L_{18}^S$  de la myosine de muscle squelettique de Lapin.

2°) L'ELECTROPHORESE EN PRESENCE DE SDS A pH 7,0

α) *Chez le Lapin*

La myosine de muscle squelettique blanc de Lapin possède trois chaînes légères  $L_{25}^S$ ,  $L_{18}^S$  et  $L_{16}^S$  (Figure III-2c).

β) *Chez le Poulet*

La myosine de muscle squelettique de Poulet possède trois chaînes légères dont les mobilités électrophorétiques sont similaires respectivement à celles de  $L_{25}^S$ ,  $L_{18}^S$  et  $L_{16}^S$  de la myosine de muscle squelettique de Lapin (Figure III-2d).

γ) *Chez le Rat*

La myosine de muscle squelettique de Rat possède trois chaînes légères dont les mobilités électrophorétiques sont également similaires à celles des chaînes légères de la myosine de muscle squelettique de Lapin (Figure III-2g).

δ) *Chez le Porc*

La myosine de muscle squelettique de Porc possède trois chaînes légères (Figure III-2b). Si la mobilité électrophorétique de la chaîne légère de plus faible poids moléculaire est identique à celle de  $L_{18}^S$  de la myosine de muscle squelettique de Lapin, la chaîne légère qui en SDS à pH 8,4 a une mobilité électrophorétique légèrement supérieure à  $L_{25}^S$  de la myosine de muscle squelettique de Lapin, en SDS à pH 7,0 elle a un comportement électrophorétique identique à  $L_{25}^S$ . La chaîne légère de plus haut poids moléculaire a une mobilité électrophorétique légèrement inférieure à  $L_{25}^S$ .

ε) *Chez l'Homme*

La myosine de muscle squelettique humain présente deux bandes protéiques correspondant aux chaînes légères. Les mobilités électrophorétiques sont identiques respectivement à celles des chaînes légères  $L_{25}^S$  et  $L_{18}^S$  de la myosine de muscle squelettique de Lapin (Figure III-2a).

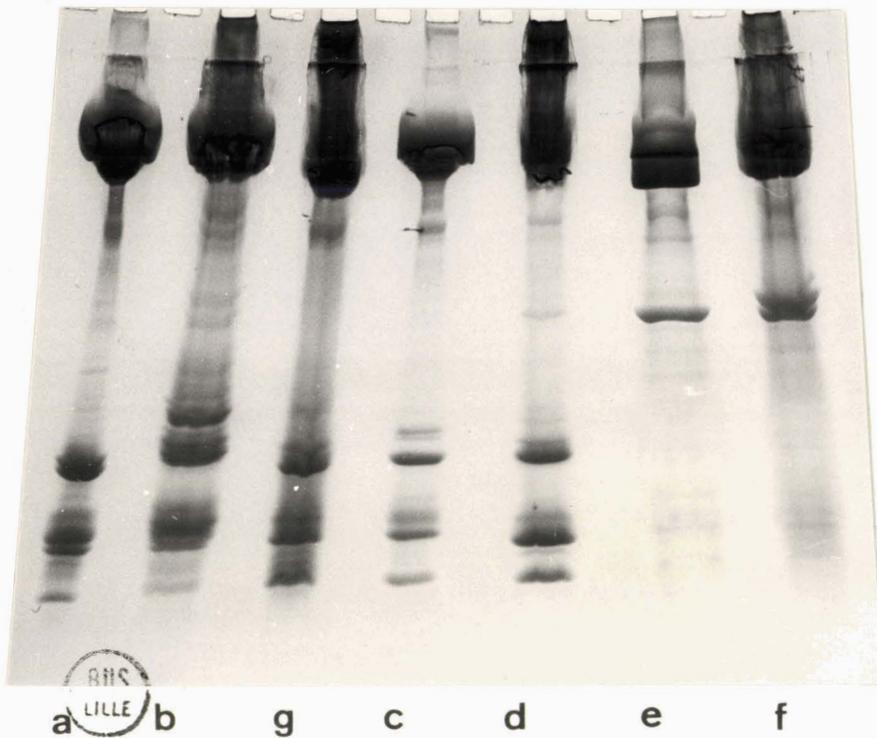


FIGURE III-2 : Electrophorèse sur gel gradient d'acrylamide (5-30%), en plaque, en présence de SDS à pH 7,0

- (a) "myosine-S" de muscle squelettique Humain adulte
- (b) "myosine-S" de muscle squelettique de Porc adulte
- (c) "myosine-S" de muscle squelettique de Lapin adulte
- (d) "myosine-S" de muscle squelettique de Poulet adulte
- (e) et (f) "myosine-S" de muscle squelettique de Grenouille
- (g) "myosine-S" de muscle squelettique de Rat adulte

3°) L'ELECTROPHORESE EN PRESENCE D'UREE 8 M A pH 8,4

*α) Chez le Lapin*

La myosine de muscle squelettique de Lapin possède quatre chaînes légères que nous notons  $L_{25}^S$ ,  $L_{18}^S$ ,  $L_{18-p}^S$  et  $L_{16}^S$ . Le muscle étudié pourrait être hétérogène, vu la présence d'une bande protéique, notée  $L_{16}'^S$ , de mobilité électrophorétique intermédiaire à  $L_{25}^S$  et  $L_{18}^S$  ( nous la notons  $L_{24}^S$  ) ( Figure III-3c ).

*β) Chez la Grenouille*

La myosine de muscle squelettique de Grenouille possède quatre chaînes légères. Les mobilités électrophorétiques de trois chaînes légères correspondent à celles de  $L_{25}^S$ ,  $L_{18}^S$ ,  $L_{18-p}^S$  de la myosine de muscle squelettique de Lapin tandis que la quatrième correspond à  $L_{16}'^S$  ( Figure III-3h ).

*γ) Chez le Poulet*

La myosine de muscle squelettique de Poulet possède quatre chaînes légères dont les mobilités électrophorétiques correspondent à celles de  $L_{25}^S$ ,  $L_{18}^S$ ,  $L_{18-p}^S$  et  $L_{16}'^S$  ( Figure III-3f )

*δ) Chez le Rat*

La myosine de muscle squelettique de Rat possède quatre chaînes légères (Figure III-3e). La chaîne légère de plus haut poids moléculaire et celle de plus faible poids moléculaire correspondent respectivement à  $L_{25}^S$  et  $L_{16}^S$  de la myosine de muscle squelettique de Lapin. La chaîne légère phosphorylée de la myosine de muscle squelettique de Rat a une mobilité électrophorétique correspondant à la chaîne

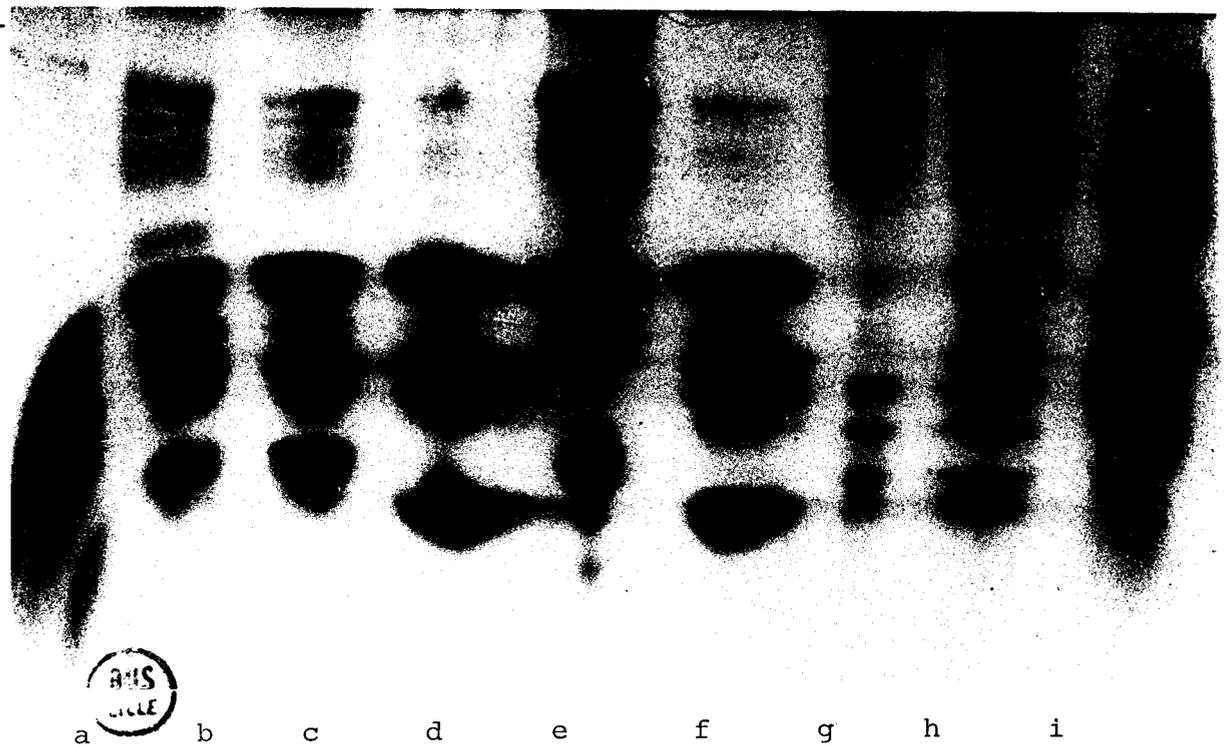


FIGURE III-3 : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (20 %), en plaque, en présence d'urée 8 M à pH 8,4.

- (a) "myosine-S" de muscle squelettique Humain adulte
- (b) "myosine-S" de muscle squelettique rouge de Lapin adulte
- (c) "myosine-S" de muscle squelettique blanc de Lapin adulte
- (d) et (f) "myosine-S" de muscle de Poulet adulte
- (e) "myosine-S" de muscle squelettique de Rat adulte
- (g) et (h) "myosine-S" de muscle squelettique de Grenouille adulte
- (i) "myosine-S" de muscle squelettique de Porc adulte

légère non phosphorylée  $L_{18}^S$  de la myosine de muscle squelettique de Lapin tandis que la forme non phosphorylée du Rat ( $L_{18}^R$ ) à une mobilité électrophorétique légèrement inférieure. à  $L_{18}^S$  et supérieure à  $L_{25}^S$ .

ε) *Chez le Porc*

La myosine de muscle squelettique de Porc possède quatre chaînes légères (Figure III-3i). Trois chaînes légères ont des mobilités électrophorétiques correspondant respectivement à celles de  $L_{25}^S$ ,  $L_{18}^S$  et  $L_{18-P}^S$ . La quatrième chaîne légère a une mobilité électrophorétique très inférieure à  $L_{25}^S$ .

δ) *Chez l'Homme*

La myosine de muscle squelettique humain possède quatre chaînes légères (Figure III-3a). Les mobilités électrophorétiques de ces chaînes correspondent à celles de la myosine de muscle squelettique de Rat précédemment décrite.

4°) CONCLUSION

*L'étude des myosines de muscles squelettiques a été effectuée pour six espèces (des Batraciens aux Mammifères supérieurs en passant par les Oiseaux et les Rongeurs). Par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (en présence de SDS à pH 8,4), les myosines de muscle squelettique possèdent trois chaînes légères dont les mobilités électrophorétiques diffèrent d'une espèce à l'autre comme nous l'avons schématisé (Tableau III-2a).*

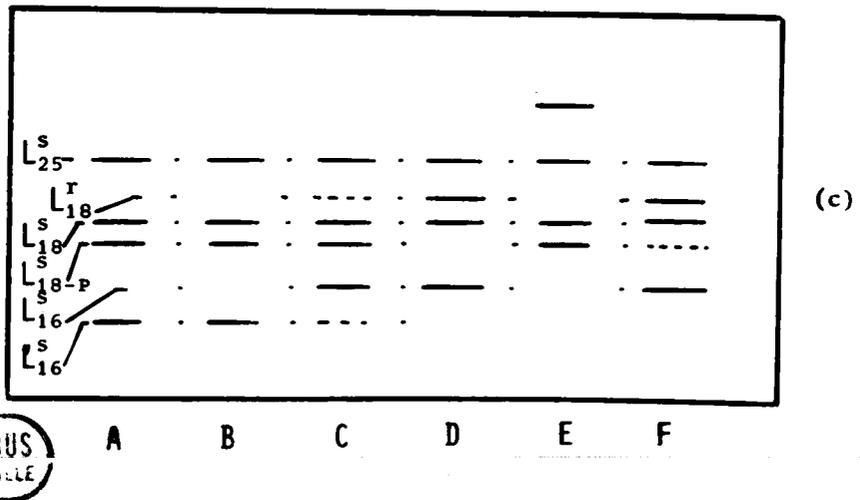
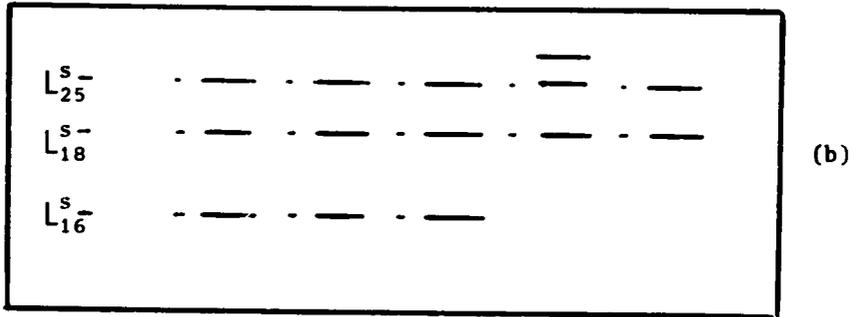
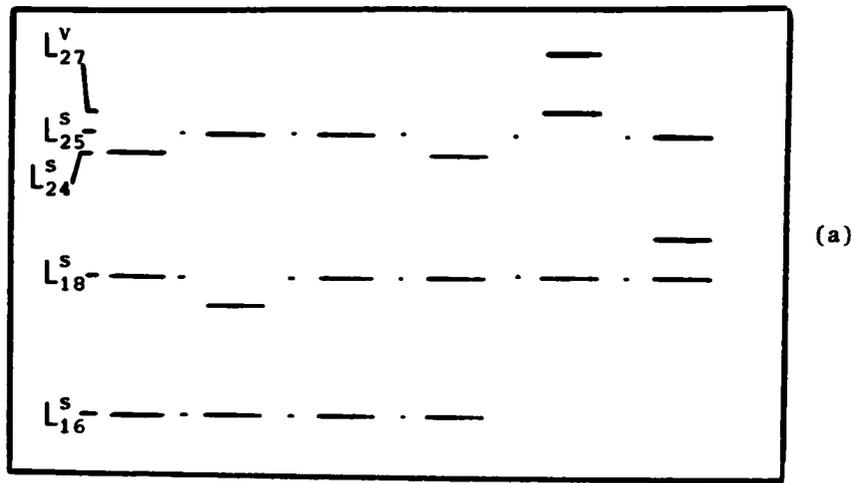


TABLEAU III-2 : Schéma récapitulatif des mobilités électrophorétiques des chaînes légères de la myosine de muscle squelettique de : Grenouille (A), Poulet (B), Lapin (C), Rat (D), Porc (E), Homme (F). Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en plaque :

(a) gel gradient (5-30 %) en présence de SDS à pH 8,4.

(b) gel gradient (5-30 %) en présence de SDS à pH 7,0

(c) gel à 20 % en présence d'urée 8 M à pH 8,4

$L_{25}^S$ ,  $L_{18}^S$ ,  $L_{18}^S-P$ ,  $L_{16}^S$  représentent les migrations électrophorétiques des chaînes légères de la myosine de référence (C).

. Après électrophorèse en présence de SDS à pH 7,0, les chaînes légères ne sont pas toutes séparées, malgré un temps de migration important (la chaîne légère  $L_{16}^{\delta}$  migrant dans la partie du gel correspondant à 30 % d'acrylamide). Par exemple, nous constatons les faits suivants :

- Deux chaînes légères sont observées pour la myosine de muscle squelettique humain.

- Les chaînes légères de 25 000 daltons (Lapin, Poulet et Homme), de 24 000 daltons (Rat) et de 27 000 daltons (Porc) ont la même mobilité électrophorétique.

- La même constatation est faite pour les chaînes légères de poids moléculaire inférieur à 18 000 daltons (Poulet) ou celle de poids moléculaire de plus de 18 000 daltons (Homme) qui ont des mobilités électrophorétiques identiques à  $L_{18}^{\delta}$  (Lapin, Rat, Porc et Homme).

Ces résultats sont schématisés dans le Tableau III-2b).

. En présence d'urée 8 M à pH 8,4, toutes les myosines de muscle squelettique étudiées ont quatre chaînes légères dont une est la forme phosphorylée. Après cette électrophorèse, on peut noter que :

- Les chaînes légères de poids moléculaires différents ont la même charge (par exemple  $L_{25}^{\delta}$  de Lapin,  $L_{24}^{\delta}$  de Rat et  $L_{27}^{\delta}$  de Porc).

- Les chaînes légères ayant le même poids moléculaire n'ont pas la même charge (par exemple,  $L_{16}^{\delta}$  de Lapin,  $L_{16}^{\delta}$  de Rat,  $L_{16}^{\delta}$  de Poulet et  $L_{16}^{\delta}$  de Grenouille).

- La myosine de muscle squelettique de Lapin semble un cas particulier. En effet, bien qu'homogène après électrophorèse en présence de SDS à pH 8,4 et ayant la composition en chaînes légères du muscle rapide ( $L_{25}^s$ ,  $L_{18}^s$  et  $L_{16}^s$ ), elle présente après électrophorèse en présence d'urée 8 M à pH 8,4 quatre bandes protéiques fortement colorées et deux bandes protéiques supplémentaires de faible intensité. Trois des bandes protéiques fortement colorées ( $L_{25}^s$ ,  $L_{18}^s$  et  $L_{18-p}^s$ ) et la bande faiblement colorée de plus grande mobilité électrophorétique ( $L_{16}^s$ ) correspondent aux chaînes légères de la myosine de muscle rapide. L'autre bande protéique fortement colorée  $L_{16}^s$  (de mobilité électrophorétique comprise entre  $L_{18-p}^s$  et  $L_{16}^s$ ) et la bande protéique faiblement colorée (de mobilité électrophorétique comprise entre  $L_{25}^s$  et  $L_{18}^s$ ) correspondent aux chaînes légères de muscle lent. Ces résultats semblent montrer que la myosine de muscle squelettique de Lapin n'a pas été isolée d'un muscle hétérogène.

- La myosine de muscle squelettique de Porc est la seule à posséder une chaîne légère de mobilité électrophorétique inférieure à celle correspondant à  $L_{25}^s$ .

Tous ces résultats sont schématisés dans le Tableau III-2c.

C'est surtout l'étude de la composition en chaînes légères des myosines de muscles squelettiques de différentes espèces, après électrophorèse en présence de SDS à pH 8,4 qui permet de montrer l'existence d'isoenzymes de myosine de muscle squelettique dont les différences se situent au niveau de

leurs chaînes légères (Tableau III-2a). A partir des Mammifères supérieurs, il y a disparition de la chaîne légère d'environ 16.000 daltons et cette troisième chaîne légère a un poids moléculaire qui peut varier de 30.000 pour la myosine de muscle squelettique de Porc à 20.000 pour la myosine de muscle squelettique humain.

Il ne semble pas y avoir de relation entre la composition en chaînes légères de la myosine de muscle squelettique et l'évolution des espèces. Toutefois, une remarque intéressante est qu'en prenant la myosine de muscle squelettique de Lapin comme myosine de référence, toutes les myosines de muscles squelettiques étudiées, sauf celle du Porc, possèdent trois chaînes légères dont deux ont des mobilités électrophorétiques qui correspondent à celles de la myosine de référence ( $L_{25}^S$ ,  $L_{18}^S$ ,  $L_{16}^S$ ).

## II - ETUDE DES MYOSINES SQUELETTIQUES A DIFFERENTS STADES DE DIFFERENCIATION

La composition en chaînes légères de la myosine squelettique chez le Lapin, le Rat et l'Homme a été étudiée à l'état foetal, adulte et tumoral.

### 1°) ELECTROPHORESE EN PRESENCE DE SDS A pH 8,4

#### α) Chez le Lapin

Si la myosine de muscle squelettique de Lapin adulte normal possède trois chaînes légères ( $L_{25}^S$ ,  $L_{18}^S$  et  $L_{16}^S$ ), les myosines isolées de muscles foetaux et tumoraux ne

possèdent que deux chaînes légères  $L_{25}^S$  et  $L_{18}^S$ . Les myosines tumorales et foetales ont un déficit en chaîne légère de plus faible poids moléculaire correspondant à  $L_{16}^S$  ( Figure III-4bc).

*β) Chez le Rat*

La myosine de muscle squelettique normal de Rat adulte possède trois chaînes légères (  $L_{24}^S$ ,  $L_{18}^S$  et  $L_{16}^S$  ) ( Figure III- 4d ). La myosine foetale possède trois chaînes légères dont les poids moléculaires correspondent aux deux chaînes légères  $L_{24}^S$  et  $L_{18}^S$  de la myosine de muscle rouge de Rat et à la chaîne légère  $L_{25}^S$  de la myosine de muscle blanc de Lapin. La chaîne légère de plus faible poids moléculaire  $L_{16}^S$  est absente ( Figure III- 4e ). La myosine tumorale possède deux chaînes légères dont les mobilités électrophorétiques correspondent aux chaînes légères  $L_{25}^S$  et  $L_{18}^S$ . La chaîne légère de plus faible poids moléculaire est absente ( Figure III- 4f ).

*γ) Chez l'Homme*

La myosine de muscle squelettique normal adulte humain possède trois chaînes légères dont deux ont des mobilités électrophorétiques identiques à  $L_{25}^S$  et  $L_{18}^S$ , la troisième chaîne légère ayant une mobilité électrophorétique légèrement inférieure à  $L_{18}^S$ .

La myosine de muscle squelettique foetal humain possède deux chaînes légères dont les poids moléculaires correspondent à ceux des chaînes légères  $L_{25}^S$  et  $L_{18}^S$ . La myosine de muscle squelettique tumoral possède également deux chaînes légères dont les poids moléculaires correspondent à  $L_{25}^S$  et  $L_{18}^S$  de la myosine de muscle squelettique adulte ( Figure III-4gh)

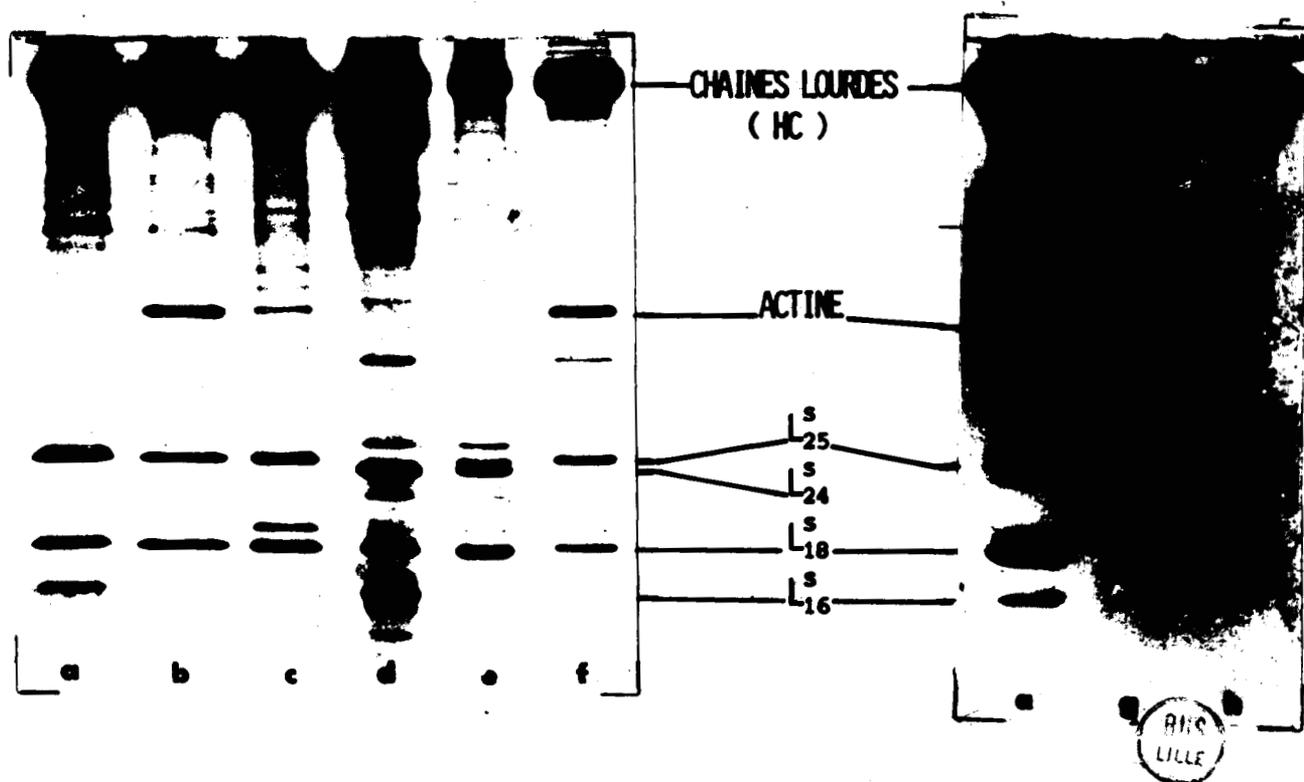


FIGURE III-4 Electrophorèse sur gel gradient de polyacrylamide (5-30%), en plaque, en présence de SDS à pH 8,4.

- (a) "myosine-S" de muscle squelettique normal de Lapin adulte
- (b) myosine tumorale de Lapin
- (c) myosine foetale de Lapin
- (d) "myosine-S" de muscle squelettique normal de Rat adulte
- (e) myosine foetale de Rat
- (f) myosine tumorale de Rat
- (g) myosine tumorale Humaine
- (h) myosine foetale Humaine

2°) L'ELECTROPHORESE EN PRESENCE D'UREE 8 M A pH 8,4

*α) Chez le Lapin*

Comme nous l'avons décrit précédemment la myosine de muscle normal de Lapin adulte possède quatre chaînes légères, la chaîne légère  $L_{18}^S$  existant sous deux formes différentes : la forme phosphorylée ( $L_{18-P}^S$ ) et la forme non phosphorylée ( $L_{18}^S$ ). La myosine de muscle squelettique foetal possède deux chaînes légères dont les mobilités électrophorétiques correspondent à la chaîne légère  $L_{25}^S$  et à la chaîne légère  $L_{18}^S$ . La myosine tumorale possède aussi deux chaînes légères dont les mobilités électrophorétiques sont identiques à celles de la myosine foetale. Comme pour la myosine foetale nous n'observons pas de chaîne légère  $L_{18-P}^S$  (Figure III-5).

*β) Chez le Rat*

La myosine de muscle squelettique normal de Rat adulte possède quatre chaînes légères ( $L_{25}^S$ ,  $L_{18}^R$ ,  $L_{18}^S$  et  $L_{16}^S$ ) comme précédemment décrit. Les myosines foetale et tumorale ne possèdent que deux chaînes légères  $L_{25}^S$  et  $L_{18}^R$ . Comme pour le Lapin, les myosines tumorale et foetale ne possèdent pas de forme phosphorylée de la chaîne légère de plus faible mobilité électrophorétique. Nous observons que les différences de migration, décelées sur l'électrophorégramme (de l'électrophorèse effectuée en présence de SDS), de la chaîne légère  $L_{24}^S$  de la myosine foetale et  $L_{25}^S$  de la myosine tumorale n'existent pas après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'urée 8 M (Figure III-6).

3°) CONCLUSION

La comparaison de la composition en chaînes légères des myosines squelettiques de Lapin à différents stades de différenciation (à l'état adulte, foetal et tumoral) nous permet de montrer que les myosines tumorale et foetale de

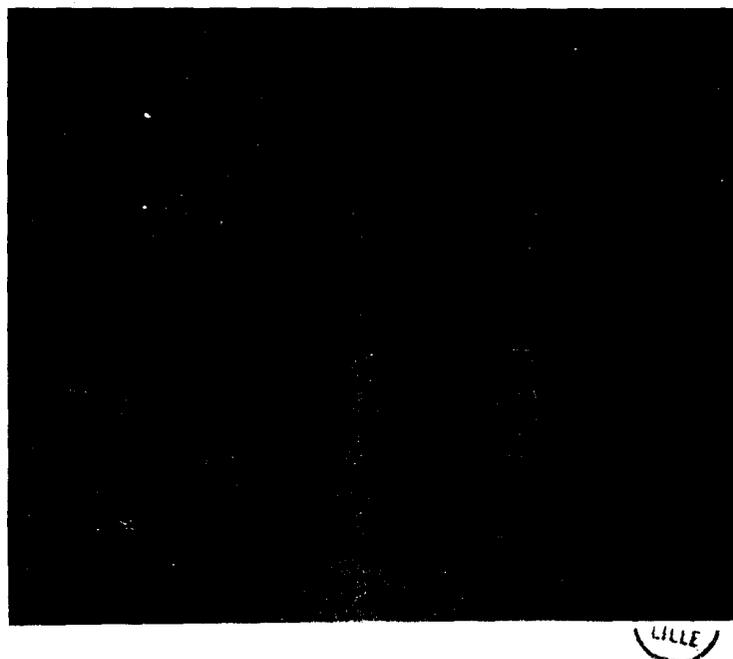


FIGURE III-5 : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide  
(20%) en plaque en présence d'urée 8M à pH 8,4  
(a) myosine de muscle squelettique normal  
de Lapin  
(b) myosine de muscle foetal de Lapin  
(c) myosine de muscle tumoral de Lapin

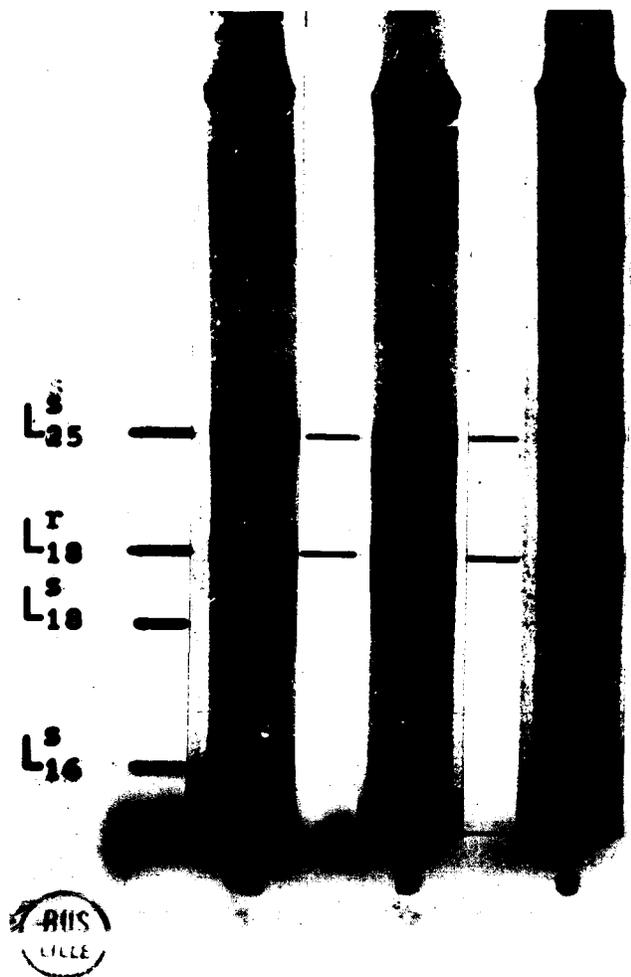


FIGURE III-6 : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (10%) en tube en présence d'urée 8M à pH 8,4  
(a) myosine de muscle squelettique normal de Rat  
(b) myosine de muscle foetal de Rat  
(c) myosine de muscle tumoral de Rat

muscle squelettique de Lapin possèdent deux chaînes légères qui correspondent aux chaînes légères  $L_{25}^S$  et  $L_{18}^S$  de la myosine de muscle squelettique adulte normal de Lapin. De plus, par électrophorèse en présence d'urée 8 M à pH 8,4, on a pu montrer qu'aucune des chaînes légères des myosines tumorale et foetale ne possèdent de forme phosphorylée.

La comparaison de la composition en chaînes légères des myosines de muscle squelettique de Rat (muscles adulte normal, foetal et tumoral) nous a permis de montrer que la myosine tumorale bien qu'issue de muscle rouge lent possède les mêmes caractéristiques que la myosine de muscle tumoral issue de muscle rapide. Quant à la myosine foetale, la présence d'une chaîne légère de mobilité électrophorétique identique à  $L_{25}^S$  de muscle squelettique de Lapin et d'une bande protéique de mobilité électrophorétique comparable à  $L_{16}^S$  faiblement représentée, est sans doute liée au fait que la myosine foetale a été isolée d'un muscle déjà trop différencié et hétérogène. Comme dans le cas du muscle tumoral ou foetal de Lapin, les myosines tumorale et foetale de Rat ne possèdent aucune chaîne légère phosphorylée.

La comparaison de la composition en chaînes légères des myosines de muscles squelettiques humains (muscle à l'état adulte normal, foetal et tumoral) nous a permis de montrer que les myosines tumorale et foetale possèdent deux chaînes légères dont les mobilités électrophorétiques correspondent aux chaînes légères  $L_{25}^S$  et  $L_{18}^S$  de la myosine de muscle squelettique adulte normal.

La comparaison des myosines tumorales des muscles squelettiques de ces trois espèces (Lapin, Rat et Homme) montre que les myosines possèdent deux chaînes légères quelle que soit l'espèce. Les mobilités électrophorétiques des chaînes légères correspondantes sont identiques.

La comparaison des myosines foetales de muscles squelettiques des trois espèces montrent qu'elles possèdent deux chaînes légères. Dans le cas de muscles très peu différenciés, les différences existent dans les mobilités électrophorétiques des chaînes légères de plus haut poids moléculaire suivant que l'on étudie un muscle foetal lent ou rapide.

Ces études nous ont permis de mettre en évidence un nouvel isoenzyme de myosine de muscle squelettique qui est la myosine tumorale et qui est différent aussi bien de la myosine foetale que de la myosine de muscle squelettique adulte normal.



## C - ETUDE DES MYOSINES POUR NOTRE MODÈLE : LE PORC

Cette étude a été effectuée sur la myosine de ventricules droit et gauche, d'oreillettes droite et gauche de coeur de Porc, de muscle squelettique\* et de muscle lisse (utérus de Truie) à l'état adulte. Les myosines de muscle squelettique et de muscle cardiaque à l'état foetal ont également été étudiées.

### I - LES MYOSINES DE MUSCLES ADULTES

#### 1°) L'ELECTROPHORESE EN PRESENCE DE SDS A pH 8,4

##### α) Myosine ventriculaire

L'électrophorégramme (Figure III-7) révèle que la "myosine-V<sub>D</sub>" et la "myosine-V<sub>G</sub>" possèdent deux chaînes légères

\* Diaphragme

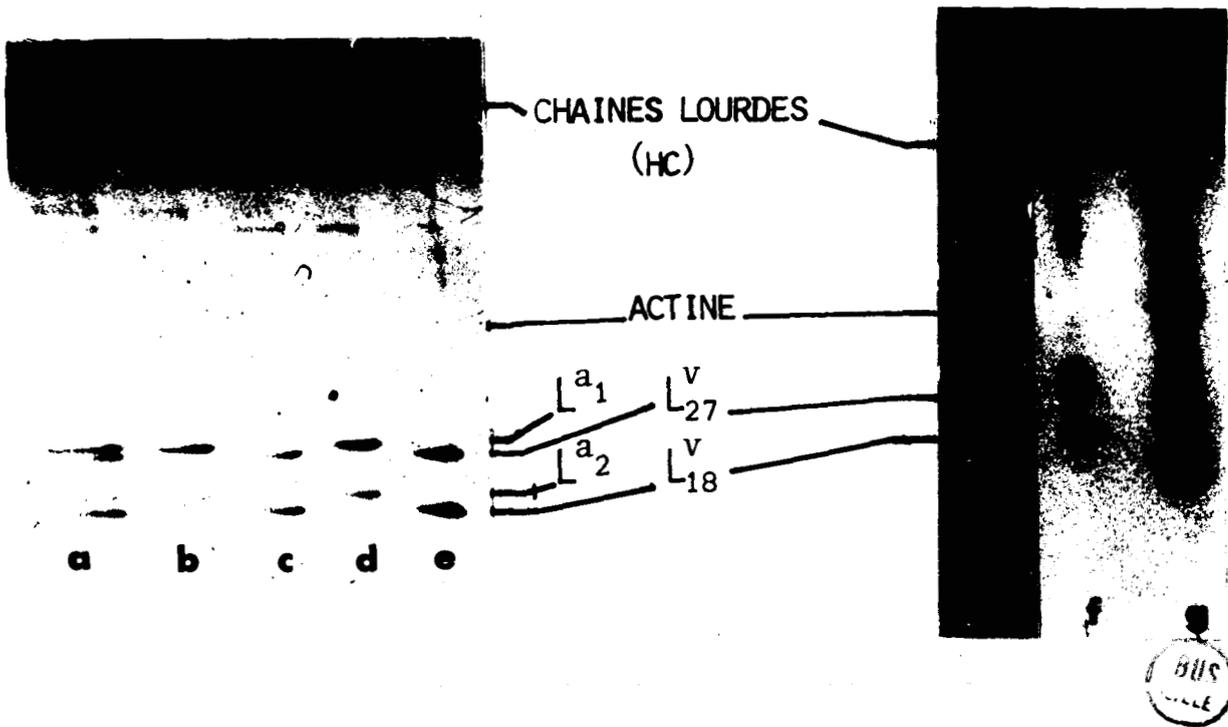


FIGURE III-7 : Electrophorèse sur gel gradient de polyacrylamide (5-30%), en plaque, en présence de SDS à pH 8,4.

- (a) "myosine- $V_G$ " + "myosine- $O_G$ " de coeur de Porc adulte
- (b) "myosine- $O_G$ " de coeur de Porc adulte
- (c) "myosine- $V_G$ " " " " " "
- (d) "myosine- $O_D$ " " " " " "
- (e) "myosine- $V_D$ " " " " " "
- (f) "myosine-S" de muscle squelettique de Porc
- (g) "myosine-L" de muscle lisse d'utérus de Truie

Les mobilités électrophorétiques des chaînes légères de plus haut poids moléculaire sont identiques. Il en est de même quand on compare entr'elles les chaînes légères de plus faible poids moléculaire. Elles correspondent à environ 27 000 et 18 000 daltons ( $L_{27}^V$  et  $L_{18}^V$ ).

β) *Myosine auriculaire*

Le même électrophorégramme révèle que la "myosine- $O_D$ " et la "myosine- $O_G$ " possèdent aussi deux chaînes légères dont les mobilités électrophorétiques des chaînes légères de plus haut poids moléculaire  $L^{a1}$  sont identiques. La même constatation est faite quand on compare entr'elles les chaînes légères de plus faible poids moléculaire  $L^{a2}$ .

Si l'on compare dans les mêmes conditions d'électrophorèse les myosines auriculaires et ventriculaires entr'elles, nous observons que les mobilités électrophorétiques des deux chaînes légères  $L_{27}^V$  et  $L_{18}^V$  de la myosine ventriculaire sont supérieures à celles de leurs homologues auriculaires  $L^{a1}$  et  $L^{a2}$ .

γ) *Myosine squelettique*

La myosine de muscle squelettique de Porc possède trois chaînes légères dont deux  $L_{27}^S$  et  $L_{18}^S$  (Figure III-7f) ont respectivement des mobilités électrophorétiques similaires à  $L_{27}^V$  et  $L_{18}^V$ . La troisième chaîne légère  $L_{30}^S$  a une mobilité électrophorétique inférieure à celle de la chaîne légère de plus haut poids moléculaire de la myosine auriculaire  $L^{a1}$ .

δ) *Myosine lisse*

Quant à la myosine utérine, elle possède deux chaînes légères caractéristiques d'un muscle lisse ( $L_{20}^l$  et

$L_{17}^l$ ). La chaîne légère de plus haut poids moléculaire  $L_{20}^l$  a une mobilité électrophorétique comprise entre  $L^{a2}$  et  $L_{18}^V$  tandis que la chaîne légère de plus faible poids moléculaire a une mobilité électrophorétique supérieure à  $L_{18}^V$  (Figure III-7g).

### 2°) L'ELECTROPHORESE EN PRESENCE DE SDS A pH 7,0

L'électrophorégramme (Figure III-8) montre que dans ce système tampon les myosines ventriculaires sont identiques entr'elles. Il en est de même pour les myosines auriculaires. Par contre, la comparaison des myosines ventriculaires et auriculaires entr'elles, révèle par rapport au système tampon à pH 8,4 que les différences dans les mobilités des chaînes légères ont changé : la différence de migration entre  $L_{27}^V$  et  $L^{a1}$  est diminuée tandis que celle entre  $L_{18}^V$  et  $L^{a2}$  est augmentée. Ces différences sont nettement visibles lors de la migration simultanée de la myosine ventriculaire et de la myosine auriculaire, déposées dans un même puits de la plaque d'électrophorèse (Figure III-8).

### 3°) L'ELECTROPHORESE EN PRESENCE D'UREE 8 M A pH 8,4

#### a) Myosine ventriculaire

Aucune différence ne peut être mise en évidence entre la "myosine- $V_D$ " et la "myosine- $V_G$ ". L'électrophorégramme (Figure III-9) montre qu'elles possèdent trois chaînes légères, la chaîne légère  $L_{18}^V$  migrant sous deux formes : une forme phosphorylée  $L_{18-p}^V$  et l'autre non  $L_{18}^V$ .

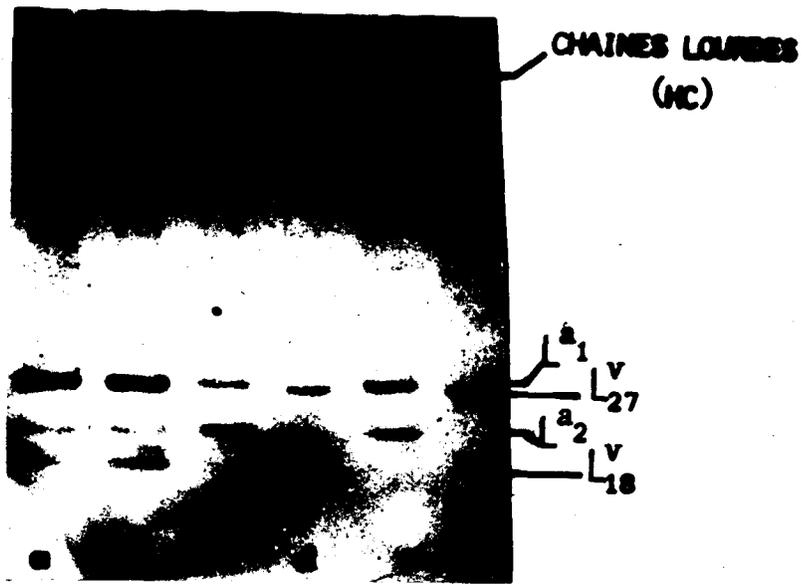


FIGURE III-8 : Electrophorèse sur gel gradient de polyacrylamide (5-30%), en plaque, en présence de SDS à pH 7,0.

- (a) "myosine-V<sub>D</sub>" + "myosine-O<sub>G</sub>" de coeur de Porc adulte
- (b) "myosine-V<sub>G</sub>" + "myosine-O<sub>D</sub>" de coeur de Porc adulte
- (c) "myosine-V<sub>D</sub>" de coeur de Porc adulte
- (d) "myosine-O<sub>D</sub>" " " " " "
- (e) "myosine-V<sub>G</sub>" " " " " "
- (f) "myosine-O<sub>G</sub>" " " " " "

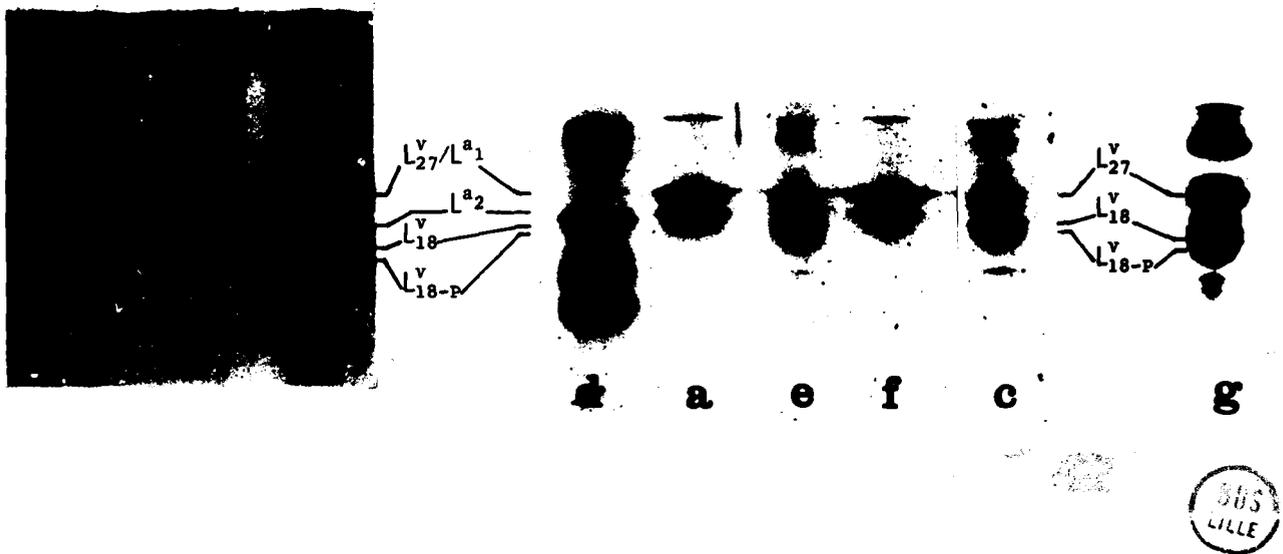


Figure III-9 : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide (20%),  
en plaque, en présence d'urée 8 M à pH 8,4.

- (a) "myosine- $O_G$ " de coeur de Porc adulte
- (b) "myosine- $V_G$ " + "myosine- $O_G$ " de coeur de Porc adulte
- (c) "myosine- $V_G$ " de coeur de Porc adulte
- (d) "myosine lisse" d'utérus de Truie
- (e) "myosine- $V_D$ " de coeur de Porc adulte
- (f) "myosine- $O_D$ " de coeur de Porc adulte
- (g) "myosine-S" de muscle squelettique de Porc adulte

β) *Myosine auriculaire*

Dans les mêmes conditions d'électrophorèse, aucune différence ne peut être mise en évidence entre la "myosine-O<sub>D</sub>" et la "myosine-O<sub>G</sub>". Elles ne possèdent que deux chaînes légères. Pour les myosines auriculaires, il n'est pas observé de forme phosphorylée de la chaîne de plus faible poids moléculaire L<sup>a2</sup> ( Figure III- 9 ).

La comparaison des myosines ventriculaires et auriculaires entr'elles montre :

- que les chaînes légères de plus haut poids moléculaire L<sub>27</sub><sup>V</sup> et L<sup>a1</sup> ont une mobilité électrophorétique similaire ;

- que la chaîne légère de plus faible poids moléculaire de la myosine auriculaire L<sup>a2</sup> a une mobilité électrophorétique inférieure à L<sub>18</sub><sup>V</sup> (Figure III- 9b).

γ) *Myosine squelettique*

La myosine de muscle squelettique possède quatre chaînes légères L<sub>30</sub><sup>S</sup>, L<sub>27</sub><sup>S</sup>, L<sub>18</sub><sup>S</sup> et L<sub>18-p</sub><sup>S</sup> dont trois ont une mobilité électrophorétique similaire aux chaînes légères de la myosine ventriculaire L<sub>27</sub><sup>V</sup>, L<sub>18</sub><sup>V</sup> et L<sub>18-p</sub><sup>V</sup>. La quatrième L<sub>30</sub><sup>S</sup> a une mobilité électrophorétique très inférieure à la chaîne légère L<sub>27</sub><sup>V</sup>. Nous notons la présence d'une chaîne légère phosphorylée L<sub>18-p</sub><sup>S</sup> (Figure III-9g).

δ) *Myosine lisse*

La myosine utérine possède trois chaînes légères (L<sub>20</sub><sup>l</sup>, L<sub>17</sub><sup>l</sup> et L<sub>17-p</sub><sup>l</sup>). La chaîne légère de plus haut poids

moléculaire  $L_{20}^l$  a une mobilité électrophorétique intermédiaire entre celles des chaînes légères  $L_{27}^v$  et  $L_{18}^v$ . Les chaînes légères  $L_{17}^l$  et  $L_{17-p}^l$  ont des mobilités électrophorétiques supérieures à celle de  $L_{18-p}^v$  (Figure III-9h).

## II - LA MYOSINE DE MUSCLE FOETAL

Comme il est difficile de connaître avec certitude l'âge du foetus de Porc, nous avons arbitrairement choisi des foetus de 11 cm qui correspondent à environ 3 mois de gestation de la Truie. Ainsi, le muscle étudié n'est pas trop différencié et peut être considéré comme du muscle foetal.

### 1°) L'ELECTROPHORESE EN PRESENCE DE SDS A pH 8,4

#### a) Les myosines cardiaques

*Les myosines ventriculaires foetales.* - Les myosines extraites des ventricules droit et gauche de coeur de Porc foetal possèdent trois chaînes légères (Figure III-10). Les mobilités électrophorétiques des chaînes légères de plus haut poids moléculaire de la myosine ventriculaire droite et gauche de coeur foetal sont identiques et correspondent à la chaîne légère de plus haut poids moléculaire de la myosine auriculaire de coeur adulte  $L^{a1}$ .

Les chaînes légères de plus faible poids moléculaire sont identiques entr'elles et correspondent à la chaîne légère de plus faible poids moléculaire de la myosine ventriculaire de coeur adulte  $L_{18}^v$ .

Les mobilités électrophorétiques des chaînes légères de poids moléculaire intermédiaire sont identiques entr'elles et correspondent à celle de la chaîne légère de la myosine ventriculaire de coeur adulte  $L_{27}^v$ .

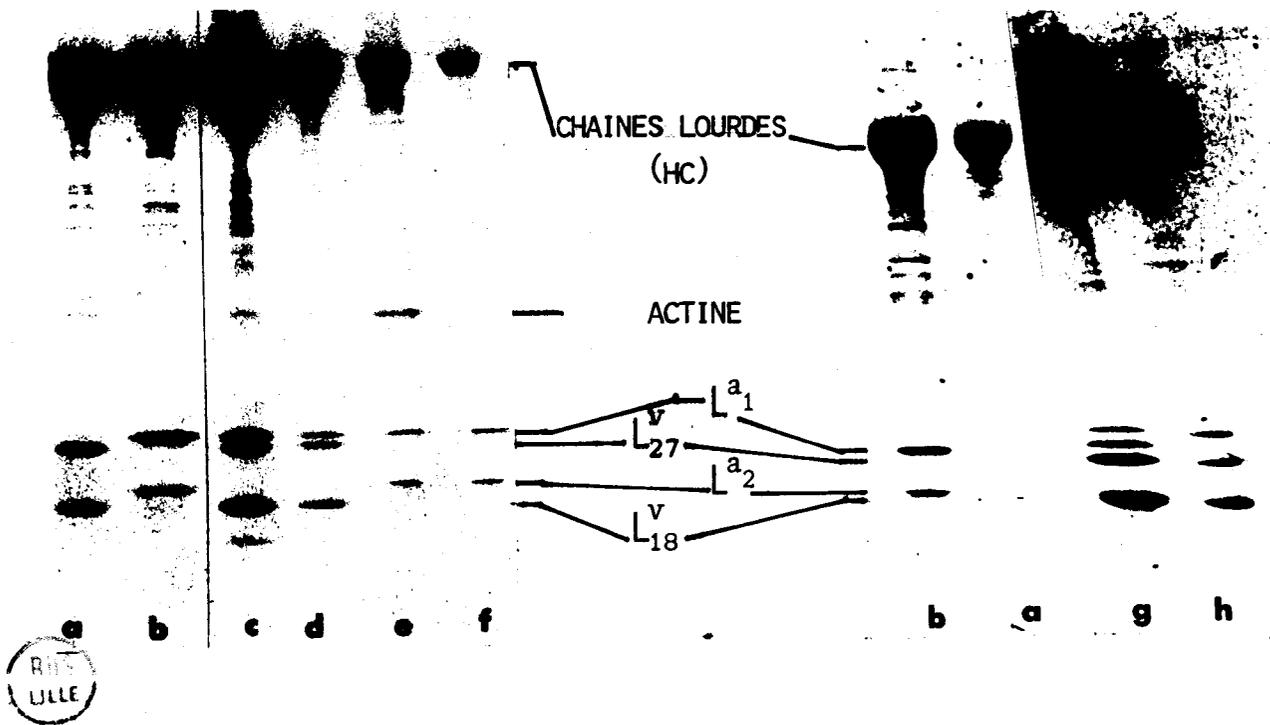


FIGURE III-10 : Electrophorèse sur gel gradient de polyacrylamide (5-30%), en plaque, en présence de SDS à pH 8,4.

- (a) "myosine- $V_G$ " de coeur de Porc adulte
- (b) "myosine- $O_G$ " " " " " "
- (c) "myosine- $V_D$ " " " " " foetal
- (d) "myosine- $V_G$ " " " " " "
- (e) "myosine- $O_G$ " " " " " "
- (f) "myosine- $O_D$ " " " " " "
- (g) "myosine-S" de muscle squelettique de Porc foetal
- (h) "myosine-S" de muscle squelettique de Porc adulte

*Les myosines auriculaires foetales.*- Les myosines extraites des oreillettes droite et gauche de coeur de Porc foetal possèdent deux chaînes légères (Figure III-10). Les mobilités électrophorétiques des chaînes de plus haut poids moléculaire sont identiques entr'elles et correspondent à la chaîne légère de plus haut poids moléculaire de la myosine auriculaire de coeur de Porc adulte  $L^{a1}$ .

Les mobilités électrophorétiques des chaînes légères de plus faible poids moléculaire sont identiques entr'elles et correspondent à la chaîne légère de plus faible poids moléculaire de la myosine auriculaire de coeur de Porc adulte  $L^{a2}$ .

*La comparaison entr'elles des myosines auriculaires et ventriculaires de coeur de Porc foetal* montre que si les myosines ventriculaires possèdent trois chaînes légères, les myosines auriculaires n'en possèdent que deux. La comparaison du comportement électrophorétique montre que seules les chaînes légères de plus haut poids moléculaire ont une mobilité électrophorétique identique correspondant à  $L^{a1}$ .

### *β) Le muscle squelettique*

La myosine de muscle squelettique foetal possède quatre chaînes légères ( Figure III-10g), trois correspondent aux chaînes légères  $L_{30}^S$ ,  $L_{27}^S$  et  $L_{18}^S$  de la myosine de muscle squelettique adulte, la chaîne légère supplémentaire a un poids moléculaire intermédiaire entre ceux des deux chaînes légères  $L_{30}^S$  et  $L_{27}^S$  de la myosine de muscle squelettique de Porc adulte. Il est à noter que si la myosine de muscle squelettique de Porc adulte ne correspond ni à de la myosine de muscle blanc de Lapin ni à de la myosine de la myosine de muscle rouge de Rat, la myosine de muscle squelettique foetal est différente de la myosine de muscle squelettique foetal de Lapin, de Rat et d'Homme.

2°) L'ELECTROPHORESE EN PRESENCE D'UREE 8 M A pH 8,4

α) Le muscle cardiaque

Les électrophorégrammes des myosines ventriculaires droite et gauche de coeur de Porc foetal sont identiques et montrent deux bandes protéiques (Figure III-11). La bande protéique de faible mobilité électrophorétique correspond à la chaîne légère  $L^{a1}$  ou  $L_{27}^V$  de la myosine de coeur de Porc adulte. L'autre bande protéique correspond à la chaîne légère  $L_{18}^V$  de la myosine de coeur de Porc adulte. Malgré la largeur de la bande, il ne peut être mis en évidence :

- ni de chaîne légère correspondant à  $L^{a2}$  de la myosine auriculaire de coeur adulte ;

- ni de forme phosphorylée correspondant à  $L_{18-P}^V$

L'électrophorégramme des myosines auriculaires droite et gauche de coeur de Porc foetal révèle l'existence de deux chaînes légères. La chaîne légère de plus haut poids moléculaire correspond à la chaîne légère  $L^{a1}$  ou  $L_{27}^V$  de la myosine de coeur de Porc adulte tandis que la chaîne légère de plus faible poids moléculaire correspond à la chaîne légère  $L^{a2}$  de la myosine de coeur de Porc adulte. Malgré la faible intensité des bandes protéiques comme dans le cas des myosines auriculaires de coeur adulte, il n'est pas mis en évidence de forme phosphorylée de cette chaîne légère de plus faible poids moléculaire.

β) Le muscle squelettique

L'électrophorégramme de la myosine de muscle squelettique de Porc foetal montre trois bandes protéiques correspondant aux chaînes légères  $L_{30}^S$ ,  $L_{27}^S$  et  $L_{18}^S$  de la myosine de muscle squelettique de Porc adulte. Nous notons surtout l'absence de la forme phosphorylée correspondant à  $L_{18-P}^S$  (Figure III-11f).

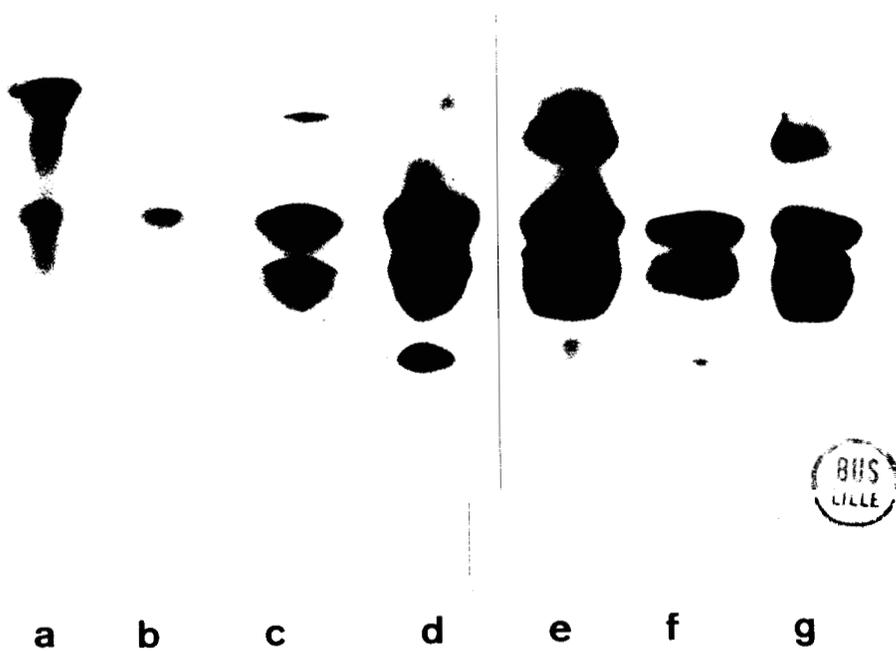


FIGURE III-11 : Electrophorèse sur gel d'acrylamide (20 %), en plaque, en présence d'urée 8 M à pH 8,4.  
(a) "myosine- $O_D$ " de coeur de Porc adulte  
(b) "myosine- $O_D$ " de coeur de Porc foetal  
(c) "myosine- $V_D$ " de coeur de Porc adulte  
(d) "myosine- $V_D$ " de coeur de Porc foetal  
(e) et (g) "myosine-S" de muscle squelettique de Porc adulte  
(f) "myosine-S" de muscle squelettique de Porc foetal

### 3°) CONCLUSION

L'étude de la composition en chaînes légères après électrophorèse en présence de SDS, des myosines extraites de deux différents muscles de Porc adulte et foetal nous a permis de caractériser sept isoenzymes de myosine de Porc dont les différences se situent au niveau de leur composition en chaînes légères, comme le montre le schéma récapitulatif ( Tableau III-3 )

D'après ce tableau, chacune des myosines étudiées possède une composition en chaînes légères spécifique. Par exemple, la myosine foetale cardiaque n'est pas la somme des constituants des myosines auriculaires et ventriculaires de coeur de Porc adulte.

Après électrophorèse en présence d'urée, nous avons mis en évidence l'existence de forme phosphorylée des chaînes légères de plus faible poids moléculaire pour la plupart des myosines de muscle adulte, sauf pour la myosine auriculaire. Nous avons observé également que les chaînes légères de poids moléculaires voisins, par exemple  $L^{a1}$  et  $L_{27}^v$ , ont une migration identique sur gel de polyacrylamide en présence d'urée 8 M.

Les caractéristiques essentielles des myosines foetales sont l'absence de forme phosphorylée de la chaîne légère de plus faible poids moléculaire et que les myosines extraites des oreillettes de coeur foetal semblent être différenciées plus rapidement que les myosines extraites des ventricules de coeur foetal.

## D - ÉTUDE DES MYOSINES CARDIAQUES DES AMPHIBIENS, DES OISEAUX ET DES MAMMIFÈRES

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre des généralités, le coeur s'est transformé au cours de l'évolution des espèces. Il est passé de deux chambres chez la Lamproie,

M Y O S I N E S D E P O R C						
MUSCLE SQUELETTIQUE		MUSCLE LISSE	MUSCLE CARDIAQUE			
NORMAL	FOETAL	NORMAL	VENTRICULE		OREILLETTE	
			NORMAL	FOETAL	NORMAL	FOETAL
L <sub>30</sub> <sup>S</sup> —	L <sub>30</sub> <sup>SF</sup> —			L <sub>a1</sub> —	L <sub>a1</sub> —	L <sub>a1</sub> —
	L <sub>29</sub> <sup>SF</sup> —					
L <sub>27</sub> <sup>S</sup> —	L <sub>27</sub> <sup>SF</sup> —		L <sub>27</sub> <sup>Y</sup> —	L <sub>27</sub> <sup>Y</sup> —	L <sub>a2</sub> —	L <sub>a2</sub> —
		L <sub>20</sub> <sup>P</sup> —				
L <sub>18</sub> <sup>S</sup> —	L <sub>18</sub> <sup>SF</sup> —		L <sub>18</sub> <sup>Y</sup> —	L <sub>18</sub> <sup>Y</sup> —		
L <sub>18-P</sub> <sup>S</sup> ---		L <sub>17</sub> <sup>P</sup> —	L <sub>18-P</sub> <sup>Y</sup> ---			
		L <sub>17-P</sub> <sup>P</sup> ---				

TABLEAU III-3 : SCHEMA RECAPITULATIF DES DIFFERENTES COMPOSITIONS EN CHAINES LEGERES OBSERVEES PAR ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE ( 5 - 30% ) EN PRESENCE DE SDS EN TAMPON TRIS-GLYCOCOLLE DE pH 8,4 A PARTIR DES MYOSINES ISOLEES DE DIFFERENTS MUSCLES DE PORC

L<sub>18-P</sub> INDIQUE LES FORMES PHOSPHORYLEES DE LA CHAINE LEGERE SEPARÉES PAR ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE ( 20% ) EN PRESENCE D'UREE 8 M EN TAMPON TRIS-GLYCOCOLLE DE pH 8,4



à trois chambres chez les Batraciens et à quatre chambres à partir des Reptiles avec une partie droite et une partie gauche bien individualisée.

Il nous a donc paru intéressant de comparer les chaînes légères des myosines extraites des différentes parties du coeur pour différentes espèces de l'arbre phylogénétique, en particulier de Batraciens, d'Oiseaux, d'Ongulés et de l'Homme. Du fait de la difficulté d'approvisionnement, nous n'avons pas pu étudier ensuite la composition en chaînes légères de la Lamproie qui possède un coeur formé d'un seul ventricule et d'une seule oreillette.

1°) L'ELECTROPHORESE EN PRESENCE DE SDS A pH 8,4

α) *Le coeur de Porc*

Les chaînes légères de la myosine cardiaque de Porc (auriculaire et ventriculaire) que nous avons décrites précédemment, nous servent de témoins pour la comparaison des mobilités électrophorétiques (Figure III-12).

β) *Le coeur de Grenouille*

La myosine extraite du ventricule de coeur de Grenouille possède deux chaînes légères (Figure III-12). La mobilité électrophorétique de la chaîne légère de plus haut poids moléculaire est comprise entre  $L_{27}^V$  et  $L^{a2}$ . La mobilité électrophorétique de la chaîne légère de plus faible poids moléculaire est largement supérieure à celle de  $L_{18}^V$ . La myosine extraite des oreillettes possèdent la même composition en chaînes légères que celle extraite du ventricule.

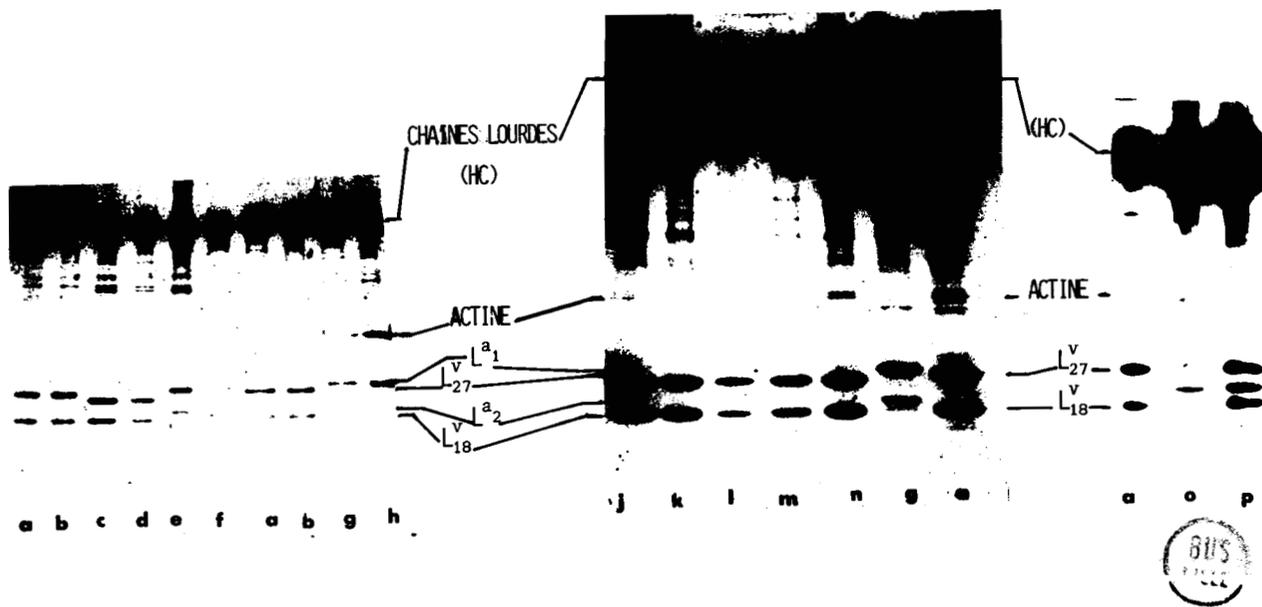


FIGURE III-12 : Electrophorèse sur gel gradient de polyacrylamide (5-30%), en plaque, en présence de SDS à pH 8,4.

- (a) "myosine- $V_G$ " de coeur de Porc adulte
- (b) "myosine- $V_D$ " " " " " "
- (c) "myosine- $V_G$ " de coeur d'Humain adulte
- (d) "myosine- $V_D$ " " " " " "
- (e) "myosine- $O_G$ " " " " " "
- (f) "myosine- $O_D$ " " " " " "
- (g) "myosine- $O_G$ " de coeur de Porc adulte
- (h) "myosine- $O_D$ " " " " " "
- (j) "myosine- $V_D$ " + "myosine- $O_G$ " de coeur de Poulet adulte
- (k) "myosine- $V_D$ " de coeur de Poulet adulte
- (l) "myosine- $O_D$ " " " " " "
- (m) "myosine- $O_G$ " " " " " "
- (n) "myosine- $V_G$ " " " " " "
- (o) "myosine- $V$ " de coeur de Grenouille
- (p) "myosine- $V_G$ " de coeur de Porc adulte  
+ "myosine- $V$ " de coeur de Grenouille

*γ) Le coeur de Poulet*

Les myosines extraites des ventricules droit et gauche et des oreillettes droite et gauche de coeur de Poulet possèdent deux chaînes légères (Figure III-12). Les mobilités électrophorétiques des chaînes légères de plus faible poids moléculaire sont identiques pour les quatre myosines et correspondent à  $L_{18}^V$ . Pour les chaînes légères de plus haut poids moléculaire, des quatre myosines cardiaques de Poulet, les mobilités électrophorétiques sont identiques et légèrement supérieures à celle de  $L_{27}^V$ .

*δ) Le coeur humain*

Les myosines extraites des ventricules droit et gauche et des oreillettes droite et gauche du coeur d'un Homme de 50 ans possèdent aussi deux chaînes légères (Figure III-12).

Pour les myosines ventriculaires, les mobilités électrophorétiques des chaînes légères de plus haut poids moléculaire sont identiques. Il en est de même pour les chaînes légères de plus faible poids moléculaire.

Les chaînes légères de plus faible poids moléculaire ont une mobilité électrophorétique identique à  $L_{18}^V$  de coeur de Porc, tandis que les chaînes légères de plus haut poids moléculaire ont une mobilité électrophorétique supérieure à  $L_{27}^V$  de coeur de Porc et inférieure à  $L^{a2}$  de coeur de Porc. Ces observations sont confirmées par la migration simultanée de la myosine de ventricule gauche de coeur de Porc et de coeur humain déposées dans un même puits de la plaque d'électrophorèse (Figure III-13).

Pour les myosines auriculaires droite et gauche, les mobilités électrophorétiques des chaînes légères de même poids moléculaire sont identiques.

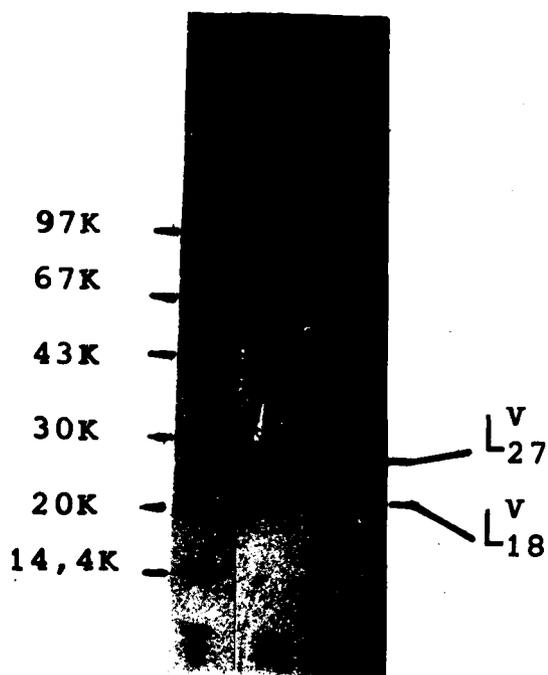


Figure III-13 : Electrophorèse sur gel gradient de polyacrylamide (5-30%), en plaque, en présence de SDS à pH 8,4.

(a) "myosine- $V_G$ " de coeur Humain adulte  
+ "myosine- $V_G$ " de coeur de Porc adulte

(b) "myosine- $O_G$ " de coeur Humain adulte  
+ "myosine- $V_G$ " de coeur de Porc adulte

T témoin de poids moléculaire correspondant  
à 97.000; 67.000; 43.000; 30.000; 20.000;  
et 14.400 daltons

Les chaînes légères de faible poids moléculaire ont une mobilité électrophorétique identique à  $L^{a2}$  de coeur de Porc.

Les chaînes légères de plus haut poids moléculaire ont une mobilité électrophorétique légèrement supérieure à  $L^{a1}$  de coeur de Porc et légèrement inférieure à  $L_{27}^V$  de coeur de Porc. Ces observations sont confirmées par la migration simultanée des myosines extraites du ventricule gauche de coeur de Porc et celle de l'oreillette gauche de coeur humain déposées dans un même puits de la plaque d'électrophorèse (Figure III-13).

## 2°) L'ELECTROPHORESE EN PRESENCE DE SDS A pH 7,0

### *α) Le coeur de Porc*

Les myosines auriculaires et ventriculaires de Porc révèlent des différences dans les mobilités électrophorétiques de leurs chaînes légères, comme nous l'avons décrit précédemment (Figure III-14).

### *β) Le coeur de Poulet*

Les myosines auriculaires et ventriculaires de coeur de Poulet présentent des chaînes légères dont les mobilités électrophorétiques des bandes protéiques de même poids moléculaire sont identiques (Figure III-14).

## 3°) CONCLUSION

L'étude de la composition en chaînes légères, après électrophorèse en présence de SDS à pH 8,4, montre que toutes les myosines des oreillettes et de ventricules de coeur pour toutes les espèces étudiées possèdent deux chaînes légères.

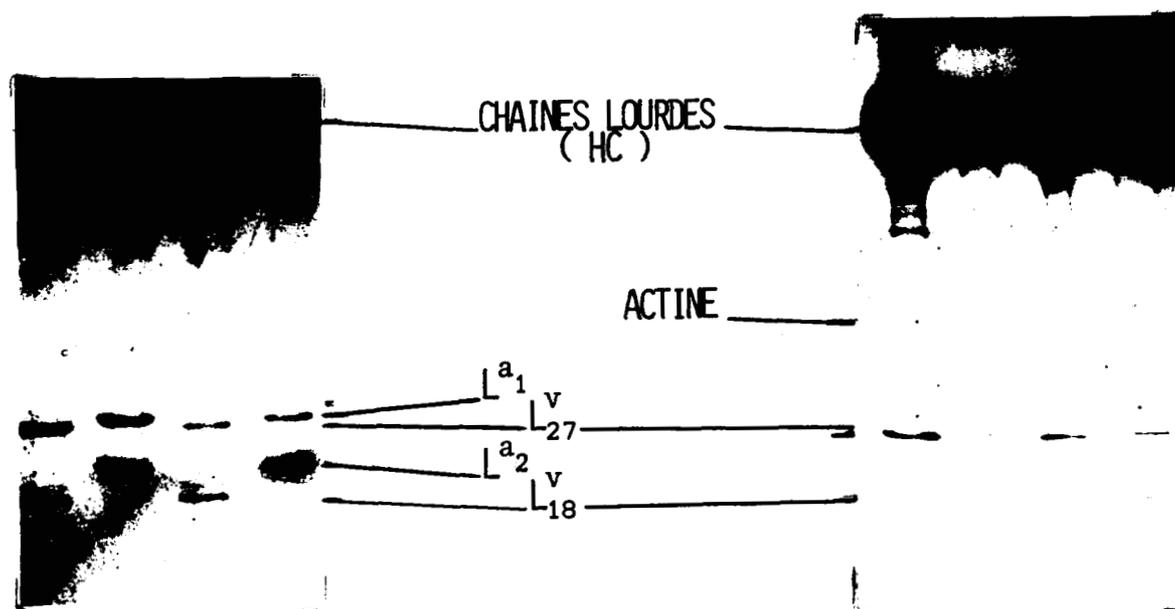


FIGURE III-14 : Electrophorèse sur gel gradient de polyacrylamide (5-30%), en plaque, en présence de SDS à pH 7,0 .

- |     |                   |    |       |    |        |        |
|-----|-------------------|----|-------|----|--------|--------|
| (a) | "myosine- $V_D$ " | de | coeur | de | Porc   | adulte |
| (b) | "myosine- $O_D$ " | "  | "     | "  | "      | "      |
| (c) | "myosine- $V_G$ " | "  | "     | "  | "      | "      |
| (d) | "myosine- $O_G$ " | "  | "     | "  | "      | "      |
| (e) | "myosine- $V_G$ " | "  | "     | "  | Poulet | adulte |
| (f) | "myosine- $O_G$ " | "  | "     | "  | "      | "      |
| (g) | "myosine- $V_D$ " | "  | "     | "  | "      | "      |
| (h) | "myosine- $O_D$ " | "  | "     | "  | "      | "      |

Le coeur de Batraciens est constitué d'un seul ventricule et de deux oreillettes : les myosines extraites des oreillettes et du ventricule ont une composition en chaînes légères identique, avec en particulier pour la chaîne légère de plus grande mobilité électrophorétique un poids moléculaire inférieur à 18.000.

Chez les Oiseaux, le coeur est constitué de deux ventricules et de deux oreillettes dont les myosines correspondantes ont une même composition en chaînes légères. La chaîne légère de plus grande mobilité électrophorétique a un poids moléculaire de 18.000 .

Chez les Mammifères supérieurs, le coeur est également constitué de deux ventricules et de deux oreillettes. La composition en chaînes légères des myosines auriculaires et ventriculaires sont différentes :

- La comparaison des myosines ventriculaires de coeur de Porc et de coeur humain montre que bien qu'elles possèdent la chaîne légère de 18 000 daltons, leur composition en chaînes légères est différente.

- La même comparaison pour les myosines auriculaires montre que bien que possédant la même chaîne légère de plus faible poids moléculaire, elle diffèrent par leur chaîne légère de plus haut poids moléculaire.

A partir de l'apparition des Mammifères au cours de l'évolution des espèces, on constate une différenciation au niveau des chaînes légères entre les myosines auriculaires et ventriculaires (Tableau III- 4).

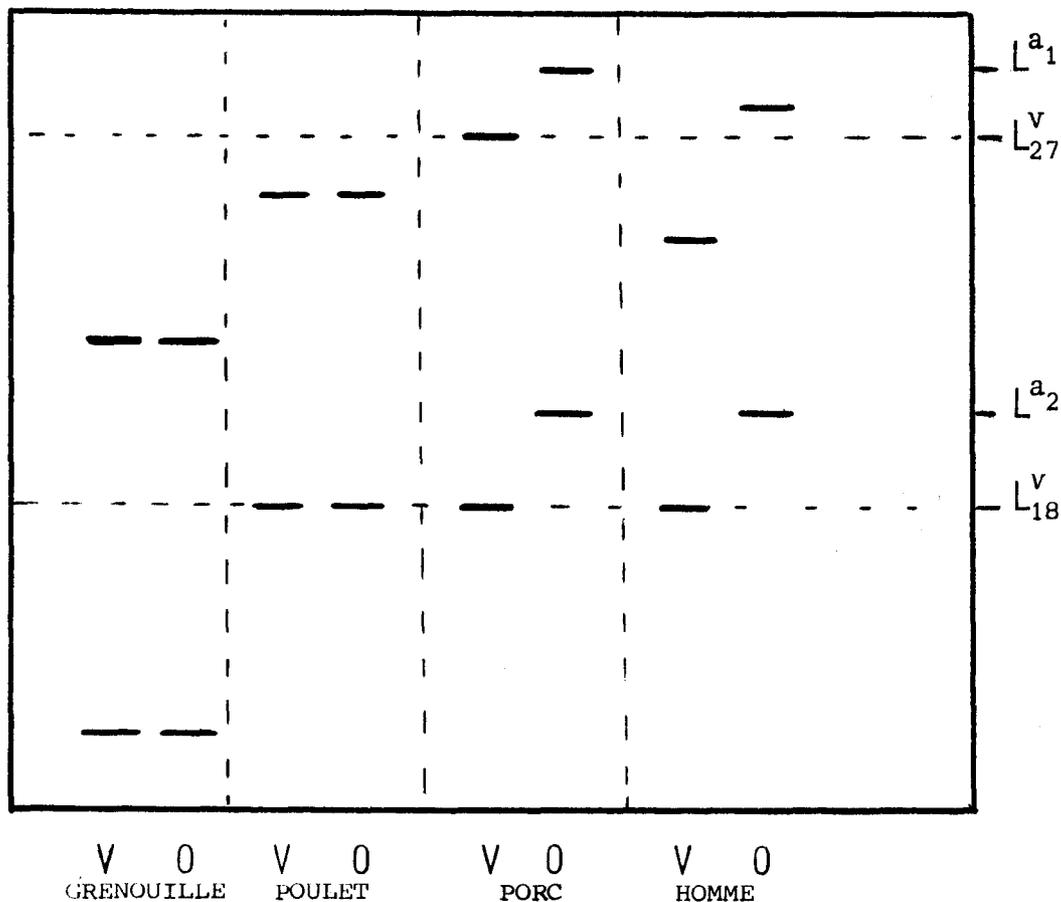


TABLEAU III-4 : Schéma de la composition en chaînes légères de l'oreillette et du ventricule de coeur au cours de l'évolution des espèces. Composition établie à partir des électrophorèses sur gel d'acrylamide en présence de SDS à pH 8,4.

O : désigne la myosine auriculaire

V. : désigne la myosine ventriculaire

Les différences entre les différentes chaînes légères sont à l'échelle et comparative par rapport à la "myosine-V" extraite du coeur de Porc (27.000 et 18.000 daltons).

Ces schémas sont établis à partir des distances de migration électrophorétique mesurées directement sur le gel de polyacrylamide.



**ETUDE**  
**DE LA STRUCTURE PRIMAIRE**  
**DE LA CHAINE LEGERE**  
**DE PLUS HAUT POIDS MOLECULAIRE**  
**DE LA MYOSINE**  
**DU VENTRICULE GAUCHE**  
**DE COEUR DE PORC**

Ce chapitre a fait l'objet des publications suivantes :

- X. GRANDIER-VAZEILLE et D. TETAERT,  
Isolement des chaînes légères de la myosine cardiaque de Porc et étude des polypeptides obtenus après action du bromure de cyanogène.  
*Biochimie*, 1978, 60, 409-415.
- X. GRANDIER-VAZEILLE, D. TETAERT, B. HEMON, K.K. HAN and G. BISERTE,  
Partial amino acid sequence of pig heart left ventricular myosin light chain L<sub>27</sub>.  
*Protides of biological fluids XXVIIIth Colloquium edited by H. Peeters*, 1980, 28, 75-78.
- X. GRANDIER-VAZEILLE, D. TETAERT, B. HEMON and G. BISERTE  
Evaluation of commercial RP-HPLC columns for the separation of peptides from porcine cardiac myosin light chain L<sub>27</sub>.  
*Protides of biological fluids XXXth Colloquium, edited by H. PEETERS*, 1982, 30 (sous presse).

#### AVANT-PROPOS

L'étude de la structure primaire des chaînes légères de myosine a fait l'objet de quelques travaux. Lors de nos premières études de la structure de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la "myosine-V<sub>G</sub>" de coeur de Porc, seules les structures primaires des chaînes légères L<sub>25</sub> et L<sub>16</sub> de la myosine de muscle squelettique de Lapin (Frank et Weeds, 1974) et la structure partielle de L<sub>27</sub> de la myosine de coeur de Boeuf (Weeds, 1975) étaient connues.

Depuis neuf structures primaires ont été déterminées :

- . chaîne légère L<sub>18</sub> de la myosine de muscle squelettique de Lapin (Matsuda *et al.*, 1977),
- . chaîne légère L<sub>27</sub> de la myosine cardiaque de Poulet (Maita *et al.*, 1980),
- . chaîne légère L<sub>25</sub> de la myosine de muscle squelettique de Poulet (Matsuda *et al.*, 1981),
- . chaîne légère L<sub>16</sub> de la myosine de muscle squelettique de Poulet (Maita *et al.*, 1981),
- . chaîne légère L<sub>18</sub> de la myosine de muscle squelettique de Poulet (Matsuda *et al.*, 1977),
- . chaîne légère L<sub>20</sub> de la myosine lisse de gésier de Poulet (Matsuda *et al.*, 1981),
- . chaîne légère L<sub>18</sub> et L<sub>18-p</sub> de la myosine de ventricule de cœur de Poulet et chaîne légère L<sub>17</sub> de la myosine de muscle lisse de gésier de Poulet (Matsuda *et al.*, 1981).

La comparaison des séquences en acides aminés montre que toutes les chaînes légères ont leur acide aminé en position N-terminale bloqué. Elles ne contiennent pas de résidu de tryptophane et le taux en tyrosine et en histidine est peu élevé.

Il a été montré également qu'il y a une homologie certaine entre les séquences en acides aminés des chaînes légères, (celles de plus haut poids moléculaire), la TN-C et la parvalbumine de Carpe (Collins, 1974) ce qui indiquerait que ces protéines auraient eu une protéine ancestrale commune. D'autre part, les répétitions de séquence suggèrent qu'il y ait eu duplication de gène pendant leur évolution.

La structure tridimensionnelle de la parvalbumine de Carpe a été déterminée par diffraction aux rayons X (Kretsinger et Nockdls, 1973). Elle montre que cette protéine, qui lie le calcium, est formée par duplication de gène et possède deux sites de fixation. Chacun des sites est situé dans une boucle, celle-ci étant insérée entre deux régions hélicoïdales. La parvalbumine

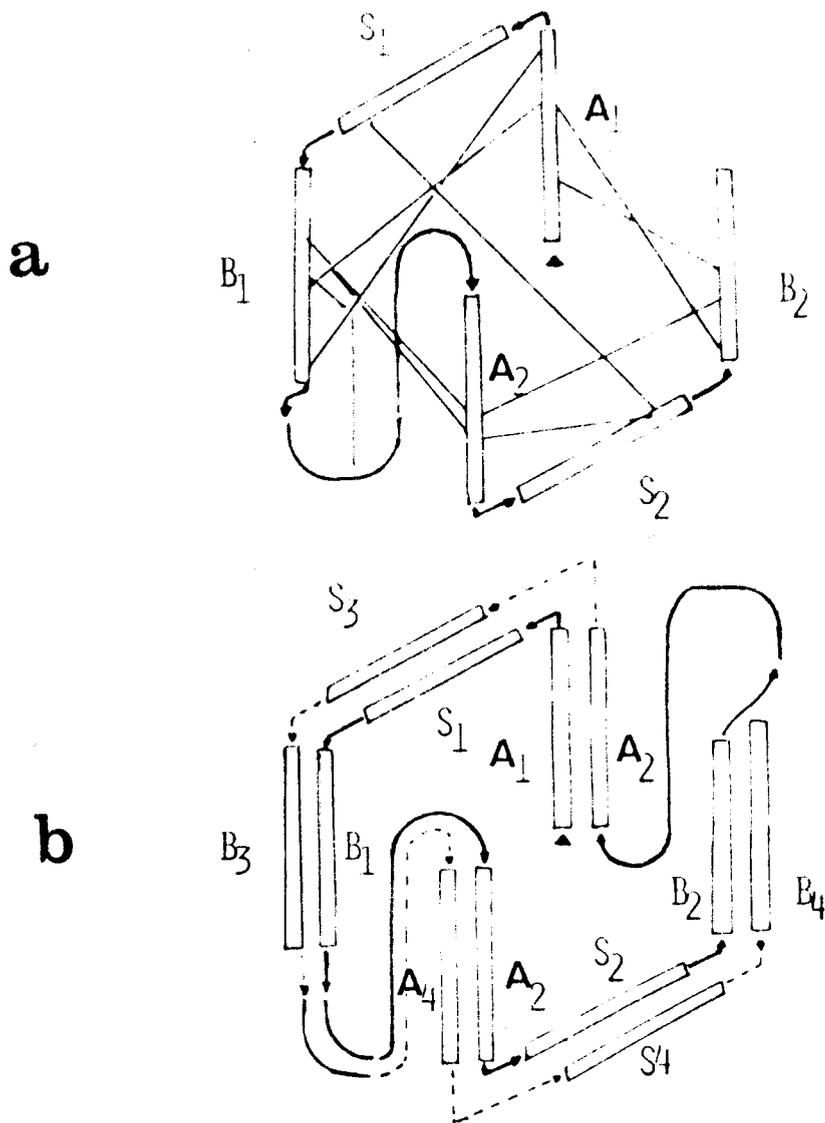


FIGURE IV-1 (a) Structure tridimensionnelle établie par diffraction aux rayons X de la Parvalbumine de Carpe ( Notons les interactions de type Van der Waals entre les différentes hélices  $\alpha$  )

( KRETSINGER et NOCKOLDS 1973 )

(b) Structure tridimensionnelle de la chaîne légère  $L_{25}$  de la myosine de muscle squelettique de Lapin déduite par homologie ( WEEDS et Mc LACHLAN 1974 ).

Les symboles A et B correspondent aux hélices  $\alpha$  qui stabilisent la structure et les symboles S correspondent aux "sites de fixation du calcium".



possède deux régions hélicoïdales supplémentaires et ainsi les six hélices s'arrangent pour former une structure très hydrophobe qui stabilise la structure tridimensionnelle (Figure IV-1).

L'existence de cette structure hydrophobe dépend de certains acides aminés apolaires situés dans des positions très spécifiques. Ils permettent des interactions de type Van der Waals entre chaque région hélicoïdale.

La comparaison des séquences en acides aminés des calciprotéines, parvalbumine et TN-C, montre l'existence de séquences homologues se situant au niveau des sites de fixation du calcium et dans les régions hélicoïdales. La TN-C, qui possède quatre sites de fixation du calcium, a une structure similaire à celle de la structure hydrophobe particulière de la parvalbumine (Weeds et Mc Lachlan, 1974) (Figure IV-1).

L'étude de la séquence en acides aminés de la chaîne légère  $L_{25}$  de la myosine de muscle blanc de Lapin a permis de montrer une homologie de séquence certaine entre la TN-C, la parvalbumine et la chaîne légère, mais aussi des petites différences, comme par exemple le nombre de résidus acides au niveau des "sites de fixation du calcium", qui seraient suffisantes pour que les chaînes légères ne fixent pas le calcium (Weeds, 1975).

Il est donc intéressant d'étudier la structure primaire de la chaîne légère de plus haut poids moléculaire de la "myosine- $V_G$ " de coeur de Porc et de la comparer à celles des myosines d'autres espèces, ou d'autres muscles, ainsi qu'à la TN-C et à la parvalbumine, afin de savoir s'il existe une relation entre l'évolution des espèces et les petites différences au niveau des séquences du "site de fixation du calcium". De plus, un autre intérêt de cette étude est de connaître le rôle de la duplication de gène de ces différentes protéines (parvalbumine, TN-C et chaîne légère).

Cette étude de structure primaire semble néanmoins difficile du fait de l'hétérogénéité de structure de cette chaîne légère de plus haut poids moléculaire (Ueda et Yazaki, 1981).

## A - INTRODUCTION

Bien que les mobilités électrophorétiques des chaînes légères de même poids moléculaire, pour la "myosine  $V_D$ " et la myosine  $V_G$ ", soient identiques (Chapitre III), les différences observées au niveau des chaînes lourdes de ces myosines (Chapitre I), nous ont amené à séparer les deux ventricules pour l'étude de la structure covalente des chaînes légères de la myosine cardiaque de Porc.

Nous nous sommes attachés, dans ce travail, à l'étude de la chaîne légère de plus haut poids moléculaire (" $L_{27}$ ") de la myosine extraite du ventricule gauche de coeur de Porc. (Pour la définition de la chaîne légère  $L_{27}$ , voir le Chapitre I)

## B - PRÉPARATION, CARACTÉRISATION ET HYDROLYSE DES CHAINES LÉGÈRES DE MYOSINE DE VENTRICULE GAUCHE DE COEUR DE PORC.

### I - POINTS ISOELECTRIQUES DES SOUS-UNITES DES MYOSINES VENTRICULAIRES.

La détermination des points isoélectriques des sous-unités d'extraits bruts d'actomyosine des ventricules de coeur de Porc a été effectuée par électrophorèse en double dimension (isoélectrofocalisation/électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS) selon la méthode de Boulanger et al., (1979) (AT-IV-A). Les valeurs des points isoélectriques pour les trois sous-unités (chaînes lourdes et les deux chaînes légères  $L_{27}$  et  $L_{18}$ ) de la "myosine- $V_D$ " sont identiques à celles de la "myosine- $V_G$ ". Ces valeurs ainsi que celle de l'actine cardiaque

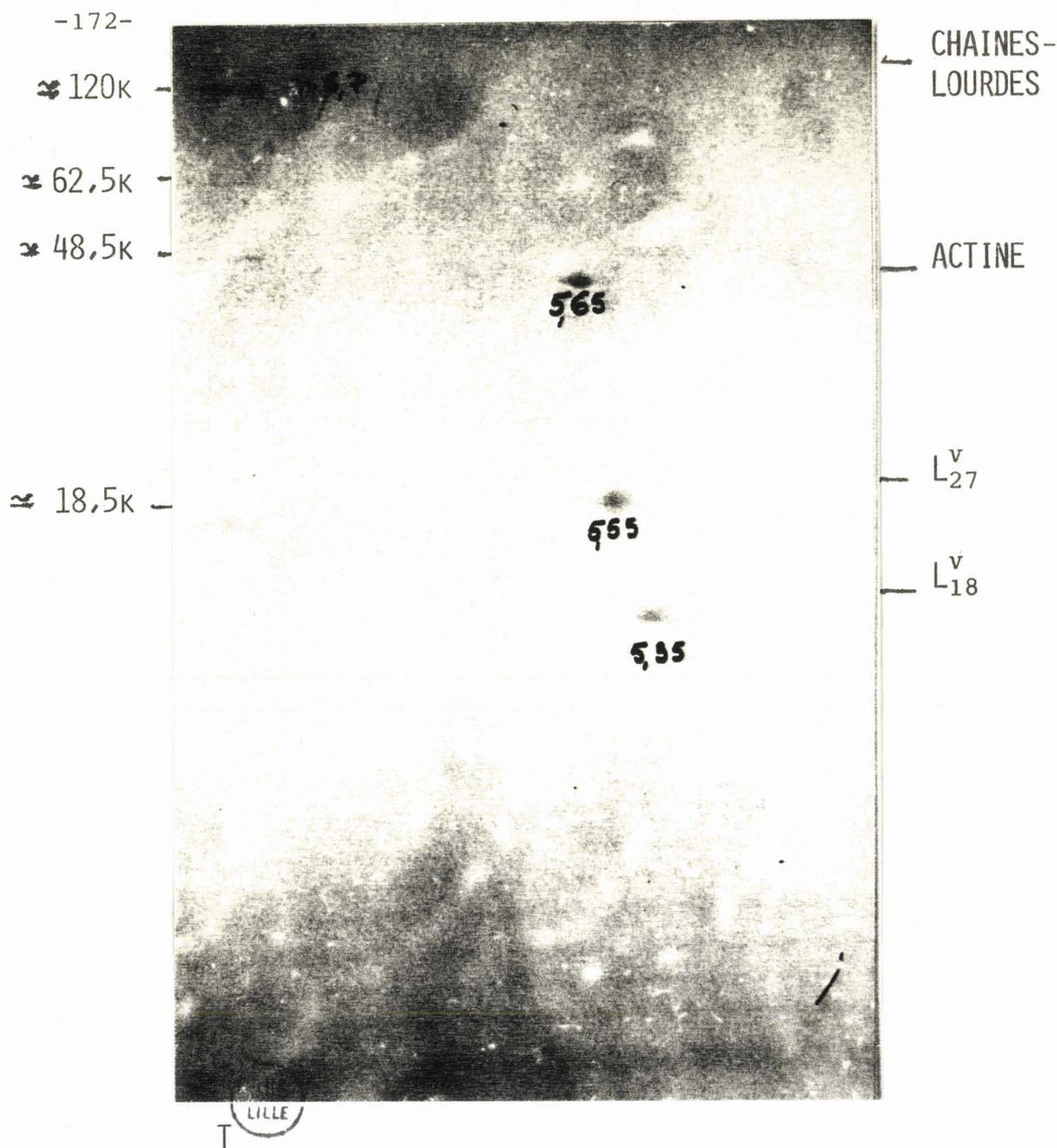


FIGURE IV-2 Détermination des points isoelectriques des sous-unités d'actomyosine cardiaque par électrophorèse en double dimension

Première dimension isoélectrofocalisation dans les conditions décrites par BOULANGER et al 1979

Deuxième dimension électrophorèse sur gel de polyacrylamide ( 20% ) en plaque, en tampon Tris-Glycocolle de pH 8,4 en présence de SDS. Les marqueurs de poids moléculaire sont des protéines de l'adénovirus de type II correspondant à des sous-unités d'environ 120.000 ; 62.500 ; 48.000 et 18.500 daltons.

sont données dans la Figure IV-2.

## II - PREPARATION DE LA CHAÎNE LÉGÈRE "L<sub>27</sub>"

Pour isoler la chaîne légère "L<sub>27</sub>", une préparation brute (AT-I-Ab) de myosine cardiaque de ventricule gauche a été utilisée. Contrairement à la myosine de muscle squelettique, l'action de l'acide 5,5'-dithio bis-2 nitro benzoïque (DTNB) ou le traitement alcalin ne permettent pas de dissocier sélectivement chacune des chaînes légères de la myosine cardiaque. Seule l'action d'agents dissociants (urée 8M ou chlorhydrate de guanidine 6M) permet la dissociation chaînes lourdes/chaînes légères de la myosine cardiaque. Trois techniques ont été utilisées pour purifier chacune des chaînes légères de la myosine cardiaque de Porc.

### 1°) CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE D'IONS

Pour séparer les chaînes légères de la myosine cardiaque plusieurs auteurs (Perrie et Perry, 1970 ; Kendrick-Jones et al., 1976) effectuent une dissociation chaînes lourdes/chaînes légères suivie d'une chromatographie d'échange d'ions sur DEAE-Cellulose (Weeds et Lowey, 1971 ; Leger et al., 1975). Le rendement de la séparation est en général faible. Dans le cas de la myosine cardiaque de Porc, nous avons utilisé la chromatographie d'échange d'ions sur colonne de DEAE-Sephadex A<sub>50</sub> dans les conditions de Richards et al., (1967) (AT-XII-Bb) qui a conduit à l'obtention de 9 mg de l'une des chaînes légères par gramme de myosine.

### 2°) PRECIPITATION DITE "ISOELECTRIQUE"

Cette méthode de séparation plus récente (Hiratsuka, 1980) a été essayée au laboratoire (AT-II-B).

Lors de nos deux essais, nous avons rencontré de nombreux problèmes :

. après dissociation des chaînes lourdes/chaînes légères, l'étape d'élimination des chaînes lourdes, par

précipitation, entraîne une quantité importante de chaînes légères.

. lors de l'étape de dialyse, pour éliminer l'urée, il y a formation d'un précipité qui, analysé par électrophorèse sur gel de polyacrylamide, est un mélange de chaînes lourdes et de chaînes légères.

. l'étape de concentration par ultrafiltration provoque un abaissement du pH de la solution et entraîne la précipitation des chaînes légères (une étape de dissolution et de centrifugation supplémentaire est nécessaire).

. lors de la séparation sélective des chaînes légères par précipitation isoélectrique à pH 5,3, nous obtenons la chaîne légère L<sub>27</sub> dans le surnageant, mais le précipité contient la chaîne légère L<sub>18</sub> contaminée par une quantité importante de L<sub>27</sub>.

Lors de nos deux essais, les rendements obtenus ont toujours été nettement inférieurs à ceux publiés par les auteurs.

### 3°) ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE PREPARATIVE

*L'étude de la structure primaire exigeant l'isolement par une technique simple d'une quantité relativement importante d'une protéine dans un état de pureté élevé, nous avons mis au point un mode opératoire original permettant de séparer en une seule étape les chaînes lourdes de chacune des chaînes légères. Une technique d'électrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide en présence d'urée 8M et l'éluion des bandes protéiques colorées, permet d'isoler séparément 80 à 100 mg de chaînes légères par gramme de myosine déposé sur le gel (AT-II-Ab). Les chaînes légères purifiées par cette méthode ont été utilisées pour nos études de structure primaire.*

#### 4°) CRITERE DE PURETE DES PREPARATIONS

La préparation de myosine comme celle des chaînes légères sont analysées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS en tampon Tris-glycocolle de pH 8,4 (AT-III-Aa).

L'électrophorégramme (Figure IV-3) révèle que la myosine du ventricule gauche de coeur de Porc migre sous la forme de trois bandes dont les mobilités électrophorétiques correspondent respectivement à 200 000, 27 000 et 18 000 daltons.

*Chacune des préparations de chaînes légères se révèlent homogènes compte tenu du témoin de myosine adjacent (Figures IV-3c et IV 3d).*

### III - ETUDE DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINES ET DE L'ACIDE AMINE N-TERMINAL DES CHAINES LEGERES

#### 1°) COMPOSITION EN ACIDES AMINES

Les compositions en acides aminés des chaînes légères L<sub>27</sub> et L<sub>18</sub> de la "myosine V<sub>G</sub>" de coeur de Porc ont été réalisées dans les conditions décrites (AT-XV-A).

Ces compositions ne mettent pas en évidence de différences très caractéristiques entre les deux chaînes légères (Tableau IV-1). *Seul le taux de proline peut être considéré comme différent.*

#### 2°) DETERMINATION DE L'ACIDE AMINE N-TERMINAL

La méthode des dansyl-amino-acides devait nous permettre de déterminer l'acide aminé en position N-terminale (AT-XVI-A).

Par cette technique, aucun  $\alpha$ -dansyl-amino-acide n'est identifiable, aussi bien pour L<sub>27</sub> que pour L<sub>18</sub> : les deux chaînes légères possèdent une *extrémité N-terminale bloquée*, comme les chaînes légères d'autres types de muscle (dont la structure covalente a déjà été déterminée) (L<sub>25</sub> ; L<sub>18</sub> ;

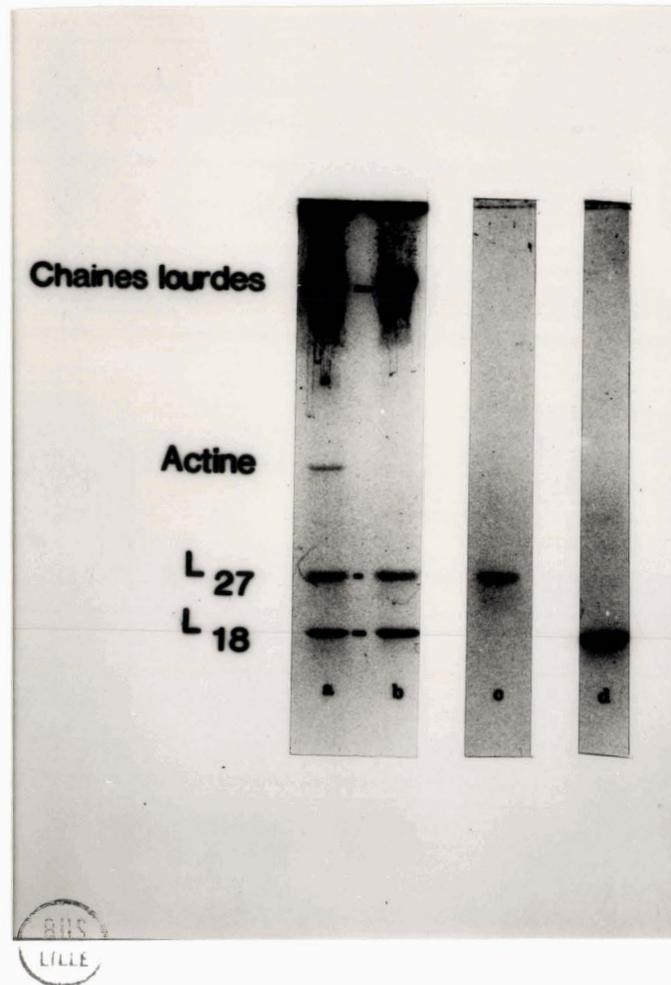


FIGURE IV-3 Electrophorèse sur gel gradient de polyacrylamide ( 5-30% ) en plaque en tampon Tris-Glycocolle de pH 8,4 et en présence de SDS

- (a) d'un extrait brut d'une préparation de myosine de coeur de Porc
- (b) de la préparation purifiée par centrifugation à 105.000 g en présence de  $\text{Na}_2\text{-ATP}$
- (c) préparation de la chaîne légère L<sub>27</sub>
- (d) préparation de la chaîne légère L<sub>18</sub>

	( a ) *	( b )	( c )	( d )	( e ) *	( f )
ASP	18	20	18	16	18	23
THR	10	7	11	12	7	10
SER	6	8	5	4	10	5
GLU	28	29	28	34	32	23
PRO	14	13	17	17	4	6
GLY	13	12	14	11	12	13
ALA	17	23	18	14	17	14
CYS/2	1	1	3	2	1	2
VAL	8	11	9	11	8	9
MET	7	6	7	8	7	6
ILE	6	9	7	7	7	10
LEU	13	14	14	12	15	9
TYR	3	3	3	3	3	2
PHE	8	8	10	10	4	12
HIS	3	2	3	3	1	1
LYS	15	20	20	22	14	16
ARG	6	4	5	6	6	6
TRP	0	0	0	0	0	1

TABLEAU IV-1 *Composition en acides aminés des chaînes*

*légères de myosine pour différentes espèces*

(a)  $L_{27}$  de la "myosine- $V_G$ " de coeur de Porc

( GRANDIER-VAZEILLE et TETAERT 1978 )

(b)  $L_{25}$  de la myosine de muscle squelettique

de Lapin ( FRANCK et WEEDS 1974 )

(c)  $L_{27}$  de la myosine de coeur de Boeuf ( WEEDS 1975 )

(d)  $L_{27}$  de la myosine de coeur de Poulet ( MAITA et al  
1980 )

(e)  $L_{18}$  de la "myosine- $V_G$ " de coeur de Porc

( GRANDIER-VAZEILLE et TETAERT 1978 )

(f)  $L_{18}$  de la myosine de muscle squelettique

de Lapin ( MATSUDA et al 1977 )

\* Valeur moyenne arrondie pour 12 analyses ( 24 et 72 heures )

Le tryptophane a été dosé selon la méthode de LIU et CHANG 1969



L<sub>16</sub> de la myosine du muscle squelettique blanc de Lapin (Franck et Weeds, 1974) L<sub>25</sub> de la myosine de muscle cardiaque de Poulet (Maita *et al.*, 1980) et la structure partielle de L<sub>27</sub> de la myosine cardiaque de Boeuf (Weeds, 1975).

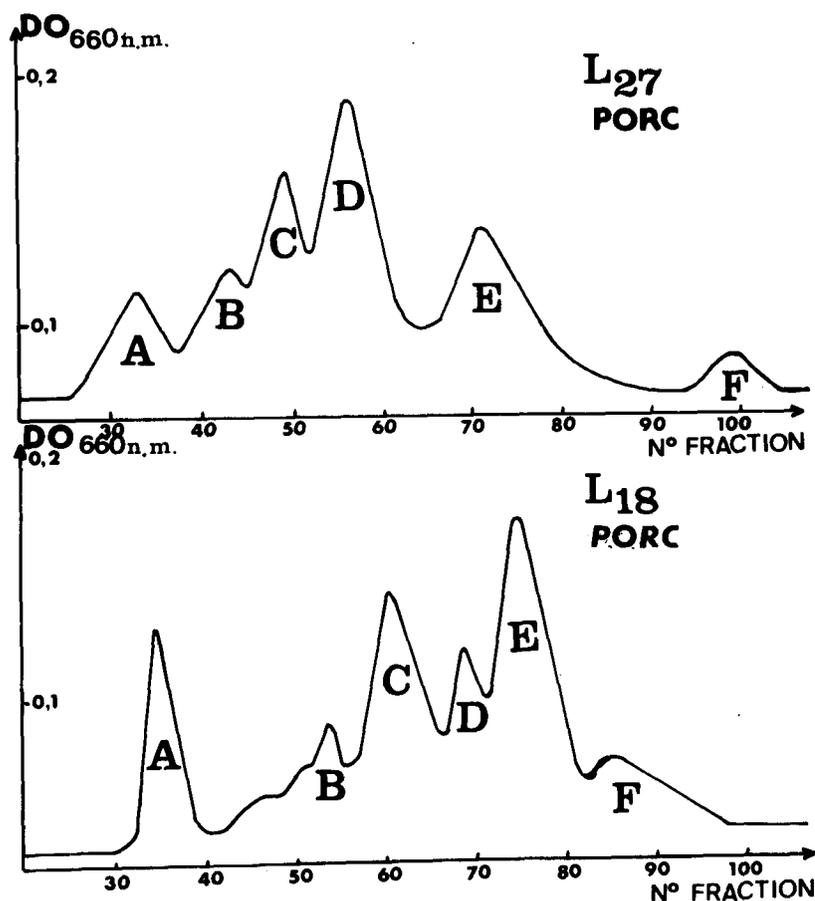
#### IV - ETABLISSEMENT D'UN CRITERE DE PURETE SPECIFIQUE DE LA CHAINE L<sub>27</sub>

Les chaînes légères L<sub>27</sub> et L<sub>18</sub> de la "myosine-V<sub>G</sub>" du coeur de Porc ne révélant pas de différences très caractéristiques ni dans les compositions en acides aminés, ni au niveau de leurs extrémités N-terminales, nous avons pensé qu'il était important d'établir un autre critère de pureté que l'électrophorèse analytique sur gel de polyacrylamide.

Les hydrolysats par le bromure de cyanogène (BrCN) de chacune des chaînes légères préalablement alkylées (AT-VIII-Ab) sont fractionnés par chromatographie de gel filtration sur colonne de Sephadex G<sub>50</sub> en tampon Tris-HCl de pH 9,5 ; propionate de sodium 1M (AT-X-D).

Les profils d'élution, représentés figure IV-4 montrent que seules les fractions de faible temps de rétention (Fraction A), sont bien séparées. Ces fractions A<sub>27</sub> pour L<sub>27</sub> et A<sub>18</sub> pour L<sub>18</sub> correspondent au peptide de plus haut poids moléculaire. Elles ont été isolées et analysées en déterminant leur composition en acides aminés et en étudiant leur acide aminé en position N-terminale.

. La fraction A<sub>27</sub> n'a pas d'extrémité N-terminale dansylable et sa composition en acides aminés est caractérisée par un taux élevé en proline, en acide glutamique, en alanine et en lysine tandis que celui en leucine est faible et celui en tyrosine est nul (Tableau IV-2).



**FIGURE IV-4** Profil d'élution sur colonne de Sêphadex G-5 0  
 a) de l'hydrolysât après action du Bromure de cyanogène de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la "myosine-V<sub>G</sub>"  
 b) de l'hydrolysât après action du Bromure de cyanogène de la chaîne légère L<sub>18</sub> de la "myosine-V<sub>G</sub>"  
 Les fractionnements sont réalisés en tampon propionate de sodium 1 M ; Tris-HCl 0,05 M de pH 9,5 sur une colonne de Sêphadex G 50 ( 150 x 26 cm ) à un débit de 25,2 ml/mn et les fractions collectées sont de 5 ml. La courbe d'élution est établie par réaction de LOWRY.

	( a ) *	( b )	( c )	( d )	( e ) *	( f )
ASP	3	3	3	3	6	5
THR	1	2	2	0	2	4
SER	1	2	3	2	3	1
GLU	9	9	14	7	14	10
PRO	12	10	14	10	0	2
GLY	1	1	0	0	1	5
ALA	11	8	5	13	7	2
CYS/2	0	1	0	0	1	1
VAL	1	1	2	1	2	2
MET	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
ILE	3	2	2	3	2	3
LEU	1	1	1	1	6	5
TYR	0	0	0	0	1	0
PHE	1	3	5	1	1	4
HIS	0	0	0	0	0	0
LYS	9	8	13	9	5	8
ARG	0	1	1	0	2	1
TRP	0	0	0	0	0	0
N-TER	N.D N-bloqué	N.D N-bloqué	N.D N-bloqué	N.D N-bloqué	Phe	Phe

TABLEAU IV-2

Composition en acides aminés et extrémité

N-terminale de la fraction A

(a) de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la "myosine-V<sub>G</sub>" de coeur de Porc ( GRANDIER-VAZEILLE et TETAERT 1978 )

(b) de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la myosine de coeur de Boeuf ( WEEDS 1975 )

(c) de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la myosine de coeur de Poulet ( MAITA et al 1980 )

(d) de la chaîne légère L<sub>25</sub> de la myosine de muscle squelettique de Lapin ( FRANK et WEEDS 1974 )

(e) de la chaîne légère L<sub>18</sub> de la "myosine-V<sub>G</sub>" de coeur de porc ( GRANDIER-VAZEILLE et TETAERT 1978 )

(f) de la chaîne légère L<sub>18</sub> de la myosine de muscle squelettique de Lapin ( MATSUDA et al 1977 )

\* Valeur moyenne arrondie pour 12 analyses ( 24 et 72 heures )  
les résidus de méthionine sont identifiés en homosérine

. Pour la fraction A<sub>18</sub>, l'extrémité N-terminale est un résidu de phénylalanine et la composition en acides aminés est caractérisée par l'absence de proline (Tableau IV-2e).

Ce critère d'homogénéité de la préparation, spécifique de la chaîne légère L<sub>27</sub>, est performant. Il fait intervenir la méthode au chlorure de dansyl pour la détermination de l'acide aminé en position N-terminale qui permet de détecter jusqu'à 0,2 nanomole de peptide contaminant.

## V - CONCLUSION

Parmi les méthodes d'isolement et de purification des chaînes légères de myosine, que nous avons utilisées, seule la méthode par électrophorèse préparative (mise au point au Laboratoire) nous a permis d'obtenir chacune des chaînes légères avec un bon rendement (80 à 100 mg de chaînes légères par gramme de myosine cardiaque).

L'homogénéité des préparations de protéine est vérifiée habituellement en utilisant des critères de pureté tels que l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide, la détermination de la composition en acides aminés ou de l'acide aminé en position N-terminale.

Dans le cas des chaînes légères, seule l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide était utilisable. En effet, les extrémités N-terminales sont bloquées et les compositions en acides aminés ne sont pas caractéristiques.

Nous avons mis au point un critère de pureté spécifique de la chaîne légère L<sub>27</sub> qui fait intervenir le fractionnement par gel filtration sur colonne de Sephadex G<sub>50</sub> et l'étude de l'extrémité N-terminale (par la méthode du chlorure de dansyl) de la fraction de plus haut poids moléculaire, obtenue par action du bromure de cyanogène.

## C - SÉPARATION DES HYDROLYSATS DE LA CHAÎNE LÉGÈRE, PAR LES TECHNIQUES CLASSIQUES, ET ÉTUDE DES PEPTIDES ISOLÉS.

### I - ETUDE DE L'HYDROLYSAT PAR LE BROMURE DE CYANOGENE DE LA CHAÎNE LEGERE "L<sub>27</sub>"

#### 1°) CONTROLE DE L'HYDROLYSE

La chaîne légère préalablement réduite et alkylée (AT-VIIIA) est hydrolysée par le BrCN. Les résultats de l'hydrolyse sont contrôlés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. Cependant, l'électrophorèse analytique ne permet pas dans nos conditions de détecter les peptides de faible poids moléculaire. Pour déterminer le nombre de peptides obtenus après hydrolyse, la dansylation de l'hydrolysats total a été effectuée : cinq  $\alpha$ -dansyl-amino acides ont été mis en évidence (DNS acide aspartique; DNS-glycine ; DNS-alanine ; DNS-leucine et DNS-lysine). Une quantification des différents acides aminés en position N-terminale par la technique des PTH-amino - acides, associée à la chromatographie liquide haute performance (AT-XVI-Bb) a été établie et est donnée dans le Tableau IV-3.

#### 2°) FRACTIONNEMENT

L'hydrolysats est fractionné par chromatographie de gel filtration sur colonne de Sephadex G<sub>50</sub> comme nous l'avons précédemment décrit. Le profil d'élution (Figure IV-4) montre que *six* fractions peuvent être séparées. Ces fractions sont débarrassées des sels (Tris-propionate de sodium) par chromatographie de gel filtration sur colonne de Sephadex G<sub>15</sub> ou G<sub>25</sub> en ammoniacque 0,1M (AT-X-B) puis lyophilisées.

#### 3°) ETUDE DES DIFFERENTES FRACTIONS

Par l'étude de l'acide aminé en position N-terminale, seule la *fraction A* qui correspond au peptide de plus haut poids moléculaire est homogène.

NANOMOLES DE PTH-AMINO ACIDES  
DE L'HYDROLYSAT DE L<sub>27</sub> PAR LE BRCN

	1° CYCLE	2° CYCLE
ACIDE ASPARTIQUE	15,3	
SÉRINE		1,1
ACIDE GLUTAMIQUE		3,6
GLYCOCOLLE	1,7	2,9
ALANINE	6,8	4,8
ISOLEUCINE	4,9	5,7
LEUCINE	2,8	
LYSINE	2,3	

**TABLEAU IV-3**

*Détermination quantitative par HPLC*

*des PTH-amino acides formés après deux cycles de dégradation d'EDMAN manuelle sur les peptides de l'hydrolysat obtenu après action du Bromure de cyanogène de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la "myosine-V<sub>G</sub>" de coeur de Porc*



Les autres fractions doivent être repurifiées. Plusieurs essais de séparation ont été effectués :

. soit par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de sulfopropyl Sephadex C<sub>25</sub> : les fractions B ; C ; D et E ont été rechromatographiées sur colonne de SP-Sephadex C<sub>25</sub> pour tenter de séparer les différents peptides (AT-XII-Ab). Les profils d'élution de ces différents fractionnements révèlent trois pics.

Par exemple pour la fraction B (Figure IV-5) deux fractions peptidiques peuvent être isolées. En effet, le pic élué en premier ne contient pas d'acide aminé et correspond à des sels. Par contre, les pics 1 et 2 correspondent respectivement à des peptides de 59 et 39 résidus (Tableau IV-4). A partir des 25 mg de la fraction B chromatographiée sur la colonne, nous avons obtenu 1,4 mg (15,2 nanomoles) du peptide de 59 résidus et 1,3 mg (20,4 nanomoles) du peptide de 39 résidus : *le rendement de la chromatographie est donc très faible.*

De même pour les purifications des fractions C ; D et E, les quantités de peptides isolées et purifiées sont trop faibles pour une étude ultérieure.

. soit par électrophorèse à haut voltage sur papier, les fractions E et F, correspondant à des peptides de faible poids moléculaire, ont été séparées par électrophorèse préparative à haut voltage sur papier. Après coloration par la ninhydrine à 0,2 %, *six bandes* ont été révélées pour la fraction E et *trois* pour la fraction F. Les bandes localisées ont été découpées et éluées. Toutefois, les quantités de peptides ainsi récupérées sont également trop faibles pour une étude ultérieure.

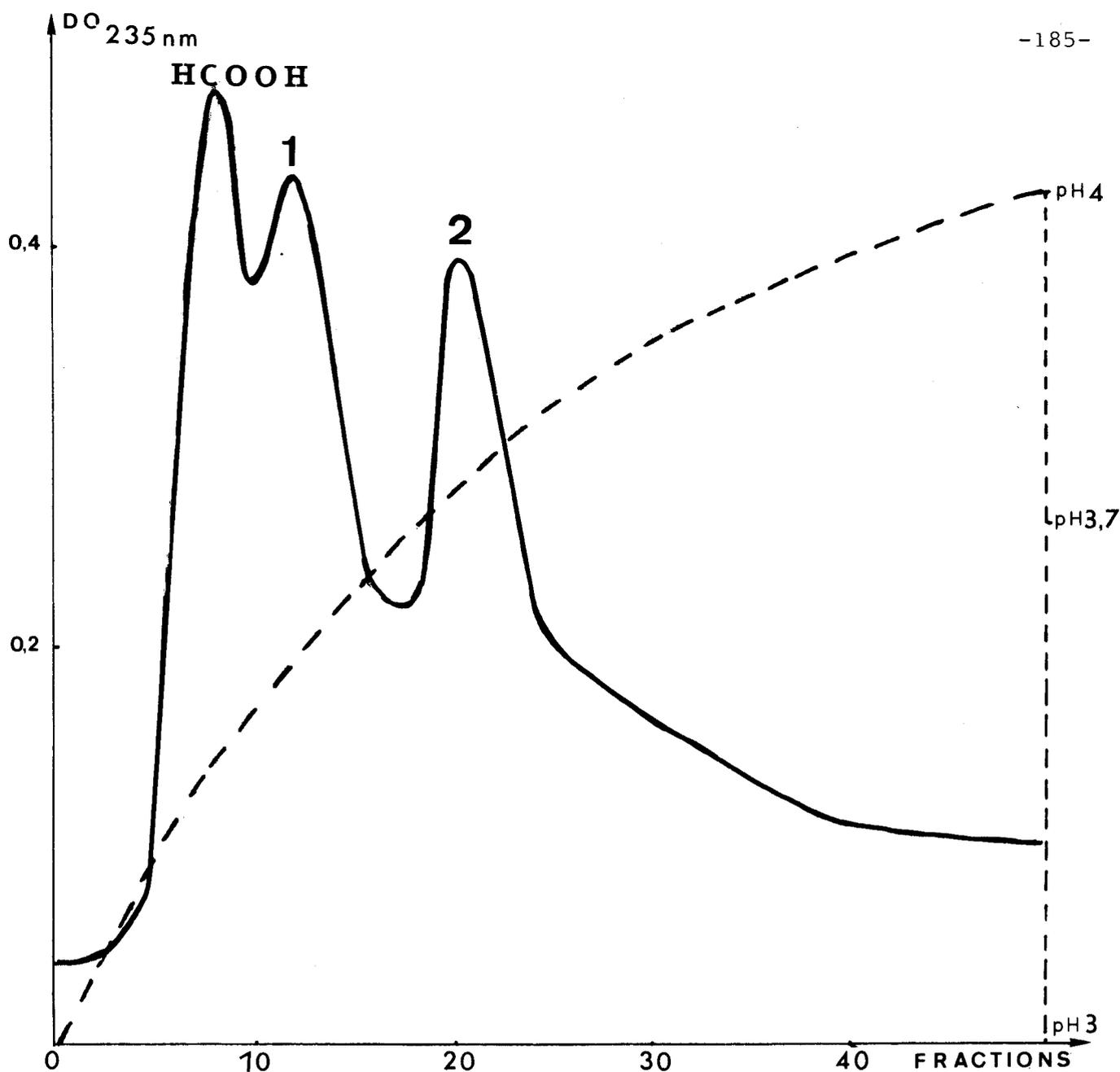


FIGURE 17-5

Fractionnement sur colonne de Sulfopropyl Séphadex C 25 ( 7 x 2 cm ) de 25 mg de la fraction B obtenue après fractionnement de l'hydrolysate obtenu après action du Bromure de cyanogène, sur colonne de Séphadex G 50 de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la "myosine-V<sub>3</sub>" de coeur de porc. Le fractionnement est réalisé avec un tampon d'élution de formiate d'ammonium et de chlorure d'ammonium de molarité et de pH croissant à un débit de 1,8 ml/mn. Les fractions recueillies sont de 0,9 ml.

	Pic 1		Pic 2	
	Valeurs	Valeurs	Valeurs	Valeurs
	Trouvées	Arrondies	Trouvées	Arrondies
ASP	5,0	5	5,1	5
THR	1,8	2	2,2	2
SER	2,0	2	1,6	2
GLU	8,6	9	6,8	7
PRO	11,0	11	3,8	4
GLY	3,6	4	3,4	3
ALA	9,8	10	4,4	4
CYS/2	0	0	0	0
VAL	1,1	1	2,0	2
MET	Hse	(1)	Hse	(1)
ILE	2,3	2	1,2	1
LEU	1,4	1	2,0	2
TYR	0	0	0	0
PHE	3,1	3	1,8	2
HIS	0	0	0	0
LYS	7,9	8	4,0	4
ARG	0	0	0,8	1
TOTAL	59		39	
NMOLES	15,2		20,4	
POIDS	1,4 mg		1,3 mg	

**TABLEAU IV-4** Composition en acides aminés et rendement des pics 1 et 2 isolés après chromatographie sur colonne de SP-Séphadex C-25 de la fraction B ( 25 mg obtenus après chromatographie sur colonne de Séphadex G 50 ) obtenue après action du bromure de cyanogène sur la chaîne légère L<sub>27</sub> de la "myosine-V<sub>G</sub>" de coeur de Porc.

\* Hse = Homosérine ( après action du bromure de cyanogène, le résidu de méthionine se transforme en homosérine ou homosérine lactone )

. soit par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de résine "Chromobeads P"

Les peptides de faible poids moléculaire sont séparés par chromatographie sur résine d'échange d'ions. Ainsi la fraction E est séparée en sept sous-fractions et la fraction F est séparée en trois.

Comme pour les fractionnements précédents, les peptides s'adsorbent sur la résine et les quantités recueillies sont trop faibles pour leur étude structurale.

Seule une sous-fraction, de la fraction F, révèle une composition en acides aminés caractéristique : alanine et sérine en rapport équimolaire. Ce peptide ne contient pas d'homosérine. Comme aucun dansyl-sérine n'a été mis en évidence dans l'hydrolysate total, nous pensons que ce peptide Ala-Ser est le peptide C-terminal de la molécule obtenu après action du BrCN.

#### 4°) CONCLUSION

L'étude de l'hydrolysate après l'action du bromure de cyanogène nous permet d'obtenir le peptide N-terminal de 51 résidus environ (fraction A) et, des peptides d'environ 59 et 39 résidus, mais en quantité trop faible pour des études ultérieures.

Seul un dipeptide, par sa composition en acides aminés et l'étude des extrémités N-terminales (des peptides de l'hydrolysate total) peut être replacé et correspond au peptide C-terminal (Ala-Ser).

## II - ETUDE DES PEPTIDES TRYPSIQUES DE LA CHAÎNE LÉGÈRE "L<sub>27</sub>"

La chaîne légère préalablement réduite et alkylée par l'iodoacétamide (AT-VIII-Ab) est hydrolysée par la trypsine (AT-IX-Aa) traitée par le T.P.C.K.

### 1°) CONTROLE DU RENDEMENT DE L'HYDROLYSE TRYPSIQUE

L'étude par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS a permis de contrôler l'efficacité de l'hydrolyse trypsique. L'électrophorégramme a révélé, en plus d'une bande protéique dont la mobilité électrophorétique est comparable

à celle de la chaîne légère, la présence de plusieurs bandes correspondant à des peptides de plus faible poids moléculaire.

## 2°) FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE

Seule la partie soluble de l'hydrolysat est fractionnée par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Chromobeads P (AT-XII Aa). Le profil d'élution établi par réaction à la ninhydrine révèle 30 pics (Figure IV-6).

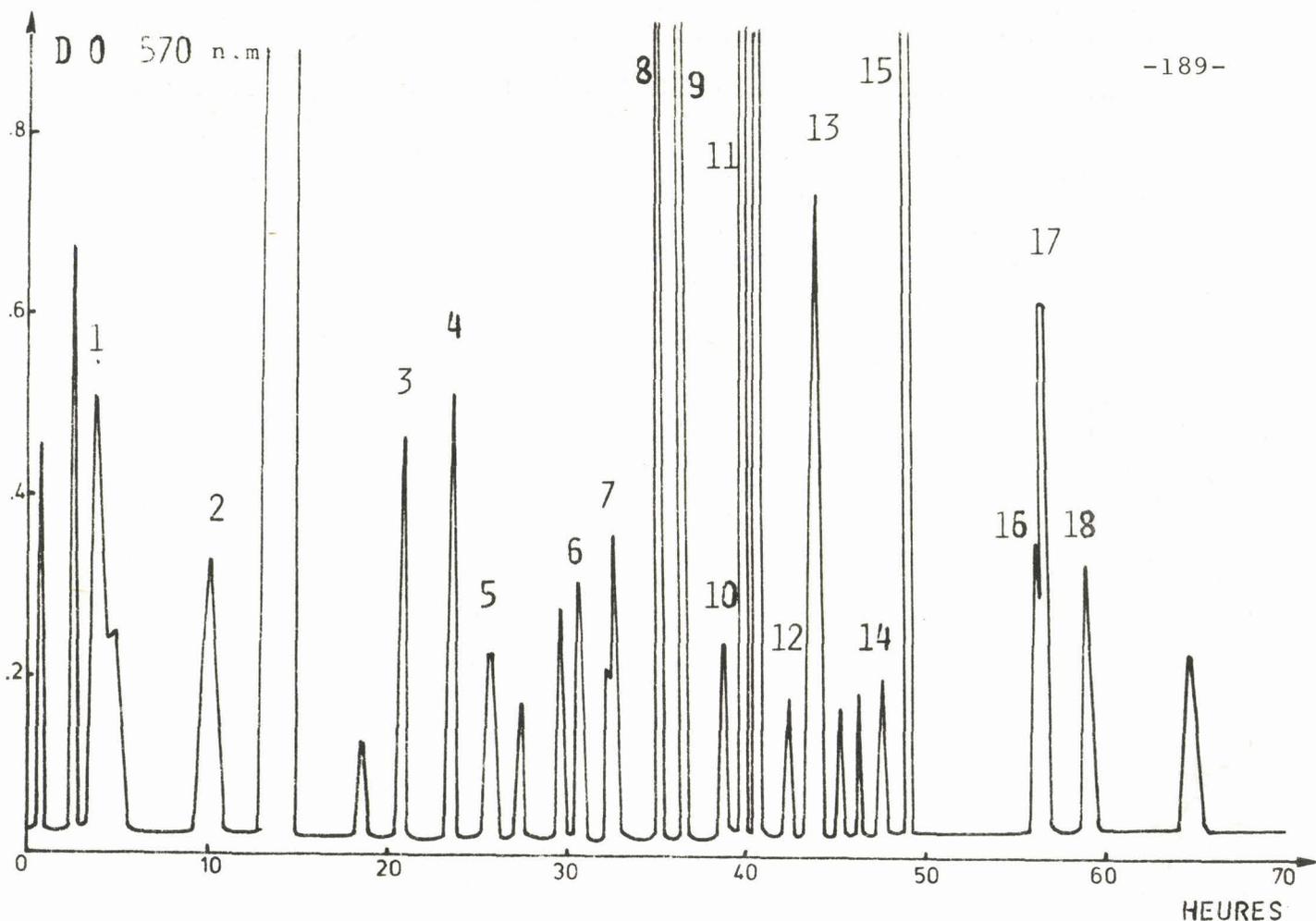
Il est à noter que lors du passage du tampon formiate de pyridine 0,1M de pH 2,9, il se forme un flocculat sur le haut de colonne, celui-ci ne disparaissant qu'après passage de la soude 0,2 N (lors de la régénération de la colonne de résine)

## 3°) ANALYSE DES PEPTIDES TRYPSIQUES

L'homogénéité des fractions isolées est contrôlée par électrochromatographie sur papier (AT XIII-A). Les fractions homogènes sont ensuite caractérisées par leur extrémité N-terminale (dansyl-amino acide) et par leur composition en acides aminés (Tableau IV-5). Les fractions rapidement éluées sont très hétérogènes (présence de huit tâches peptidiques révélées après électrochromatographie de la première fraction éluée).

## 4°) ETABLISSEMENT D'UNE STRUCTURE PARTIELLE DE L<sub>27</sub> PAR HOMOLOGIE

La séquence complète de la chaîne légère L<sub>25</sub> de la myosine de muscle blanc squelettique de Lapin ainsi que la séquence partielle de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la myosine cardiaque de Boeuf étant connues, nous avons pu proposer une structure partielle de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la myosine de muscle cardiaque de ventricule gauche de cœur de Porc à partir de l'étude de l'hydrolysat trypsique. Parmi trente fractions recueillies dix sept peptides ont été replacés (Figure IV-7)



**FIGURE IV-6** Profil d'élution du fractionnement de l'hydrolysats trypsique de la chaîne légère  $L_{27}$  de la myosine de ventricule gauche de coeur de Porc sur colonne de résine Chromobeads P.

Le fractionnement est réalisé en utilisant un gradient de tampon formiate et d'acétate de pyridine ( de molarité et de pH croissant ). La courbe d'élution est établie par dosage à la ninhydrine. Les fractions anotées ( 1 à 18 ) ont été purifiées et caractérisées.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
ASP	3,0	1,7	2,2	1,2		1,0		1,0	2,1	1,1									
THR			1,9	1,1	0,9						1,1					1,0			
SER	1,9	1,5											1,1					1,1	
GLU	3,3	4,2	2,3	3,1	4,8		1,3	0,9				0,8			1,2	1,2		1,2	
PRO		11,0		1,1	1,0						1,1				2,0			0,8	
GLY	3,2		2,0	1,0				1,2				0,9				1,2	0,9		
ALA	1,6	10,2		1,9				4,8	1,0			0,9	1,1			1,1			
CYS/2	0,5																		
VAL			1,0	0,9						1,0						0,9	0,9		
MET	0,6						0,8						1,0						
ILE	0,7	1,8			0,6								1,0	1,0				0,9	
LEU	1,0		1,2	1,8	1,6							0,7				1,9	0,8	1,0	
TYR	0,5		0,9																
PHE		1,6	1,2		2,6					0,8									
HIS													0,8			0,8		0,8	
LYS	0,7	2,6			1,0			2,0	2,0	1,1	2,0	1,0		1,0				1,7	1,1
ARG			1,0	0,9		1,0	1,2								2,0	1,2			
TOTAL	19	36	13	13	14	2	3	10	5	4	4	5	5	2	5	9	6	6	
N-TER	Leu	Asx	Asx	Ala	Glx	Asx	Glx	Ala	Asx	Val	Thr	Gly	His	Ile	Lys	His	Val- Leu	Leu	
peptide trypsique	T <sub>23</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>17</sub>	T <sub>10</sub>	T <sub>8</sub>	T <sub>16</sub>	T <sub>7</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>13</sub>	T <sub>18</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>20</sub>	T <sub>24</sub>	T <sub>4</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>21</sub>	T <sub>11</sub>	T <sub>15</sub>	



TABLEAU IV-5

Composition en acides aminés et extrémité N-terminale des peptides tryptiques purifiés des fractions 1 à 18 du fractionnement sur colonne de résine Chromobeads P. Les peptides tryptiques T<sub>1</sub> à T<sub>24</sub> sont placés dans la séquence par homologie ( voir texte ).

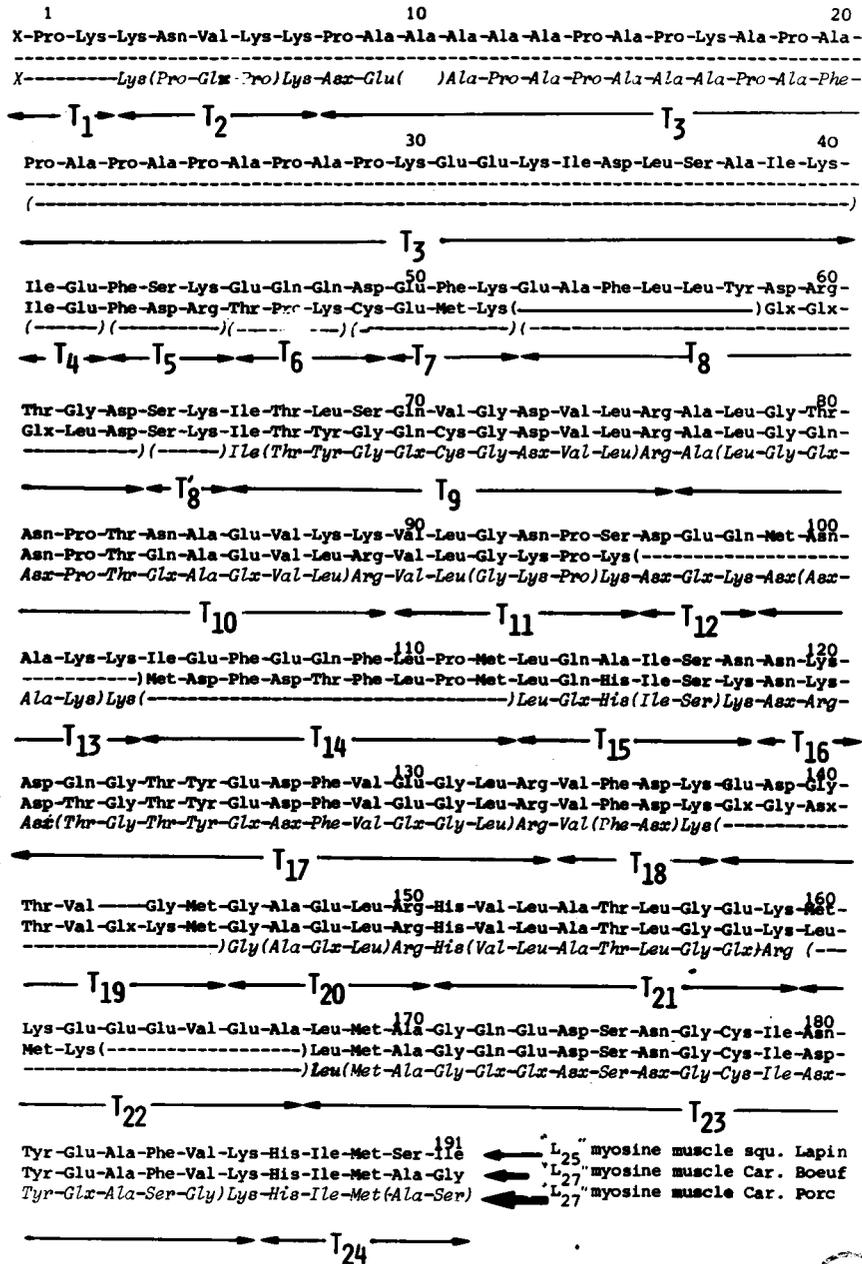


FIGURE IV.7

Séquence partielle de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la myosine de ventricule gauche de coeur de Porc établie à partir des peptides trypsiques ( 3<sup>o</sup> ligne en italique ) et par homologie avec la séquence complète de L<sub>25</sub> de la myosine de muscle squelettique de Lapin ( 1<sup>o</sup> ligne ) et la séquence partielle de L<sub>27</sub> de la myosine cardiaque de Boeuf ( 2<sup>o</sup> ligne ). Les peptides trypsiques T<sub>1</sub> à T<sub>24</sub> sont placés en tenant compte des compositions en acides aminés, des Dansyls amino-acides et des séquences homologues.

. huit le sont sans ambiguïté, il s'agit des peptides T<sub>9</sub>, T<sub>10</sub>, T<sub>11</sub>, T<sub>15</sub>, T<sub>17</sub>, T<sub>18</sub>, T<sub>20</sub> et T<sub>24</sub>.

. quatre l'ont été, compte tenu du principe des mutations ponctuelles et conservatives. Les peptides T<sub>12</sub>, T<sub>16</sub>, T<sub>21</sub> où par exemple une arginine remplace une lysine, et T<sub>23</sub>.

. Deux peptides ont été replacés compte tenu qu'il s'agit de mutation ponctuelle non conservative. Les peptides T<sub>2</sub>, T<sub>13</sub> où un résidu d'asparagine ou d'acide aspartique remplace un résidu de méthionine.

. Compte tenu de son taux en proline et alanine élevé et des treize premiers cycles obtenus par dégradation automatique d'EDMAN (identifiés seulement par chromatographie sur couche mince et chromatographie en phase gazeuse sans silylation), le peptide T<sub>3</sub> d'environ trente six résidus a été déterminé comme étant le peptide correspondant à la séquence 8-40.

. D'autres peptides peuvent être placés. Par exemple, dans la séquence 46-52, la mutation d'un résidu de cystéine en lysine permet de placer les peptides T<sub>6</sub> et T<sub>7</sub>.

#### 5°) LOCALISATION DES PEPTIDES CONTENANT LES RESIDUS DE METHIONINE

Parmi tous les peptides tryptiques obtenus, seuls trois d'entre eux contiennent un résidu de méthionine : T<sub>7</sub>, T<sub>23</sub> et T<sub>24</sub>. Parmi ceux-ci seul T<sub>24</sub> est placé avec certitude comme étant le peptide C-terminal de L<sub>27</sub> : la composition en acides aminés révèle l'absence de résidu de lysine et d'arginine ; l'acide aminé N-terminal est un résidu d'histidine suivi des résidus d'isoleucine et de méthionine (dégradation d'EDMAN et dansyl-aminoacides).

Pour isoler les peptides contenant des résidus de méthionine manquants, nous avons utilisé la technique d'électrophorèse diagonale (AT-XIV). Nous avons été là encore confrontés au problème de la faible solubilité de l'hydrolysate tryptique à pH 3,9 et sur les sept tâches peptidiques attendues (en fonction de la composition en acides aminés de la chaîne légère et des séquences homologues), seulement trois tâches ont été localisées. L'analyse des compositions en acides aminés des fractions isolées après électrophorèse diagonale sur papier et élution des fractions peptidiques, a révélé l'hétérogénéité des fractions.

#### 6°) CONCLUSION

*Une faible partie de l'hydrolysate tryptique est soluble. Celle-ci a été fractionnée sur colonne de résine Chromobeads P. Malgré l'apparition d'un flocculat sur le haut de colonne à l'arrivée du tampon formiate de pyridine de pH 2,9, un certain nombre de peptides (30) ont pu être isolés dont dix-sept ont pu être replacés dans la séquence par homologie.*

*D'autres peptides isolés (établissement de leur composition et de leur extrémité N-terminale) doivent provenir de coupures secondaires comme par exemple le peptide correspondant à la séquence 113-118 sur lequel trois cycles de dégradation d'Edman ont été effectués.*

*Dans cet hydrolysate tryptique, des peptides n'ont pu être isolés comme par exemple les peptides correspondant aux séquences 104-112 ; 138-145 et 160-167 qui contiennent des résidus de méthionine. La faible solubilité de l'hydrolysate tryptique (même à pH 6,5) et l'hétérogénéité des fractions obtenues par électrophorèse diagonale n'a pas permis d'isoler tous les peptides à méthionine.*

*Néanmoins, une structure partielle provisoire de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la myosine de ventricule gauche de cœur de Porc peut être proposée en ne tenant compte que des homologies de séquence (Figure IV-7).*

III - ETUDE DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES DE LA CHAÎNE LÉGÈRE

"L<sub>27</sub>"

La chaîne légère préalablement alkylée est hydrolysée par la chymotrypsine (AT-IX-Ba) traitée par le T.L.C.K. (AT-IX-B). Le contrôle de l'hydrolyse a été fait par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

La chaîne légère est totalement et rapidement hydrolysée, par la chymotrypsine, avec formation d'un peptide de taille importante. Les fractionnements de cet hydrolysate ont été effectués par chromatographie d'échange d'ions.

1°) FRACTIONNEMENT SUR COLONNE DE RESINE  
CHROMOBEADS P

Afin de séparer les peptides chymotrypsiques suivant leur taille moléculaire, un préfractionnement sur 20 nanomoles de l'hydrolysate citraconylé (AT-VIII-D) a été réalisé par gel filtration sur colonne de Sephadex G<sub>50</sub>. *Trois* préfractions (1, 2 et 3) ont été séparées, comme le montre le profil d'élution (Figure IV-8).

Après décitraconylation, chaque fraction est chromatographiée sur colonne de résine Chromobeads P. Les profils d'élution des différents fractionnements sur colonne de résine Chromobeads P des préfractions 1, 2 et 3 sont représentés sur les schémas b, c et d, e de la Figure IV-8.

Avec 20 micromoles de la préfraction 1, nous avons obtenu 5 nanomoles de peptides après rechromatographie sur colonne de résine Chromobeads P. Nous notons également la faible solubilité à pH acide des préfractions de l'hydrolysate chymotrypsique à l'arrivée du tampon de pH 2,9.

Les préfractions 2 et 3 sont repurifiées dans les mêmes conditions que la préfraction 1 (Figure IV-8). Les peptides ainsi obtenus sont tous hétérogènes comme l'ont

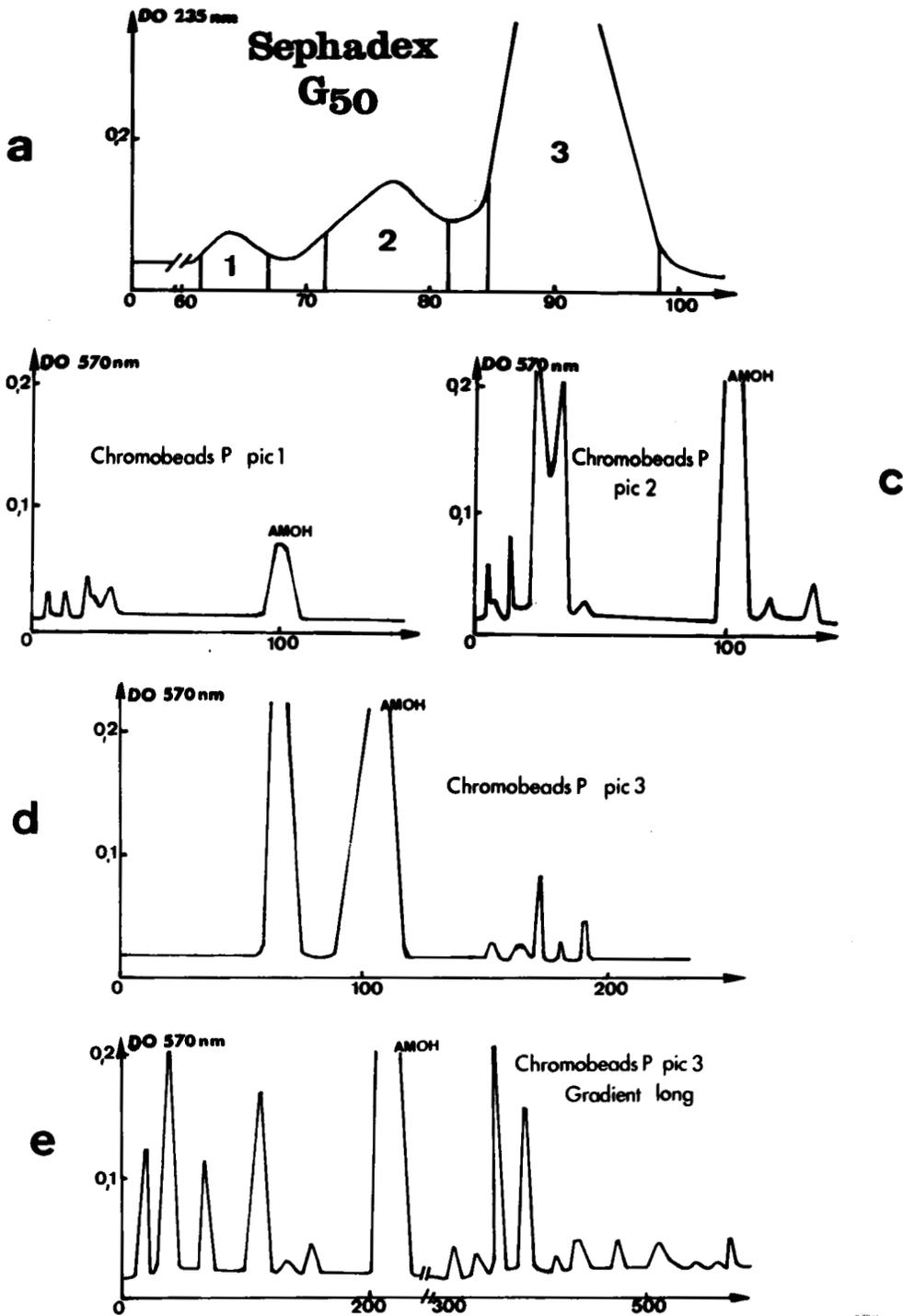


FIGURE IV-8.

a) Séparation de l'hydrolysate chymotrypsique ( 600 mg ) sur colonne de Séphadex G 50 ( 150 X 26 cm )  
 (b) ; (c) ; (d) Fractionnement des fractions 1 ;  
 2 et 3 obtenues à partir du fractionnement sur  
 Séphadex G 50 , sur colonne de résine Chromobeads P  
 avec le gradient d'éluion de formiate et d'acétate  
 de pyridine ( §AT-XI Aa ).

e) Séparation de la fraction 3 ( Fractionnement a )  
 sur colonne de résine Chromobeads P avec un gradient  
 d'éluion différent ( passage d'acide formique 10%  
 avant le gradient de formiate de pyridine ).



montré l'étude de leur composition en acides aminés et de leur extrémité N-terminale.

## 2°) FRACTIONNEMENT SUR COLONNE DE RESINE DE DEAE TRISACRYL M

Les résultats obtenus lors du préfractionnement sur colonne de gel filtration nous avaient permis de constater une meilleure solubilité à pH basique de l'hydrolysate.

La commercialisation d'un nouveau type de gel d'échange d'anions (la DEAE Trisacryl M) utilisé pour la séparation des protéines avec de bons rendements (absence d'absorptions non spécifiques), nous a amené à utiliser ce support pour la séparation de nos hydrolysats chymotrypsiques.

Nous avons mis au point un système de tampons d'élution volatils et permettant le repérage des peptides par la réaction à la ninhydrine (AT-XII-Ba).

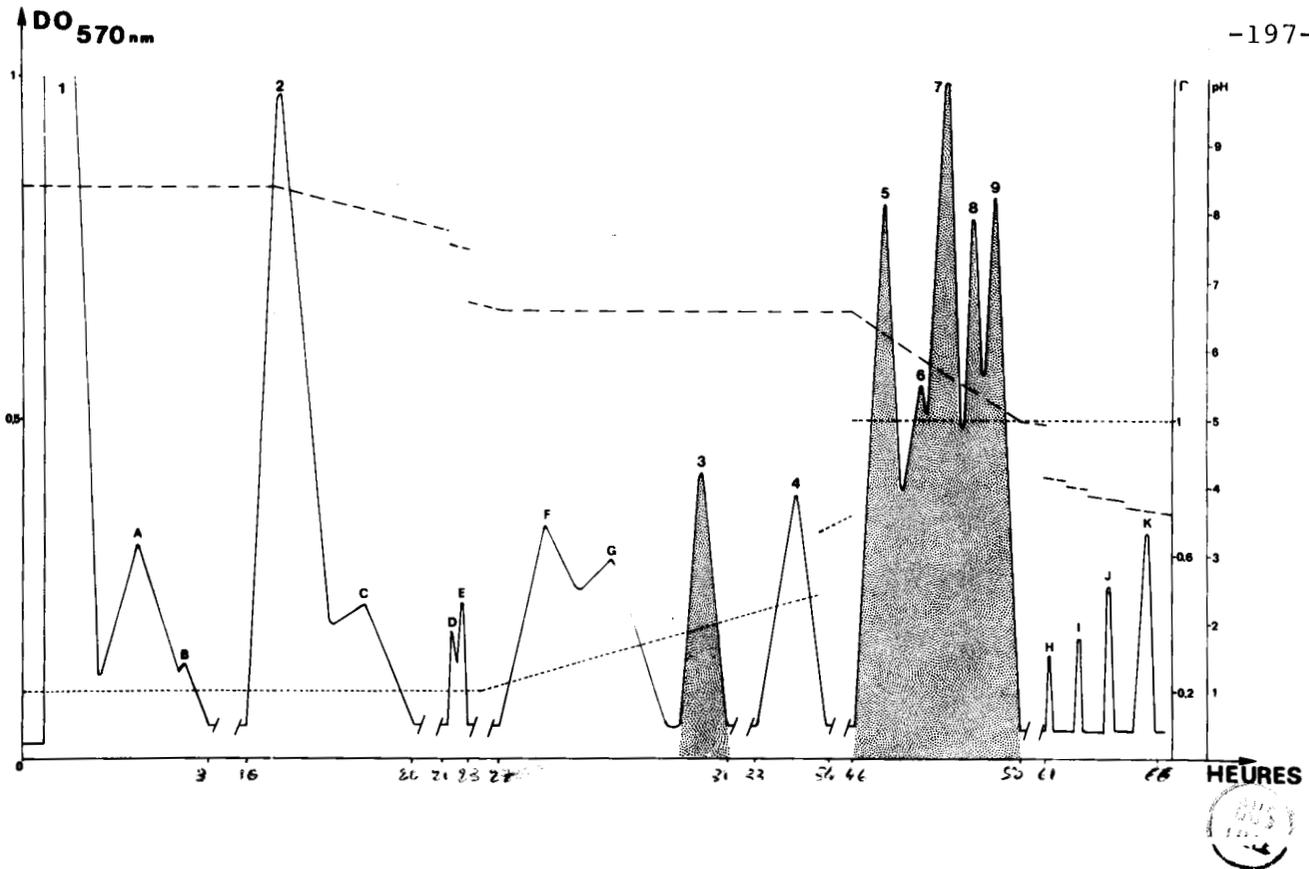
Dans nos conditions, l'hydrolysate total est séparé en 21 fractions dont 6 réagissent fortement à la ninhydrine (Figure IV-9).

Les différentes fractions étudiées par électrochromatographie sur couche mince de Cellulose (AT-XIII-B) ne sont pas homogènes. Parmi ces fractions quelques unes (les majeures) sont repurifiées par chromatographie liquide haute performance (HPLC).

## 3°) CONCLUSION

Le préfractionnement par chromatographie de gel filtration sur colonne de Sephadex G<sub>50</sub> en tampon propionate de sodium 1M ; Tris-HCl 50 mM de pH 9,5 nous a permis :

- . de solubiliser l'hydrolysate chymotrypsique à pH basique,
- . de le séparer suivant les tailles moléculaires en trois préfractions.



**FIGURE IV-9** Profil d'élution du fractionnement sur colonne de DEAE-Trisacryl M ( 25 x 2,5 cm ) de l'hydrolysats chymotrypsique de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la "myosine-V<sub>G</sub>". Le fractionnement est réalisé avec un gradient discontinu de formiate de pyridine, croissant en force ionique  $\Gamma$  (.....) et décroissant en pH (----), avec un débit de 150 ml/h . Les fractions collectées sont de 10 ml. La courbe d'élution est établie par dosage à la ninhydrine. Les fractions 1 à 9 correspondent aux fractions majeures. Les fractions A à K sont les fractions mineures.

A partir de 20 nanomoles de préfraction, la faible solubilité à pH acide et l'apparition d'un flocculat à pH 2,9 lors du fractionnement sur colonne de résine Chromobeads P n'a permis d'isoler que 5 nanomoles de peptides chymotrypsiques purifiés.

En raison de la solubilité à pH basique, un échangeur d'anions (la DEAE-Trisacryl M) devait permettre d'obtenir quantitativement les peptides chymotrypsiques. Malgré la mise au point d'un gradient d'éluion de tampons volatils (de force ionique croissante et de pH décroissant) les fractions obtenues quantitativement sont hétérogènes. Sans doute les peptides chymotrypsiques ont des points isoélectriques voisins et toute méthode de séparation faisant intervenir la charge (échange ionique; électrophorèse) ne semble pas appropriée.

#### IV - ETUDE DES PEPTIDES APRES ACTION DE L'ENZYME STAPHYLOCOCCUS AUREUS V<sub>8</sub> SUR LA CHAINE LEGERE L<sub>27</sub>

Pour obtenir des peptides de faible poids moléculaire et contenant les résidus de méthionine, nous avons hydrolysé la chaîne légère par l'enzyme Staphylococcus Aureus V<sub>8</sub> (SAV<sub>8</sub>) (AT-IX-Da). La SAV<sub>8</sub> coupe spécifiquement la liaison peptidique, dans des conditions de tampons et de pH bien précises, après les résidus d'acide glutamique ou d'acide aspartique. Après l'action de la SAV<sub>8</sub> sur la chaîne légère, l'hydrolysat a été fractionné par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de résine Chromobeads P.

L'hydrolysat, par SAV<sub>8</sub>, de la chaîne légère est comme les autres, peu soluble à pH acide.

Le profil d'éluion révèle un très petit nombre de pics et pour chaque pic une faible concentration, sauf pour le pic élué en début de gradient (ce pic se révélant très hétérogène par électrochromatographie sur couche mince de cellulose).

*EN CONCLUSION : l'étude de l'hydrolysate de la chaîne légère L<sub>27</sub> par l'enzyme SAV<sub>8</sub> n'a pas permis de résoudre le problème d'insolubilité des peptides à pH acide, ni de séparer qualitativement la partie soluble.*

*L'utilisation de SAV<sub>8</sub> a été abandonnée.*

V - ETUDE DE L'HYDROLYSAT PAR L'ACIDE 2-NITRO-5-THIO CYANATO-BENZOÏQUE DE LA CHAÎNE LÉGÈRE L<sub>27</sub>

De par la spécificité de l'acide 2-nitro-5-thio-cyanatobenzoïque (NTCBA) et de la répartition des résidus de cystéine dans la structure covalente de la chaîne légère (d'après la structure partielle établie par homologie à l'aide des peptides tryptiques) (Figure IV-7) trois peptides de 70, 177 et 14 résidus devraient être libérés.



Après réduction, en présence d'urée 8M, par le DTT (5 nMoles/g de chaîne légère) (AT-VIII-Ba) et hydrolyse par le NTCBA (AT-VIII-Bb) un préfractionnement par gel filtration sur colonne de Sephadex G<sub>50</sub>, en tampon Tris-HCl pH 9,5 ; propionate de sodium 1M, sépare l'hydrolysate en trois fractions.

Lors de la réaction par le NTCBA, il y a hydrolyse des liaisons peptidiques au niveau des cystéines et formation d'un résidu d'iminothiazolidine du côté N-terminal des peptides. Ce résidu d'iminothiazolidine est un hétérocycle, auquel ne se couple ni le chlorure de dansyl, ni le phenyl isothiocyanate (PITC). Des essais d'élimination de ce résidu d'iminothiazolidine ont été effectués en utilisant l'hydrogénation catalytique en présence de nickel de Raney (AT-XVIII). La dégradation d'EDMAN manuelle est ensuite utilisée pour contrôler si nous avons régénéré l'extrémité N-terminale. Après hydrogénation catalytique des 3 fractions séparées par chromatographie sur colonne de Sephadex G<sub>50</sub>, la dégradation d'EDMAN n'a pas permis de mettre en évidence

de PTH-amino acides. L'élimination du résidu d'iminothiazolidine se fait avec un faible rendement, venant du fait que les thiols seraient des "poisons" pour les catalyseurs (Losse *et al.*, 1982).

*EN CONCLUSION, le faible nombre de résidus de cystéine dans la chaîne légère L<sub>27</sub> (2 en position 71 et 177 d'après la structure partielle) aurait dû permettre l'obtention de trois peptides facilement séparables par filtration sur gel à pH basique.*

*L'élimination difficile du résidu d'iminothiazolidine formé ne permet pas de connaître l'état de pureté des peptides ni d'en déterminer la structure primaire.*

*Toutefois les peptides N-bloqués pourront être utiles pour l'obtention d'un peptide plus petit, après clivage spécifique au niveau des résidus de tyrosine (par exemple : peptides 128-178 et 183-192).*

## VI - CINÉTIQUE D'ACTION D'ENDOPEPTIDASES SUR LA CHAÎNE LÉGÈRE L<sub>27</sub>

Étant confrontés au problème de séparation des peptides et d'insolubilité à pH acide, nous avons voulu obtenir un minimum de peptides dont un de taille importante pour une éventuelle séparation par gel filtration à pH basique. Dans ce but nous avons soumis la chaîne légère à l'hydrolyse partielle par différents enzymes (trypsine, chymotrypsine, pepsine, papaïne, thermolysine, SAV<sub>8</sub>, pronase, protéase extraite du pancréas, collagénase et élastase). Ces hydrolyses limitées effectuées à différentes températures et à différents rapports enzyme-substrat, sont suivies par électrophorèse sur gel gradient de polyacrylamide (5-30 %) en présence de SDS, des aliquots étant prélevés à des temps variants de 2 à 150 minutes.

1°) TRYPSINE TRAITÉE PAR LE TPCK A pH 8,78

L'électrophorégramme a révélé qu'après cinq minutes d'hydrolyse à 38° C ( $\frac{E}{S} = 4 \%$ ) une faible bande protéique de mobilité électrophorétique correspondant à environ 14 000 daltons apparaît.

Pour des temps d'hydrolyse supérieurs, l'intensité de cette bande ainsi que celle correspondant à la chaîne légère disparaît. Pour des temps supérieurs à 150 minutes, l'hydrolyse semble totale (des peptides de petite taille seraient libérés mais ne seraient pas révélés par le bleu Commassie sur le gel en gradient de polyacrylamide).

2°) CHYMOTRYPSINE TRAITÉE PAR LE TLCK A pH 8,78

A 37° C ;  $E/S = 0,5 \%$ , après 5 minutes d'hydrolyse en plus de la bande protéique correspondant à la chaîne légère, il y a apparition d'une large bande protéique de mobilité électrophorétique correspondant à un poids moléculaire compris entre 14 000 et 18 000 daltons. Jusqu'à 40 minutes l'intensité de cette bande est croissante tandis que diminue celle correspondant à la chaîne légère. Après 40 minutes si la chaîne légère disparaît, l'intensité de la bande d'environ 14 000 daltons diminue laissant apparaître d'autres bandes protéiques de plus faible poids moléculaire.

A 25° C ;  $E/S = .2 \%$ . Après deux minutes, la bande de plus haut poids moléculaire sur l'électrophorégramme est un doublet correspondant à 14 000 daltons environ. Après 10 minutes de réaction l'intensité de ce doublet diminue au profit de bandes protéiques de plus faible poids moléculaire.

A 4° C ;  $E/S=2 \%$ . Les résultats obtenus sont analogues à ceux précédemment décrits sauf que la bande protéique correspondant à la chaîne légère ne disparaît qu'après 4 minutes d'hydrolyse.

3°) STAPHYLOCOCCUS AUREUS  $V_8$  A pH 4,0

Après 10 minutes d'hydrolyse à 37° C ; E/S=2,5 %, nous notons l'apparition de deux bandes protéiques. L'une, faible, correspond à 20 000 daltons. L'autre de plus forte intensité, correspondant à 15 000 daltons, disparaît après 130 minutes de réaction.

4°) COLLAGENASE A pH 7,4

A 37° C ; E/S=1 pour mille. La collagénase hydrolyse très rapidement la chaîne légère en libérant des peptides de grande taille. Après 5 minutes un peptide de poids moléculaire d'environ 16 000 apparaît. Après 20 minutes d'hydrolyse deux autres peptides dont les poids moléculaires sont compris entre 27 et 20 000 sont libérés. Après 90 minutes nous notons la présence de cinq peptides qui ont des poids moléculaires compris entre 14 000 et 27 000.

5°) ELASTASE A pH 8,8

La réaction d'hydrolyse, étudiée à 25°C ; E/S=1 % entre 0 et 10 minutes, permet après deux minutes la libération d'un peptide d'environ 20 000 daltons. Au temps 4 minutes, deux peptides supplémentaires, entre 15 000 et 18 daltons, sont libérés.

6°) PROTEASE EXTRAITE DU PANCREAS pH 8,78

L'étude à 37°C ; E/S=1 % a porté sur des temps de 5 à 50 minutes. Dans cette zone il y a hydrolyse de la chaîne légère avec formation d'un peptide d'environ 20 000 de poids moléculaire.

## 7°) AUTRES ENDOPEPTIDASES

Nous avons étudié l'action de la pepsine (pH 1,8; 37°C ; E/S = 5 pour mille), la pronase (pH 7,4 ; 37° C ; E/S = 5 pour mille), la papaïne (pH 7,1 ; 37° C ; E/S = 2 %) ; la thermolysine (pH ; 37° C ; E/S = 2 %) et la thrombine (pH 7,9 ; 37° C ; E/S = 2 %) sur la chaîne légère en fonction des temps (0 à 150 min). Pour ces cinq endopeptidases aucune action n'a été observée.

## 8°) EN CONCLUSION

*L'étude de l'action limitée des endopeptidases sur la chaîne légère a permis de montrer que de toutes les endopeptidases seules la collagénase et la chymotrypsine semblent être intéressantes.*

*. la collagénase hydrolyse la chaîne légère après 20 minutes pour donner un peptide de 16 000 daltons environ facilement séparable de la chaîne légère.*

*. la chymotrypsine après 30 minutes hydrolyse presque totalement la chaîne légère avec la formation d'un seul peptide de 14 000 à 18 000 daltons fortement colorée par le bleu de Commassie sur le gel de polyacrylamide.*

## VII - CONCLUSION

*L'étude par les techniques conventionnelles de séparation, des hydrolysats peptidiques après action d'enzymes ou d'agents chimiques, ne nous a pas permis d'obtenir quantitativement des fractions homogènes pour une étude de structure.*

*L'hydrolysat par le BrCN, par exemple, ne nous a permis d'obtenir et de caractériser que le dipeptide C-terminal de la chaîne légère L<sub>27</sub>. Les autres peptides, obtenus qu'avec de faibles rendements, n'ont pas permis une étude de leur composition en acides aminés et de l'acide aminé en position N-terminale après purification sur colonne de SP-Sephadex.*

L'hydrolysats trypsique est peu soluble à pH acide, même dans l'acide formique 20 %. De plus, il apparaît un flocculat sur le haut de colonne de résine d'échange d'ions Chromobeads P lors de l'arrivée du premier tampon d'élution (formiate de pyridine 0,1 M de pH 2,9). Ce flocculat ne disparaît que lors du passage de soude 0,2 N. A partir des faibles quantités de fractions tryptiques isolées, seule une structure partielle peut être proposée par détermination de la composition en acides aminés, de l'acide aminé en position N-terminale et par dégradation d'Edman manuelle. Ainsi huit peptides ont été placés sans ambiguïté, quatre l'ont été en tenant compte des mutations ponctuelles conservatives tandis que cinq l'ont été en tenant compte des mutations ponctuelles non conservatives. Parmi les peptides libérés par action de la trypsine, certains résultent d'hydrolyse non spécifique. Par exemple, le peptide correspondant à la séquence 113-118 provient de l'hydrolyse d'une liaison méthionyle. D'autres peptides n'ont pu être replacés bien que connaissant leur composition en acides aminés et leur extrémité N-terminale.

Même après fractionnement, suivant la taille moléculaire, de l'hydrolysats chymotrypsique nous avons été confrontés aux mêmes problèmes que ceux avec l'hydrolysats tryptique lors du fractionnement sur colonne de résine Chromobeads P (faible solubilité des préfractions à pH acide ; flocculat sur le haut de colonne ; faible rendement du fractionnement). Si l'hydrolysats chymotrypsique est peu soluble à pH acide, la solubilité est très augmentée à pH 9,5. Nous avons donc tenté de fractionner l'hydrolysats complet sur colonne d'échange d'anions. Le gel utilisé (DEAE-Trisacryl M) dont le pouvoir de résolution est élevé tandis que les phénomènes d'adsorption non spécifiques sont faibles, nous a permis d'obtenir les fractions peptidiques quantitativement. Des fractions hétérogènes sont néanmoins obtenues malgré l'utilisation d'un gradient linéaire de faible pente de pH décroissant et de force ionique croissante. Ceci semble indiquer que certains peptides chymotrypsiques ont des points isoélectriques très voisins et que les techniques de séparation faisant intervenir la charge ne sont pas appropriées.

*L'étude des peptides libérés par action du NTCBA semblait intéressante. De par leur taille respectivement de 70 ; 105 et 14 résidus, ces peptides sont facilement séparés par gel filtration et intéressants pour une étude en séquence automatique. L'élimination du résidu d'iminothiazolidine, formé par cyclisation de la thiocycloalanine après hydrolyse de la liaison N-cystéine, est difficile et n'a pas permis d'obtenir, en quantité suffisante, les peptides dont l'extrémité N-terminale est régénérée. Ces peptides pourront être utilisés pour l'obtention de sous-peptides après clivage spécifique (par action de la N-bromosuccinimide par exemple libérant dans le peptide de 70 résidus un peptide de 51 résidus directement utilisable dans la coupelle du séquenceur).*

*Devant l'échec de séparation et la faible quantité de peptides utilisables obtenus à partir des différents hydrolysats étudiés, nous avons cherché à obtenir des peptides de tailles nettement différentes pour une séparation par gel filtration à pH basique. Une étude cinétique d'hydrolyse par différentes endopeptidases a été réalisée. Cette étude a permis de montrer que seule la collagénase et la chymotrypsine correspondent à cet objectif.*

*En conclusion, il apparaît donc que l'isolement des peptides de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la "myosine-V<sub>G</sub>" de coeur de Porc, en quantité suffisante pour une étude de structure primaire, est très difficile par les méthodes conventionnelles.*

D - SEPARATION DES HYDROLYSATS PEPTIDIQUES  
DE LA CHAÎNE LÉGÈRE L<sub>27</sub> PAR CHROMATOGRAPHIE  
LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)

I - INTRODUCTION

Les méthodes conventionnelles utilisées pour l'étude de la structure primaire de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la "myosine-V<sub>G</sub>" n'ont pas permis d'obtenir des peptides purs en quantité suffisante pour déterminer la séquence complète.

Nous avons donc eu recours à des techniques plus résolutive telles que l'analyse de la composition en acides aminés à haute sensibilité et la chromatographie liquide haute performante (HPLC) qui permet aussi bien la séparation des peptides (même si la taille diffère seulement d'un résidu d'acide aminé) que la détection quantitative des PTH-amino-acides (environ 0,5 nanomoles).

Pour la séparation de peptides par HPLC, le choix des phases stationnaires et des phases mobiles est particulièrement important. La plupart des séparations par HPLC ont porté sur des peptides de petite taille et sont effectuées avec des phases inverses comme phase stationnaire et des gradients de tampon organique comme phase mobile.

Les peptides obtenus après hydrolyse de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la "myosine-V<sub>G</sub>", sont pour la plupart très hydrophobes et possèdent une configuration particulière. Nous avons donc été amenés à choisir également comme phases stationnaires des phases inverses (octyldécylsilane C<sub>18</sub>, octylsilane C<sub>8</sub> ou phénylsilane RØ) et comme phases mobiles soit des gradients constitués d'eau contenant un "contre-ion"

---

\*\* Le "contre-ion" est l'acide trifluoroacétique 0,013 M (TFA).

(solvant A) et de solvants organiques, dont la polarité décroissante est : l'acétonitrile, l'isopropanol (2-propanol) et le n-propanol (1-propanol) contenant aussi le "contre-ion" (solvant B), soit un pourcentage constant du solvant B (élution isocratique).

## II - ETUDE DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES

### 1°) L'HYDROLYSAT CHYMOTRYPSIQUE TOTAL

Pour éviter une multiplicité d'étapes de chromatographie qui diminue les rendements, nous avons fractionné directement l'hydrolysat chymotrypsique total par HPLC. Pour tenter d'améliorer le rendement de la séparation et la qualité de la chromatographie, nous avons essayé trois types de colonne :

α) La colonne analytique  $C_8$  (5  $\mu$ ) MERCK (250 x 4 mm)

Cette colonne permet de séparer l'hydrolysat en plus de vingt fractions dont dix-huit peuvent être considérées comme majeures. Comme le montre le profil d'élution (Figure IV-10), la plupart de ces fractions sont contaminées les unes par les autres (asymétrie des pics). La capacité et la "durée de vie" de la colonne sont faibles.

β) La colonne analytique  $C_{18}$  (10  $\mu$ ) WATERS (300 x 3,9 mm)

Cette colonne permet de séparer l'hydrolysat en une trentaine de fractions (Figure IV-10). La plupart des pics ne sont pas symétriques. On note aussi une faible capacité de cette colonne mais un meilleur pouvoir de résolution que la colonne analytique  $C_8$  (5  $\mu$ ) MERCK.

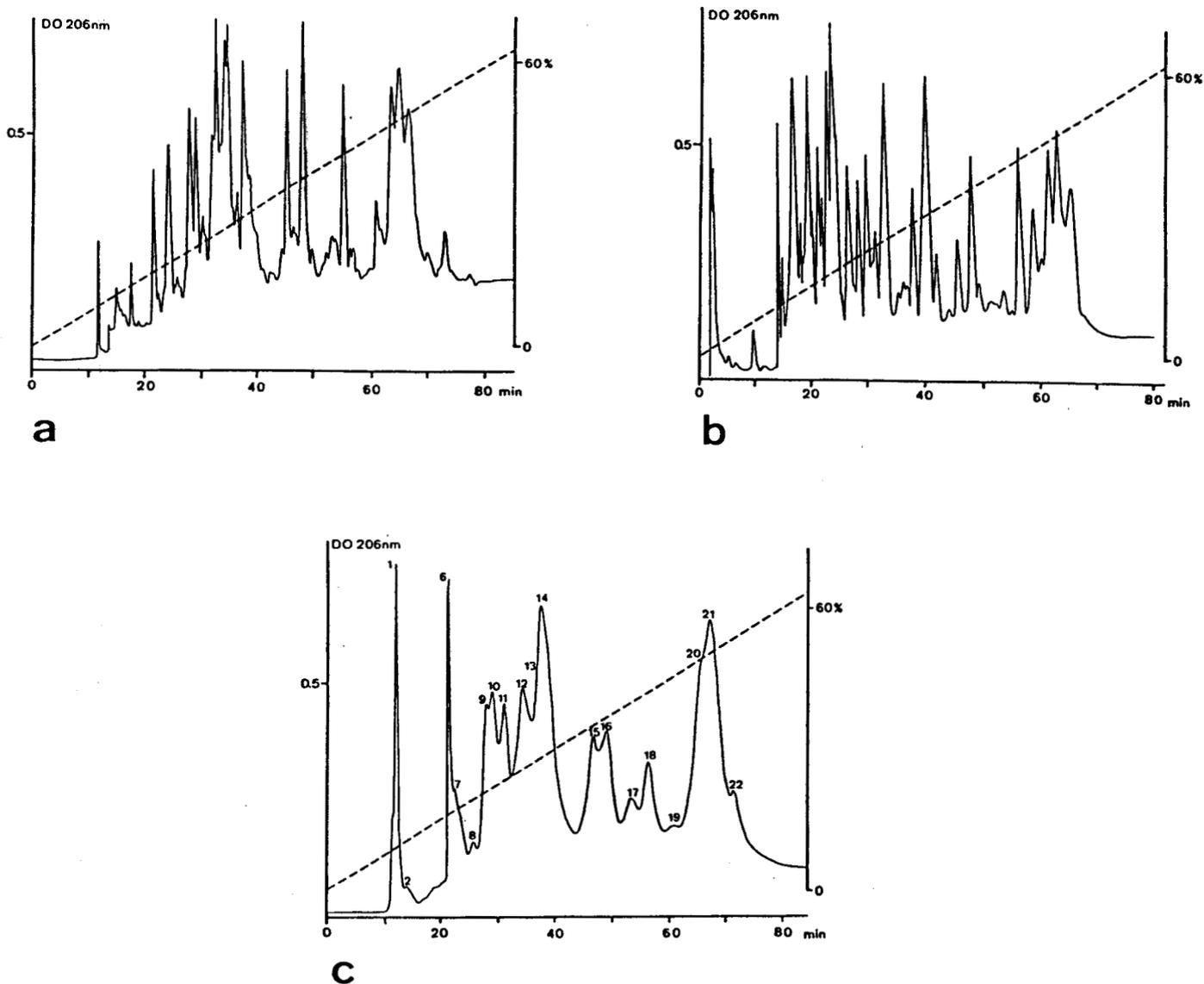


FIGURE IV-10 Séparation par HPLC de l'hydrolysate chymotrypsique de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la "myosine-V<sub>G</sub>" de coeur de Porc

- (a) sur colonne C<sub>18</sub> (10 $\mu$ ) WATERS (300x3,9 mm) avec un gradient linéaire de 0 à 60% de solvant B<sub>2</sub> en 80min à un débit de 1ml/min
- (b) sur colonne C<sub>8</sub> (5 $\mu$ ) MERCK (250x4 mm) avec un gradient linéaire de 0 à 60% de solvant B<sub>2</sub> en 80min à un débit de 0,5ml/min
- (c) sur colonne semi-préparative C<sub>18</sub> WATERS 2(600x7,8 mm) avec un gradient linéaire de 0 à 60% de solvant B<sub>2</sub> en 80min à un débit de 3ml/min



Solvant B<sub>2</sub> : 2-propanol et 0,013 M TFA comme contre-ion

γ) La colonne semi-préparative C<sub>18</sub> WATERS  
[2(600 x 7,8) mm]

Cette colonne sépare l'hydrolysate en seize fractions dont la plupart sont hétérogènes (Figure IV-10). Cependant, la quantité d'hydrolysate déposée sur cette colonne est vingt fois supérieure à celle qui peut l'être sur les colonnes analytiques.

Ces trois colonnes étudiées ne permettent pas de séparer en une seule étape tous les peptides de l'hydrolysate chymotrypsique. Des rechromatographies sont nécessaires.

Dans ces conditions, la colonne semi-préparative a été préférée pour sa plus grande capacité afin de séparer (en plusieurs fois) 4 μmoles de l'hydrolysate chymotrypsique. Les différentes fractions isolées ont été rechromatographiées sur colonnes analytiques pour leur meilleur pouvoir de résolution.

Par exemple, à partir de la fraction 19, trois rechromatographies sont nécessaires (en changeant de colonne ou de système solvant) pour obtenir une fraction homogène (19-21-6-9) en quantité suffisante pour une caractérisation et une étude de structure primaire.

Dans des conditions similaires nous avons pu obtenir trois autres fractions homogènes.

D'autres fractions ont été isolées mais avec de plus faibles rendements.

2°) APRES FRACTIONNEMENT SUR COLONNE DE DEAE-  
TRIS-ACRYL M

Les essais de séparation de l'hydrolysate chymotrypsique total montrent qu'une étape de préfractionnement de cet hydrolysate est nécessaire.

Le fractionnement de l'hydrolysat chymotrypsique sur colonne d'échange d'anions (DEAE-Trisacryl M) avait permis d'isoler des fractions hétérogènes dont quelques-unes quantitativement.

Ces fractions hétérogènes ont été rechromatographiées par HPLC sur colonnes analytiques en phase inverse ( $C_{18}$ , RØ).

Par exemple, à partir de la fraction 9 de DEAE-Trisacryl M et d'une rechromatographie sur colonne  $C_{18}$  (10  $\mu$ ) WATERS, nous obtenons deux sous-fractions (9/D) et (9/E), tandis qu'à partir de la fraction 6, trois rechromatographies sont nécessaires pour obtenir une fraction homogène (6-24-8-3).

### 3°) CONCLUSION

*Après essai de trois types de colonnes de RP-HPLC, nous avons fractionné les quatre  $\mu$ moles d'un hydrolysat chymotrypsique sur colonne semi-préparative dont le pouvoir de résolution est inférieur, mais la capacité est 20 fois supérieure à ceux des colonnes analytiques.*

*A partir de plusieurs rechromatographies sur colonne analytique de ces préfractions, trois peptides ont pu être caractérisés et sont étudiés en structure primaire.*

*D'autres fractions ont été isolées avec de plus faibles rendements et pourront être utilisées, si des recouvrements de séquence sont nécessaires. Il sera facile de faire le choix, connaissant la composition en acides aminés de ces fractions.*

*Les essais de fractionnement de l'hydrolysat chymotrypsique par HPLC nous permettent de montrer que pour séparer un grand nombre de petits peptides un préfractionnement est nécessaire.*

Après préfractionnement sur colonne de DEAE-Trisacryl M, les purifications par HPLC des petits peptides chymotrypsiques sont facilitées.

Ainsi à partir de la fraction 9 et d'une étape chromatographique sur colonne RP-HPLC, deux peptides purs ont été obtenus. A partir de la fraction 6, trois étapes de re-chromatographies sur RP-HPLC ont permis d'isoler une fraction homogène. Ces quatre fractions sont obtenues en quantité suffisante pour une caractérisation et une étude de structure primaire.

### III - ETUDE DES PEPTIDES OBTENUS APRES ACTION DU BrCN

La séparation, par les techniques conventionnelles, des peptides obtenus après action du BrCN (peptides CB) ne nous avait pas permis de les obtenir en quantité et dans un état de pureté suffisants pour qu'ils puissent être étudiés en séquence.

L'isolement des peptides CB est de première importance pour une détermination rapide de structure primaire : les résidus de méthionine sont peu nombreux (sept déterminés par composition en acides aminés) et semblent bien répartis le long de la chaîne peptidique de L<sub>27</sub> (structure partielle établie par homologie). Nous avons tenté de les séparer par HPLC, malgré leurs tailles.

Comme le problème de séparation de peptides de taille importante est nouveau par la méthode HPLC, nous avons été obligés de faire une étude systématique des phases stationnaires et des phases mobiles :

. Les phases stationnaires utilisées sont des colonnes de phases inverses et parmi celles-ci, six colonnes analytiques [ $C_8$  (5  $\mu$ ) MERCK ;  $C_8$  (10  $\mu$ ) à compression radiale WATERS ;  $C_{18}$  (10  $\mu$ ) WATERS ;  $C_{18}$  (5  $\mu$ ) WHATMAN ; RP-phényl WATERS et Synchronpack-RP-P SYNCHROM] et une colonne semi-préparative  $C_{18}$  WATERS.

. Les phases mobiles. Nous avons utilisé le solvant A (eau + contre-ion TFA 0,013 M) et le solvant B ( $B_1$  : n-propanol et  $B_2$  : 2-propanol additionnés du contre-ion TFA 0,013 M). Les conditions d'élution sont soit des gradients linéaires continus (0 à 75 % de solvant  $B_2$  en 75 min ; 0 à 70 % de solvant  $B_1$  en 70 min), soit des gradients linéaires discontinus (solvant  $B_2$  de 0 à 24 % en 10 min ; 24 à 60 % en 60 min ; 60 à 75 % en 10 min).

#### 1°) FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT TOTAL

Après nos différents essais, parmi toutes les colonnes utilisées et les différentes conditions de solvants, nous avons sélectionné deux types de colonne (colonne semi-préparative et colonne analytique  $R\emptyset$  WATERS) pour séparer l'hydrolysat total obtenu après action du BrCN sur la chaîne légère  $L_{27}$  de la "myosine- $V_G$ " de coeur de Porc.

##### *$\alpha$ ) Colonne semi-préparative WATERS*

Nous avons déjà remarqué la capacité 20 fois supérieure de cette colonne par rapport aux colonnes analytiques et comme le faible pouvoir de résolution pouvait être de moindre importance, eu égard au petit nombre et à la taille des peptides CB, nous avons fractionné 2,6  $\mu$ moles de l'hydrolysat total sur cette colonne semi-préparative en utilisant un gradient de 0 à 60 % de solvant  $B_2$  en 80 min à 3 ml/min.

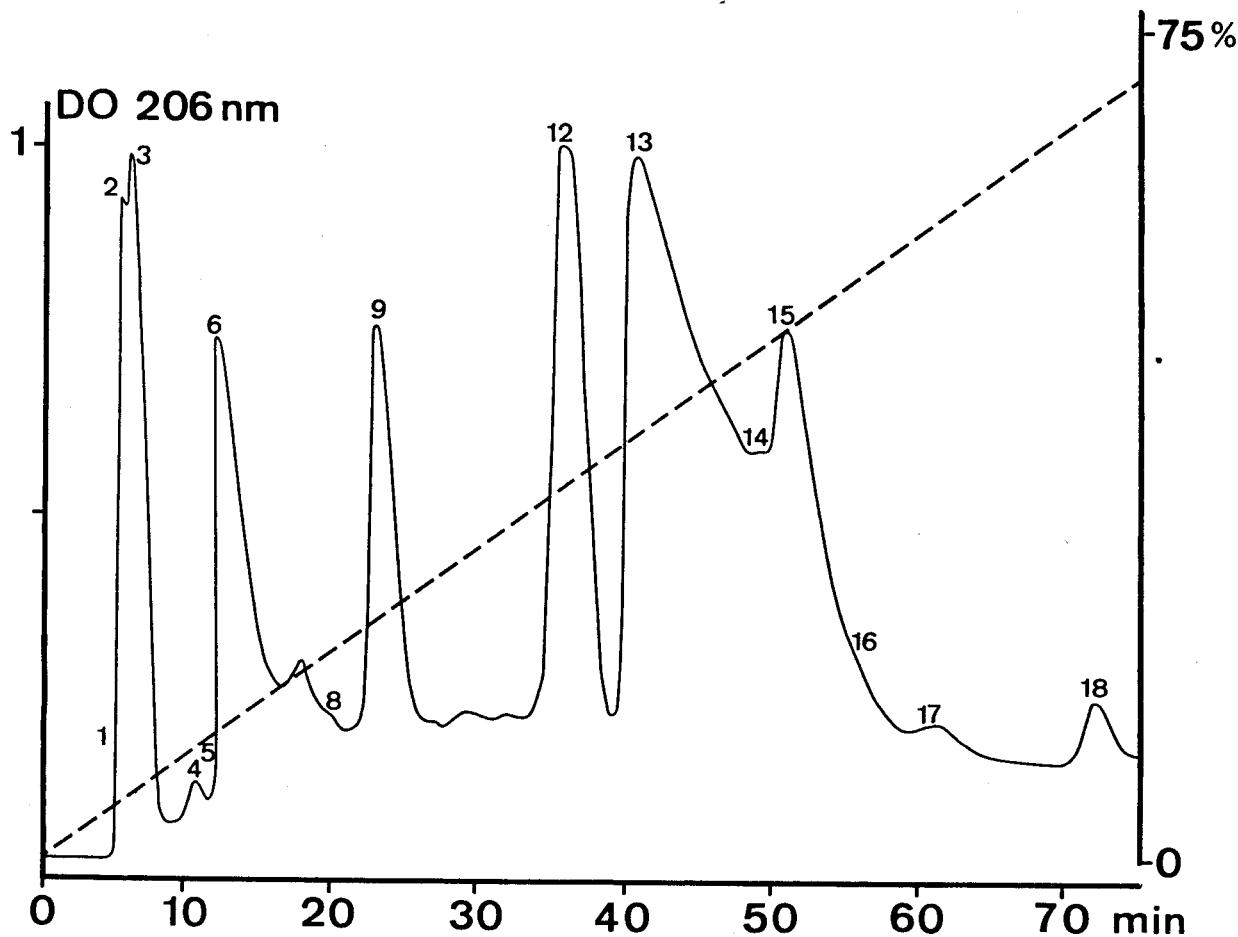


FIGURE IV- 11

Fractionnement de l'hydrolysate obtenu après action du Bromure de cyanogène de la chaîne légère  $L_{27}$  de la "myosine- $V_G$ " de coeur de Porc sur colonne semi-préparative  $C_{18}$  WATERS  $2 \times (600 \times 7,8 \text{ mm})$  avec un gradient linéaire de 0 à 75% de solvant  $B_2$  en 80 mn à un débit de 3 ml/mn.

solvant  $B_2 = 2\text{-propanol}$  et 0,013 M TFA comme contre ion.



Les huit fractions majeures obtenues (Figure IV-11) sont hétérogènes et ont dû être rechromatographiées. Après fractionnement sur colonnes analytiques, quelques sous-fractions ont été isolées en quantité juste suffisante pour une caractérisation.

β) Sur colonne RØ WATERS

Cette colonne nous ayant montré une capacité et un facteur de résolution supérieurs à toutes les autres colonnes analytiques utilisées pour séparer l'hydrolysat de la chaîne légère L<sub>27</sub> après action du BrCN, 4 µmoles ont été fractionnées. L'utilisation d'un gradient linéaire de 70min de 0 à 70 % de solvant B<sub>1</sub> à un débit de 1ml/min permet de séparer l'hydrolysat en treize fractions (Figure IV-12).

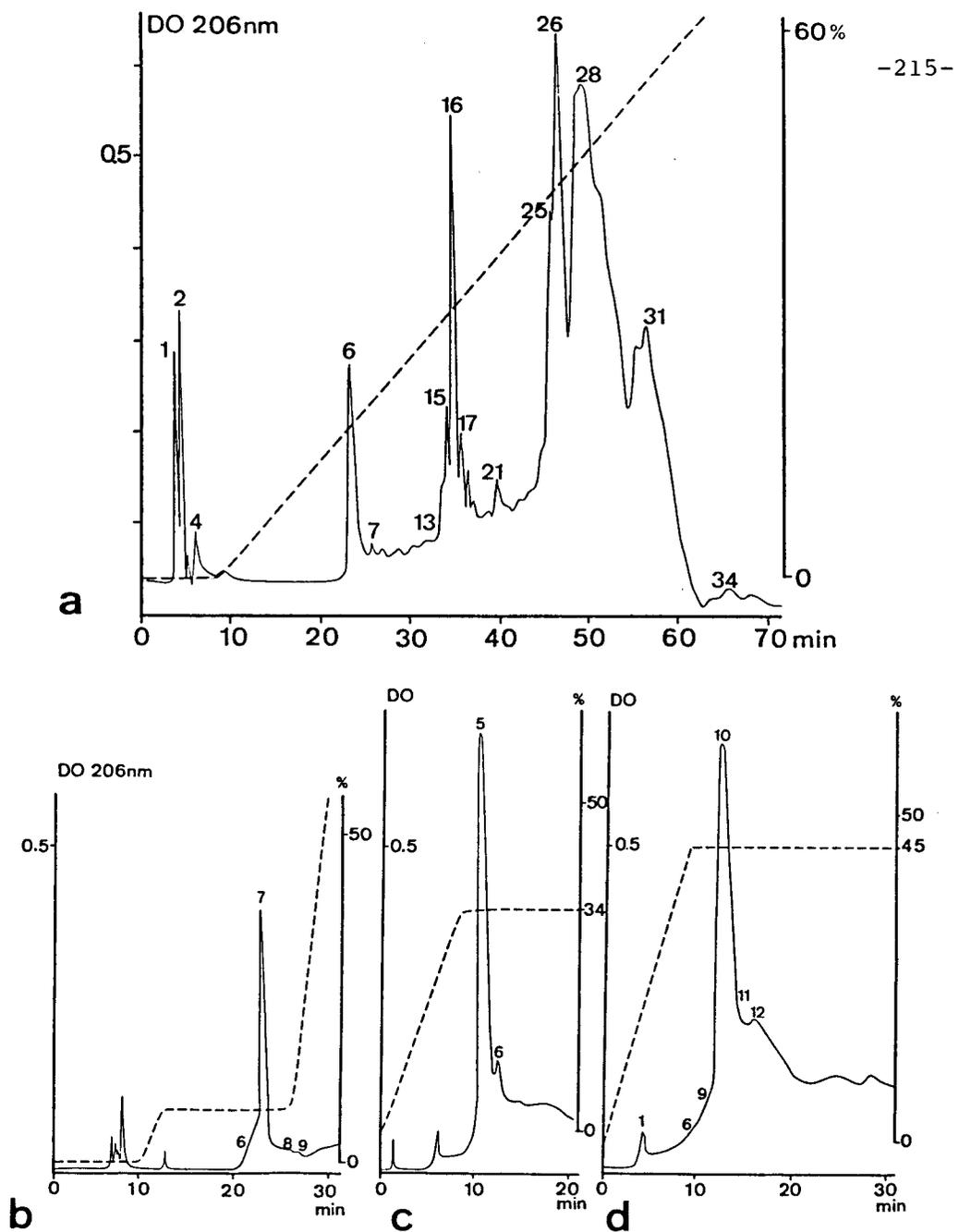
Toutes les fractions isolées ont été rechromatographiées en changeant les conditions soit de solvant, soit de gradient d'élution ou soit de colonne. Par exemple :

- la fraction 6 est rechromatographiée sur colonne C<sub>18</sub> (10 µ) MERCK en isocratique à 8 % de solvant B<sub>2</sub> et donne un pic symétrique (6-7) (Figure IV-12) ;

- la fraction 25 est rechromatographiée sur colonne C<sub>8</sub> (10 µ) WATERS à compression radiale en isocratique à 34 % de solvant B<sub>2</sub> et donne un pic symétrique (25-15) ;

- la fraction 26 est rechromatographiée sur colonne C<sub>18</sub> (5 µ) à compression radiale WATERS en isocratique à 34 % de solvant B<sub>2</sub> et donne un pic (26-5) auquel est associé un épaulement (26-6) (Figure IV-12) ;

- la fraction 29 est rechromatographiée sur colonne C<sub>18</sub> (5 µ) à compression radiale WATERS en isocratique à 35 % de solvant B<sub>2</sub> et donne un pic majeur (29-11) auquel est associé un pic plus faible ;



**FIGURE IV-12** Purification par HPLC des peptides de l'hydrolysat obtenu après action du Bromure de cyanogène de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la "myosine-V<sub>G</sub>" de coeur de Porc

- (a) Separation de l'hydrolysat total sur colonne R<sub> </sub> WATERS à un débit de 1ml/min avec un gradient linéaire de 0   70% de solvant B<sub>1</sub> en 70min
- (b) Purification de la fraction 6 sur colonne C<sub>18</sub> (10 ) MERCK en isocratique à 8% de solvant B<sub>2</sub>   un débit de 0,7ml/min
- (c) Purification de la fraction 26 sur colonn  C<sub>18</sub> (5 )   compression radiale WATERS en isocratique à 34% de solvant B<sub>2</sub>   un débit de 2ml/min
- (d) Purification de la fraction 30 sur colonne C<sub>18</sub> (5 )   compression radiale WATERS en isocratique à 45% de solvant B<sub>2</sub>   un débit de 2ml/min

- la fraction 30 est rechromatographiée sur colonne  $C_{18}$  ( $5 \mu$ ) à compression radiale WATERS en isocratique à 45 % de solvant  $B_2$  et donne un pic majeur (30-10) auquel est associé un épaulement (Figure IV-12).

## 2°) APRES PREFRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT

Puisque la capacité des colonnes analytiques est limitée, pour une séparation quantitative d'un peptide particulier, il est parfois intéressant de préfractionner l'hydrolysate par gel filtration et de ne rechromatographier par HPLC que la fraction qui nous intéresse. De plus, un préfractionnement permet d'éliminer les agrégats de la chaîne légère qui n'a pas été hydrolysée, facilitant l'utilisation de la HPLC et la durée de vie de la colonne.

Pour préparer quantitativement le peptide N-terminal de la chaîne légère  $L_{27}$ , obtenu après action du  $BrCN$ , nous avons préfractionné l'hydrolysate sur colonne de gel filtration (Sephadex  $G_{75}$ ) (Voir Appendice technique, § X-E). Seule la fraction retenue avec le plus faible  $K_{av}$  ( $K_{av} > 0$ ) qui correspond au peptide de plus haut poids moléculaire, peptide N-terminal, est rechromatographiée par HPLC.

Trois types de colonne en phase inverse ont été utilisés :

a) Colonne  $C_{18}$  ( $10 \mu$ ) WATERS ( $300 \times 3,9$  mm)

Cette colonne permet de séparer le peptide N-terminal des autres contaminants peptidiques, mais la qualité du fractionnement diminue après plusieurs dépôts. Une quantité importante de peptide reste cependant adsorbée sur la colonne et n'est plus éluee conduisant à une détérioration rapide des performances de la colonne.

β) Colonne C<sub>8</sub> (7 μ) MERCK (250 x 4 mm)

Le fractionnement par HPLC de la fraction contenant le peptide N-terminal est impossible sur la colonne C<sub>8</sub> MERCK. En effet, quelques minutes après l'injection, la pression dans la colonne augmente fortement, correspondant à un colmatage complet de la colonne, même pour une faible quantité de peptide déposée. Aucun peptide n'a été élué.

γ) Colonne Synchronpack RP-P SYNCHROM (250 x 4 mm)

La capacité de cette colonne est élevée et une quantité importante de peptide N-terminal peut être ainsi purifiée. Nous notons cependant, au cours du fractionnement, que la pression en tête de colonne augmente puis se stabilise. La pression redevenant normale lorsque tous les peptides sont élués.

3°) CONCLUSION

L'isolement par HPLC des peptides CB, obtenus après hydrolyse par le BrCN de L<sub>27</sub>, a fait l'objet d'une étude particulière et d'une évaluation des différentes colonnes analytiques et semi-préparatives commercialisées pour la HPLC, car il était essentiel d'obtenir ces peptides purs et en quantité suffisante pour leur étude de séquence.

Le fractionnement de l'hydrolysate BrCN total sur colonne HPLC semi-préparative permet une séparation peu sélective mais rapide d'une quantité relativement importante d'hydrolysate. Avec la colonne RØ WATERS, sans doute du fait de la nature même du greffon sur la matrice silane, cinq peptides CB (de 66 à 20 résidus) ont été purifiés à partir de l'hydrolysate total BrCN et ont été caractérisés pour leur étude en séquence automatique. Les peptides de faible poids moléculaire

(de 9 et 2 résidus) élués certainement en début de fractionnement avec les sels, sont difficilement détectables même à 206 nm et n'ont pas été isolés.

L'isolement par HPLC du peptide N-terminal N-bloqué a été facilité par un préfractionnement sur colonne de Séphadex G-75. Cependant, ce peptide dont la composition est caractéristique (un taux élevé en proline et alanine), est très hydrophobe et reste fortement adsorbé sur certaines matrices avec d'autres peptides. Seuls certains types de colonne HPLC peuvent être utilisés pour la purification de ce peptide N-terminal.

#### IV - ETUDE DES HYDROLYSATS TRYPSIQUES LIMITES A LA LIAISON ARGINYLE

Dans toute étude de structure primaire, l'étude d'un seul type d'hydrolysat est insuffisant pour déterminer complètement une séquence, car d'une part, il n'est pas toujours possible d'isoler tous les peptides (en particulier les di- ou tripeptides ou les acides aminés libres) et, d'autre part, il faut replacer les peptides entre eux. Dans ce but, il était intéressant de préparer d'autres peptides de taille importante qui permettent les recouvrements de séquence et de combler les vides laissés par les peptides manquants.

Dans le cas de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la myosine de ventricule gauche de coeur de Porc d'après la séquence partielle, établie par homologie à l'aide des peptides tryptiques, les résidus d'arginine sont bien répartis le long de la chaîne peptidique. Il était donc intéressant d'utiliser la trypsine (traitée par le TPCK), qui est une endopeptidase très spécifique, en limitant son action aux résidus d'arginine par modification des résidus de lysine par une alkylation réversible (maléylation et citraconylation).

### 1°) LA MALEYLATION

L'action de l'anhydride maléique dans les conditions décrites (Voir Appendice technique, § VIII-E) permet le blocage réversible des groupements  $\epsilon$ -aminés des résidus de lysine et l'alkylation a été effectuée sur 2,4  $\mu$ moles de chaîne légère L<sub>27</sub>. La chaîne légère ainsi modifiée est hydrolysée par la trypsine traitée par le TPCK.

La faible solubilité de l'hydrolysate ne nous a pas permis de séparer par HPLC des fractions homogènes en quantité suffisante pour une étude structurale.

### 2°) LA CITRACONYLATION

L'action de l'anhydride citraconique, qui permet le blocage réversible des groupements  $\epsilon$ -aminés des résidus de lysine par alkylation, a été effectuée (Voir Appendice technique, § VIII-D) sur 5  $\mu$ moles de chaîne légère L<sub>27</sub>. La chaîne légère ainsi modifiée est hydrolysée par la trypsine traitée par le TPCK.

Etant donné le petit nombre de peptides tryptiques, pour obtenir la meilleure séparation en une seule étape, l'hydrolysate a été fractionné sur deux types de colonnes analytiques d'HPLC.

#### *a) Sur colonne C<sub>18</sub> (5 $\mu$ ) à compression radiale WATERS*

L'hydrolysate tryptique de la chaîne légère préalablement citraconylée a été fractionné sur la colonne C<sub>18</sub> à compression radiale. Cinq fractions sont séparées mais elles ne sont pas homogènes. Ce type de colonne HPLC ne semble pas approprié pour un fractionnement de l'hydrolysate tryptique citraconylé.

### β) Sur colonne RØ WATERS

L'hydrolysate (4 µmoles) a été fractionné par HPLC sur colonne RP-phényl avec un gradient linéaire de 0 à 70 % de solvant B<sub>1</sub> en 70 min. Sur les quatorze fractions isolées, huit sont des fractions majeures (Figure IV-13). Parmi ces huit fractions, trois sont homogènes (13 ; 16 et 18), les autres sont rechromatographiées en changeant les conditions de fractionnement. Par exemple :

- La fraction 4 est chromatographiée sur colonne C<sub>18</sub> (10 µ) WATERS en isocratique à 10 % d'acétonitrile/TFA 0,0013 M. Un pic symétrique est obtenu (4-16)

- La fraction 7 est chromatographiée sur colonne C<sub>18</sub> (10 µ) WATERS en isocratique à 13 % d'acétonitrile/TFA 0,0013 M. Deux fractions sont obtenues dont une est majeure (7-8).

- La fraction 21 est séparée sur colonne C<sub>18</sub> (7 µ) MERCK en isocratique à 26 % de solvant B<sub>2</sub>, en trois fractions dont une est majeure (21-17) (Figure IV-13).

- La fraction 28 est rechromatographiée sur colonne RØ WATERS en isocratique à 38 % de solvant B<sub>2</sub> en deux fractions 28-8 et 28-9 (Figure IV-13).

### 3°) CONCLUSION

*Pour une hydrolyse limitée aux résidus d'arginine, l'action de l'anhydride citraconique s'est révélée supérieure à celle de l'anhydride maléïque. En effet, après maléylation nous sommes confrontés à des problèmes d'insolubilité de l'hydrolysate que nous avons déjà rencontrés pour la séparation de l'hydrolysate trypsique sur colonne de résine Chromobeads P. De plus, la décitraconylation est plus facile à effectuer et elle est plus complète.*

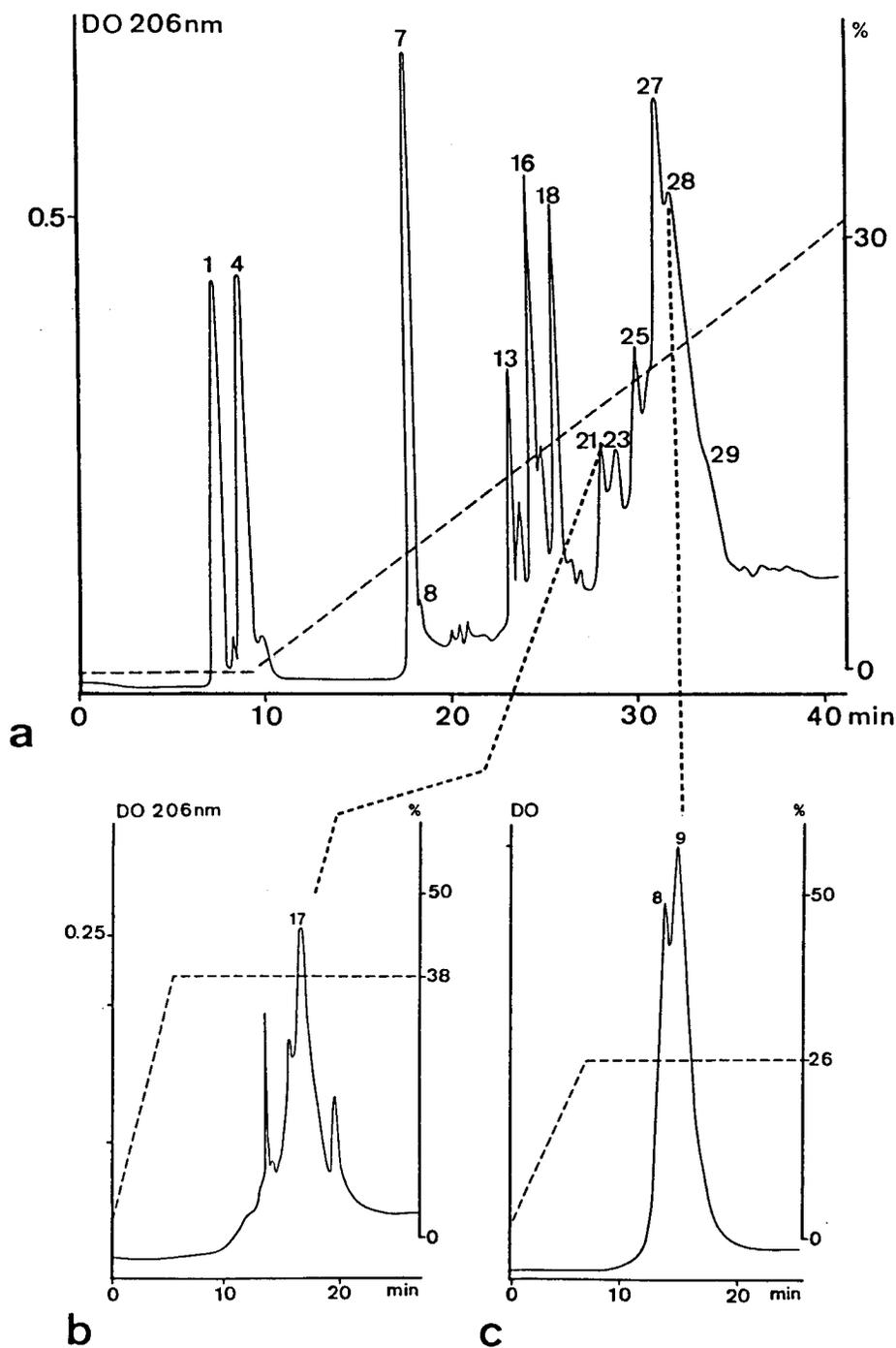


FIGURE IV-13

Purification par HPLC des peptides de l'hydrolysate obtenu après action de la trypsine limitée aux liaisons arginyles, de la chaîne légère  $L_{27}$  de la "myosine- $V_G$ "

(a) Séparation de l'hydrolysate total sur colonne RØ WATERS à un débit de 1 ml/mn avec un gradient linéaire de 0 à 70% de solvant  $B_1$  en 70 mn.

(b) Purification de la fraction 21 sur colonne  $C_{18}$  ( $7\mu$ ) MERCK en isocratique à 26% de solvant  $B_2$  à un débit de 0,7 ml/mn.

(c) Purification de la fraction 28 sur colonne RØ WATERS en isocratique à 38% de solvant  $B_2$  à un débit de 1 ml/mn



Dans le cas de la séparation de cet hydrolysats trypsique total après citraconylation parmi toutes les colonnes utilisées [ $C_{18}$  (10  $\mu$ ) VARIAN,  $C_{18}$  (5  $\mu$ ) à compression radiale WATERS, RP-phényl WATERS etc...], seule la RØ WATERS sépare l'hydrolysats total avec une grande efficacité. En effet, sur huit fractions majeures, trois sont homogènes (symétrie des pics) les autres étant purifiées par une seule étape de rechromatographie.

#### V - ETUDE D'AUTRES TYPES D'HYDROLYSATS ENZYMATIQUES

Pour obtenir des peptides de taille importante permettant d'autres recouvrements de séquence, s'ils étaient nécessaires, d'autres endopeptidases ont été utilisées et les hydrolysats ont été fractionnés par HPLC.

##### 1°) L'HYDROLYSAT PAR LA PROTÉASE DE LA GLANDE SOUS-MAXILLAIRE DE SOURIS (GSMS)

Le rendement de la réaction de maléylation ayant été faible et celui de la citraconylation étant, pour certaines protéines, parfois largement inférieur à 100 %, nous avons choisi d'hydrolyser la chaîne légère par l'endopeptidase GSMS pour sa spécificité d'hydrolyse au niveau des liaisons arginyles. Cependant, malgré une  $\mu$ mole de chaîne légère au départ et un fractionnement sur colonne RØ WATERS, la quantité de peptide purifié est trop faible pour effectuer une caractérisation et une étude de structure primaire.

##### 2°) L'HYDROLYSAT APRES ACTION DE LA N-BROMOSUC-CINIMIDE (NBS)

La composition en acides aminés de la chaîne légère ne révèle pas la présence de résidu de tryptophane. L'action de la NBS dans les conditions utilisées (Voir Appendice technique, § VIII-C) ne doit se limiter qu'à la coupure au niveau

des liaisons tyrosyles. Malgré l'utilisation d'une colonne RØ WATERS pour le fractionnement de l'hydrolysate, les quantités de peptides isolés sont trop faibles pour une caractérisation et une étude de structure.

### 3°) L'HYDROLYSAT PAR LA COLLAGENASE

Les études de cinétique d'hydrolyse par la collagénase ont permis de montrer qu'après 50 min, il y a libération de trois larges peptides dont les tailles sont comprises entre 14 000 et 27 000 daltons. L'hydrolysate a été préfractionné par chromatographie de gel filtration sur colonne de Sephadex G-50 en tampon sesqui-carbonate d'ammonium 50 mM de pH 8.78 (Voir Appendice technique, § X-Db). La fraction exclue ( $K_{av} = 0$ ) de la colonne de gel filtration est éliminée. Elle contient l'enzyme, la chaîne légère non hydrolysée et des agrégats. Les deux autres fractions retenues ont été fractionnées par HPLC sur colonne  $C_{18}$  (10  $\mu$ ) WATERS avec un gradient linéaire, de 0 à 75 % de solvant  $B_2$  en 75 min. Huit fractions ont été isolées dont quatre sont des fractions majeures. Parmi ces fractions :

- La fraction 21 est rechromatographiée en isocratique à 55 % d'acétonitrile/TFA 0,013 M sur colonne  $C_{18}$  (10  $\mu$ ) WATERS. Nous obtenons un pic majeur (21-13).

- La fraction 17 est rechromatographiée en isocratique à 40 % d'acétonitrile/TFA 0,013 M sur colonne  $C_{18}$  (10  $\mu$ ) WATERS. Nous obtenons un pic majeur (17-7).

A partir d'une micromole de l'hydrolysate, les fractions obtenues sont en quantité suffisante pour une caractérisation et une étude structurale.

#### 4°) CONCLUSION

*Afin d'obtenir des peptides de taille importante pour des recouvrements de séquence, seule l'hydrolyse limitée par la collagénase a donné les résultats escomptés. Les quantités de fractions homogènes, obtenues par HPLC (symétrie des pics), sont suffisantes pour des études de caractérisation et de structure.*

### E - LA STRUCTURE PRIMAIRE DE LA CHAÎNE LÉGÈRE L<sub>27</sub>

#### I - INTRODUCTION

A partir des fractions séparées des différents hydrolysats (chymotrypsique ; BrCN ; trypsique limitée aux liaisons arginyles ; collagénase) par chromatographie liquide haute performance, un contrôle d'homogénéité est effectué par deux cycles de dégradation manuelle d'Edman (Voir Appendice technique, § XVI-B) et détection avec quantification, par HPLC, des PTH-amino acides-obtenus.

L'étude de la composition en acides aminés des peptides purs permet :

- de déterminer (approximativement) le nombre de résidus constituant le peptide ;

- de caractériser ces peptides eu égard aux deux acides aminés en position N-terminale et à la structure primaire de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la myosine cardiaque de Poulet déjà déterminée.

Les peptides purs sont soumis à la dégradation automatique d'Edman.

## II - LES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES

### 1°) LES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES OBTENUS A PARTIR DE L'HYDROLYSAT TOTAL

Les fractions homogènes peptidiques (symétrie des pics dans le profil d'élution après HPLC) ont été étudiées. Les acides aminés en position N-terminale ainsi que la composition en acides aminés de ces différentes fractions sont donnés dans le Tableau IV-6a. On peut remarquer que deux fractions éluées à des temps de rétention différents en HPLC (fraction 19/21-6-9 et fraction 19/21-7-7) possèdent des compositions en acides aminés similaires et des extrémités N-terminales bloquées. Ils correspondent au même peptide N-terminal riche en acide glutamique, proline, alanine et lysine dont l'un correspond au peptide désamidé.

### 2°) LES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES OBTENUS APRES FRACTIONNEMENT SUR DEAE-TRISACRYL M

Plusieurs peptides obtenus en quantité suffisante, ont été étudiés par leur composition en acides aminés et leur acide aminé en position N-terminale (Tableau IV-6b). Parmi ces fractions, trois ont été étudiées par dégradation automatique d'Edman :

- La fraction 9/D dont l'enchaînement en acides aminés est :

Thr-Pro-Glu-Gln-Ile-Glu-Glu-Phe

est appelée le peptide C-3. Il correspond à la séquence 44-51 de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la myosine cardiaque de Poulet avec une mutation en position 46 (Asp en Glu).

	21/19-5-10	19/21-6-9	19/21-7-7	19/21-8-6	32/6-24	32/22-8
ASP	1,5	1,2	0,9	1,1	1,1	1,2
THR	2,3	1,1			0,8	2,2
SER			0,9	0,9		
GLU	5,1	3,8	3,1	3,3	3,6	4,4
PRO	0,9	3,2	3,1	4,9	3,7	
GLY	1,4				0,8	1,2
ALA	1,8	3,4	4,6	4,6	3,8	1,2
CYS/2						
VAL	1,2					1,1
MET						
ILE		1,1	1,3	1,4	1,2	
LEU	3,4	1,5			1,1	3,1
TYR						
PHE		0,7	1,2	1,2	1,1	
HIS						
LYS	1,5	3,2	2,1	2,1	2,2	1,1
ARG	1,1					1,1
TOTAL	~ 19	~ 19	~ 19	~ 19	~ 20	~ 15
N-TER	Ala	N.D	N.D	N.D	N.D	Ala

**a**

	3/27-6	9/D	9/E	9/10	6/24-8-3	6/3-19	6/28-5-7	5/2-18	8/17	8/18
ASP	0,8		1,3	1,1	1,2	2,8	0,8	2,4		1,3
THR		1,5			2,1	1,2			1,1	
SER	1,1			0,9			0,9			
GLU	2,8	4,6	2,6	3,1	3,9	1,2	3,4	2,7	4,1	2,2
PRO	5,3	1,5		1,1			4,3		1,2	
GLY			2,6		1,3			2,4		1,1
ALA	5,3				0,9		3,4			
CYS/2										
VAL			1,3		1,6			2,1		0,9
MET				1,1						
ILE	0,9	1,4					1,4		0,9	
LEU			1,1		3,0			1,0		0,9
TYR										
PHE	1,1	1,1	1,5			0,5	1,0		0,8	0,8
HIS										
LYS	1,8			1,1	1,1		1,4			
ARG				1,2	1,0					
TOTAL	~ 19	~ 10	~ 10	~ 9	~ 16	~ 6	~ 14	~ 10	~ 8	~ 6
N-TER	N.D	Thr	Glu	Arg	Ala	Asp	N.D	Gly	Thr	Glu

Peptide  
Chymotryp-  
sique

**b**

**TABLEAU IV- 6** Composition en acides aminés et extrémité N-terminale

( déterminée par PTH-amino acide ) des peptides obtenus après hydrolyse par la chymotrypsine de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la "myosine-V<sub>G</sub>" de coeur de Porc et purifiés par HPLC

(a) Après fractionnement de l'hydrolysat total sur colonne C<sub>18</sub> semi-préparative WATERS

(b) Après le préfractionnement dur colonne de DEAE-Trisacryl M les peptides chymotrypsiques ont été chromatographiés sur colonne C<sub>18</sub> ou RØ WATERS.

- La fraction 9/E dont l'enchaînement en acides aminés est :

Glu-Asp-Phe-Val-Glu-Gly-Leu

est appelée le peptide C-16. Il correspond à la séquence 128-134 de la structure primaire L<sub>27</sub> de la myosine cardiaque de Poulet.

- La fraction 6/24-8-3 dont l'enchaînement en acides aminés est :

Ala-Thr-Leu-Gly-Glu-Arg-Leu-Thr-Glu-Asp-Glu-Val-Glu-Lys-Leu

est appelée le peptide C-19. Il correspond à la séquence 155-169 avec les mutations en positions 164 (Glu en Asp) et 167 (Asp en Glu) de la séquence déjà citée.

### III - LES PEPTIDES OBTENUS APRES ACTION DU BrCN

#### 1°) PEPTIDES OBTENUS APRES PREFRACTIONNEMENT, SUR COLONNE HPLC SEMI-PREPARATIVE, DE L'HYDROLYSAT TOTAL

Deux des peptides obtenus après rechromatographies sur colonnes HPLC analytiques des fractions isolées après préfractionnement sur colonne semi-préparative ont été caractérisés par leur composition en acides aminés et leurs acides aminés en position N-terminale

Les résultats donnés dans le Tableau IV-7a montrent que la fraction 15/11-19 ne possède pas de PTH-amino-acides après deux cycles de dégradation d'Edman. Ce peptide, long d'une soixantaine de résidus, a une composition en acides aminés caractéristique : un taux élevé en acide glutamique, proline, alanine et lysine. Ce peptide nommé CB-1 correspond au peptide N-terminal de la chaîne légère. Sa composition en acides aminés est intermédiaire entre celle de la chaîne légère

L<sub>25</sub> de la myosine de muscle squelettique de Lapin et celle de L<sub>27</sub> de la myosine cardiaque de Poulet (Tableau IV- 7a)

Les fractions 15/21-9 et 12/23-8 possèdent l'alanine suivie de glycolle en position N-terminale et la composition en acides aminés montre une vingtaine de résidus d'acides aminés. Ce peptide nommé CB-6 a une composition en acides aminés correspondant à la séquence 176-190 de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la myosine cardiaque de Poulet.

Il a été possible d'isoler tous les peptides CB sauf CB-3, qui correspond à la séquence 106-114, et CB-7 qui correspond à la séquence 191-192. Par l'étude des PTH-amino acides obtenus à partir de l'hydrolysat total, nous avons montré l'existence de ces peptides CB-3 et CB-7.

## 2°) LES PEPTIDES OBTENUS APRES FRACTIONNEMENT SUR COLONNE R-PHENYL

Cinq peptides, obtenus après fractionnement de l'hydrolysat total sur colonne R<sub>0</sub>, ont été caractérisés (Tableau IV-7b) :

- La fraction 28/15 qui ne possède pas d'acide aminé réagissant avec le P.I.T.C., a une composition en acides aminés contenant un taux élevé en acide glutamique, proline, alanine et lysine. Ce peptide CB-1 est caractéristique de la partie N-terminale de la chaîne légère L<sub>27</sub>.

- Les fractions 28/12, 27/9 et 29/13 possèdent après deux cycles de dégradation manuelle d'Edman une lysine et une isoleucine en séquence N-terminale. Ce peptide nommé CB-2 d'environ 35 résidus a une composition en acides aminés semblable à celle du peptide correspondant à la séquence 67-101 de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la myosine cardiaque de Poulet.

	15/11-19	12/23-8	12/24-20	16/14-10	15/22-13
	13/18-20	15/21-9	15/23-7	16/13-20	
ASP	3,4	3,2	3,8	3,9	1,6
THR	1,3		2,1	3,7	2,1
SER	1,4	0,8	0,9	0,9	
GLU	11,3	3,3	7,2	4,0	4,8
PRO	14,8		2,2	0,9	
GLY	0,7	2,2	3,8	3,0	2,1
ALA	13,6	2,2	1,9		2,0
CYS/2	0,6	0,7			
VAL		0,9	2,9	2,8	1,6
MET ( Hse )	1,2	0,8	0,8	0,8	0,7
ILE	3,1	1,7	0,9	0,7	
LEU			4,5	2,2	4,2
TYR		1,0	1,0	0,8	
PHE	4,2	1,2		1,9	
HIS		0,9		0,8	0,7
LYS	9,9	1,2	4,9	2,3	1,3
ARG	1,2		2,0	1,0	1,7
TOTAL	66	20	38	31	24
N-TER	N.D	Ala	Lys	Leu	Gly
Peptide BrCN correspondant	CB <sub>1</sub>	CB <sub>6</sub>	CB <sub>2</sub>	CB <sub>4</sub>	CB <sub>5</sub>

a

	28/15	29/12	28/11	30/10	26/5
		27/9	29/11	31/16	25/15
ASP	4,3	3,7	4,2	1,2	3,1
THR	1,8	2,1	3,5	2,1	
SER	1,2	1,1	1,0		
GLU	10,9	8,2	4,2	5,1	3,2
PRO	10,9	1,9			
GLY	1,7	4,2	3,7	2,1	2,9
ALA	11,6	2,1		1,3	3,8
CYS/2		0,8			0,7
VAL	1,1	3,1	2,9	2,1	1,1
MET ( Hse )	0,7	0,8	0,7	0,6	0,7
ILE	2,6		0,7		2,4
LEU	1,4	5,2	1,5	4,9	
TYR		0,8	0,7		0,9
PHE	4,1		2,7		1,3
HIS			0,9	1,1	0,8
LYS	8,2	3,8	3,8	0,9	1,2
ARG	1,1	2,1	1,1	1,9	
TOTAL	≈ 62	≈ 39	≈ 32	≈ 22	≈ 21
N-TER	N.D	Lys	Leu	Gly	Ala
peptide BrCN correspondant	CB <sub>1</sub>	CB <sub>2</sub>	CB <sub>4</sub>	CB <sub>5</sub>	CB <sub>6</sub>

b

TABLEAU IV-7

Composition en acides aminés et extrémité N-terminale ( déterminée par PTH-amino acide ) des peptides obtenus après action du BrCN sur la chaîne légère L<sub>27</sub> de la "myosine-V<sub>G</sub>" de coeur de Porc et purifiés par HPLC .

(a) Après fractionnement de l'hydrolysate total sur colonne C<sub>18</sub> semi-préparative WATERS

(b) Après fractionnement de l'hydrolysate total sur colonne RØ WATERS.

Des rechromatographies ont été nécessaires pour obtenir des fractions homogènes ( ../ ..- .. ) .



- Les fractions 28/11 et 29/11 possèdent après deux cycles de dégradation manuelle d'Edman la leucine et la glutamine comme extrémité N-terminale. Ce peptide CB-4 d'environ 30 résidus a une composition en acides aminés correspondant à celle de la séquence 115-146 de la chaîne légère de référence.

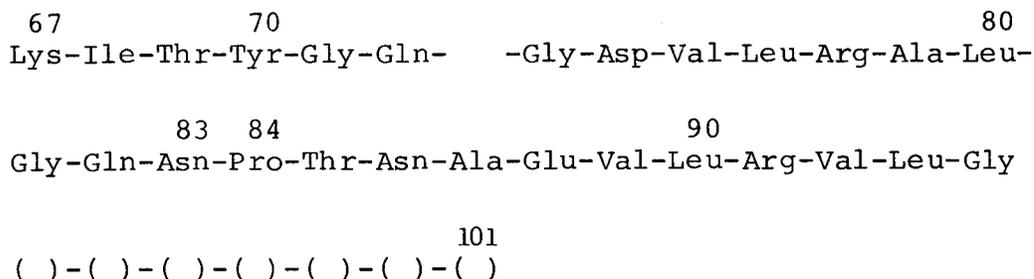
- Les fractions 30/10 et 31/16 ont la séquence Gly-Ala N-terminale. Ce peptide nommé CB-5 d'environ 24 résidus a une composition en acides aminés correspondant à celle de la partie 147-170 de la chaîne légère de référence.

- Les fractions 25/15 et 26/5 ont la séquence N-terminale Ala-Gly. Ce peptide nommé CB-6 d'une vingtaine de résidus a une composition en acides aminés correspondant à celle de la partie 171-190 de la chaîne légère de référence.

A partir de ces fractionnements, nous n'avons pas pu isoler les peptides correspondants aux séquences 108-114 (CB-3) et 191-192 (CB-7) de la chaîne légère de référence.

La séquence en acides aminés a été effectuée sur les différents peptides CB au séquenceur automatique :

- Le peptide CB-2 : Sur 35 résidus, 31 ont été identifiés sans ambiguïté et la séquence obtenue est :



Après six cycles de dégradation automatique, il y a un "blanc" qui doit correspondre à un résidu de cystéine. Celui-ci n'est jamais identifié lors de la quantification des PTH-amino-acides.



171 Ala-Gly-Gln-Glu-Asp-Ser-Asn-Gly- 180 -Ile-Asn-Tyr-Glu-Ala-  
190 Phe-Val-( )-( )-( )-(Hse)

Comme pour la séquence du peptide CB-2, le "blanc" dans la séquence en position 179 doit correspondre à un résidu de cystéine pour les raisons évoquées précédemment. Nous notons par rapport à la séquence de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la myosine de muscle cardiaque de Poulet une seule mutation en position 176 (Ala en Ser).

### 3°) CONCLUSION

*La détermination de la séquence automatique des différents peptides CB obtenus après action du bromure de cyanogène sur la chaîne légère L<sub>27</sub> nous a permis de placer 119 sur les 132 résidus de la partie C-terminale de la chaîne légère. Parmi les séquences manquantes il y a la séquence 102-114 correspondant au peptide CB-3 que nous n'avons pas pu isoler, qui ne doit pas posséder la séquence Asn-Ser en position N-terminale et dont la composition en acides aminés est différente de celle du peptide homologue de la chaîne légère L<sub>27</sub> du muscle cardiaque de Poulet.*

*Les résidus de cystéine non identifiés à partir du PTH-amino-acide peuvent néanmoins être remplacés compte tenu des compositions en acides aminés et des séquences homologues.*

## IV - LES PEPTIDES OBTENUS APRES ACTION DE LA TRYPSINE LIMITEE AUX LIAISONS ARGINYLES

### 1°) CARACTERISATION DES PEPTIDES

*Comme pour les peptides CB, les peptides obtenus après fractionnement sur colonne R-phényl HPLC à partir de l'hydrolysats par la trypsine limitée aux liaisons arginyles (peptides Tc), ont été caractérisés par deux cycles de*

dégradation manuelle d'Edman et leur composition en acides aminés (Tableau IV-8).

- Les fractions 19/12 et 19/13 possèdent l'enchaînement N-terminal Thr-Pro et sont constituées de 18 résidus. Ce peptide Tc-2 doit correspondre à la séquence 61-78 de la chaîne légère de référence.

- La fraction 16 possède l'enchaînement Ala-Leu en position N-terminale et est constituée de 13 résidus. Ce peptide Tc-3 a une composition en acides aminés similaire à celle du peptide correspondant à la séquence 79-91 de son homologue de coeur de Poulet.

- Les fractions 28/8 et 28/9 possèdent l'enchaînement Val-Leu en position N-terminale et plus de 40 résidus. La composition en acides aminés de ce peptide Tc-4 pourrait correspondre à la séquence 92-135 de la chaîne légère L<sub>27</sub> de myosine de muscle cardiaque de Poulet.

- La fraction 18 possède l'enchaînement Val-Phe en position N-terminale. Ce peptide Tc-5 qui possède 16 résidus doit correspondre à la séquence 136-151.

- La fraction 13 possède l'enchaînement His-Val en position N-terminale et d'après la composition en acides aminés, elle est constituée de 9 résidus. Ce peptide Tc-6 dont la partie N-terminale a été déterminée par l'étude du peptide C-19 doit correspondre à la séquence 152-160.

- Les fractions 20/9 et 22/16 possèdent la leucine et la thréonine en positions N-terminales. Ce peptide Tc-7 qui comporte une trentaine de résidus et aucun résidu d'arginine doit correspondre à la partie C-terminale 161-192 de la chaîne légère. Neuf des premiers résidus avaient été déterminés par l'étude du peptide chymotrypsique C-19.

	27	19/13	16	28/8	18	13	22/16
		19/12	17/14	28/9	14/14		20/9
ASP	4,2	1,2	1,4	5,0	1,9		4,3
THR	1,3	2,1	1,1	2,6	1,1	1,2	0,9
SER	1,2			2,1			1,8
GLU	10,4	2,2	2,8	6,8	2,3	1,4	6,2
PRO	13,8	1,2	0,8	3,0			
GLY	1,1	2,1	1,4	3,2	2,7	1,2	1,3
ALA	11,9	0,9	2,1	2,9	1,0	1,2	2,8
CYS/2		1,2					0,6
VAL	1,2	1,2	0,9	3,0	2,1	1,4	2,1
MET		0,7		1,0	0,9		1,5
ILE	2,8	0,8		2,5			1,8
LEU	0,9	1,2	2,2	4,3	1,3	1,9	2,2
TYR		1,1					0,7
PHE	3,3			3,9	1,1		1,2
HIS						0,9	0,8
LYS	7,7	1,8		2,1	0,9		1,8
ARG	0,8	0,9	1,1	1,0	1,1	1,2	
TOTAL	60	18	13	44	16	9	31
N-TER	N.D	Thr	Ala	Val	Val	His	Leu
Peptide							
Trypsique	Tc <sub>1</sub>	Tc <sub>2</sub>	Tc <sub>3</sub>	Tc <sub>4</sub>	Tc <sub>5</sub>	Tc <sub>6</sub>	Tc <sub>7</sub>
Correspondant							

**TABLEAU IV-8**

*Composition en acides aminés et extrémité*

*N-terminale ( déterminée par PTH-amino acide ) des peptides obtenus après hydrolyse par la trypsine dont l'action a été limitée aux liaisons arginyles par citraconylation de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la "myosine-V<sub>G</sub>" de coeur de Porc*

*Ces peptides ont été isolés à partir du fractionnement de l'hydrolysat trypsique total par HPLC sur colonne RØ-WATERS et ont été purifiés par rechromatographie sur d'autres types de colonnes RP-HPLC analytiques.*

*Ces peptides ( Tc ) ont été identifiés compte tenu de leur composition en acides aminés, de leur extrémité N-terminale et des homologues de séquence ( voir texte )*







### 3°) CONCLUSION

La détermination de la séquence automatique des différents peptides Tc, obtenus après séparation par HPLC de l'hydrolysats par la trypsine de la chaîne légère (dont les résidus de lysine ont été citraconylés), a permis d'aligner 63 résidus de la partie C-terminale. La détermination de 9 résidus pour le peptide Tc-4 ne nous a pas permis d'obtenir la région 101-117 correspondant au peptide CB-3 non isolé. Seul le peptide Tc-7 reste à séquencer pour recouvrir la partie 160-192.

### V - INTERET DE LA HPLC

Les expériences effectuées pour la séparation des différents peptides des différents hydrolysats par HPLC nous ont permis de montrer :

- que l'hydrolysats des petits peptides chymotrypsiques, qui sont nombreux, est fractionné avec une bonne efficacité par HPLC lorsqu'un préfractionnement par des méthodes conventionnelles (gel filtration ou échange d'ion) a été réalisé. En effet, si les fractionnements d'hydrolysats totaux sur colonnes analytiques ou semi-préparative ne nous permettent d'obtenir les peptides purs qu'en faible quantité (à cause des nombreuses étapes de rechromatographies), un hydrolysats préfractionné sur colonne d'échange d'anions (DEAE-Trisacryl M) nous a permis d'obtenir après HPLC quelques peptides purs en quantité suffisante pour des études de structure ultérieures.

- que pour les hydrolysats de gros peptides (CB ou Tc), qui sont peu nombreux, une étude systématique des colonnes et des solvants d'éluion était nécessaire, car dans ce domaine, peu de choses sont actuellement connues.

Dans le cas des peptides CB et Tc de la chaîne légère  $L_{27}$  de la "myosine- $V_G$ ", seule la colonne R-phényl nous a permis d'obtenir des fractions homogènes en quantité suffisante. Par exemple :

- Cinq des sept peptides CB sont purifiés après une seule étape de rechromatographie.

- Les sept peptides Tc sont obtenus et seuls quatre d'entre eux ont dû être rechromatographiés.

Il semble donc que pour purifier les gros peptides de la chaîne légère  $L_{27}$  de la "myosine- $V_G$ ", il vaudrait mieux utiliser une colonne analytique adaptée qu'une colonne semi-préparative ainsi que des solvants très apolaires tels que le 2-propanol/TFA 0,0013 M ou le 1-propanol/TFA 0,0013 M et même des gradients linéaires de pente faible. Pour obtenir des quantités suffisantes de peptides, il vaut mieux multiplier le nombre de dépôts, ce qui nécessite une automatisation de l'appareillage d'HPLC (injecteur automatique ; collecteur de fractions adapté et automatique, muni d'un détecteur de pente et qui permette la collection des fractions identiques dans les mêmes tubes).

## VI - L'ENCHAINEMENT PEPTIDIQUE DE $L_{27}$

A partir des séquences en acides aminés des différents peptides obtenus à partir des différents hydrolysats, nous avons pu établir la séquence partielle de toute la partie C-terminale de la chaîne légère  $L_{27}$  de la myosine cardiaque de ventricule gauche de coeur de Porc (Figure IV-14). La séquence avec les recouvrements\* a été obtenue grâce à l'étude des peptides Tc et des peptides CB. Dans la partie N-terminale, seule la séquence du peptide chymotrypsique C-3 a pu être déterminée.

\*Figure IV-15

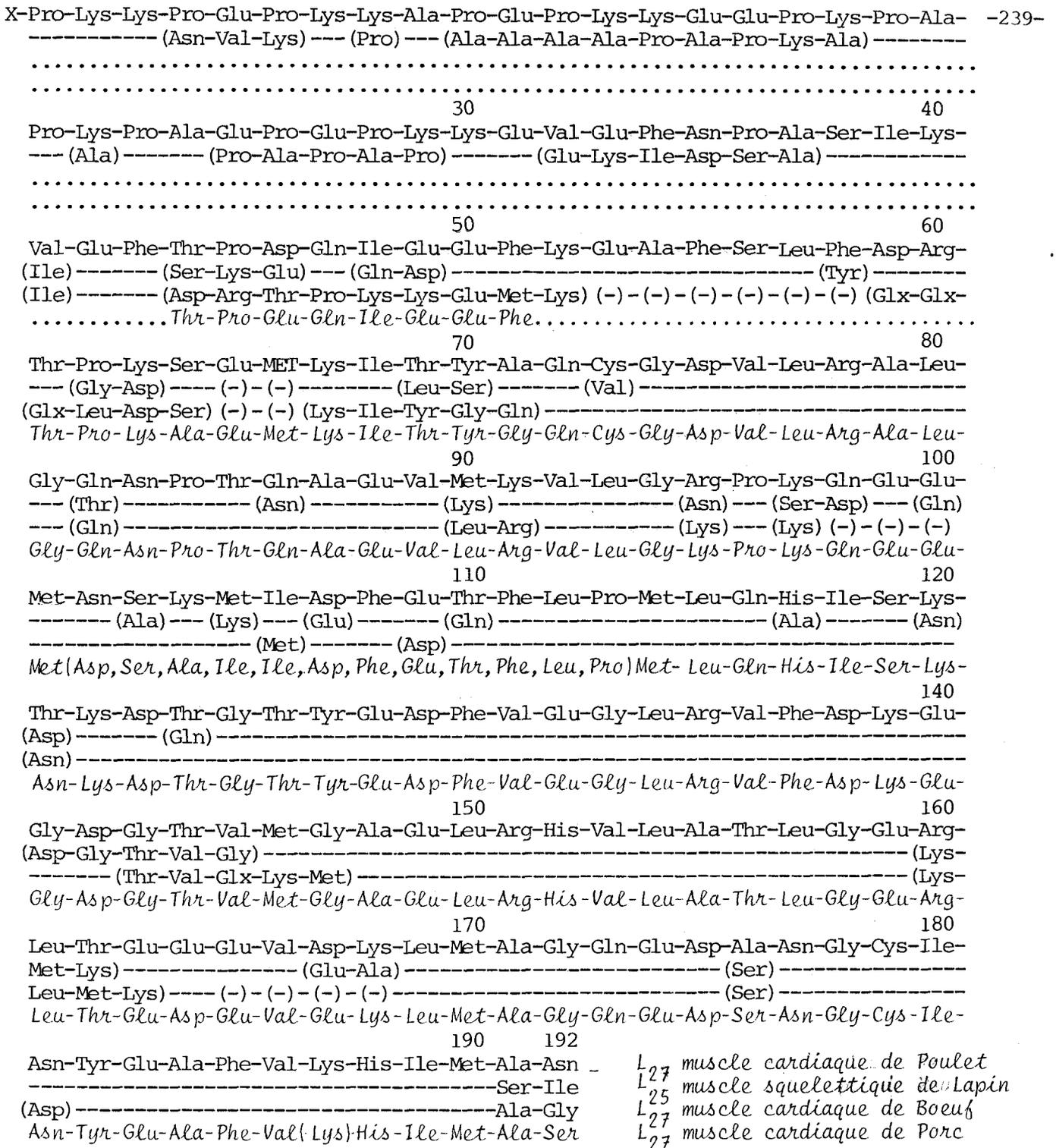


Figure IV-14 : Comparaison des séquences en acides aminés des chaînes légères de plus haut poids moléculaire de la myosine de muscle squelettique de Lapin et des myosines cardiaques de Poulet, de Boeuf et de ~~Poulet~~ Porc



Les peptides CB-1 et Tc-1 ainsi que le peptide N-terminal obtenu après action de la collagénase sont purifiés en quantité suffisante. La stratégie utilisée pour établir la séquence de la partie N-terminale et donc de la structure primaire complète de la chaîne légère  $L_{27}$  de la myosine de ventricule gauche de coeur de Porc est :

- d'hydrolyser ce peptide CB-1 par des endopeptidases spécifiques (trypsine, chymotrypsine...) ;
- de séparer les fractions par HPLC ;
- de les caractériser et d'établir la séquence de ces peptides ;
- d'utiliser les fractions obtenues lors d'autres fractionnements, de les sélectionner pour établir les recouvrements de séquence nécessaires.

#### VII - HOMOLOGIE DE STRUCTURE ENTRE LES CHAINES LEGERES "ALCALI", LA TN-C ET LA PARVALBUMINE.

Les chaînes légères  $L_{25}^S$  et  $L_{16}^S$  de la myosine de muscle squelettique de Lapin sont dissociées selectivement par traitement alcalin. Bien qu'il n'y ait pas de procédé de dissociation sélectif des chaînes légères de plus haut poids moléculaire de la myosine cardiaque, elles ont des propriétés similaires et sont appelées chaînes légères "alcali".

##### 1°) COMPARAISON DES CHAINES LEGERES "ALCALI"

La comparaison des parties C-terminales de  $L_{27}$  de Porc avec celles des chaînes légères de plus haut poids moléculaires d'autres espèces et d'autres muscles ( $L_{25}^S$  de muscle squelettique de Lapin,  $L_{27}$  de muscle cardiaque de Boeuf, d'Homme et de Poulet) révèle une très grande homologie de leur structure

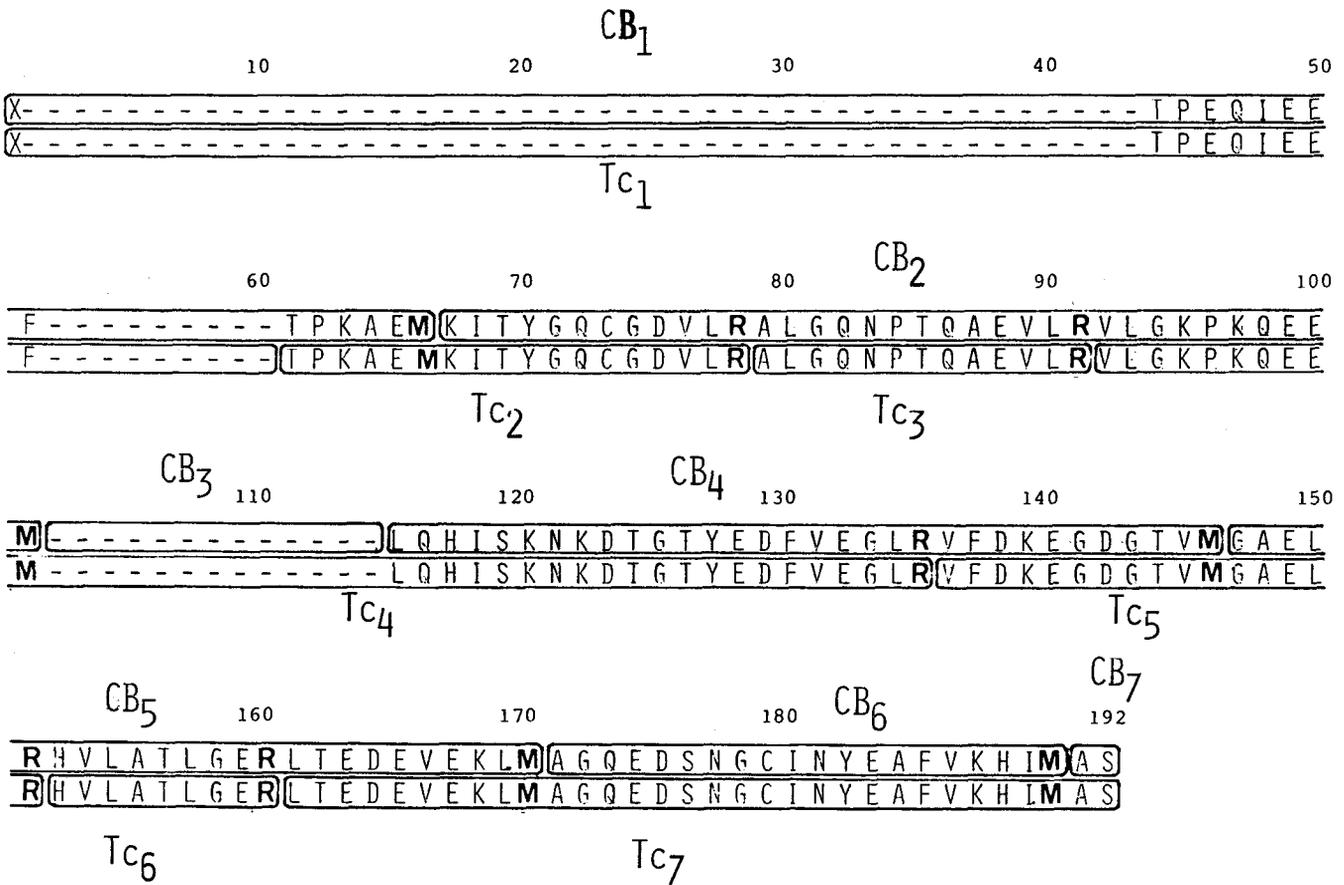


FIGURE IV-15 : Recouvrements des séquences en acides aminés des peptides obtenus après action du Bromure de cyanogène ( CB ) par les peptides obtenus après hydrolyse par la trypsine limitée aux liaisons arginyles ( Tc ) de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la "myosine-V<sub>G</sub>" de coeur de Porc.



primaire (Figure IV-16a). En ne plaçant que quatre "intervalles" pour aligner les parties homologues, le pourcentage d'homologie entre la chaîne légère  $L_{25}^S$  de muscle squelettique de Lapin et  $L_{27}$  de coeur de Porc est de 62% tandis qu'entre  $L_{25}^S$  et  $L_{27}$  de muscle cardiaque de Poulet il est de 75%. Le pourcentage d'homologie des séquences de chaînes légères d'un même muscle (muscle cardiaque de Porc et de Poulet) est de 90%.

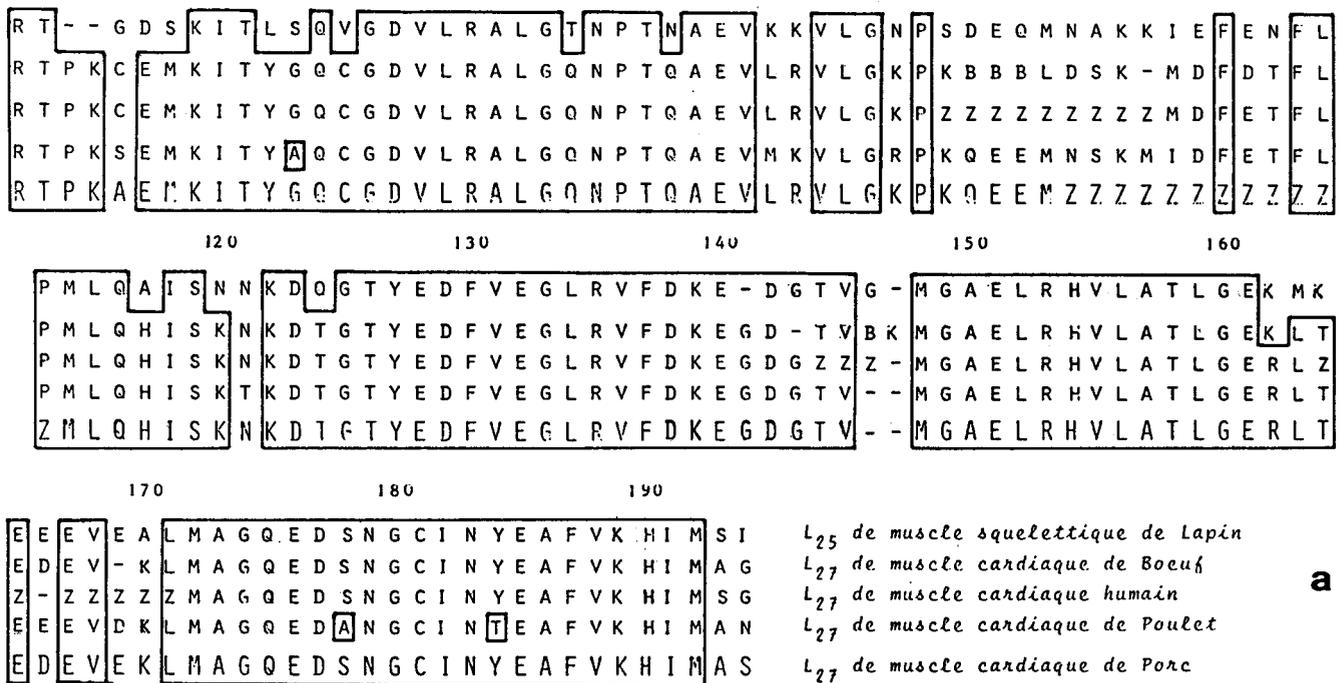
Si nous comparons les acides aminés hydrophobes (Figure IV-16b), sur 31 positions 29 sont conservées (en position 74 une Valine est remplacée par une Cystéine et en position 184 une Thréonine remplace une Tyrosine).

De la même façon si nous comparons les acides aminés chargés sur les 22 positions 17 sont aussi conservées, la variation de la charge étant aléatoire. L'addition de deux "intervalles" en position 146 et 147 pour  $L_{27}$  de coeur de Poulet et de Porc, d'un intervalle en position 147 pour  $L_{27}$  de muscle squelettique de Lapin et le fait que le peptide tryptique de  $L_{27}$  de coeur de Boeuf (position 140 à 147) n'ait pas été séquencé semblent montrer que la séquence proposée pour ce peptide est inexacte.

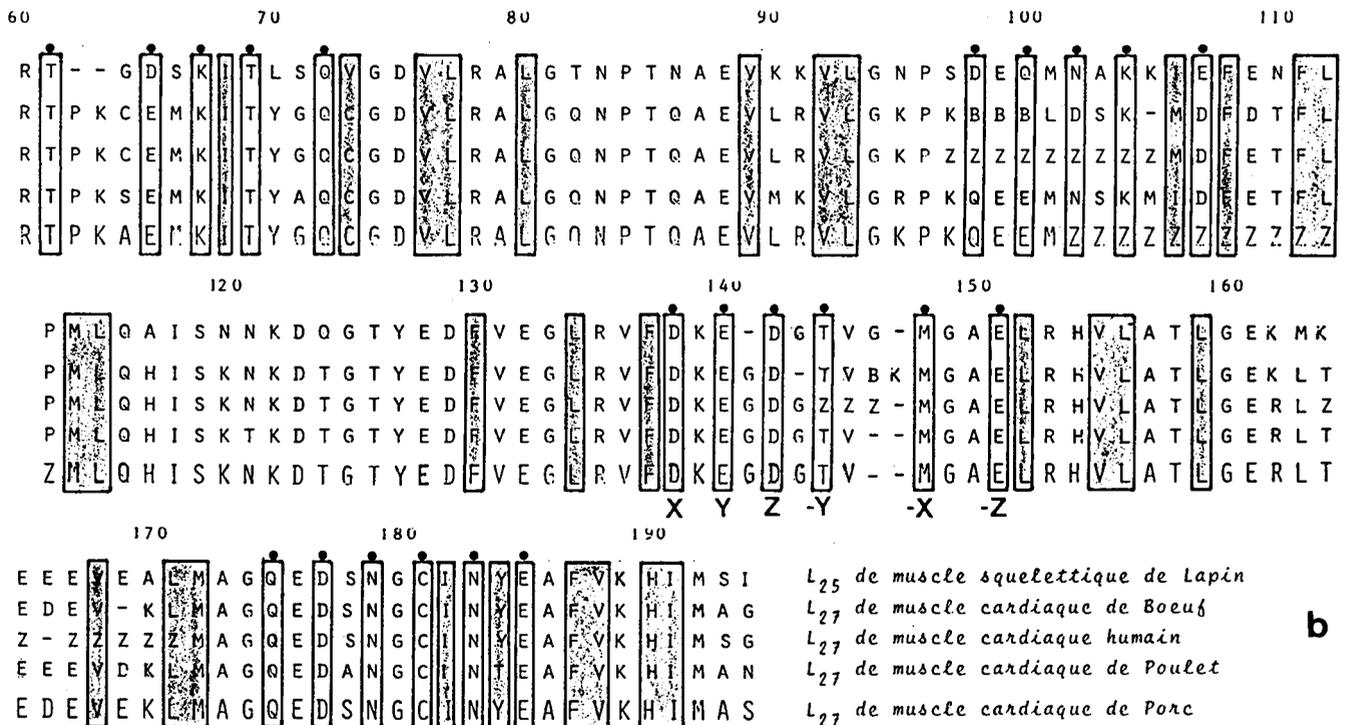
## 2°) COMPARAISON DES CHAINES LEGERES $L_{27}$ DE MUSCLE CARDIAQUE DE PORC ET DE POULET A LA TN-C DE MUSCLE SQUELETTIQUE DE LAPIN.

Les études de WEEDS et Mc LACHLAN (1975) avaient montré que  $L_{25}^S$  de muscle squelettique de Lapin avait une analogie de structure importante avec les calciprotéines (TN-C de Lapin et parvalbumine de Carpe) bien que le pourcentage d'homologie ne soit que de 32%. Nous avons étendu cette étude aux chaînes légères de muscle cardiaque de Porc et de Poulet. Comme dans le cas de  $L_{25}^S$  de muscle squelettique de Lapin le pourcentage d'homologie entre la TN-C et les chaînes légères  $L_{27}$  de muscle cardiaque de Porc et de Poulet est de 32% (Figure IV-17a)

La comparaison des acides aminés importants dans les différents sites A, B, S (Figures I-8 et IV-1) a permis de montrer que les acides aminés qui participent aux interactions de type VAN DER WAALS sont bien conservés: un acide aminé hydrophobe (Leucine) remplace un autre acide aminé hydrophobe (Méthionine) en position 67 du site  $B_1$ , de même en position 89 du site  $A_2$  une



a



b

FIGURE IV-16 : Comparaison des séquences C-terminales des chaînes légères de plus haut poids moléculaire des myosines de muscle squelettique de Lapin, de muscle cardiaque de boeuf, d'Homme, de Poulet et de Porc

- a) Les séquences homologues sont encadrées. Des "intervalles" (—) ont été placés pour obtenir le maximum d'homologie  
 b) [ ] détermine la position des acides aminés hydrophobes et • [ ] détermine la position des acides aminés ayant la capacité de fixer les ions divalents.

Les symboles X, Y et Z correspondraient aux résidus d'acides aminés fixant les ions divalents (région III homologue d'après Matsuda et al. 1981).



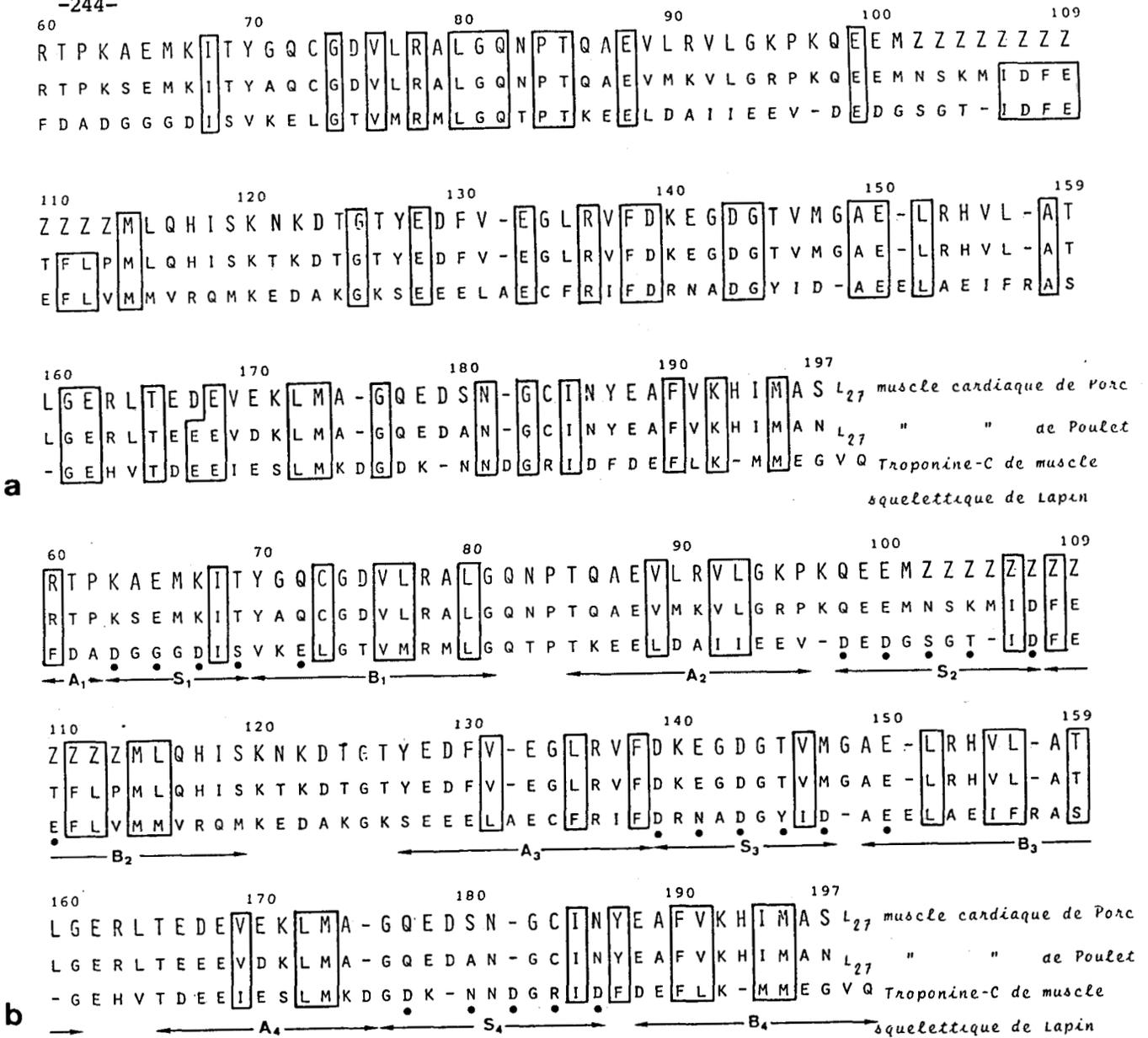


FIGURE IV-17 : Comparaison des séquences C-terminales des chaînes légères L<sub>27</sub> des myosines cardiaques de Porc et de Poulet avec la séquence de la Troponine-C ( TN-C ) de muscle squelettique de Lapin.

a) Les séquences homologues sont encadrées. Des "intervalles" ( — ) ont été placés pour obtenir le maximum d'homologie.

b) Les symboles S représentent les quatre sites présumés de fixation du calcium de la TN-C

Les symboles A et B représentent les hélices stabilisant la structure tridimensionnelle

( ● ) sont les acides aminés fixant les ions divalents

□ sont les acides aminés hydrophobes permettant les interaction de type Van der Waals

Légende d'après Weeds et Mc Lachlan 1974



Valine remplace une Leucine etc... (Figure IV-17b). Par contre, les acides aminés qui sont présumés intervenir dans les sites de fixation des ions divalents ne sont pas remplacés par des acides aminés de même charge. Par exemple, dans le site  $S_1$  de la TN-C qui fixe le calcium, une Lysine remplace un acide Aspartique (position 63 et 67) et dans le site  $S_2$  une Glutamine remplace un acide Aspartique (position 88). Ces différences sont moins nettes en ce qui concerne les sites de fixation du calcium de plus faible affinité, par exemple dans le site  $S_3$  une Thréonine remplace une Tyrosine (position 145).

### 3°) CONCLUSION

*A la vue de nos résultats et de ceux de MATSUDA et al. (1981), seul le site  $S_3$  serait susceptible de lier le calcium (position X Y Z de la Figure IV-16b). De plus ce site étant de faible affinité, même si la chaîne légère peut fixer le calcium, ces résultats montrent que la chaîne légère ne peut être considérée comme une calciprotéine. Néanmoins, vue sa structure homologue elle doit avoir eu comme protéine ancestrale une calciprotéine.*

## CHAPITRE V

# **DISCUSSION ET CONCLUSION**

## A - INTRODUCTION

L'évolution montre que l'acquisition par les organismes vivants d'une maîtrise de plus en plus grande de leur environnement a été accompagnée de l'apparition de structures biochimiques plus perfectionnées. Par exemple, la taille et le nombre de sous-unités des enzymes sont variables bien que l'on constate une très nette prédominance d'enzymes oligomériques formés de deux à quatre sous-unités.

Les enzymes oligomériques peuvent posséder des sous-unités qui ne sont pas identiques mais très semblables et possèdent qualitativement la même fonction enzymatique. Ces différentes formes d'enzymes oligomériques sont appelées des isoenzymes, comme par exemple la lacticodéshydrogénase qui existe sous cinq formes isoenzymiques. La myosine, *protéine de structure polymorphe*, possède une activité enzymatique qui varie d'un type de muscle à l'autre et d'une espèce à l'autre et possède aussi des sous-unités variables dans leur nombre et dans leur structure primaire. On parle aussi d'isoenzymes (ou isozymes) de la molécule de myosine.

## B - LE POLYMORPHISME DES CHAÎNES LOURDES DES MYOSINES

Pour l'étude des chaînes lourdes des myosines ventriculaires et auriculaires de coeur de Porc, nous avons mis au point un protocole de préparation permettant l'obtention des myosines cardiaques dans un état de pureté élevé. Le temps d'extraction est limité à 7 minutes afin d'obtenir principalement la myosine et non les autres protéines myofibrillaires. L'élimination de l'actine et des autres contaminants du filament fin est effectuée par dissociation du complexe actine-myosine en faisant agir l'ATP en présence de  $MgCl_2$  suivis d'une

ultra-centrifugation. L'élimination de tout contaminant, et des nucléotides en particulier, est réalisée par le fractionnement par relargage au sulfate d'ammonium en ne recueillant que la fraction 38 - 45 % de saturation en sulfate d'ammonium.

Nous avons noté au cours de nos nombreuses préparations de myosine l'importance de l'action de l'ATP. L'utilisation d'ATP conservé trop longtemps ainsi que son action pendant un temps trop faible ne permettent pas l'élimination de tous les contaminants du filament fin.

Dans toutes nos études comparatives des myosines, dont les différences se situaient au niveau de leurs chaînes lourdes, nous nous sommes attachés à préparer les myosines cardiaques *en parallèle*, en utilisant toujours les mêmes solutions tampons et la même solution d'ATP. La pureté des préparations de myosine est contrôlée par la mesure des densités optiques à 260 et 280 nm ainsi que par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS à pH 8,4. Pour toutes les expériences effectuées, les préparations de myosine utilisées sont celles qui correspondent aux critères de pureté suivants :

. présence de seulement trois bandes protéiques après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. Les mobilités électrophorétiques des bandes protéiques correspondent aux chaînes lourdes et aux deux chaînes légères (GRANDIER-VAZEILLE et *al.* 1980).

. rapport de densité optique DO 280nm/ DO 260nm supérieur ou égal à 1,6.

L'étude comparative des myosines ventriculaires a permis de montrer qu'elles ne possèdent que deux chaînes légères dont les mobilités électrophorétiques sont identiques. Par contre, les "myosine-V<sub>D</sub>" et "myosine-V<sub>G</sub>" révèlent des différences qui se situent au niveau de la structure de leurs chaînes lourdes :

.études des filaments synthétiques formés par dilution rapide.

.études de la sensibilité à l'action d'agents chimiques et d'enzymes spécifiques.

.études des activités ATPasiques.

.mobilité électrophorétique des différents variants en électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu non dissociant.

LES OBSERVATIONS EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE REVELENT :

. que les filaments formés *in vitro* sont toujours bipolaires.

Cette observation indique que les formes initiatrices sont des dimères de molécule de myosine associées "tête-bêche". Ce résultat est en accord avec le fait que, même à force ionique élevée, la myosine à faible concentration existe sous forme de dimères (HARRINGTON et BURKE 1972), peut-être même de plus haut n-mères (MOREL et al. 1978), et que les dimères sont associés antiparallèlement.

. que les filaments formés sont répartis en plusieurs classes de longueur et que la répartition de ces classes diffère selon l'origine de la myosine ventriculaire.

Ce résultat suggère qu'il existe plusieurs espèces dimériques initiatrices et que les molécules de myosine se différencient au niveau des sites d'interactions (la LMM des chaînes lourdes de myosine).

LES RESULTATS OBTENUS APRES ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EFFECTUEE EN PRESENCE DE PYROPHOSPHATE DE POTASSIUM, MONTRENT :

Que les bandes protéiques observées pour les myosines ventriculaires ne peuvent pas être dûes :

. à des contaminants de la myosine : la myosine est pure selon nos critères (rapport DO 280 / DO 260 et électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS).

. à des produits de protéolyse : les bandes découpées et analysées sur gel de polyacrylamide en présence de SDS ne révèlent que des chaînes lourdes et les deux chaînes légères.

. à des oligomères de myosine : la myosine dissoute dans le tampon d'électrophorèse est centrifugée préalablement à 105.000 g pendant 30 min avant d'être déposée sur le gel et les agrégats, les oligomères, ne peuvent pas être présents en grande quantité.

Ces résultats peuvent rendre compte des différences observées dans les activités ATPasiques spécifiques dépendantes du calcium des "myosine-V<sub>D</sub>" et "myosine-V<sub>G</sub>" de coeur de Porc. En effet, les travaux de HOH et al. 1978 montrent que pour la myosine ventriculaire du coeur de Rat, les variants de plus

grande mobilité électrophorétique ont les activités  $\text{Ca}^{2+}$  - ATPasiques les plus fortes. Ceci permet d'expliquer aisément que l'activité  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasique spécifique est supérieure pour la "myosine- $V_D$ " de coeur de Porc. Cette activité  $\text{Ca}^{2+}$ ATPasique spécifique pouvant être représentée mathématiquement par :

$$\text{Activité } \text{Ca}^{2+}\text{-ATPasique de "myosine-V"} = \frac{\sum_i n^i v^i}{\sum_i n^i}$$

$n^i$  et  $v^i$  sont respectivement la concentration et l'activité  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasique de la bande protéique de mobilité électrophorétique  $i$ . Ceci rend bien compte de la différence entre les myosines ventriculaires de coeur de Porc.

La séparation des protéines sur gel de polyacrylamide en milieu non dissociant s'effectue selon le poids moléculaire et la charge. Ce type de migration n'est pas observable par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS ou d'urée. Comme la composition en chaînes légères des myosines ventriculaires droite et gauche est identique (deux chaînes légères de 27.000 et 18.000 daltons), les variants ainsi mis en évidence ne peuvent pas, comme pour la myosine de muscle squelettique, être attribués à une répartition des chaînes légères sur les chaînes lourdes : homodimères  $A_1$  et  $A_2$  et hétérodimères  $A_1, A_2$  (D'ALBIS et *al.* 1979).

L'existence de ces variants ne peut s'expliquer que par la présence de plusieurs types de myosine dont les différences se situent au niveau de leurs chaînes lourdes (HOH 1978). La technique d'électrophorèse en milieu non dissociant, de mise en oeuvre difficile, semble ne pas être très bien maîtrisée comme le montrent les résultats hétérogènes suivants :

D'ALBIS et *al.* (1979) montrent qu'il existe seulement deux bandes protéiques pour la myosine ventriculaire de coeur de Lapin, de Porc et de Boeuf, et que les électrophorégrammes des myosines ventriculaires droite et gauche sont "grossoirement" semblables.

HOH et *al.* (1977) montrent qu'il existe trois bandes protéiques pour la myosine ventriculaire et deux bandes pour la myosine auriculaire de coeur de Rat.

Pour notre part, l'utilisation de gels en plaque nous a permis de déposer une quantité plus importante de préparation de myosine. A l'inverse des auteurs précédemment cités, qui déposent des extraits bruts sur des gels en tubes, nous avons utilisé des préparations de myosine pures. Ceci peut expliquer que nous pouvons mettre en évidence :

. le variant de mobilité électrophorétique supérieure et présent en faible concentration pour la "myosine-V<sub>G</sub>" qui n'avait pas été observé par D'ALBIS et *al.*

. la différence sur les électrophorégrammes entre la "myosine-V<sub>D</sub>" et la "myosine-V<sub>G</sub>" que D'ALBIS et *al.* trouvent "grossièrement" semblables.

Ces résultats semblent néanmoins éliminer l'hypothèse de HOH et *al.* (1979) selon laquelle les trois isoenzymes de la myosine de ventricule de coeur seraient une combinaison de deux chaînes lourdes (HC<sub>α</sub> ; HC<sub>β</sub>) de structure distincte : du type (HC<sub>α</sub>)<sub>2</sub> ; (HC<sub>α</sub>) (HC<sub>β</sub>) ; (HC<sub>β</sub>)<sub>2</sub>. Il semble aussi que les différences observées au niveau des chaînes lourdes des myosines soient liées pour un même muscle à l'espèce comme par exemple le soleus de Rat et de Cobaye (D'ALBIS et *al.* 1979), à l'âge par exemple l'ADL\* de Poulet (HOH 1978), à l'état pathologique par exemple l'hypothyroïdie (HOH et *al.* 1977) ou l'hypertrophie (LOMPRE et *al.* 1979).

#### LES DIFFERENCES ENTRE LES VARIANTS DE MYOSINE SE SITUENT AU NIVEAU DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE LEURS CHAINES LOURDES,

comme nous l'avons montré lors de l'étude de la sensibilité des myosines à l'action d'endopeptidases (GRANDIER-VAZEILLE et *al.* 1978) et confirmé par l'étude de l'action d'agents chimiques sur les myosines cardiaques (GRANDIER+VAZEILLE et *al.* 1979). Le rendement d'obtention du fragment HMM-S<sub>1</sub> inférieur pour la "myosine-V<sub>D</sub>" peut être expliqué, car la "myosine-V<sub>D</sub>" possède des dimères plus courts, qui ont une compacité plus importante. L'action de la chymotrypsine est ainsi gênée (encombrement stérique), ce qui ne permet pas une libération

---

\* ADL = Anterior Latissimus Dorsi

rapide des têtes globulaires. La formation de peptides ayant les mêmes mobilités électrophorétiques, mais présents dans les deux hydrolysats de "myosine-V<sub>D</sub>" et "myosine-V<sub>G</sub>" dans des rapports de concentration différents, révèle la présence de plusieurs espèces de myosines qui diffèrent dans leur composition en acides aminés et dans la répartition entre les deux ventricules. Certaines espèces peuvent être représentées dans un seul ventricule comme l'indique la présence de peptides de plus haut poids moléculaire pour la "myosine-V<sub>D</sub>".

Les différences entre les myosines ventriculaires droite et gauche ont été également mises en évidence de façon indirecte chez d'autres Mammifères par des techniques immunochimiques avec des anticorps anti-myosine (SARTORE et *al.* 1981). Ces auteurs ont montré que chez un Mammifère supérieur, le Boeuf, l'anticorps (Anti-bAm<sup>\*</sup>) réagissait avec toutes les fibres de l'oreillette, avec une proportion plus faible des fibres du ventricule droit et avec presque aucune des fibres du ventricule gauche. Chez un Mammifère inférieur, le Lapin, les résultats étaient complètement différents.

La comparaison des myosines extraites des oreillettes et des ventricules de coeur de Porc a également permis de mettre en évidence des différences : au niveau des chaînes légères et au niveau des chaînes lourdes que ce soit au niveau du HMM-S<sub>1</sub> (activité Ca<sup>2+</sup>-ATPasique) ou au niveau de leur structure primaire (peptides obtenus après action du NTCBA). Nous avons ainsi pu montrer que l'activité Ca<sup>2+</sup>-ATPasique était telle que :

$$O_D > O_G > V_D > V_G$$

De plus, l'étude des hydrolysats obtenus après action du NTCBA sur les différentes myosines a permis de montrer qu'ils étaient différents.

---

\* Anti-bAm = Anticorps Anti-myosine d'oreillette de Boeuf.

En particulier, des peptides de plus haut poids moléculaire sont libérés pour la "myosine- $O_G$ " par rapport à la "myosine- $V_D$ ". Ce résultat est à rapprocher de celui obtenu lors de la comparaison des hydrolysats de la "myosine- $V_D$ " et de la "myosine- $V_G$ " obtenus après action du NTCBA. Aussi, on peut se poser la question de savoir s'il n'existe pas de relation entre l'activité  $Ca^{2+}$ -ATPasique et la formation de peptides de plus haut poids moléculaire après action du NTCBA? Dans l'affirmative, quel rôle joueraient les résidus de cystéine dans la conformation des différents variants de myosine ?

Ayant montré des différences entre les myosines auriculaires et ventriculaires droite et gauche de coeur de Porc, nous avons voulu savoir si ces différences pouvaient être mises en évidence dans des conditions plus physiologiques. Pour cela, nous avons étudié les activités ATPasiques des myosines cardiaques de Porc en les activant par l'actine. Cette méthode a été très utilisée pour étudier les fragments de myosine (EISENBERG et MOOS 1970), mais très peu pour la myosine elle-même. L'une des raisons est la difficulté d'interprétation des résultats (POPE et al. 1980). Pour éliminer cette difficulté, nous avons fait une étude comparative des myosines ventriculaires, auriculaires et squelettique. Cette étude pour une même concentration d'actine a permis de montrer que les valeurs ne vont pas dans le même sens que celles de la  $Ca^{2+}$ -ATPase, mais que néanmoins les différences existent entre les quatre myosines de coeur de Porc. A cause de difficultés expérimentales, dépolymérisation de l'actine-F au cours du temps et durée de l'expérimentation, seules trois valeurs à différentes concentrations d'actine ont été étudiées et les valeurs de  $K_m$  et de  $V_m$  n'ont pas pu être déterminées.

*En conclusion, à la vue de nos résultats et ceux d'autres auteurs, il est clair que dans le muscle cardiaque de Mammifères supérieurs, plusieurs types de fibres musculaires peuvent coexister et que différents isoenzymes de myosine, dont la structure primaire des chaînes lourdes est*

différente, sont présents dans ces fibres. Pour le muscle cardiaque normal de Mammifère supérieur, les puissances mé- caniques et la répartition des isoenzymes de myosine varient d'une partie du cœur à l'autre.

A l'origine de ce travail, les différences obtenues dans les activités  $Ca^{2+}$ -ATPase des myosines cardiaques nous avaient permis d'émettre l'hypothèse de l'existence de diffé- rents isoenzymes de myosine d'un cœur normal, et qu'au cours d'une hypertrophie, il y aurait modification dans la réparti- tion de ces différents variants préexistants. Malheureusement, nous n'avons pas pu confirmer cette hypothèse car un seul cœur hypertrophie (le ventricule droit) sur le grand nombre de cœurs de Porc étudiés, a été obtenu et que d'un point de vue financier, il ne nous a pas été possible de provoquer

l'hypertrophie du cœur pour notre modèle, le Porc. Mais depuis, cette hypothèse a été confirmée. En effet, il a été montré que lorsqu'un cœur est soumis à une surcharge mécanique ou à une variation du taux d'hormone thyroïdienne, il y a une évolution rapide dans la répartition des isoenzymes de myosine cardiaque, privilégiant la biosynthèse du variant de plus forte activité  $Ca^{2+}$ -ATPase (HOH et al. 1977 ; LOMPRE et al. 1979). Cette évolution rapide peut s'expliquer par la modification du temps de demi-vie des variants de myosine préexistants du cœur nor- mal lorsque celui-ci s'hypertrophie (de 7 à 3 jours - MORKIN et al. 1972).

Si l'existence de plusieurs isoenzymes de myosine car- diaque ainsi que le renouvellement rapide des variants au cours d'hypertrophie par exemple, sont des résultats acquis, le rôle des différents variants, préexistants dans les différences par- ties du cœur en concentration différente, reste à définir.

La répartition des variants peut être due à l'âge (WATRAS 1981) ou au traitement subi par l'animal (alimentation, traitement hormonal ou autre (MORKIN et al. 1972). Dans le cas des Porcs tués à l'abattoir de Lille, les animaux sont jeunes (environ un an) et proviennent pour la plupart du Bénélux. Quant aux cœurs obtenus aux Etablissements Caby, ils proviennent d'animaux âgés. Dans tous les cas, les Porcs

étudiés sont des animaux d'élevage, mais malheureusement, nous n'avons pu obtenir de renseignements concernant leur provenance exacte et le traitement qu'ils ont subi, qui auraient pu expli- quer les résultats que nous obtenons.

## C - LES DIFFÉRENTES FORMES DE CHAINES LÉGÈRES DES MYOSINES

### LES MYOSINES SQUELETTIQUES

La notion de l'existence des isoenzymes de myosine est relativement ancienne. SARKAR et *al.* (1971) comparant les myosines extraites de différents muscles de Lapin par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, avaient montré des différences significatives dans le nombre et le poids moléculaire des chaînes légères des myosines. Ces différences étaient attribuées à l'existence de deux types de fibres musculaires bien distinctes (type lent et type rapide). Le muscle blanc est considéré comme étant constitué de fibres de type rapide, tandis que le muscle rouge est constitué de fibres de type lent (LOWEY et RISBY 1971). Cette conclusion était partiellement confirmée par l'analyse des myosines de ces types de fibres musculaires. La différence la plus significative entre les myosines de ces deux types de fibres est la présence d'une chaîne légère d'environ 16.000 daltons ( $L_{16}^S$ ) pour la myosine de type rapide. Des études comparatives entre les myosines de muscle squelettique de Lapin (muscle blanc) et de Rat (muscle rouge) (HILDEBRAND et *al.* 1977), nous avaient permis de montrer que le muscle squelettique de Rat, bien qu'étant un muscle rouge, n'était pas de type lent : la myosine possède la chaîne légère  $L_{16}^S$  et la chaîne légère de plus haut poids moléculaire a une mobilité électrophorétique supérieure à celle de 25.000 daltons environ, présente pour la myosine de muscle rapide de lapin ( $L_{25}^S$ ).

Nous avons donc été amenés à étudier les myosines de muscles considérés comme rapides pour différentes espèces (le gastrocnémien de Grenouille et de Poulet, le diaphragme de Porc, le quadriceps crural d'Homme). Cette étude a permis de montrer que les myosines de muscles dits "rapides" possèdent toutes trois chaînes légères. Jusqu'aux Rongeurs, bien que les compositions en chaînes légères soient toutes différentes, il existe une constante : les myosines possèdent la chaîne légère d'environ 16.000 daltons ( $L_{16}^S$ ). Il est à noter que les chaînes

légères de même poids moléculaire  $L_{18}^S$  (Lapin et Rat) ou  $L_{16}^S$  (Poulet et Lapin) ont des "charges" différentes comme le révèle l'électrophorèse effectuée sur gel de polyacrylamide en présence d'urée 8 M.

Pour le Rat, la myosine de diaphragme possède cinq chaînes légères, trois de type rapide et deux de type lent (GAUTHIER et al. 1982). A partir des Mammifères supérieurs, la chaîne légère  $L_{16}^S$  de la myosine de muscle squelettique est absente. Cette absence de  $L_{16}^S$  pourrait indiquer que la myosine de muscle squelettique n'est pas de type rapide. Or, le diaphragme est constitué de fibres lentes et de fibres rapides (GAUTHIER et al. 1978). Le manque de chaîne légère  $L_{16}^S$  dans le cas de la myosine de diaphragme de Porc n'est pas dû à l'absence de fibres de type rapide mais semble être lié à la différenciation de la myosine au cours de l'évolution des espèces. En effet, si nous considérons la composition en chaînes légères de la myosine de muscle squelettique humain, il y a également absence de  $L_{16}^S$ .

L'étude de la myosine de diaphragme semble un cas très intéressant. En effet, l'étude de la composition en chaînes légères de la myosine de diaphragme d'une *Truie âgée* révèle qu'il existe aussi cinq chaînes légères mises en évidence par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS. Seules les chaînes légères  $L_{27}^S$  et  $L_{18}^S$  semblent être dédoublées. Ce phénomène reproductible ne peut être dû à une diffusion ou à une mauvaise migration électrophorétique. Il pourrait être expliqués comme le montrent GAUTHIER et al. (1982), pour la myosine de diaphragme de Rat, par l'apparition des chaînes légères de type lent ( $LC_1^S$  et  $LC_2^S$ ) dans le cas de Porc âgé. Il semblerait qu'avec l'âge, il y ait différenciation du muscle squelettique avec l'apparition de myosine de type lent.

En conclusion, bien qu'il y ait des différences dans la composition en chaînes légères des myosines de muscle squelettique pour les différentes espèces étudiées, il nous est impossible d'établir une relation entre composition en chaînes légères et évolution des espèces. Nous avons néanmoins montré pour la première fois l'existence d'une chaîne légère d'environ 30.000 daltons, pour la myosine de diaphragme de Porc qui est

un muscle squelettique intéressant. La chaîne légère  $L_{30}^S$  a été caractérisée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide tant en présence de SDS qu'en présence d'urée 8 M.

### LES MYOSINES SQUELETTIQUES FOETALES

L'analyse du développement du muscle squelettique chez l'embryon a également été faite, pour différentes espèces (Lapin, Rat, Porc, Homme), en comparant la composition en chaînes légères des myosines à l'état foetal. SYROVY (1976) avait montré que chez le Lapin, la myosine squelettique foetale ne possède pas la chaîne légère  $L_{16}^S$ . Pour notre part, nous avons montré qu'en plus de l'absence de la chaîne légère  $L_{16}^S$ , la forme phosphorylée de la chaîne légère  $L_{18}^S$  est aussi absente pour les myosines foetales de Rongeurs.

Chez les Mammifères supérieurs, les résultats sont plus hétérogènes. En effet, pour la myosine de muscle squelettique foetal de Porc, nous notons la présence d'une chaîne légère supplémentaire de poids moléculaire compris entre 30.000 et 27.000 daltons, et l'absence de la forme phosphorylée de la chaîne légère  $L_{18}^S$ . Par contre, pour la myosine de muscle squelettique foetal humain, nous notons la disparition de la chaîne légère de poids moléculaire compris entre  $L_{25}^S$  et  $L_{18}^S$  et l'absence de la forme phosphorylée  $L_{18}^S$ . L'existence d'une chaîne légère  $L^{Cl\ emb}$  spécifique du muscle embryonnaire (WHALEN et al. 1978 ; GAUTHIER et al. 1982) pourrait correspondre chez le Porc à la chaîne légère supplémentaire (poids moléculaire compris entre  $L_{30}^S$  et  $L_{27}^S$ ). Chez le Rat, elle pourrait correspondre à la chaîne légère  $L_{25}^S$  qui avait été attribuée soit à un muscle trop différencié, soit à un muscle hétérogène. Chez le Lapin et l'Homme, cette forme  $L^{Cl\ emb}$  n'a pas été mise en évidence car son poids moléculaire doit être voisin de  $L_{25}^S$  et seule une électrophorèse en deux dimensions (IEF / SDS) permettrait de la caractériser.

En définitive, nous pouvons affirmer qu'il n'existe pas un type unique de myosine foetale, mais qu'il serait possible de définir des types embryonnaires de fibres musculaires.

En effet, toutes les myosines foetales étudiées pour différentes espèces ne possèdent pas de forme phosphorylée de la chaîne légère  $L_{18}^S$  mais en outre elles possèdent une chaîne légère  $L_{C1}^{emb}$ , définie comme étant spécifique du tissu embryonnaire. Il semble que la mobilité électrophorétique de cette chaîne légère  $L_{C1}^{emb}$  soit fonction de l'espèce.

### LES MYOSINES TUMORALES

Ayant été amenés à étudier les tumeurs musculaires (Rhabdomyosarcomes) chez le Lapin, le Rat et l'Homme, nous avons comparé la composition en chaînes légères des myosines squelettiques normales, foetales et tumorales. La composition en chaînes légères des myosines foetales et tumorales sont similaires :

- absence de  $L_{16}^S$  et de la forme phosphorylée de  $L_{18}^S$ .
- présence de la chaîne légère  $L_{25}^S$  qui peut être la chaîne légère embryonnaire.
- présence de la chaîne légère  $L_{18}^S$ .

Nous avons ainsi montré dans le cas de trois espèces, qu'une protéine de structure comme la myosine aurait, du point de vue composition en chaînes légères, un caractère oncofoetal (HILDEBRAND et al. 1979).

Nous avons caractérisé, par l'étude des chaînes lourdes des myosines tumorales, un nouvel isoenzyme de myosine de muscle squelettique (HILDEBRAND et al. 1980).

### LES MYOSINES DE DIFFERENTS TYPES DE MUSCLES CHEZ LE PORC

L'étude des myosines (adulte et foetale) de muscle squelettique de Porc, révèle des compositions en chaînes légères particulières, qui sont différentes des myosines de muscle squelettique d'autres espèces. Il nous a donc paru intéressant d'étudier les myosines de différents types de

muscles chez le Porc.

La myosine d'utérus de Truie possède une composition en chaînes légères caractéristique d'un muscle lisse (TETAERT et al. 1977) : deux chaînes légères  $L_{20}^1$  et  $L_{17}^1$ , la  $L_{17}^1$  existant sous une forme phosphorylée. Nous n'avons pas entrepris des études supplémentaires de la myosine lisse pour trois raisons :

- difficulté d'isolement et de purification de la myosine de muscle lisse adulte.
- la composition en chaîne légère est semblable pour différents muscles lisses et pour différentes espèces.
- l'étude de la myosine lisse foetale avait été déjà entreprise, montrant la présence d'une chaîne légère supplémentaire (23.000 daltons environ (KATOH et KUBO 1978)).

Les myosines ventriculaires droite et gauche de coeur de Porc adulte possèdent la même composition en chaînes légères : deux chaînes légères d'environ 27.000 ( $L_{27}^V$ ) et 18.000 ( $L_{18}^V$ ) daltons. La chaîne légère  $L_{18}^V$  existe sous une forme phosphorylée. Les myosines auriculaires droite et gauche de coeur de Porc adulte possèdent une composition en chaînes légères identique :  $L^{a1}$  et  $L^{a2}$ . La chaîne légère  $L^{a1}$ , de mobilité électrophorétique inférieure à  $L_{27}^V$ , correspond à  $L_{29}^{sf}$ , tandis que la chaîne légère  $L^{a2}$  qui ne possède pas de forme phosphorylée, a une mobilité électrophorétique comprise entre  $L_{27}^V$  et  $L_{18}^V$ . Ces résultats sont en désaccord avec ceux obtenus par SYROVY et al. (1979). Ces auteurs ont déterminé des valeurs de 26.000 et 18.000 daltons pour les chaînes légères de myosine ventriculaire et des valeurs de 24.000 et 20.000 daltons pour les chaînes légères de myosine auriculaire de Porc, par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en tube. Malheureusement, il semble que leur étude comparative entre myosine ventriculaire et auriculaire n'a pas été effectuée dans des conditions identiques. Pour lever cette ambiguïté sur les migrations électrophorétiques des myosines auriculaire et ventriculaire, nous avons étudié les quatre myosines cardiaques par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en plaque en présence de SDS en ayant soin de faire "comigrer" le mélange de myosine auriculaire et ventriculaire, et en changeant les conditions de pH (Tris-glycocolle pH 8,4 et Tris-borate pH 7,0).

On peut en conclure que les mobilités électrophorétiques des chaînes légères des myosines cardiaques de Porc sont telles que:

$$L^{a1} < L_{27}^V < L^{a2} < L_{18}^V$$

L'étude des myosines ventriculaires droite et gauche d'un coeur de Porc foetal, montre que la composition en chaînes légères est identique.

Il existe trois chaînes légères dont les mobilités électrophorétiques correspondent aux deux chaînes légères  $L_{27}^V$  et  $L_{18}^V$  de la myosine ventriculaire adulte et à la chaîne légère  $L^{a1}$  de la myosine auriculaire adulte. Il n'a pas été mis en évidence de forme phosphorylée des chaînes légères de la myosine foetale ventriculaire. La myosine ventriculaire foetale ne peut être considérée comme étant constituée de myosine ventriculaire et auriculaire adulte. La présence d'une bande protéique de mobilité électrophorétique identique à  $L_{29}^{sf}$  ( $L^{a1}$ ) est à rapprocher des résultats de WHALEN et SELL (1980) sur la myosine ventriculaire foetale de Rat. Ces auteurs montrent que cette chaîne légère supplémentaire, par rapport à la myosine ventriculaire adulte, serait très proche ou même identique à celle mise en évidence pour la myosine de muscle squelettique foetale de Rat (WHALEN et al. 1978). D'après les résultats obtenus par WHALEN et al. pour le Rat et ceux que nous obtenons pour le Porc, nous confirmons que la forme embryonnaire de chaîne légère existe, mais il semble qu'elle soit typique d'une espèce et variable d'une espèce à l'autre.

L'étude des myosines auriculaires droite et gauche de coeur de Porc foetal montre que la composition en chaînes légères est identique. Il existe deux chaînes légères  $L^{a1}$  et  $L^{a2}$  et aucune de ces chaînes légères n'existent sous sa forme phosphorylée. Il est à noter que les compositions en chaînes légères de la myosine auriculaire foetale et adulte sont identiques. Le fait que la chaîne légère  $L^{a1}$  soit identique à  $L_{29}^{sf}$ , que la composition en chaînes légères soit identique pour les myosines

auriculaires foetale et adulte, semble montrer que la myosine auriculaire de Porc se différencie très tôt et plus rapidement que la myosine ventriculaire. Ces faits ajoutés à celui que la myosine auriculaire ne possède pas de chaîne légère ayant une forme phosphorylée, à l'état foetal comme à l'état adulte, pourrait indiquer que la myosine auriculaire serait une myosine qui ne se différencierait pas à l'état adulte. Cette hypothèse peut être reliée à l'activité de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase qui est élevée pour la myosine auriculaire de coeur de Porc adulte. En effet, les activités de  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPases de la myosine cardiaque foetale de Rat sont supérieures à celles de la myosine cardiaque adulte (SYROVY 1976).

*A la vue de tous ces résultats, et quelles que soient les myosines des muscles étudiés, le Porc est un modèle très intéressant, qui nous a permis de mettre en évidence sept isoenzymes de la myosine.*

#### LES MYOSINES CARDIAQUES AU COURS DE L'EVOLUTION DES ESPECES

Les nombreux résultats concernant la composition en chaîne légère des myosines auriculaire et ventriculaire chez différentes espèces sont hétérogènes du fait que les électrophorèses sur gel de polyacrylamide en présence de SDS soient effectuées dans différentes conditions, en particulier de pH. Les résultats obtenus par SYROVY et al. (1979) ne peuvent pas être pris en considération car leur étude comparative a été effectuée sur gel de polyacrylamide en présence de SDS (à pH 7,0) en tube et en utilisant des préparations d'actomyosine. Par contre, d'autres auteurs montrent qu'il peut exister d'une espèce à l'autre des différences dans les compositions en chaînes légères entre les myosines auriculaire et ventriculaire. Pour le coeur de Poulet, les myosines auriculaires et ventriculaires ont des compositions en chaînes légères identiques (DALLA-LIBERA 1979), tandis que pour le coeur de Chien et de Boeuf, la myosine auriculaire n'a pas la même composition en chaîne légère que la myosine ventriculaire (WIKMANN-COFFELT et SRIVASTAVA 1979).

Entre les Oiseaux et les Mammifères, il semble qu'il y ait une évolution dans les compositions en chaînes légères des myosines ventriculaire et auriculaire. Les résultats que nous avons obtenus pour le coeur de Porc confirment cette évolution. Il nous a donc paru intéressant d'étudier la composition en chaînes légères des myosines de coeur d'autres espèces, puisque le coeur est un muscle qui s'est transformé depuis les Agnathes : le coeur de la Lamproie est constitué de deux cavités, un ventricule une oreillette, le coeur de Grenouille possède un ventricule et deux oreillettes et à partir des Oiseaux, il possède quatre cavités bien individualisées. Les myosines de coeur de Grenouille, de Poulet, de Porc et d'Homme ont donc été étudiées. Pour des raisons techniques, nous n'avons pas pu, jusqu'à présent, obtenir des coeurs de Lamproie.

*Nous observons tout d'abord que les compositions en chaînes légères des myosines auriculaire et ventriculaire, quelle que soit l'espèce, possèdent toutes deux chaînes légères. Les myosines extraites des oreillettes droite et gauche et du ventricule de coeur de Grenouille ont une composition en chaînes légères identique. Les myosines extraites des oreillettes droite et gauche et des ventricule droit et gauche de coeur de Poulet ont aussi des compositions en chaînes légères identiques, que ce soit à pH 8,4 ou à pH 7,0. Pour les deux autres espèces, Porc et Homme, les compositions en chaînes légères des myosines auriculaire et ventriculaire sont différentes.*

A partir de ces résultats partiels, il semble qu'il y ait une augmentation des poids moléculaires des chaînes légères, liée à l'augmentation du nombre de cavités, mais cette hypothèse est à confirmer par l'étude du coeur de Lamproie. A partir d'un coeur formé de quatre cavités, parmi les sous-unités légères, il semble que seule la chaîne légère de plus faible poids moléculaire ( $L_{18}^V$ ) soit conservée. Il est à noter que seule cette chaîne légère possède une forme phosphorylée. A partir des Mammifères, les chaînes légères des myosines auriculaire et ventriculaire sont bien distinctes mais aucune relation ne semble exister entre les mobilités électrophorétiques de ces chaînes légères et l'évolution des espèces.

Cette étude partielle de l'évolution du coeur et la molécule de myosine existe sous plusieurs formes dont les différences se situent au niveau de la structure primaire des chaînes légères. En ce qui concerne les chaînes légères, il n'existe que peu d'informations : seule la chaîne légère  $L_8$  de muscle squelettique de Lapin (PINSET-HÄRSTRÖM et TRUFFY 1978 ; WEEDS et POPE 1977) et la chaîne légère régulatrice de gésier de Poulet (JAKES et al. 1976) auraient un rôle défini. Bien que la chaîne légère, de la myosine cardiaque ventriculaire de Boeuf, de plus haut poids moléculaire ( $L_{27}$ ) ne soit pas dissociée sélectivement par traitement alcalin comme les chaînes légères  $L_5$  et  $L_{16}$  de la myosine de muscle squelettique de Lapin (WEEDS et LOWRY 1971), il existerait une grande homologie de structure primaire entre  $L_V$  et  $L_{25}$  (WEEDS 1975).  $L_V$  a donc été considéré comme étant une chaîne légère dite de type "alcali" comme  $L_5$  et ayant les caractéristiques structurales proches des protéines fixant le calcium.

D - ETUDE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE LA CHAÎNE  
LÉGÈRE DE PLUS HAUT POIDS MOLÉCULAIRE " $L_{27}$ " DE  
LA MYOSINE DE VENTRICULE GAUCHE DE COEUR  
DE PORC

L'étude que nous avons entreprise, montre donc que la molécule de myosine existe sous plusieurs formes dont les différences se situent tant au niveau de la structure primaire des chaînes lourdes que des chaînes légères. En ce qui concerne les chaînes légères, il n'existe que peu d'informations : seule la chaîne légère  $L_8$  de muscle squelettique de Lapin (PINSET-HÄRSTRÖM et TRUFFY 1978 ; WEEDS et POPE 1977) et la chaîne légère régulatrice de gésier de Poulet (JAKES et al. 1976) auraient un rôle défini. Bien que la chaîne légère, de la myosine cardiaque ventriculaire de Boeuf, de plus haut poids moléculaire ( $L_{27}$ ) ne soit pas dissociée sélectivement par traitement alcalin comme les chaînes légères  $L_5$  et  $L_{16}$  de la myosine de muscle squelettique de Lapin (WEEDS et LOWRY 1971), il existerait une grande homologie de structure primaire entre  $L_V$  et  $L_{25}$  (WEEDS 1975).  $L_V$  a donc été considéré comme étant une chaîne légère dite de type "alcali" comme  $L_5$  et ayant les caractéristiques structurales proches des protéines fixant le calcium.

Les myosines ventriculaires droite et gauche de coeur de Porc sont différentes au niveau des chaînes lourdes. Bien que les poids moléculaires des chaînes légères de ces myosines soient identiques après électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS et en présence d'urée, nous avons pensé qu'il pouvait y avoir des différences au niveau de leur structure primaire. Les résultats pour la myosine cardiaque de Chien (WIKMAN-COFFELT et al. 1975) et les travaux plus récents

sur la myosine de ventricule gauche de coeur de Lapin (UEDA et YAZAKI 1981) semblent confirmer cette hypothèse des différences de structure primaire de la chaîne légère L<sub>27</sub>.

Dans un premier temps, nous avons entrepris l'étude de la structure primaire de la chaîne légère de plus haut poids moléculaire de la myosine de ventricule gauche de coeur de Porc L<sub>27</sub>. L'étude d'une structure primaire exige l'isolement d'une quantité relativement importante de protéine dans un état de pureté élevé. Nous avons donc mis au point un protocole simple et original de préparation et de purification de la chaîne légère L<sub>27</sub> de ventricule gauche de coeur de Porc permettant de séparer en une seule étape les chaînes lourdes de chacune des chaînes légères. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence d'urée 8 M permet en outre d'isoler avec de très bons rendements chacune des chaînes légères.

Pour déterminer l'homogénéité d'une préparation de protéine, deux critères de pureté sont généralement nécessaires. Habituellement, les critères utilisés sont l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS, la détermination de l'acide aminé en position N-terminale et la détermination de la composition en acides aminés. Dans le cas de la chaîne légère L<sub>27</sub> parmi ces trois critères, seule l'électrophorèse analytique est utilisable. En effet, l'acide aminé en position N-terminale n'est pas identifiable (N-bloqué) et les compositions en acides aminés de L<sub>27</sub> et de L<sub>18</sub> ne révèlent pas de différences significatives. Nous avons donc établi un critère de pureté spécifique de la chaîne légère L<sub>27</sub> par l'étude du peptide de plus haut poids moléculaire obtenu après fractionnement des hydrolysats BrCN des chaînes légères.

Si le peptide de plus haut poids moléculaire caractéristique a pu être isolé pur, les autres fractions peptidiques sont hétérogènes. La difficulté de purifier les peptides de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la myosine cardiaque de Porc semble être liée à la structure très particulière des chaînes légères L<sub>27</sub> des *myosines cardiaques de Mammifères supérieurs*. En effet, seulement des structures très partielles de L<sub>27</sub> ont été établies pour le Boeuf (WEEDS 1975) et pour l'Homme (KLOTZ et al. 1982).

L'utilisation de méthodes conventionnelles de séparation ne nous a pas permis quel que soit l'hydrolysats étudié, d'obtenir des peptides purs en quantité suffisante pour une étude de structure. Seule, à partir des peptides tryptiques, une structure partielle de  $L_{27}$  a pu être proposée par homologie avec les séquences des chaînes légères ( $L_{25}^S$  de muscle de Lapin,  $L_{27}$  de coeur de Boeuf) déjà établies. Toutefois, l'établissement d'une structure de chaîne légère par homologie est très difficile.

Des peptides sont obtenus après des coupures secondaires non spécifiques par la trypsine ( $T_{15}$  par exemple).

- Des insertions ou des délétions d'acides aminés existent (par exemple, entre le Boeuf et le Lapin)

- Pour un même peptide, des mutations peuvent exister bien que la composition globale soit identique.

L'établissement de la structure primaire par homologie pour la chaîne légère  $L_{27}$  est difficile et la purification en quantité importante de tous les peptides est nécessaire. En plus des difficultés de séparation des peptides (par chromatographie d'échange de cations, par gel filtration et par électrophorèse sur papier), nous avons observé que l'action de certaines endopeptidases est faible ou même nulle. Par exemple, malgré les nombreuses liaisons glutamyles, l'enzyme de *Staphylococcus aureus*  $V_8$  n'a pas hydrolysé  $L_{27}$ . Par contre, la collagénase qui est peu utilisée pour des études de structure primaire (enzyme sans spécificité propre) a permis d'obtenir des peptides de  $L_{27}$  de taille importante. Ces résultats sont en accord avec d'autres travaux (CARDINAUD 1979 ; CARDINAUD et MOURUGEON 1982) qui montrent la faible sensibilité des chaînes légères par rapport aux chaînes lourdes, à l'action d'endopeptidases comme la trypsine, l'élastase, la papaïne ou la collagénase. La chymotrypsine hydrolyse rapidement la chaîne légère. Des études de séparation de ces hydrolysats par les techniques conventionnelles (gel filtration sur séphadex  $G_{50}$ , échange de cations sur chromobeads P) ne nous avaient pas permis d'obtenir, purs et en quantité suffisante, les peptides chymotryptiques. Comme les hydrolysats peptidiques de  $L_{27}$  sont plus solubles à pH basique, nous avons mis au point un protocole de séparation sur un nouveau type de

gel échangeur d'anion : la DEAE-Trisacryl M. Malgré la faible pente en pH ou en force ionique du gradient, les peptides obtenus quantitativement sont hétérogènes. Ces résultats semblent indiquer que les points isoélectriques des peptides de L<sub>27</sub> sont voisins, et que les techniques de séparation basées sur la charge ne sont pas adaptées.

Nous avons eu recours à la chromatographie liquide haute performance en utilisant des colonnes de phase inverse, la séparation s'effectuant selon le caractère hydrophobe des peptides. Si la chromatographie liquide haute performance est une technique efficace pour purifier quantitativement les peptides, cette méthodologie est de mise en oeuvre relativement difficile : un choix minutieux des phases stationnaires et des phases mobiles doit être entrepris systématiquement. Selon le type d'hydrolysats (nombre et taille des peptides) un préfractionnement par des techniques conventionnelles peut améliorer la séparation ultérieure par HPLC. Pour l'étude de la chaîne légère L<sub>27</sub>, nous avons effectué une évaluation systématique des colonnes HPLC, en phase inverse, commercialisées. Bien que très peu d'auteurs utilisent la colonne RP-Phényl, les meilleurs résultats pour la séparation des peptides de L<sub>27</sub> ont été obtenus avec ce type de colonne (GRANDIER-VAZEILLE et *al.* 1982). Malgré les phénomènes d'absorption non spécifique qui existent plus ou moins selon le type de colonne, les peptides de taille importante de L<sub>27</sub> ont été isolés quantitativement et dans un état de pureté élevé.

La détermination des séquences en acides aminés des différents peptides isolés par HPLC a pu être entreprise.

Ainsi sur les sept peptides de l'hydrolysats BrCN (2 à 66 résidus), cinq peptides (CB<sub>1</sub>, CB<sub>2</sub>, CB<sub>4</sub>, CB<sub>5</sub>, CB<sub>6</sub>) ont été purifiés et caractérisés, et trois peptides CB ont été séquencés automatiquement (CB<sub>2</sub>, CB<sub>5</sub>, CB<sub>6</sub>). Les peptides CB<sub>7</sub> et CB<sub>3</sub> (de 2 et d'environ 10 résidus) n'ont pas été isolés par HPLC.

Pour l'étude d'une structure primaire, l'étude d'un seul type d'hydrolysats est insuffisant. En effet, les peptides de faible taille ne sont pas toujours isolés (par exemple, CB<sub>3</sub> et CB<sub>7</sub>), il faut replacer les peptides entre eux et effectuer les recouvrements de séquence. Pour obtenir des peptides de taille importante, nous avons choisi d'étudier des hydrolysats dont la coupure a lieu au niveau des liaisons arginyles. L'étude de l'action de la trypsine sur L<sub>27</sub> dont les résidus de lysine ont été modifiés soit par l'anhydride maléïque, soit par l'anhydride citraconique et l'action de l'enzyme GMSS a été effectuée. Seule la trypsine a hydrolysé les liaisons arginyles et uniquement après citraconylation de la chaîne légère, avec de bons rendements. Les différents peptides tryptiques Tc ont été purifiés par HPLC sur colonne RP-phényl et caractérisés. Trois peptides (Tc<sub>2</sub>, Tc<sub>3</sub> et Tc<sub>5</sub>) ont été séquencés automatiquement. Le peptide Tc<sub>6</sub> d'après sa composition en acides aminés et ses deux acides aminés en position N-terminale, fait partie du peptide CB<sub>5</sub> déjà déterminé en séquence.

Parmi les peptides chymotrypsiques séparés par chromatographie sur DEAE-Trisacryl M, trois ont été purifiés par HPLC et déterminés en séquence automatique. Le peptide C<sub>3</sub> nous apporte des renseignements intéressants sur la partie N-terminale de la séquence.

La séquence du dipeptide BrCN C-terminal Ala-Ser isolé après fractionnement sur colonne de Chromobeads P a été déterminée compte tenu de sa composition en acides aminés et de l'absence de PTH-Ser lors de l'étude des extrémités N-terminales des peptides de l'hydrolysats BrCN.

De même, la séquence du peptide tryptique C-terminal (His-Ile-Met-Ala Ser) a été déterminée par trois cycles de dégradation manuelle d'EDMAN et par sa composition en acides aminés.

La séquence de la partie C-terminale de la chaîne légère L<sub>27</sub> de la myosine de ventricule gauche de coeur de Porc a pu être proposée. 114 résidus d'acides aminés ont été alignés dans la séquence des 134 résidus qui constituent la partie C-terminal de la chaîne légère.

La comparaison de cette séquence avec celles des chaînes légères de plus haut poids moléculaire de la myosine de muscles de différentes espèces révèle une très grande homologie de struc-

ture primaire de la partie C-terminale des chaînes légères de type "alcali" ( $L_{25}^S, L_{16}^S$  de muscle squelettique de Lapin;  $L_{27}$  de muscle cardiaque de Poulet). En particulier, entre les parties C-terminales des chaînes légères  $L_{27}$  de myosine de coeur de Porc et de Poulet, j'usqu'à présent nous n'avons pu mettre en évidence que neuf mutations. Ce nombre sera dans tous les cas inférieur à 21 car seul le peptide correspondant à la séquence 102-113, peptide de grande variabilité, n'a pas été déterminé.

Néanmoins, des différences importantes existent au niveau de la partie N-terminale comme le révèlent les compositions en acides aminés de ces peptides. En effet, la partie N-terminale de  $L_{27}$  "de Porc" est riche en résidus de Proline, d'Alanine, de Lysine et d'acide Glutamique (ou de Glutamine). Elle semble plus proche de  $L_{25}$  de muscle de Lapin que de  $L_{27}$  de muscle cardiaque de Poulet.

*L'étude des structures primaires des parties C-terminales et de la composition en acides aminés des parties N-terminales montre qu'il y aurait spécificité de muscle et d'espèce.*

La spécificité d'espèce réside principalement dans la partie N-terminale des chaînes légères qui possède un taux élevé de Proline chez les Mammifères supérieurs. Ceci peut expliquer les difficultés rencontrées pour établir la séquence en acides aminés des chaînes légères de myosine cardiaque de Boeuf, de Porc et d'Homme.

*Quels rôles peuvent avoir ces parties N-terminales?*

En effet, pour la myosine de muscle squelettique de Lapin, les différences entre  $L_{25}^S$  et  $L_{16}^S$  résident dans un peptide N-terminal supplémentaire de 41 résidus pour  $L_{25}^S$  (FRANK et WEEDS 1974). Au cours de l'évolution des espèces, pour le muscle squelettique il y a disparition de la chaîne légère  $L_{16}^S$  et pour le muscle cardiaque une structure plus complexe de la partie N-terminale apparaît comme nous l'ont montré nos résultats préliminaires de Dichroïsme Circulaire (structure du peptide N-terminal en poly-Proline II).

*Pourquoi les chaînes légères de structure tridimensionnelle analogue aux calciprotéines ne fixent pas le calcium?*

En effet, WEEDS et Mc LACHLAN (1974) avaient montré une similitude de structure entre la chaîne légère  $L_{25}^S$  de muscle squelettique de Lapin, la TN-C et la parvalbumine de Carpe. Nous avons étendu cette étude aux chaînes légères  $L_{27}$  de muscle

cardiaque de Poulet, d'Homme et de Porc. Cette étude révèle le caractère conservatif des résidus hydrophobes qui pourvoient au maintien de la structure tridimensionnelle. Par contre, au niveau des sites présumés de fixation des ions divalents, de nombreuses mutations interviennent expliquant ainsi pourquoi les chaînes légères ne fixent pas le calcium. Toutefois, la comparaison des chaînes légères aux calciprotéines permet de confirmer l'hypothèse de WEEDS et Mc LACHLAN que toutes ces protéines ont un précurseur ancestral commun.

*N'existe-t'il pas pour la myosine de coeur de Porc plusieurs formes de chaînes légères  $L_{27}$  dont le rapport différerait entre les deux ventricules?*

UEDA et YAZAKI (1981) ont montré que la myosine de ventricule gauche de coeur de Lapin possède deux formes de chaîne légère  $L_{27}$  dans un rapport de 1:9.

Pour la chaîne légère  $L_{27}$  de coeur de Porc, nous ne pouvons pas répondre à cette question, car actuellement seule la séquence des peptides majeurs de la partie C-terminale a été déterminée et que l'hétérogénéité de structure peut exister au niveau de la partie N-terminale.

Pour répondre à cette question nous envisageons:

- . L'étude des peptides de la partie N-terminale.
- . L'étude des peptides mineurs de la partie C-terminale que nous avons séparés par HPLC.
- . L'étude de la structure primaire de la chaîne légère  $L_{27}$  de la myosine de ventricule droit de coeur de Porc en comparant quelques peptides majeurs, séparés par HPLC, à ceux du ventricule gauche.

En conclusion, la détermination de la séquence en acides aminés de la partie C-terminale de la chaîne légère de plus haut poids moléculaire du ventricule gauche de coeur de Porc nous a permis de montrer que les chaînes légères  $L_{25}^{\delta}$ ,  $L_{16}^{\delta}$  de muscle squelettique de Lapin,  $L_{27}$  de muscle cardiaque de Poulet, de Boeuf, de Porc, d'Homme ont une structure très conservative au niveau de leur partie C-terminale. Par contre, la détermination de la composition en acides aminés montre que la partie N-terminale serait spécifique de l'espèce et aurait pour le Porc une structure très particulière.

## E - CONCLUSION

Notre travail a permis de mettre en évidence que la molécule de myosine est une *protéine polymorphe* .

Ce polymorphisme se traduit par des différences importantes au niveau des *chaînes lourdes* et aussi des *chaînes légères* pour un même muscle de différentes espèces ou pour différents muscles d'une même espèce . Dans notre modèle, *le Porc*, pour un même muscle, *le coeur*, nous avons mis en évidence des différences entre les *myosines ventriculaire et auriculaire* (chaînes lourdes et chaînes légères) et entre les *myosines ventriculaires droite et gauche* (répartition différente des variants) .

Aux différents variants de myosine ventriculaires pourraient être aussi associées des chaînes légères différentes dans leur structure primaire puisque une hétérogénéité de structure a été mise en évidence dans les chaînes légères de la myosine ventriculaire de coeur de Lapin.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- ADELSTEIN, R.S., CONTI, M.A., JOHNSON, G.S., PASTAN, I. et POLLARD, T.D. (1972)  
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69, 3693-3697.
- ADELSTEIN, R.S. et CONTI, M.A. (1973)  
Cold Spring Harbor Symposia of Quantitative Biology, 37, 599-605.
- APPELMAN, H.D. et HELWIG, E.B. (1976)  
Cancer, 38, 708-728.
- BARANY, M., GATJENS, E., BARANY, K. et KARP, E. (1964)  
Arch. Biochem. Biophys., 106, 280-293.
- BARANY, M. (1967)  
J. Gen. Physiol., 50, 197-216.
- BARANY, M., BAILIN, G. et BARANY, K.J. (1969)  
J. Biol. Chem., 244, 648-657.
- BEARMAN, R.M. (1974)  
Arch. Pathol., 98; 62-65.
- BECKER, C.G. et NACHMAN, R.L. (1973)  
Am. J. Pathol., 71, 1-22.
- BOUE, H. et CHANTON, R. (1978)  
Zoologie, 2.1, 167, 264, 485, Edité par DOIN (3<sup>e</sup> édition)
- BOULANGER, P., LEMAY, P., BLAIR, G.E. et RUSSEL, W.C. (1979)  
J. Gen. Virol., 44, 783-800.
- BRETCHER, A., VANDEKERCKHOVE, J. et WEBER, K. (1979)  
Eur. J. Biochem., 100, 237-243.
- BRAND,  
J. Biol. Chem., 86, 315- .
- CARDINAUD, R. (1979)  
C.R. Acad. Sc., 288 Série D , 1481-1484.
- CARDINAUD, R. et MOURUGEON, M. (1982)  
Proc. VIII<sup>e</sup> Club Francophone du Muscle de Marseille
- CHAMLEY-CAMPBELL, S., CAMPBELL, G.R., GROSCHELL-STEWART, U. et BURNSTOCK, G. (1977)  
Cell Tiss. Res., 183-166.
- CLARKE, F.M., LOVELL, S.J., MASTERS, C.J. et WINZOR, D.J. (1976)  
Biochem. Biophys. Acta, 427, 617-626.
- COHEN, I. et COHEN, C. (1972)  
J. Mol. Biol., 68, 383-387.
- COLLINS, J.H., POTTER, J.D., HORN, M.J., WILSHIRE, G. et JACKMAN, N. (1973)  
FEBS Letters, 36, 268-272.
- COLLINS, J.H. (1974)  
Biochem. Biophys. Res. Comm., 58, 301-308.
- CUMMINS, P. et PERRY, S.V. (1973)  
Biochem. J., 133, 765-777.

D'ALBIS, A. et GRATZER, W.B. (1973)

FEBS Letters, 29, 292-296.

D'ALBIS, A., PANTALONI, C. et BECHET, J.J. (1979)

FEBS Letters, 106, 81-84.

D'ALBIS, A., PANTOLONI, C. et BECHET, J.J. (1979)

Eur. J. Biochem., 99, 261-272.

DALLA-LIBERA, L., SARTORE, S. et SCHIAFFINO, S. (1979)

Biochem. Biophys. Acta, 581, 283-294.

DELANGE, R.J., FAMBROUGH, D.M., SMITH, E.L. et BONNER, J. (1969)

J. Biol. Chem., 244, 319-334.

DHOOT, G.K., GELL, P.G.H. et PERRY, S.V. (1978)

Exp. Cell. Res., 117, 357-370.

DREIZEN, P. et GERSHMANN, L.C. (1970)

Biochemistry, 9, 1688-1693.

DREIZEN, P. et RICHARDS, D.H. (1972)

Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 37, 29-45.

EASLEY, C.W. et PUTNAM, F.W. (1966)

J. Biol. Chem., 241, 3671-3678.

EATON, B.L. et PEPE, F.A. (1972)

J. Cell. Biol., 55, 681-695.

EBASHI, S. et EBASHI, F. (1965)

J. Biochem., 58, 7-12.

EBASHI, S., ENDO, M. et OHTSUKI, I. (1969)

Quart. Rev. Biophys., 2, 351-384.

EDMAN, P. et BEGG, G. (1967)

Eur. J. Biochem., 1, 80-91.

EISENBERG, E. et MOSS, S. (1970)

J. Biol. Chem., 245, 2451-2456.

ELLIOT, G.F., ROME, E.M. et SPENCER, M. (1970)

Nature, 266, 417-419.

ELZINGA, M. (1970)

Biochemistry, 9, 1365-1374.

ELZINGA, M. et COLLINS, J.H. (1977)

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 74, 4281-4284.

EPSTEIN, H.F., ARONOW, B.J. et HARRIS, H.E. (1976)  
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 73, 3015-3019.

FISKE, C.H. et SUBBAROW, Y. (1925)  
J. Biol. Chem., 66, 375-400.

FLINK, I.L., MORKIN, E. et ELZINGA, M. (1977)  
FEBS Letters, 84, 261-265.

FLINK, I.L., RADER, J.H. et MORKIN, E. (1979)  
J. Biol. Chem., 254, 3105-3110.

FRANK, G. et WEEDS, A.G. (1974)  
Eur. J. Biochem., 144, 317-334.

FREASON, N. et PERRY, S.V. (1975)  
Biochem. J., 151, 99-67.

FREDERIKSEN, D.W. et HOLZER, A. (1968)  
Biochemistry, 7, 3935-3950.

GILLIS, J.M. (1975)  
La Recherche, 6, 840-849.

GAUTHIER, G.F., LOWEY, S. et HOBBS, A.W. (1978)  
Nature, 274, 25-29.

GAUTHIER, G.F., LOWEY, S., BENFIELD, P.A. et HOBBS, A.W. (1982)  
J. Cell. Biol., 92, 471-484.

GILLOT, C. (1980)  
Enciclopédia Universalis, 4, 653-655.

GOLL, D.E., SUZUKI, A., TEMPLE, J. et HOMES, J.R. (1972)  
J. Mol. Biol., 67, 469-488.

GORNALL, A.G., BARADAWILL, G.J. et DAVID, M.M. (1949)  
J. Biol. Chem., 177, 751-766.

GRAND, R.J.A., WILKINSON, J.M. et MOLE, L.E. (1976)  
Biochem. J., 159, 633-641.

GRANDIER-VAZEILLE,X. et TETAERT,D.(1978)

Biochimie,60,409-415.

GRANDIER-VAZEILLE,X.,TETAERT,D.,HILDEBRAND,H.F. et BISERTE,G.(1978)

Proc.VII<sup>th</sup> Europ.Conf.on Muscle and Cell Motility,7,92.

GRANDIER-VAZEILLE,X.,TETAERT,D.,HEMON,B. rt LEMAY,P.(1979)

Proc.VIII<sup>th</sup>Europ.Conf.on Muscle and Cell Motility,8,110.

GRANDIER-VAZEILLE,X.,TETAERT,D.,HEMON,B. et BISERTE,G.(1982)

Protides Biol.Fluids Proc.Colloq.,30,(sous presse)

GRAY,W.R. et HARTLEY,B.S.(1963)

Biochem.J.,89,379-380.

GREASER,M.L. et GERGELY,s.(1971)

J.Biol.Chem.,246,4226-4233.

GREASER,M.L. et GERGELY,J.(1973)

J.Biol.Chem.,248,2125-2133.

GREEN,I. et MOMMEARTS,W.F.H.M.(1953)

J.Biol.Chem.,202,541-549.

GROS,G. et LABOUESSE,B.(1969)

Eur.J.Biochem.,è,463-470.

HAN,K.K.,TETAERT,D.,MOSCHETTO,Y.,DAUTREVAUX,M. et KOPEYAN,C.(1972)

Eur.J.Biochem.,27?585-592.

HAN,K.K.,TETAERT,D.,DEBUIRE,B.,DAUTREVAUX,M. etBISERTE,G.(1977)

Biochimie,59,557-576.

HARDY,M.F.,HARRIS,C.I.,PERRY,S.V. et STONE,D.(1970)

Biochem.J.,120,653-660.

HARRINGTON,W.F. etBURKE,M.(1972)

Biochemistry,11,1448-1455.

HARRINGTON,W.F. et HIMMELFARB,S.(1972)

Biochemistry,11,2945-2952.

- HARRINGTON, W.F., BURKE, M. et BARTON, J.S. (1973)  
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 37, 77-85.
- HARTSHORNE, D.J. et DREIZEN, P. (1973)  
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 37, 225-234.
- HARTWIG, J.H. et STOSSEL, T.P. (1975)  
J. Biol. Chem., 250, 5696-5705.
- HARTLEY, B.S. (1970)  
Biochem. J., 119, 805-822.
- HASSELBACH, W. et SCHNEIDER, G. (1951)  
Biochem. Z., 321, 462-475.
- HERMANN, J., TITANI, K., ERICSSON, L.H., NEURATH, H. et WALSH, K.A. (1978)  
Biochemistry, 17, 5672-5679.
- HEUMANN, H.G. (1971)  
Cytobiologie, 3, 259-281.
- HILDEBRAND, H.F., KERCKAERT, J.P., BISERTE, G., TETAERT, D. et GRANDIER-VAZEILLE, X. (1977)  
Proc. VII<sup>th</sup> Europ. Conf. on Muscle and Cell Motility, 6, 6.
- HILDEBRAND, H.F., KERCKAERT, J.P., BISERTE, G., GRANDIER-VAZEILLE, X. et TETAERT, D.  
Carcinoembryonic Proteins (F.W. LEHMANN ed.) Elsevier/North Holland Biochemical press, 2, 717-722.
- HILDEBRAND, H.F., TETAERT, D. et GILLOTEAUX, J. (1979)  
C.R. Acad. Sci. PARIS, 288, 109-111.
- HILDEBRAND, H.F., KERCKAERT, J.P., BISERTE, G., GRANDIER-VAZEILLE, X. et TETAERT, D. (1980)  
Eur. J. Cell. Biol., 20, 240-248.
- HIRATSUKA, T. (1980)  
Biochem. Biophys. Acta, 625, 369-373.

HJERTEN, S. (1962)

Arch. Biochem. Biophys. Suppl., 1, 147-151.

HOH, J.F.Y., Mc GRATH, P.A. et WHITE, R.I. (1976)

Biochem. J., 157, 87-95.

HOH, J.F.Y., Mc GRATH, Y.A. et HALE, P.T. (1977)

J. Mol. Cell. Cardiol., 10, 1053-1076.

HOH, J.F.Y. et LOWEY, S. (1977)

Biochemistry, 16, 4398-4402.

HOH, J.F.Y. (1978)

FEBS Letters, 90, 297-300.

HOH, J.F.Y., YEOH, G.P.S., THOMAS, M.A.W. et HIGGINBOTTOM, L. (1979)

FEBS Letters, 97, 330-334.

HOLMES, T.J. et LAWTON, R.G. (1977)

J. Am. Chem. Soc., 99:6, 1984-1986.

HORVATH, B.Z. et GAETJENS, E. (1972)

Biochem. Biophys. Acta, 263, 779-793.

HOUK, T.W. et UE, K. (1974)

Anal. Biochem., 66-74.

HUSZAR, G. et ELZINGA, M. (1971)

Biochemistry, 10, 229-236.

HUSZAR, G. et ELZINGA, M. (1972)

J. Biol. Chem., 247, 745-753.

HUXLEY, H.E. et HANSON, J. (1954)

Nature (London), 173, 973-976.

HUXLEY, H.E. (1963)

J. Mol. Biol., 7, 281-308.

HUXLEY, H.E. et BROWN, W. (1967)

J. Mol. Biol., 30, 383-434.

- HUXLEY, H. E. (1969)  
Science, 164, 1356-1366.
- JAKES, R., NORTHROP, F. et KENDRICK-JONES, J. (1976)  
FEBS Letters, 70, 229-234.
- JÖRNVALL, H. (1967)  
Eur. J. Biochem., 16, 25-40.
- KAMINER, B. et BELL, A. L. (1966)  
J. Mol. Biol., 20, 391-401.
- KATOH, N et KUBO, S. (1978)  
Biochem. Biophys. Acta, 535, 401-411.
- KENDRICK-JONES, J., SZENTIRALYI, E. M., et SZENT-GYÖRGYI, A. G. (1976)  
J. Mol. Biol., 104, 747-775.
- KERCKAERT, J. P. (1978)  
Anal. Biochem., 84, 354-360.
- KLOTZ, C., LEGER, J. J. et ELZINGA, M. (1982)  
Circ. Res., 50, 201-209.
- KNAPPEIS, G. G. et CARLSEN, F. (1968)  
J. Cell. Biol., 38, 202-211.
- KOMNICK, H., SOCKEM, W. et WOHLFARTH-BOTTERMANN, K. E. (1973)  
Intern. Rev. Cytology, 34, 196-249.
- KOPEYAN, C. et ROCHAT, H. (1972)  
(communication personnelle)
- KOSTKA, V. et CARPENTER, F. H. (1964)  
J. Biol. Chem., 239, 1799-1803.
- KRETSINGER, R. H. et NOCKOLDS, C. E. (1973)  
J. Biol. Chem., 248, 3313-3326.
- KULBE, K. D. (1974)  
Anal. Biochem., 59, 564-573.

LAEMMLI, U.K. (1970)  
Nature, 227, 680-685.

LANDON, M.F. et ORIOL, C. (1975)  
Biochem. Biophys. Res. Comm., 62, 241-245.

LEAVIS, P.C. et KRAFT, E.L. (1978)  
Arch. Biochem. Biophys., 186, 411-415.

LEGER, J.J. et FOCANT, B. (1973)  
Biochem. Biophys. Acta, 328, 166-172.

LEGER, J.J., BERSON, G., DELCAYRE, C. STEPHENS, M. et SWYNGHEDAUW, B. (1975)  
Biochimie, 57, 1249-1273.

LEGER, J., BOUVERET, P., SCHWARTZ, K. et SWYNGHEDAUW, B. (1976)  
Pflügers Arch., 369, 271-277.

LEGER, J.J., KLOTZ, C., CAVAILLE, F. et MAROTTE, F. (1979)  
FEBS Letters, 106, 157-161.

LEWIS, W.G. et SMILLIE, L.B. (1980)  
J. Biol. Chem., 255, 6854-6859.

LINEWEAVER, H. et BURK, D. (1934)  
J. Am. Chem. Soc., 56, 658.

LIU, T.Y. et CHANG, Y.R. (1969)  
J. Biol. Chem., 246, 2842-2846.

LOCKER, R.H. et HAGYARD, C.J. (1967)  
Arch. Biochem. Biophys., 122, 521-522.

LOMPRE, A.M., SCHWARTZ, K., D'ALBIS, A., LACOMBE, G., VAN THIEM, N. et  
SWYNGHEDAUW, B. (1979)  
Nature, 282, 105-107.

LOSSE, G., STIEHL, H.U. et SCHWENZER, B. (1982)  
Int. J. Peptide Protein Res., 19, 114-122.

LOWEY, S., SLAYTER, H. S., WEEDS, A. G. et BAKER, H. (1969)  
J. Mol. Biol., 42, 1-29.

LOWEY, S. et RISBY, D. (1971)  
Nature, 234, 81-85.

LOWEY, S., BENFIELD, P. A., SILBERSTEIN, L. et LANG, L. M. (1979)  
Nature, 282, 522-524.

LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, M. J., FARR, A. L. et RANDALL, R. J. (1951)  
J. Biol. Chem., 193, 265-275.

LOWY, J. et POULSEN, F. R. (1977)  
Symposium on Excitation and Contraction Coupling in Smooth Muscle  
(Heidelberg-Louvain)

MALHOTRA, A., HUANG, S. et BHAN, A. (1979)  
Biochemistry, 18, 461-466.

MAITA, T., UMEGANE, T., KATO, Y. et MATSUDA, G. (1980)  
Eur. J. Biochem., 107, 565-575.

MAITA, T., UMEGANE, T. et MATSUDA, G. (1981)  
Eur. J. Biochem., 114, 45-49.

MANI, R. S. et KAY, K. M. (1978)  
a) Biochem. Biophys. Acta, 533, 248-256.  
b) Biochem. Biophys. Acta, 536, 134-141.

MANNHERZ, H. G., BARRINGTON LEICH, J., HOLMES, K. C. et ROSENBAUM, G. (1973)  
Nature new biology, 241, 226-229.

MARUTA, H. et KORN, E. D. (1977)  
J. Biol. Chem., 252, 6501-6509.

MASAKI, T. (1974)  
J. Biochem., 76, 441-449.

MATSUDA, G., SUZUYAMA, Y., MAITA, T. et UMEGANE, T. (1977)  
FEBS Letters, 84, 53-56.

MATSUDA, T., MAITA, T., KATO, Y., CHEN, J. I. et UMEGANE, T. (1981)  
FEBS Letters, 135, 232-236.

MOIR, A. J. G. et PERRY, S. V. (1977)  
Biochem. J., 167, 333-343.

MOOS, C., OFFER, G., STARR, R. et BENNETT, P. (1975)  
J. Mol. Biol., 97, 1-9.

MOREL, J. E. et PINSET-HARSTRÖM, I. (1975)  
Biomedecine, 22, 88-96.

MOREL, J. E., CARDINAUD, R., BARDIN, A. M., BUISSON, R. et DRIFFORD, M. (1978)  
Proc. VII<sup>th</sup> Europ. Conf. on Muscle and Cell Motility, 7, 57a.

MOREL, J. E., PINSET-HARSTRÖM, I. et BARDIN, A. M. (1979)  
Biol. Cell., 34, 9-16.

MORIMOTO, K. et HARRINGTON, W. F. (1972)  
J. Biol. Chem., 247, 3052-3061.

MORKIN, E., KIMATA, S. et SKILLMAN, J. J. (1972)  
Circ. Res., 30, 690-702.

O'FARELL, P. H. (1975)  
J. Biol. Chem., 250, 4007-4021.

OFFER, G., MOOS, C. et STARR, R. L. (1973)  
J. Mol. Biol., 74, 653-676.

PEPE, F. A. (1967)  
J. Mol. Biol., 27, 203-225.

PEPE, F. A. et DRUCKER, B. (1979)  
J. Mol. Biol., 130, 379-393.

PERRIE, W. T. et PERRY, S. V. (1970)  
Biochem. J., 119, 31-38.

PINSET-HARSTTÖM, I. et TRUFFY, J. (1979)  
J. Mol. Biol., 134, 173-188.

PINSET-HARSTRÖM, I. et WHALE, R.G. (1979)  
J.Mol.Biol., 134, 189-197.

PISANO, J.J. et BRONSERT, T.J. (1969)  
J.Biol.Chem., 244, 5597-5607.

PISANO, J.J., BRONSERT, T.J. et BREWER, H.B.Jr. (1972)  
Anal.Biochem., 45, 43-59.

POLUDNAYA, Z.A., TSKHOVREBOVA, L.A., ZAALISHVILI, M.M. et  
STEFANENKO, G.A. (1975)  
J.Mol.Biol., 92, 357-359.

POLLARD, T.D. et KORN, E.D. (1973)  
J.Biol.Chem., 248, 4682-4690.

POLLARD, T.D. (1975)  
J.Cell.Biol., 67, 93-104.

POLLARD, T.D., STAFFORD, W.F. et PORTER, M.E. (1978)  
J.Biol.Chem., 253, 4798-4808.

POPE, B., HOH, J.F.Y. et WEEDS, A. (1980)  
FEBS Letters, 118, 205-208.

PORZIO, M.A. et PEARSON, A.M. (1977)  
Biochem.Biophys.Acta, 490, 27-34.

POTTER, J.D., JOHNSON, J.D., DEDMAN, J.R., SCHREIBER, W.E., MANDEL, F.,  
JACKSON, R.F. et MEANS, A.R. (1977)  
Calcium Binding Proteins and Calcium Function, 239-250.

RAMIREZ, F., SHUKLA, K.K. et LEVY, H.M. (1979)  
J.Theor.Biol., 76, 351-357.

RICHARDS, E.G., CHUNG, C.S., MENZEL, D.B. et OLCOTT, H.S. (1967)  
Biochemistry, 6, 528-540.

ROBSON, R.M. et ZEECHE, M.G. (1973)  
Biochem.Biophys.Acta, 295, 208-224.

SARKAR, S., SRETER, F.A. et GERGELY, J. (1971)  
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 68, 946-950.

SARKAR, S. (1972)  
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 37, 14-17.

SARTORE, S., GORZA, L., PIEROBON BORMIOLI, S., DALLA LIBERA, L. et  
SCHIAFFINO, S. (1981)  
J. Cell. Biol., 88, 226-233.

SERAYDARIAN, K., BRISKEY, E.J. et MOMMAERTS, W.F.H.M. (1967)  
Biochem. Biophys. Acta, 133, 399-411.

SHIVERICK, K.T., HAMRELL, B.B. et ALPERT, N.R. (1976)  
J. Mol. Cell. Cardiol., 8, 837-851.

SINGH, I., ROBSON, R.M. et STROMER, M.H. (1977)  
Biochem. Biophys. Acta, 491, 29-45.

SPUDICH, J.A. et WATT, S. (1971)  
J. Biol. Chem., 246, 4866-4871.

STOCKEM, W. (1970)  
Mikroskopie, 26, 185-189.

STONE, D. (1970)  
Thèse Université de BIRMINGHAM

STOSSEL, T.P. et POLLARD, T.D. (1973)  
J. Biol. Chem., 248, 8288-8294.

SUZUKI, A., GOLL, D.E., SINGH, I., ALLEN, R.E., ROBSON, R.M. et STROMER, M. (1976)  
J. Biol. Chem., 251, 6860-6870.

SWYNGHEDAUW, B., BOUVERET, P. et HATT, P.Y. (1973)  
J. Mol. Cell. Cardiol., 5, 441-459.

SYROVI, I. (1976)  
Physiol. Bohemoslov., 25, 295-300.

SYROVI, I., DELCAYRE, C. et SWYNGHEDAUW, B. (1979)

J. Mol. Cell. Cardiol., 11, 1129-1135.

SYSKA, H., WILKINSON, J.M., GRAND, R.J.A. et PERRY, S.V. (1976)

Biochem. J., 153, 375-387.

SZENT-GYORGYI, A.G., COHEN, C. et KENDRICK-JONES, J. (1971)

J. Mol. Biol., 56, 239-258.

TADA, M., BAILIN, G., BARANY, K. et BARANY, M. (1969)

Biochemistry, 8, 4842-4850.

TANG, J. et HARTLEY, B.S. (1967)

Biochem. J., 102, 593-599.

TANNENBAUM, M. et MARX, A.J. (1969)

Cancer, 23, 958-978.

TETAERT, D., HAN, K.K., PLANCOT, M.T., DAUTREVAUX, M., DUCASTAING, S.,

HOMBRADOS, I. et NEUZIL, E. (1974)

Biochem. Biophys. Acta, 351, 317-324.

TETAERT, D., MOREAU, O., HAN, K.K., HILDEBRAND, H.F. et BISERTE, G. (1977)

Biochimie, 59, 337-339.

TRAYER, R., WINSTANLEY, M.A. et TRAYER, I.P. (1977)

FEBS Letters, 83, 141-144.

TURNER, D.C., WALLIMANN, T. et EPPENBERGER, H.M. (1973)

Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A., 70, 702-705.

UEDA, S. et YAZAKI, Y. (1981)

J. Biochem., 90, 555-558.

VANDEKERCKHOVE, J. et WEBER, K. (1978)

J. Mol. Biol., 126, 783-802.

VANDEKERCKHOVE, J. et WEBER, K. (1979)

FEBS Letters, 102, 219-222.

VAN EERD, J.P. et TAKAHASHI, K. (1976)  
Biochemistry, 15, 1171-1180.

WACHSBERGER, P.R. et PEPE, F.A. (1974)  
J.Mol.Biol., 88, 385-391.

WAGNER, P.D. et WEEDS, A.G. (1977)  
J.Mol.Biol., 109, 455-473.

WALLIMAN, T., TURNER, D.C. et EPPENBERGER, H.M. (1975)  
Proc. IX<sup>th</sup> FEBS ME BUDAPEST, 31, 119-124.

WANG, K., ASH, J.F. et SINGER, S.J. (1975)  
Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A., 72, 4483-4486.

WANG, K., Mc CLURES, J. et TU, A. (1979)  
Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A., 76, 3698-3702.

WATRAS, J. (1981)  
J.Mol.Cell.Cardiol., 13, 1011-1021.

WEEDS, A.G. et LOWEY, S. (1971)  
J.Mol.Biol., 61, 701-725.

WEEDS, A.G. et Mc LACHLAN, A.D. (1974)  
Nature, 252, 646-649.

WEEDS, A.G. (1975)  
FEBS Letters, 59, 203-208.

WEEDS, A.G., HALL, R. et SPURWAY, N.C.S. (1975)  
FEBS Letters, 49, 320-324.

WEEDS, A.G. et TAYLOR, R.S. (1975)  
Nature, 257, 54-56.

WEEDS, A.G. et POPE, B. (1977)  
J.Mol.Biol., 111, 129-157.

WHALEN, R.G., BUTLER-BROWNE, G.S. et GROS, F. (1976)  
Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A., 73, 2018-2022.

WHALEN, R.G., BUTLER-BROWNE, G.S. et GROS, F. (1978)  
J. Mol. Biol., 126, 415-431.

WHALEN, R.G. et SELLS, S.M. (1980)  
Nature, 286, 731-733.

WIKMAN-COFFELT, J., FENNER, C., SMITH, A. et MASON, D.T. (1975)  
J. Biol. Chem., 250, 1257-1262.

WIKMAN-COFFELT, J. et DRIVASTAVA, S. (1979)  
FEBS Letters, 106, 207-212.

WILKINSON, J.M. et GRAND, A. (1978)  
Eur. J. Biochem., 82, 493-501.

WILSON, J.G. et COHEN, L.A. (1963)  
J. Am. Chem. Soc., 85, 564-567.

WOHLFARTH-BOTTERMAN, K.E. (1964)  
Primitive motile systems in Cell Biology, R.D. Allen et N. Kamiya,  
Academic Press New-York, 79-109.

YASUI, B., FUCHS, F. et BRIGGS, F.N. (1968)  
J. Biol. Chem., 243, 735-742.

YOUNG, M. et REES, M.K. (1967)  
J. Biol. Chem., 242, 4449-4457.

YOUNT, R.G., FRYE, J.S. et O'KEEFE, K.R. (1972)  
Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 37, 113-119.

## CHAPITRE VI

# APPENDICE TECHNIQUE

## I - PRÉPARATION ET PURIFICATION DES PROTÉINES

Pour nos études nous avons été amenés à préparer la myosine et l'actine de plusieurs types de muscles.

### A - LA MYOSINE

#### a) LA MYOSINE CARDIAQUE ET SQUELETTIQUE

1) *d'un muscle normal adulte* : les myosines ont été préparées et purifiées selon le protocole de Léger et al 1975, auquel nous avons apporté les modifications suivantes :

- l'action du tampon phosphate de potassium 0,015 M de pH 6,8 ; KCl 0,3 M ;  $K_4 P_2 O_7$  0,01 M ;  $MgCl_2$  0,001 M ;  $\beta$  - mercapto éthanol 0,01 M (Hasselbach et Schneider 1951) est réduite à un temps de 7 minutes.

- Sur l'extrait brut de myosine en solution, dans un tampon imidazole - HCl 0,02 M de pH 6,8 ; KCl 0,3 M ;  $MgCl_2$  0,005 M ;  $\beta$  - mercapto-éthanol 0,01 M, à une concentration de 4 à 7 mg/ml, nous laissons agir le sel disodique de l'adénosine 5' - triphosphate ( $Na_2$ -ATP) à une concentration finale de 0,005 M pendant 20 minutes en maintenant le pH à 6,8. La solution est mise à centrifuger à 105000 g pendant 2 heures.

- La myosine à une concentration de 4 mg/ml est purifiée par fractionnement par le sulfate d'ammonium. Seule la fraction qui précipite entre 38 % et 45 % de saturation de sulfate d'ammonium est recueillie. Cette fraction mise en solution dans le tampon tris-HCl 0,05 M de pH 7,5 ; KCl 0,5 M ;  $\beta$  - mercapto éthanol 0,01 M est débarrassée du sulfate d'ammonium par dialyse contre 20 volumes de ce même tampon pendant 24 heures.

2) *d'un muscle foetal* : la myosine de muscle foetal est préparée dans les mêmes conditions que celles décrites pour le muscle normal adulte.

3) *d'un muscle tumoral* : la tumeur généralement très consistante est homogénéisée avec un waring-blendor. La myosine est extraite du broyat avec un tampon phosphate de potassium 0,01 M de pH 6,8 ;  $K_4 P_2 O_7$  0,04 M ; KCl 0,6 M ;  $MgCl_2$  0,001 M ;  $\beta$  - mercapto-éthanol 0,01 M (6 ml de tampon par gramme de broyat) pendant 90 minutes. La préparation est poursuivie dans les mêmes conditions que celles décrites pour la myosine de muscle normal.

#### b) LA MYOSINE "BRUTE" CARDIAQUE

La myosine "brute" est préparée dans les conditions identiques à celles décrites pour la myosine du muscle adulte normal sauf que l'étape addition de  $Na_2$ -ATP et centrifugation à 105 000 g est remplacée par 10 étapes dissolution - précipitation. La dissolution de la myosine étant effectuée dans le tampon imidazole - HCl 0,02 M de pH 6,8 ; KCl 0,3 M ;  $MgCl_2$  0,005 M ;  $\beta$  mercapto-éthanol 0,01 M et la précipitation par 10 volumes d'eau à 4°C. Toutes les étapes suivantes sont identiques.

#### c) LA MYOSINE DE MUSCLE LISSE D'UTERUS DE TRUITE

La myosine de muscle lisse est préparée selon le protocole décrit par Tetaert et al (1977) auquel nous avons apporté quelques modifications.

- pour obtenir le plus d'actomyosine possible, les étapes de précipitation sont effectuées par dialyse contre 20 volumes d'eau contenant 50 mM de  $CaCl_2$ .

- la fraction 38-45 % de saturation en sulfate d'ammonium est recueillie à la place de la fraction 36-53 %

- l'étape de centrifugation à 105 000 g en présence de  $Na_2$ -ATP puis purification par gel filtration sur colonne de sépharose 6 B est éliminée.

## B - L'ACTINE

L'actine de Porc est préparée à partir du muscle squelettique, du muscle cardiaque ventriculaire et auriculaire.

### a) PREPARATION DE LA "POUDRE ACETONIQUE"

La "poudre acétonique" est préparée à partir d'une méthode décrite par Young et Rees (1967). Le résidu obtenu après filtration de l'homogénat de muscle dans le tampon phosphate de potassium 0,015 M de pH 6,8 ; KCl 0,3 M ;  $K_4 P_2 O_7$  0,01 M ;  $MgCl_2$  0,001 M ;  $\beta$  mercapto-éthanol 0,01 M est traité successivement par :

. 2 fois de l'eau distillée froide (4 volumes) et filtration sur gaze

. 2 fois par une solution de  $Na HCO_3$  à 0,4 % (4 volumes) et filtration sur gaze

. 5 fois par l'acétone.

Le résidu obtenu est séché sur anhydride phosphorique ( $P_2 O_5$ )

### b) EXTRACTION DE L'ACTINE

L'actine est extraite de la poudre acétonique pendant 1 heure par 20 fois son volume d'eau distillée à 4°C. Le surnageant après filtration sur gaze est laissé à 0°C pendant 30 minutes, puis centrifugé à 105 000 g pendant 90 minutes. Le surnageant est amené à une concentration finale de 0,1 M en KCl et de 0,001 M en  $MgCl_2$  à pH 8,0. L'"Actine - G" polymérise en "Actine - F" pendant 2 à 3 heures à température ambiante. Après centrifugation à 105 000 g (90 minutes) le culot (Actine - F) est dissout dans 0,15 M KCl de pH 7,0.

### c) PURIFICATION PAR CYCLE DE DEPOLYMERISATION-REPOLYMERISATION

Pour purifier davantage l'actine, l'"Actine - F" est dépolymérisée par homogénéisation dans un tampon tris-HCl 2mM de pH 7,5 ;  $CaCl_2$  0,2 mM ;

ATP 0,5 mM ;  $\beta$  mercapto-éthanol 0,5 mM. La suspension est dialysée une nuit contre ce même tampon. Après centrifugation à 105 000 g pendant 3 heures, l'actine - G est repolymérisée en ajoutant du KCl et du  $MgCl_2$  pour obtenir des concentrations finales de 100 mM et 1mM respectivement.

## II - ISOLEMENT DES CHAINES LEGERES DE MYOSINE

### A - PAR ELECTROPHORESE PREPARATIVE

Cette méthode que nous avons mis au point au laboratoire est basée sur les différences de migration électrophorétique, sur gel d'acrylamide, des deux chaînes légères de la myosine et des chaînes lourdes.

#### a) SUR GEL D'ACRYLAMIDE EN PRESENCE D'UREE

La séparation des chaînes légères par électrophorèse préparative est effectuée sur deux grammes de myosine préalablement dissociée dans 200 ml d'une solution d'urée 8 M contenant du  $\beta$  mercapto-éthanol à 1 % (v/v), pendant 1 heure à température ambiante.

L'appareillage d'électrophorèse employé est celui décrit par Kerckaert (1978) auquel nous avons apporté les modifications suivantes :

- un système de 8 plaques (200 x 160 x 6 cm)
- un gel d'acrylamide en gradient discontinu en présence d'urée 8 M polymérisé selon les conditions de Perrie et Perry (1970) : 11 cm de gel T = 20 % ; C = 2,5 % et 5 cm de gel T = 15 % ; C = 2,5 % pour le gel de séparation à pH 8,3 ; 3 cm de gel de concentration de pH 6,7 T = 2,5 % ; C = 20 % ; C et T sont les concentrations selon la notation de Hjerten (1962).
- une migration de 72 heures sous 50 mA, 35 v par plaque dans un tampon tris-glycocolle 0,025M de pH 8,3 .

- un système de régulation de température des tampons à 20°C
- un système de recyclage des tampons inférieurs et supérieurs
- une coloration et une fixation des bandes protéiques par l'amido-schwarz à 1 % dans un mélange acide-acétique/éthanol/eau (1 ; 5 ; 5) pendant 3 minutes et une décoloration des plaques par le mélange acide-acétique/méthanol/eau (7 ; 50 ; 50)
- après broyage au waring-blendor (4 fois 10 secondes) de chacune des bandes colorées, l'éluion des protéines est réalisée par une agitation dans un tampon tris-HCl 0,025 M de pH 8,0 ; urée 4 M (20 minutes à 25°C) suivie d'une centrifugation à 10 000 g pendant 15 minutes. Les extractions sont arrêtées quand la densité à 280 nm de l'éluat est voisine de zéro. L'éluat est soit dialysé puis lyophilisé, soit dessalé et concentré par filtration sur membrane millipore (N W M L : 10<sup>4</sup>).

Les protéines concentrées sur membrane ou par lyophilisation sont débarassées du colorant par chromatographie de gel filtration sur colonne de sephadex G<sub>15</sub> ou G<sub>25</sub> par adsorption non spécifique du colorant sur le gel.

#### b) SUR GEL D'ACRYLAMIDE EN PRESENCE DE S D S

La séparation est effectuée dans des conditions similaires à celles décrites pour le gel d'acrylamide en présence d'urée :

La myosine est dissociée et réduite en milieu tris-HCl 0,3 M de pH 8,9 ; S D S 5 % (p/v) β mercapto-éthanol 10 % (v/v) à 100°C pendant 3 minutes.

Le gel d'acrylamide est un gradient discontinu en présence de S D S 0,1 % (p/v) (5 cm de gel T = 30 % ; 10 cm de gel T = 20 % ; 3 cm de gel T = 10 % et 1 cm de gel T = 5 %, C étant dans tous les cas égal à 2,5 %)

#### B - METHODE PAR PRECIPITATION ISOELECTRIQUE

Cette méthode de séparation des chaînes légères a été décrite par Hiratsuka (1980). Elle est basée sur une précipitation des chaînes lourdes à pH 6,6 de la myosine préalablement dissociée (tampon glycolle 50 mM, EDTA 10mM

pH 11,5 ; urée 4 M ; phényl-méthyl-sulfonyl-chloride 0,1 mM ;  $\beta$  - mercapto-éthanol 1 mM) et sur la tendance plus forte de la chaîne légère L<sub>18</sub> à s'aggréger et à précipiter à pH 5,3.

Les différentes étapes de cette technique sont :

. une dialyse des chaînes légères pour éliminer l'urée puis une concentration du dialysat par un immersible de séparation moléculaire.

. une précipitation isoélectrique, par titration à pH 5,3 par l'acide citrique 0,1 M, une agitation lente à 0°C, puis une centrifugation à 26 000 g pendant 30 minutes. Le surnageant contient la chaîne légère L<sub>27</sub> tandis que le culot qui est un mélange de chaînes légères est resoumis, après dissolution, à un deuxième cycle de précipitation-centrifugation.

Après répétition de ce procédé la solution contenant la chaîne légère L<sub>18</sub> est clarifiée par centrifugation.

### III - ELECTROPHORESE ANALYTIQUE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE

#### A - EN PRESENCE DE S D S

##### a) EN TAMPON TRIS-GLYCOCOLLE DE pH 8,4 :

Les électrophorèses en présence de S D S sont effectuées en plaque (150 x 100 x 0,75 mm) selon la technique de Kerckaert (1978) sur gel gradient d'acrylamide (5 - 30 %) selon la technique décrite par Laemmli (1970) : C = 2,57 % et T variant linéairement de 5 à 30 %.

Les échantillons dissous dans le tampon tris-HCl 0,31 M pH 8,9 ;  $\beta$  - mercapto-éthanol 10 % (v/v) ; S D S 5 % (p/v) ; glycérol 10 % (v/v) ; traces de bleu de bromophénol comme marqueur, sont complètement dissociés à 100°C pendant 3 minutes.

.../...

L'électrophorèse est conduite, en limitant l'intensité à 10 mA et la tension à 180 v, jusqu'à ce que le marqueur ait atteint le bas du gel (6 heures environ).

Les protéines sont fixées et colorées par une solution de bleu de Coomassie R 0,25 % (p/v) dans l'éthanol/eau/acide acétique ( 50 : 45 : 5).

Les gels sont décolorés par diffusion dans le mélange méthanol/eau/acide acétique (10 : 40 : 3).

Pour la détermination des poids moléculaires une courbe étalon a été établie à partir des protéines, de référence, suivantes : Phosphorylase b (P.M = 94 000) ; Albumine (PM = 67 000) ; ovalbumine (PM = 43 000) ; anhydrase carbonique (PM = 30 000) ; inhibiteur de la trypsine (PM = 20 100) ;  $\alpha$  - lactalbumine (PM = 14 400).

b) EN TAMPON TRIS-ACIDE BORIQUE DE pH 7,0

Les électrophorèses sur gel gradient de polyacrylamide sont effectuées dans les mêmes conditions que celles décrites ci-dessus en remplaçant le tampon de gel et de migration tris HCl 0,023 M de pH 8,4 par un tampon tris-acide borique 0,041 M pH 7,0.



Toutes les autres étapes, migration, coloration des gels, détermination des poids moléculaires sont effectuées dans les mêmes conditions que celles décrites précédemment.

B - EN PRESENCE D'UREE 8 M

Les gels de polyacrylamide en présence d'urée sont faits soit en tube (17 x 0,5 cm), soit en plaques (15 x 10 x 0,2 cm) selon la méthode de Kerckaert (1978). La technique utilisée est celle décrite par Perrie et Perry (1970).

Le gel de séparation est tel que T = 20 % et C = 2,5 % tandis que le gel de concentration T = 2,5 % et C = 20 %.

.../...

Les protéines sont dissoutes dans un tampon urée 8 M ;  $\beta$  - mercapto-éthanol 1 % (v/v) avec des traces de bleu de bromophénol pendant quelques minutes sous agitation à température ambiante.

L'électrophorèse est réalisée à puissance constante en limitant volontairement la tension à 90 volts et l'intensité à 10 m A. Le temps de migration est égal à 1,5 fois le temps de migration du bleu de bromophénol.

Pour dissiper l'énergie dégagée lors de la migration électrophorétique une régulation de la température des tampons des réservoirs est réalisée par :

- . circulation dans le serpentin, entourant la plaque d'électrophorèse et immergé dans le tampon inférieur, d'un liquide thermostaté à 15°C.
- . circulation entre le tampon des réservoirs inférieur et supérieur qui permet, par élimination des produits d'électrolyse, d'éviter les changements de pH.
- . la coloration des protéines est identique à celle décrite précédemment.

#### C - SANS AGENT DISSOCIANT

Les gels de polyacrylamide en présence de pyrophosphate de sodium sont effectués sur deux plaques (14 x 10 x 0,25 cm) en parallèle selon la méthode de Kerckaert (1978). Pour obtenir des gels comparatifs, les plaques sont coulées ensemble, selon le principe des vases communicants, avec la même solution d'acrylamide.

Les gels de polyacrylamide (C = 3 % ; T = 3 %) sont préparés à 4°C selon la méthode de Hoh et al (1976).

Les concentrations finales du gel à pH 8,8 sont 20 mM en  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  ; 10 % (v/v) de glycérol ; 0,15 % (v/v) de tétraméthylethylénédiamine ; 29,1 g/l acrylamide et 0,9 g/l méthylène bis acrylamide. La polymérisation est initiée par le persulfate d'ammonium.

.../...

Pour dissiper l'énergie due à l'effet joule dans le gel, pendant l'électrophorèse et maintenir une température de 1 à 2°C dans les tampons, un système de thermostatisation et de recirculation identique à celui décrit précédemment a été utilisé.

Le tampon d'électrophorèse contient : chlorhydrate de cystéine 2 mM ;  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  20 mM ; dithiothreitol 5 mM ; glycérol 10% (v/v) de pH 8,8 à 4°C. Après polymérisation le gel a été soumis à une préélectrophorèse d'environ 60 minutes.

Les échantillons sont dissous dans le tampon  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  40 mM de pH 8,8 ; dithiothreitol 10 mM ; en concentration finale puis centrifugés à 4°C pendant 120 minutes à 106 000 g. Le surnageant recueilli est mélangé avec un même volume de glycérol à 4°C avant d'être déposé sur le gel.

L'électrophorèse est conduite pendant 24 heures sous une différence de potentiel de 8 v/cm, l'intensité étant volontairement limitée à 100 mA.

Après électrophorèse les gels sont colorés par le bleu de Coomassie R dilué dans le méthanol/acide acétique/eau (4 : 1 : 5) pendant quelques heures et décolorés dans le méthanol/acide acétique/eau (50 : 5 : 45).

#### D - ISOELECTROFOCALISATION

Nous avons utilisé la technique selon O'Farrell (1975) avec des concentrations d'ampholines de 5 % (pH 2,5 à 4 ; pH 4 à 6 ; pH 5 à 7 dans un rapport 2 : 2 : 1).

Les gels sont polymérisés dans des tubes (13 x 0,3 cm). Ils contiennent de l'acrylamide tel que T = 6 % et C = 5,4 %.

Les gels sont équilibrés en pH avec les ampholines par une migration de l'anode à la cathode sous une différence de 400 v pendant 60 minutes.

Après migration les gels sont démoulés puis mis à équilibrer dans un tampon tris-HCl 0,071 M de pH 8,4 ;  $\beta$  - mercapto-éthanol 0,8 M et SDS 2 % (p/v) pendant une heure sous agitation douce.

.../...

Les gels ainsi équilibrés sont prêts pour une deuxième dimension.

#### IV - ELECTROPHORESE EN DOUBLE DIMENSION

La première dimension est soit une isoélectrofocalisation en tube, soit une électrophorèse sur gel de polyacrylamide, en tube, en présence d'urée.

La seconde dimension est une électrophorèse en plaque (20 x 20 x 0,5 cm) de gel de polyacrylamide en présence de S D S. Dans un but comparatif les plaques sont en parallèle et les gels coulés ensemble, selon le principe décrit pour les gels en milieu non dissociant, sont tels que le gel de séparation vérifie  $C = 2,57 \%$  ;  $T = 15 \%$ , pour une hauteur de 18,5 cm tandis que le gel de concentration  $C = 2,57 \%$  ;  $T = 5 \%$  est mis à polymériser sur une hauteur de 1 cm.

Le gel obtenu après la première dimension est déposé sur le gel de concentration et maintenu par de l'agarose à 1 % dans un tampon tris 0,071 M de pH 8,4 ; agarose 1 % (p/v) ; S D S 10 % (p/v) ; bleu de bromophénol 0,02 % . La migration électrophorétique s'effectue de la cathode vers l'anode à une intensité maximum de 65 mA sous une tension maximum de 190 v.

La thermostation, la circulation des tampons, la coloration des protéines sont analogues à celles précédemment décrites dans le cas des gels analytiques.

#### V - MESURE DE LA CONCENTRATION EN PROTEINES

##### A - MESURE SPECTROPHOTOMETRIQUE

Cette méthode de mise en oeuvre facile et rapide a été la plus

utilisée dans notre travail.

Elle est basée sur la loi de Beer-Lambert :

$$A = \epsilon_0 \cdot c \cdot l$$

A : absorption en densité optique  
C : concentration de la solution  
l : longueur de la cuve  
 $\epsilon_0$  : Coefficient d'extinction molaire

Les coefficients utilisés ont été :

$$\epsilon_{0, 1\%}^{280} \approx 0,56 \text{ pour la myosine selon Shiverick et al (1976)}$$

$$\epsilon_0^{290} = 0,63 \text{ pour "l'actine - G" )}$$

)selon Houx et Ue (1974)

$$\epsilon_0^{290} = 0,66 \text{ pour "l'actine - F" )}$$

Le spectre U.V de la myosine ne révélant pas d'absorption à 320 nm, la concentration pour la myosine pure ( $\frac{A_{280}}{A_{260}} \gg 1,6$ ) est déterminée par

$$C \text{ mg/ml} = \frac{A_{280} - A_{320}}{0,56}$$

#### B - METHODE DU BIURET

Nous avons utilisé la méthode décrite par Gornall et al (1949) pour nos protéines en solution dans le tampon tris-HCl 50 mM de pH 7,5 ; KCl 0,5 M en utilisant la sérualbumine cristallisée, en solution dans le tampon comme étalon.

#### C - METHODE DE LOWRY

Nous avons appliqué la méthode décrite par Lowry et al (1951) en méthode manuelle ou en méthode automatique sur chaîne technicon pour les myosines préalablement dissoutes dans le S D S 1 % (p/v).

.../...

Ces trois méthodes donnent des valeurs de concentration similaires avec une erreur de 3 %, lorsque les rapports d'absorbance à 280 nm ( $A_{280}$ ) et à 260 nm ( $A_{260}$ ) vérifient

$$\frac{A_{290}}{A_{260}} \gg 1,6$$

## VI - MESURE DES ACTIVITES ATPASES

Quelles que soient les mesures des activités ATPasiques effectuées sur les myosines, les conditions opératoires sont les suivantes :

- . incubation à 25°C pendant 5 minutes, dans un bain thermostaté sous agitation, dont deux minutes en présence d'ATP 50 mM.
- . réaction déclenchée par addition de 100  $\mu$ l de myosine à 1 mg/ml.
- . arrêt de la réaction après un temps variant de 1 à 11 minutes, suivant la méthode utilisée, soit par l'acide trichloroacétique 15 % (p/v) soit par le système luciférine/luciférase.

### A - LES MILIEUX D'INCUBATION (2 ml de volume final)

2 ml

a)  $Ca^{2+}$  - ATPase : deux milieux différents ont été utilisés :

1) Le milieu décrit par Green et Monmaerts (1953) tris-HCl 0,05 M pH 7,5 ;  $CaCl_2$  10 mM ; KCl 0,5 M ; ATP 2,5 mM.

2) Le milieu de Pope et al (1980) : tris-HCl 12,5 mM pH 8,0 ;  $MgCl_2$  10 mM ; KCl 0,4 M ; ATP 2,5 M.

b)  $K^+$  - ATPase : en milieu tris-HCl 0,05 M pH 7,5 en remplaçant le  $CaCl_2$  10 mM par l'EDTA 1 mM.

c) ATPase activée par l'actine : le milieu selon Pope et al (1980) a été utilisé : tris-HCl 12,5 mM ;  $MgCl_2$  3,75 mM ; KCl 30 mM et des concentrations d'actine variant de 2 à 40  $\mu$ M

.../...

## B - DOSAGE DE L'ATPASE

Deux types de dosage ont été utilisés :

a) *DOSAGE DU PHOSPHORE INORGANIQUE LIBERE* : c'est la méthode de dosage la plus ancienne. Elle consiste en une mesure colorimétrique à 660 nm du phosphore inorganique libéré selon la méthode de Fiske-Subbarow (1925).

Pour relier les valeurs de l'absorbance à la concentration en phosphore inorganique nous avons établi une courbe étalon. Elle a été effectuée en remplaçant, dans la réaction d'hydrolyse de l'ATP, la myosine ou l'ATP par des concentrations croissantes de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  et en effectuant sur un aliquot (2 ml) la réaction colorimétrique. Cette courbe étalon, qui permet de relier l'absorbance à 660 nm à la concentration en phosphore inorganique n'est linéaire que pour des concentrations inférieures à  $60\mu\text{M}$ .

b) *DOSAGE DE L'ATP NON CONSOMME* :

L'ATP non consommé lors de la réaction d'hydrolyse est dosé juste après addition de la myosine et toutes les deux minutes, par prélèvement d'un aliquot ( $200\mu\text{l}$ ) et mesure sur un appareil celltester 1030 Lumac, des unités lumineuses produites par réaction de bioluminescence entre le système luciférine - luciférase et l'ATP.

Cette méthode de dosage récente permet une évaluation rapide de l'état d'avancement de la réaction.

## VII - MICROSCOPIE ELECTRONIQUE

### A - FORMATION DES FILAMENTS SYNTHETIQUES DE MYOSINE

Afin de pouvoir comparer les filaments synthétiques, toutes les myosines sont précipitées au même stade de purification (myosines obtenues après dialyse contre le tampon tris-HCl 50 mM pH 7,5 ;  $\text{MgCl}_2$  0,01 M contenant

.../...

1 mg/ml de myosine est amené à une concentration en KCl 0,1 M en ajoutant 4 volumes d'un tampon phosphate de potassium 0,01 M pH 6,8 ;  $MgCl_2$  0,01 M.

#### B - ETUDE PAR CONTRASTE NEGATIF

Des colorations négatives avec l'acétate d'uranyle sont obtenues en disposant une goutte de la suspension protéinique sur une grille recouverte d'une membrane en pioloform F (Stockem 1970). Avant d'appliquer le contrastant la grille est rincée avec environ 10 gouttes d'une solution de KCl 0,1 M, laquelle est éliminée ensuite avec du papier filtre. Une goutte d'acétate d'uranyle à 0,5 % dans l'alcool à 50° est immédiatement ajoutée. Après 5 à 10 secondes, le contrastant est éliminé et la grille est séchée pendant une à deux minutes. Les préparations sont examinées au microscope électronique PHILIPS EM 300 à 80 KV en utilisant un diaphragme d'objectif de 50  $\mu m$

#### C - ETUDE DE LA LONGUEUR DES FILAMENTS SYNTHETIQUES DE MYOSINE

La longueur des filaments est mesurée avec un double décimètre gradué au demi millimètre, à partir des photos de microscopie électronique obtenues avec un grossissement final de 75 000.

Pour chaque préparation de myosine l'étude de la longueur est effectuée dans une zone contenant environ 400 filaments.

Les histogrammes des longueurs ainsi que les courbes de répartition, pour une largeur de classe de 100 nm ont été tracés.

Le nombre de filaments formant chaque pic est calculé par mesure de la surface sous chaque pic, soit en mesurant le nombre de carreaux, sous la courbe tracée sur papier millimétré, soit en mesurant la surface délimitée par le pic.

## VIII - ACTION D'AGENTS CHIMIQUES

### A - COUPURE AU NIVEAU DES METHIONINES

#### a) REDUCTION DES RESIDUS DE CYSTINES

La protéine (myosine ou chaîne légère à la concentration de 20 mg/ml) est mise à dissoudre dans le tampon tris-HCl 100 mM pH 8,2 ; KCl 0,5 M ; EDTA 3 mM en présence d'urée 8 M (préalablement désionisée sur résine AG 11 x 8).

La réduction est effectuée soit en présence de  $\beta$  mercapto-éthanol Prolabo (20 fois en excès) soit de dithiothréitol Sigma (10 fois en excès) sous azote et sous agitation pendant 4 heures à 25°C. L'excès en agent réducteur est en rapport molaire par rapport aux résidus de Cystéine présents.

#### b) PROTECTION DES RESIDUS DE CYSTEINE

La protection des résidus de Cystéine a été réalisée en utilisant deux agents d'alkylation :

##### 1) Carboxyméthylation

A la protéine réduite, est ajoutée l'iodoacétamide Sigma (recristallisée deux fois dans l'eau) 20 fois en excès par rapport à toutes les fonctions thiols présentes (protéine et agent réducteur). La réaction se fait à l'abri de la lumière sous azote et sous agitation pendant 30 minutes à 25°C. La fin de la réaction est vérifiée par la réaction de Brand (1930).

La réaction est arrêtée par addition d'acide acétique glacial, pour obtenir un pH inférieur à 5, puis la solution est dialysée à 4°C contre l'eau additionnée d'acide acétique à 0,25 %.

##### 2) S - aminoéthylation

A la protéine réduite, est ajoutée l'éthylène-imine (Pierce) dans

.../...

les conditions décrites par Easley et Putnam (1966). La réaction est faite sous azote à température ambiante pendant 1 heure sous agitation. La fin de la réaction est contrôlée par la réaction de Brand. La réaction est arrêtée comme pour la carboxyméthylation. Cette réaction permet la formation d'une S-aminoéthyl-cystéine qui est un isostère de la lysine.

c) ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE (BrCN)

La protéine alkylée est dissoute dans l'acide formique à 70 % en volume final. A cette solution, est ajouté le Bromure de cyanogène Merck (70 moles par résidu de Méthionine) et l'hydrolyse est accomplie selon la technique décrite par Han et al (1972).

B - COUPURE AU NIVEAU DES CYSTEINES

a) REDUCTION DES RESIDUS DE CYSTINE

La protéine est mise en solution (20 mg/ml) dans le tampon tris/HCl 100 mM pH 8,2 ; KCl 0,5 M ; EDTA 3 mM en présence soit d'urée 8 M soit de SDS (5 à 10 %). La réaction est effectuée dans les conditions décrites ci-dessus, soit en présence de  $\beta$  - mercapto-éthanol, soit de DL-Dithiothréitol.

b) HYDROLYSE PAR L'ACIDE 2 - NITRO - 5 - THIOCYANATOBENZOIQUE (NTCBA)

A la solution protéique réduite, est ajouté le NTCBA 40 fois en excès molaire par rapport au résidus de Cystéine (pour palier aux SH apportés par l'agent réducteur). La réaction a lieu sous azote à pH 8,2 et sous agitation à 37°C pendant 40 heures. La réaction est arrêtée par lyophilisation.

c) HYDROLYSE PAR LE 2-METHYL-N<sup>1</sup>-BENZENESULFONYL-N<sup>4</sup>-BROMOACETHYL-QUINONEDIIMIDE (CYSSOR)

La protéine réduite est dialysée contre l'acide acétique 0,25 %. L'adialysable est additionné de SDS 0,5 % et de 1 mM d'EDTA pH 2,9. A cette solution protéique est ajouté le Cyssor 40 fois en excès (rapport molaire) par rapport aux thiols présents. Après barbotage d'azote (2 min) la solution est mise en agitation 12 heures à température ambiante puis 1 heure à 80°C (Holmes et Lawton 1977)

#### C - COUPURE AU NIVEAU DES TYROSINES PAR LA N-BROMOSUCCINIMIDE (NBS)

La protéine dont les résidus de Cystine ont été réduits et les résidus de Cystéine alkylés, dans les conditions décrites dans le paragraphe VI - A, est dialysée contre l'acide acétique 0,25 % puis lyophilisée. Après lyophilisation, la protéine est mise en solution dans l'acide acétique à 50 % (en contraction finale) à une concentration de 250  $\mu$  moles par litre.

L'hydrolyse par la NBS est effectuée dans les conditions décrites par Wilson et Cohen (1963) avec une concentration de 3 moles de NBS par résidu de Tyrosine (dans ces conditions, et en l'absence de résidu de Tryptophane, la liaison tyrosyle est hydrolysée sélectivement).

#### D - ACTION DE L'ANHYDRIDE CITRACONIQUE : CITRACONYLATION

Cet agent chimique réagit avec les fonctions  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> des peptides ou des protéines ainsi qu'avec les fonctions  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> des résidus de Lysine.

La protéine ou les peptides sont mis en solution dans un tampon bicarbonate d'ammonium 0,05 M de pH 8,3 (concentration finale de 1 à 20 mg/ml). Au mélange sous agitation, on ajoute, en maintenant le pH à 8,3 (par la soude 5 N), l'anhydride citraconique (20 moles par mole de "fonction  $\alpha$  et  $\epsilon$  - NH<sub>2</sub>") en 6 fois à 20 min. d'intervalle. Après addition du dernier aliquot, la réaction se poursuit pendant 2 heures à température ambiante et sous agitation. La réaction est arrêtée par dialyse à 4°C dans l'eau ammoniacale à pH 9,0.

Cette réaction est réversible. La décitraconylation se faisant aisément par incubation dans une solution aqueuse (50 %) d'acide formique pendant 16 heures à température ambiante.

#### E - ACTION DE L'ANHYDRIDE MALEIQUE : MALEYLATION

L'agent chimique réagit avec les fonctions  $\alpha$  et  $\epsilon$  - NH<sub>2</sub> des acides aminés.

La protéine est dissoute dans le tampon phosphate de Potassium 0,2 M

à pH 9,0 (concentration finale de 5 à 10 mg/ml). La réaction de maléylation par l'anhydride maléique est conduite dans les conditions décrites par Jörnvall (1970), 10  $\mu$  moles d'anhydride maléique par mole de Lysine sont ajoutées par petites portions, sous agitation, et en maintenant le pH à 9,0. Il faut environ 15 minutes pour ajouter l'anhydride maléique. Après la dernière addition, la réaction est poursuivie pendant 1 heure puis arrêtée par dialyse contre le tampon  $\text{NH}_4 \text{HCO}_3$  0,1 M pH 8,0 à température ambiante pendant 4 heures en changeant le tampon toutes les heures.

Cette réaction est réversible. La démaléylation est effectuée selon la méthode de De Lange et al (1969). La solution est acidifiée à pH 3,5 et maintenue sous agitation constante à 40°C pendant 40 heures en présence de toluène (0,1 ml) pour éviter tout développement de microorganismes.

## IX - ACTION DES ENDOPEPTIDASES

### A - ACTION DE LA TRYPSINE (E.C.3.4.21.4.) (Merck)

La trypsine utilisée (Merck) a été préalablement traitée par le L - (1 tosylamido-2-phényl) éthyl chlorométhyl Kétone (TPCK) selon la technique de Kosta et Carpentier (1964).

#### a) HYDROLYSE TOTALE

1 - La chaîne légère (1  $\mu$  mole par ml) est dissoute dans le tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M pH 8,0. L'hydrolyse par la trypsine-TPCK est effectuée à 37°C pendant 4 heures avec un rapport enzyme/substrat de 2 %.

2 - La myosine (1  $\mu$  mole/ml) est dissoute dans le tampon phosphate 20 mM-EDTA 1 mM - NaCl 0,1 M pH 7,0.

L'hydrolyse par la Trypsine-TPCK est effectuée à 37°C pendant 4 heures avec un rapport final enzyme/substrat de 4 %. L'arrêt de la réaction est obtenu en ajoutant du PMSF 100  $\mu$ M puis la solution est dialysée et lyophilisée.

b) HYDROLYSE PARTIELLE : CYNETIQUE D'ACTION SUR LA CHAINE LEGERE

Différentes conditions ont été utilisées : température (4 ; 20 ; 37°C) rapport enzyme/substrat (1 à 4 %) ; temps de réaction (0 à 150 minutes).

L'enzyme est ajouté en une seule fois au temps 0. Des aliquots 100 µl sont prélevés à des temps de réaction variant de 0 à 150 minutes. La réaction est arrêtée par addition à l'aliquot de la solution réductrice (33 µl) (cette solution est celle utilisée pour les gels de polyacrylamide en présence de SDS mais trois fois concentrée) et par la mise à 100°C pendant 3 minutes.

B - ACTION DE L' $\alpha$ -CHYMOTRYPSINE (E.C.3.4.21.1) (SIGMA)

La chymotrypsine utilisée est préalablement traitée par le tosyl-lysyl-chlorométhyl ketone (TLCK) .

a) HYDROLYSE TOTALE

La protéine (1 µ mole par ml) est dissoute dans le tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M pH 8,0. L'hydrolyse par la chymotrypsine-TLCK est effectuée à 37°C pendant deux heures avec un rapport final enzyme/substrat de 1 %. L'arrêt de la réaction est obtenu par lyophilisation.

b) HYDROLYSE PARTIELLE : CINETIQUE D'ACTION SUR LA CHAINE LEGERE

La myosine est dissoute dans le tampon sesqui-carbonate 50 mM de pH 8,78. La réaction a été effectuée à différentes températures et à plusieurs concentrations enzyme/substrat. A des temps d'hydrolyse variant de 0 à 150 minutes, sont prélevés des aliquots (100µl). La réaction dans l'aliquot est stoppée dans des conditions identiques à celles que nous avons décrites pour l'hydrolyse partielle par la trypsine.

c) HYDROLYSE LIMITEE : FORMATION DE HMM-S<sub>1</sub>

La myosine est dissoute dans le tampon phosphate de potassium 20 mM de pH 7,0 ; KCl 0,5 M (10 à 15 mg/ml). On ajoute l'enzyme dans un rapport enzyme/substrat 1/130. La réaction effectuée à 20°C, est arrêtée après cinq minutes par dialyse à 4°C contre le tampon phosphate de potassium 10 mM de pH 7,0.

C - ACTION DE LA THERMOLYSINE (E.C.3.4.24.4) (MERCK)

a) HYDROLYSE PARTIELLE SUR LA MYOSINE

La myosine est dissoute dans le tampon phosphate de potassium 20 mM de pH 7,0 ; KCl 0,5 M (10 à 15 mg/ml). On ajoute l'enzyme dans un rapport enzyme/substrat de 2,5 %. La réaction est effectuée à 38°C pendant des temps de 5 ; 8 ; 11 ; 15 et 20 minutes, puis arrêtée par dialyse à 4°C contre le tampon phosphate de potassium 10 mM de pH 7,0;

b) HYDROLYSE PARTIELLE : CINETIQUE D'ACTION SUR LA CHAINE LEGERE

La protéine dissoute dans le tampon tris-HCl 0,05 M de pH 8,0 ; CaCl<sub>2</sub> 5mM est mise en contact avec l'enzyme dans un rapport enzyme/substrat de 2 %. La réaction est effectuée à 37°C pendant des temps variant de 5 à 130 minutes. Les réactions sont arrêtées après prélèvement d'un aliquot de 100 µl.

D- ACTION DE L'ENZYME STAPHYLOCOCCUS AUREUS V<sub>8</sub> (SAV<sub>8</sub>) (MILES Lab.)

a) HYDROLYSE TOTALE SUR LA CHAINE LEGERE

La protéine dissoute dans le tampon bicarbonate d'ammonium 130 mM de pH 8,0 à une concentration de 10 mg/ml est hydrolysée par SAV<sub>8</sub> (E/S = 2 %) pendant 18 heures à 37°C à l'obscurité et sous atmosphère d'azote. La réaction est arrêtée par dessalage sur colonne de séphadex G<sub>25</sub> (PD<sub>10</sub> Pharmacia) en utilisant l'acide acétique 2,5%. L'éluat est alors lyophilisé.

b) HYDROLYSE TOTALE SUR LES PEPTIDES

Les peptides sont dissouts dans le tampon bicarbonate d'ammonium 130 mM à pH 7,8 à raison de 1,5 mg/ml. L'hydrolyse est effectuée à 37°C, sous azote et sous agitation avec un rapport enzyme/substrat de 2 %, pendant 15 heures.

c) HYDROLYSE PARTIELLE : CINETIQUE D'ACTION SUR LA CHAINE LEGERE

La protéine est dissoute dans le tampon acétate d'ammonium 0,2 M de pH 4,0 ; SDS 1 % (5 mg/ml). L'hydrolyse est effectuée à 37°C avec un rapport

enzyme/substrat de 1/40 pendant des temps variant de 5 à 150 minutes. La réaction est arrêtée suivant le protocole déjà décrit pour les autres cinétiques d'action sur la chaîne légère.

E - ACTION DE LA COLLAGENASE (E.C.3.4.23.7) (SIGMA)

a) HYDROLYSE PARTIELLE : CINETIQUE D'ACTION SUR LA CHAINE LEGERE

La chaîne légère est mise en solution dans un tampon phosphate 70 mM de pH 7,4 à une concentration de 12 mg/ml. A cette solution est ajouté l'enzyme dans un rapport E/S = 1 ‰. La réaction est effectuée à 37°C pendant des temps variant de 0 à 150 minutes. Elle est arrêtée comme décrit précédemment.

b) HYDROLYSE LIMITEE

La chaîne légère est hydrolysée pendant 50 minutes dans des conditions similaires à celles décrites ci-dessus. La réaction est stoppée par addition de PMSF (50 µl d'une solution à 100 mM dans l'éthanol).

F - ACTION DE L'ELASTASE (E.C.3.4.21.11) (CALBIOCHEM)

a) HYDROLYSE LIMITEE DE LA MYOSINE

La protéine est mise en solution dans le tampon tris-HCl 0,2 M de pH 8,8 ; KCl 0,5 M à une concentration de 10 mg/ml. L'hydrolyse par l'élastase dans un rapport enzyme/substrat de 1 ‰ est effectuée pendant 4 minutes à 37°C. La réaction est arrêtée en portant la solution à 100°C puis dialysée à 4°C contre le tampon phosphate de potassium 10 mM de pH 4,5.

b) CINETIQUE D'ACTION SUR LA CHAINE LEGERE

La chaîne légère est mise en solution dans le tampon tris-HCl de pH 8,0. A cette solution est ajoutée l'enzyme dans un rapport E/S = 1 ‰. La réaction est effectuée à 4°C et à 25°C pendant des temps variant de 0 à 20 minutes.

G - ACTION DE LA PRONASE (MERCK)

a) HYDROLYSE LIMITEE

La myosine est dissoute, dans le tampon phosphate de potassium 70 mM de pH 7,4 ; KCl 0,5 M, à une concentration de 10 mg/ml. A la solution est ajouté l'enzyme dans un rapport enzyme/substrat de 1 % et la réaction se poursuit pendant 4 minutes à 40°C. La réaction est arrêtée en portant la solution à 100°C puis dialysée à 4°C contre le tampon phosphate de potassium 10 mM de pH 4,5.

b) CINETIQUE D'ACTION SUR LA CHAÎNE LÉGERE

La chaîne légère est mise en solution dans les conditions décrites ci-dessus. A la solution est ajouté l'enzyme dans un rapport E/S = 5 %. La réaction est effectuée à 37°C pendant des temps variant de 0 à 130 minutes. La réaction est arrêtée dans les conditions habituelles.

H - ACTION DE LA PEPSINE (E.C.3.4.23) (SIGMA)

a) HYDROLYSE LIMITEE

La myosine est mise en solution dans l'acide acétique 0,2 N (pH 2,0). A cette solution est ajoutée la pepsine dans le rapport E/S = 1 %. La réaction est effectuée à 37°C pendant 10 minutes puis arrêtée en amenant le pH à 8,5 par l'ammoniaque.

b) CINETIQUE D'ACTION SUR LA CHAÎNE LÉGERE

La chaîne légère, mise à dissoudre dans le SDS 1 % (p/v) ; HCl 0,06 N (pH 1,8), est hydrolysée par l'enzyme (E/S = 5 % à 37°C pendant des temps allant de 0 à 130 minutes.

I - ACTION DE LA PAPAINE (EC.3.4.4.10) (SIGMA)

La chaîne légère mise à dissoudre dans le tampon acétate d'ammonium

0,2 M (pH 7,1) ;  $MgCl_2$  0,002 M est hydrolysée à 37°C par la papaïne (E/S = 2 %) pendant des temps variant de 0 à 130 minutes.

#### J - ACTION DE LA PANCREAS-PROTEASE (MERCK)

La chaîne légère est mise à dissoudre dans le tampon sesqui-carbonate d'ammonium 50 mM de pH 8,78. L'hydrolyse est effectuée par l'enzyme (E/S = 1 %) à 37°C pendant des temps allant de 0 à 150 minutes. Les aliquots prélevés aux différents temps sont traités dans les conditions déjà décrites.

#### K - ACTION DE LA PROTEASE EXTRAITE DE LA GLANDE SOUS MAXILLAIRE DE SOURIS (GSMS) (BOEHRINGER)

La chaîne légère mise à dissoudre dans le tampon 4 - méthyl-morpholine-acide acétique 0,1 M de pH 8,0, est hydrolysée par la protéase GSMS (E/S = 2 %) pendant 150 minutes à 37°C sous agitation et à l'abri de la lumière. La réaction est arrêtée par congélation.

#### L - ACTION DE LA THROMBINE (E.C.3.4.21.5) (MERCK)

La chaîne légère est mise à dissoudre dans le tampon tris-HCl 50 mM de pH 7,9 ;  $MgCl_2$  2 mM ;  $CaCl_2$  2 mM. L'hydrolyse par la thrombine (105 unités NIH par mg de protéine) est effectuée à 37°C pendant des temps allant de 0 à 24 heures.

### X - SEPARATION PAR GEL FILTRATION

#### A - DEFINITION

La gel filtration, technique de séparation des peptides et des protéines est basée sur la taille moléculaire, a été effectuée dans tous les cas sur colonne.

Les gels utilisés (Pharmacia) étaient soit des Séphadex ( $G_{15}$  ;  $G_{25}$  ;  $G_{50}$  ;  $G_{55}$  ;  $G_{100}$  ;  $G_{200}$ ) soit des Sépharose (4 B ; 2 B).

En chromatographie de gel filtration on définit un  $K_{av}$  qui détermine la position d'un pic :

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

$V_o$  : volume mort  
 $V_t$  : volume total  
 $V_e$  : volume d'élution du soluté

#### B - SEPHADEX $G_{15}$

Ce gel garnissant des colonnes (50 x 2,5 cm) a été utilisé pour dessaler les fractions peptidiques ou dessaler et débleuir les préparations de chaînes légères. L'élution a été effectuée à un débit de 9,6 ml/h en utilisant comme système tampon soit de l'ammoniaque 0,1 M soit de l'acide acétique 2,5 %. Les fractions recueillies sont d'environ 3 ml. Le profil d'élution a été établi par dosage automatique sur un aliquot (0,5 ml) de chaque fraction au moyen de la réaction de Lowry.

#### C - SEPHADEX $G_{25}$

C'est le gel qui garnit les colonnes  $PD_{10}$  (Pharmacia). Il a été utilisé pour dessaler les fractions peptidiques obtenues en faible quantité. Le système d'élution est le même que celui décrit pour le gel Séphadex  $G_{15}$ .

#### D - SEPHADEX $G_{50}$

Les colonnes utilisées, garnies de Séphadex  $G_{50}$  superfine (10-40 $\mu$ ) ont toutes un diamètre intérieur de 2,5 cm et ont été éluées à un débit de 25,2 ml/h. Des fractions de 5 ml ont été recueillies. Les profils d'élution ont été établis directement en sortie de colonne par spectrophotométrie à 235 nm et par dosage automatique sur un aliquot (0,5 ml) de chaque fraction au moyen de la réaction de Lowry. Les fractions correspondant à un même pic ont été rassemblées et lyophilisées.

La taille de la colonne et le système éluant utilisé dépendent des hydrolysats à séparer.

a) TAMPON TRIS-HCL 50 mM de pH 9,5 : PROPIONATE DE SODIUM 1 M

Ce système éluant a été utilisé pour la séparation :

- . des hydrolysats de la myosine par le BrCN (colonne 4 m)
- . des hydrolysats par la chymotrypsine de la chaîne légère L<sub>27</sub> (colonne 4 m)
- . des hydrolysats par le BrCN de la chaîne légère L<sub>27</sub> ou L<sub>18</sub> (colonne 1,25 m)
- . des hydrolysats par le N.T.C.B.A. de la chaîne légère L<sub>27</sub> (colonne 1,25 m).

b) TAMPON SESQUI CARBONATE D'AMMONIUM 50 mM pH 8,78

Ce système d'éluant a été utilisé avec une colonne de 25 cm de long pour séparer les hydrolysats peptidiques, de l'enzyme et de la partie de la chaîne n'ayant pas été hydrolysée.

E - SEPHADEX G<sub>75</sub>

La colonne (100 x 2,5 cm) garnie de Séphadex G<sub>75</sub> superfine a été éluee à un débit de 9,6 ml/h par un tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM de pH 8,0 ; isopropanol 10 % (v/v). Des fractions de 3,2 ml ont été recueillies. Le profil d'élution a été établi dans des conditions identiques à celles décrites pour le gel Séphadex G<sub>50</sub>.

F - SEPHADEX G<sub>100</sub>

La colonne de Séphadex G<sub>100</sub> (100 x 3 cm) a été éluee, par un tampon tris-HCl 20 mM (pH 8,0) ; SDS 0,5 % (p/v) à un débit de 9,6 ml/h et des fractions

de 2,4 ml ont été recueillies. La courbe d'élution est obtenue par spectrophotométrie à 230 nm de l'éluat.

#### G - SEPHADEX G<sub>200</sub>

Ce gel a été utilisé dans les conditions décrites ci-dessus pour le Séphadex G<sub>100</sub>.

#### H - SEPHAROSE 4 B

La colonne (100 x 3,5 cm) garnie de Sépharose 4 B a été éluée, à 4°C à un débit de 19,2 ml/h, par un tampon tris-HCl 15 mM de pH 7,5 ; KCl 0,5 M ; EDTA 1 mM ; DTT 2,5 mM ; azide de sodium 200 mg/l en présence ou en absence d'urée 4 M. Le profil d'élution a été établi par spectrophotométrie à 235 nm directement en sortie de colonne. Les fractions recueillies sont de 3,5 ml.

#### I - SEPHAROSE 2 B

Ce gel a été utilisé dans une colonne (100 x 2,5 cm) avec un tampon d'élution tris-HCl 15 mM de pH 7,5 ; KCl 0,5 M ; DTT 2,5 mM à un débit de 19,2 ml/h. L'éluat, sur lequel est établi un enregistrement spectrophotométrique à 230 nm, est recueilli en fractions de 3,8 ml.

### XI - SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'AFFINITE

Cette technique est basée sur l'affinité qu'ont certaines protéines pour les ions.

Le gel que nous avons utilisé est un Sépharose 4 B epoxy (Pharmacia) ;

La colonne (30 x 0,9 cm) garnie par le gel a été lavée par de l'eau distillée puis activée par une solution de  $\text{CaCl}_2$  dans l'eau à 1 mg/ml.

Les protéines déposées ont été séparées, à un débit de 25,2 ml/h par des solutions de :

- . tampon tris-HCl 50 mM pH 8,0 ; KCl 0,35 M
- . tampon phosphate de potassium 0,2 M de pH 4,5 ; KCl 0,8 M
- . tampon tris-HCl 50 mM de pH 6,5 ; KCl 0,6 M ; EDTA 50 mM.

Des fractions de 2 ml sont recueillies. Le profil d'élution est établi, en continu, en sortie de colonne par spectrophotométrie à 280 nm.

## XII - SEPARATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'ÉCHANGE D'IONS

Cette technique de séparation est basée sur les différences de charge que peuvent avoir, suivant le pH, les produits à séparer. Elle a été utilisée, sur colonne, avec deux types de garnissage : les échangeurs d'anions et les échangeurs de cations.

### A - LES ECHANGEURS DE CATIONS

#### a) LA RESINE "CHROMOBEADS" de type P (TECHNICON)

Cette résine est un polystyrène sulfoné à faible pourcentage de réticulation. Elle a été utilisée dans une colonne à jaquette (140 x 0,635 cm) régulée à une température de 50°C.

L'hydrolysats peptidique (100 à 150 mg) est élué au moyen de tampons formiate et acétate de pyridine de pH et de molarité croissants, sous une pression maximum de  $25 \text{ kg/cm}^2$  et à un débit de 36 ml/h.

- 600 ml : pyridine 0,1 M - HCOOH pH 2,9

- 1200 ml d'un gradient composé de 800 ml de pyridine 0,1 M HCOOH de pH 2,9 et 400 ml de pyridine 0,1 M - HCOOH de pH 4,25.

- 600 ml d'un gradient composé de 200 ml de pyridine 0,1 M - HCOOH de pH 4,25, 200 ml de pyridine 1 M - HCOOH de pH 5,0 et 200 ml de pyridine 2 M - acide acétique de pH 5,0.

Des fractions de 6 ml ont été recueillies. La courbe d'élution a été établie par dosage à la minhydrine sur un aliquot (0,32 ml) de chaque fraction au moyen d'une réaction automatique adaptée à l'autoanalyseur Technicon. Elle a été complétée par des réactions de Pauly et de Sakaguchi qui mettent en évidence respectivement les peptides à histidine et à arginine.

Les fractions correspondant à un même pic sont rassemblées et lyophilisées.

b) LA RESINE SULFOPROPYLSEPHADEX C<sub>25</sub> (PHARMACIA)

Cette résine est dérivée du gel Séphadex G<sub>25</sub> par liaison d'un groupe sulfopropyl ( $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{SO}_3$ ).

Cette résine a été utilisée dans une colonne (20 x 0,85 cm) à un débit de 1,8 ml/h. Les fractions recueillies étant de 0,9 ml. Le système d'éluant utilisé était un gradient formé de 4 cellules contenant 20 ml de formiate d'ammonium 10 mM de pH 3,0 ;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,1 M et 60 ml de formiate d'ammonium 50 mM de pH 3,7 ;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,5 M.

Le profil d'élution a été établi par spectrophotométrie à 235 nm directement en sortie de colonne.

B - LES ECHANGEURS D'ANIONS

a) LA RESINE DEAE-TRISACRYL M (IBF - PHARMINDUSTRIE)

Cette résine, un copolymère acrylique sous forme de perles rigides de 40 à 80  $\mu\text{m}$  de diamètre, a été utilisée en colonne (25 x 2,5 cm) à température

ambiante et à un débit de 150 ml/h; Les fractions recueillies étant de 10 ml environ. L'élution de 100 mg de l'hydrolysate chymotrypsique de la chaîne légère L<sub>27</sub> a été effectuée au moyen de tampons formiate de pyridine de molarité croissante et de pH décroissants :

- 1200 ml de pyridine 0,2 N à pH 8,4
- 1600 ml d'un gradient linéaire (8,4 à 6,6) de pH ; pyridine 0,2 N
- 1600 à pH 6,6 d'un gradient linéaire (0,2 N à 0,6 N) de pyridine
- 1200 ml à pH 6,6 d'un gradient linéaire (0,6 N à 1N) de pyridine
- 600 ml d'un gradient linéaire (6,6 à 5,25) de pH ; pyridine 1N
- 2200 ml d'un gradient linéaire (5,25 à 4,0) de pH ; pyridine 1 N
- 500 ml d'un gradient linéaire (4,0 à 3,5) de pH ; pyridine 1 N
- 300 ml d'un gradient linéaire (3,5 à 3,0 ) de pH ; pyridine 1 N
- 1300 ml d'un gradient linéaire (1 N à 2 N) de pyridine à pH 3,0.

Le profil d'élution a été établi par dosage à la ninhydrine, sur un aliquot (0,32 ml) de chaque fraction, en automatique dans les conditions précédemment décrites. Les fractions correspondant à un même pic sont rassemblées et lyophilisées.

b) LA RESINE DEAE SEPHADEX A<sub>50</sub> (PHARMACIA)

La résine DEAE Séphadex A<sub>50</sub>, utilisée dans une colonne (160 x 2,5 cm), est éluee à un débit de 19,8 ml/h ; à température ambiante par un gradient linéaire:

- 1000 ml de pyrophosphate de potassium 40 mM de pH 7,4
- 1000 ml de pyrophosphate de potassium 40 mM KCl 0,5 M de pH 7,4.

Des fractions de 6 ml ont été recueillies.

La courbe d'élution a été établie par spectrophotométrie à 280 nm directement en sortie de colonne.

### XIII - ELECTROCHROMATOGRAPHIE

Cette technique de séparation a été utilisée soit sur feuille de papier Whatman n° 1 ou 3 (46 x 57 cm) soit sur plaque de cellulose (20 x 20 cm).

#### A - SUR FEUILLE DE PAPIER WHATMAN

Cette technique décrite par Biserte et al (1960) nous a permis de contrôler l'homogénéité des peptides soit de les repurifier.

a) LA PREMIERE DIMENSION est une électrophorèse haut voltage (2200 v) de 1 h 30 à pH 3,6 en tampon pyridine/acide-acétique/eau (10 : 100 : 2820) (v/v/v).

b) LA DEUXIEME DIMENSION est une chromatographie descendante de 18 heures à 20°C dans le système butanol/pyridine/acide-acétique/eau (150 : 100 : 30 : 120) (v/v/v).

La révélation de la feuille est effectuée soit par la ninhydrine-cadmium soit par la ninhydrine à 3 pour mille dans l'acétone.

#### B - SUR PLAQUE DE CELLULOSE

Cette technique nous a permis de contrôler l'homogénéité des fractions obtenues après chromatographie d'échange d'ions.

a) LA PREMIERE DIMENSION est une électrophorèse haut voltage (1400 v) de 30 minutes à pH 3,6 en tampon pyridine/acide-acétique/eau (10 : 100 : 2820).

b) LA DEUXIEME DIMENSION est une chromatographie ascendante dans le tampon butanol/pyridine/acide-acétique/eau (150 : 100 : 30 : 120).

La révélation de la plaque est effectuée par la ninhydrine-cadmium.

#### XIV - ELECTROPHORESE DIAGONALE

Cette technique décrite par Tang et Hartley (1967) permet de séparer les peptides à méthionine ou à cystéine. Elle consiste en :

- une électrophorèse haut voltage (3000 v pendant 1 h 15) sur une bande de papier Whatman n° 3 dans un tampon pyridine/acide acétique/eau (10 : 100 : 2820) à pH 3,6. Après migration la bande de papier est séchée.

- une alkylation de la bande de papier par pulvérisation de l'iodoacétamide 0,1 M soit à pH 3,5 (alkylation des méthionines) soit à pH 8,2 (alkylation des cystéines). La bande est mise dans un dessiccateur saturé avec du tampon de pH 3,5 (alkylation des méthionines) ou du tampon de pH 8,2 (alkylation des cystéines) pendant 16 heures à 20°C. Après séchage sous la hotte l'excès d'iodoacétamide est éliminé par trempages successifs dans l'acétone.

- une électrophorèse haut voltage de la bande alkylée préalablement cousue au milieu d'une feuille de papier Whatman n° 3. Cette électrophorèse s'effectue perpendiculairement à la première dans le tampon de pH 3,5 pendant 1 h 25 sous 3 000 v.

- la révélation des peptides est effectuée par le fluram 0,01 % dans l'acétone sur la feuille préalablement séchée sous la hotte.

Les peptides sont alignés sur la diagonale de la feuille à l'exception des résidus préalablement alkylés.

- Les peptides localisés sont récupérés par élution des tâches préalablement découpées.

## XV - DETERMINATION DE LA COMPOSITION EN ACIDES AMINES

### A - L'HYDROLYSE

Dans un tube à hydrolyse on ajoute 2 ml d'une solution peptidique, 2 ml d'acide chlorhydrique (HCl 32 pour cent Merck) et 2 à 3 gouttes de solution de phénol (5 pour cent dans l'eau). Le tube dont la solution a été dégazée est scellé sous vide. Dans le cas courant le tube est laissé 24 heures dans une étuve à 105°C.

Pour une détermination plus précise de la composition en acides aminés l'hydrolyse a été effectuée en présence et en absence de tryptamine pendant des temps de 24, 48 et 72 heures.

L'hydrolysate est séché sous vide avec un évapomix (Buchler).

### B - COMPOSITION EN ACIDES AMINES

La composition en acides aminés de l'hydrolysate peptidique a été déterminée au moyen d'autoanalyseurs automatiques :

a) *BEOL PLC 5 AH* : cet appareil dont le seuil de quantification était de 10 nanomoles a été utilisé au début de notre travail. Il nous a permis d'étudier les compositions en acides aminés des chaînes légères (L<sub>27</sub> et L<sub>18</sub>), des peptides de l'hydrolysate par le BrCN séparés par gel filtration sur colonne de Séphadex G<sub>50</sub>, peptides de l'hydrolysate tryptique séparés par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de chromobeads P...

b) *BECKMAN 119 CL*. Cet appareil dont le seuil quantifiable est la nanomole a été utilisé pour les peptides isolés par HPLC.

## XVI - DETERMINATION DES ACIDES-AMINES EN POSITION N - TERMINALE

### A - DANSYLATION

Nous avons utilisé la technique décrite par Tetaert et al (1974) qui se résume en l'étude des extrémités N- terminales de la protéine totale ou des fragments polypeptidiques par la technique de Gros et Labouesse (1969) tandis que les acides aminés en position N - terminale des petits peptides sont déterminés en utilisant la technique de Gray et Hartley (1970).

### B - PTH AMINOACIDES

Pour déterminer les deux acides-aminés en position N - terminale de nos peptides nous avons aussi utilisé la technique de dégradation récurrente d'Edman modifiée et adaptée d'après le protocole de Van Eerd et Takahashi (1976) et Kopeyan et RoCHAT (1972).

Les PTH amino-acides formés sont identifiés de quatre façons différentes :

a) PAR MICROCHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE SILICE (Kieselgel 60 F 254 Merck) en utilisant les systèmes de migration de Edman et Begg (1967) et de Han et al (1977).

b) PAR MICROCHROMATOGRAPHIE SUR PLAQUE (5 x 5 cm) (Fertigfolien F 1700 Schleicher et Schüll) en utilisant la technique de Kulbe (1974).

c) PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE, en utilisant une colonne WHP 100/200 mesh imprégnée de chlorophénylsilicone SP 400 à 10 % selon le système de Pisano et al (1972). Cette méthode est très sensible (0,2 à 0,5 nanomoles) et elle permet d'analyser quantitativement les PTH amino-acides. Par cette technique les PTH amino-acides les plus polaires ne peuvent pas être identifiés directement et requièrent une conversion en des dérivés plus volatils (Pisano et Bronzert 1969).

d) PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC). Cette technique permet une quantification, d'un plus grand nombre de résidus, minimisant les risques d'erreur en présence d'un bruit de fond inévitable en fin de dégradation automatique, et en dosant le pourcentage de contaminants du peptide.

Cette technique ne nécessite aucune transformation préalable à l'injection de l'échantillon ; elle est rapide et peu coûteuse.

Lors de la détermination de nos PTH amino-acides par HPLC, nous avons utilisé une colonne C<sub>18</sub> (10 µ Waters) dans les conditions d'élution décrites par Hermann et al (1978). Dans ces conditions les PTH-Méthionine et PTH-Valine d'une part et les PTH-Isoleucine et PTH-Phénylalanine ne sont pas séparés et doivent être identifiés soit sur colonne µBondapak CN (WATERS) soit par chromatographie en phase gaz.

## XVII - LA CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE

La chromatographie liquide haute performance, technique récente (1960), se divise suivant la nature de la phase stationnaire en quatre modes:

- la chromatographie d'absorption
- la chromatographie de partage
- la chromatographie par échange d'ions
- la chromatographie d'exclusion stérique

La distinction entre les deux premiers modes est malaisée. Dans la majorité des cas les deux processus préexistent. En pratique, la distinction se fait en fonction des polarités relatives des deux phases:

- la phase normale : le lit de matériau stationnaire est de nature fortement polaire et la phase mobile est apolaire. Le type de colonne retient les composés plus polaires plus longtemps que les composés moins polaires ou apolaires.

- la phase inversée: le lit de matériau est de nature apolaire et la phase mobile est constituée d'un liquide polaire. Un composé y est retenu plus longtemps quand sa polarité est faible.

Dans notre travail de séparation de peptides par HPLC, les phases stationnaires sont des particules de silice de granulométrie moyenne  $5\mu$ ,  $7\mu$  et  $10\mu$  sur lesquelles sont greffées des fonctions superficielles qui sont soit des Octylsilanes ( OS ou 8 ), soit des Octadécylsilanes ( ODS ou 18 ) ou des phénylsilanes (  $\emptyset$  ).

Une colonne remplie de particules de silice de  $10\mu$  sur lesquelles sont greffées des fonctions octadécylsilane sera appelée  $C_{18}$  (  $10\mu$  ) ou RP-18 (  $10\mu$  ) ou ODS (  $10\mu$  ).

Les phases mobiles utilisées sont :

- solvant A : de l'eau ultra-pure Millipore additionnée de 0,013 M d'acide trifluoroacétique ( TFA ) ( PIERCE sequanal grade ).

- solvant  $B_0$  : acétonitrile Uvasol ( MERCK ) ou R-S pour HPLC ( CARLO ERBA ) auquel est additionné 0,013 M de TFA.

- solvant  $B_1$  : 1-propanol R-S pour HPLC ( CARLO ERBA ) auquel est additionné 0,013 M de TFA .

- solvant  $B_2$  : 2-propanol R-S pour HPLC ( CARLO ERBA ) ou Uvasol ( MERCK ) auquel est additionné 0,013 M de TFA.

La phase mobile, solvant A, est le tampon d'équilibrage des colonnes et le tampon d'élution des peptides hydrophiles. La phase mobile de concentration solvant B, est utilisée pour éluer les peptides plus hydrophobes en fonctionnement isocratique ( le pourcentage de solvant B est fixe ) ou en gradient ( le pourcentage de solvant B augmente linéairement au cours du temps ). La pente du gradient varie suivant les séparations à effectuer, de même que la forme du gradient.

Le débit utilisé est tel que la pression maximum en tête de colonne soit inférieure à 3.500 p.s.i (  $\sim 241$  bars ) ce qui correspond par exemple à un débit de 1 ml/min pour une  $C_{18}$  (  $10\mu$  ) WATERS et 0,5 ml/min pour une  $C_{18}$  (  $5\mu$  ) WHATMAN.

Les appareillages utilisés pour notre travail ont été nombreux. Il se décompose ainsi :

- l'appareil d'HPLC composé d'un système de pompes pour former le gradient et d'un programmeur de type

. 204 / U 1616 GM WATERS ( 2 pompes et programmeur manuel )

. CCM II SOPARES ( 2 pompes et un programmeur manuel )

. 1084 b HEWLETT-PACKARD ( 2 pompes et un programmeur automatique)

. SP 8700 SPECTRA-PHYSICS ( une pompe à trois voies et un programmeur automatique ).

. V 5060 VARIAN ( une pompe trois voies et un programmeur automatique ).

- un système de détection en sortie de colonne. Nous avons utilisé des détecteurs à absorption U.V. avec cellules HPLC de type :

. Uvicord S L.K.B. de longueur d'onde fixe à 206 nm.

. U.V. 1/214 PHARMACIA de longueur d'onde fixe à 214 nm.

. M 441 WATERS de longueur d'onde fixe à 229 nm.

. Spectromonitor III SOPARES de longueur d'onde variable et une lecture à 230 nm.

Les peptides ont été obtenus par chromatographie des hydrolysats sur colonnes analytiques, en multipliant le nombre de dépôts et en collectant ensemble les fractions éluées au mêmes temps de rétention.



**GRANDIER-VAZEILLE Xavier**

## JURY :

Président rapporteur : J. MONTREUIL  
Rapporteur : G. BISERTE  
R. KASSAB  
J. MOREL

Mots Clefs : - PORC. OREILLETTE / VENTRICULE. MYOSINE  
- MYOSINE. ISOENZYME. CHAINE LEGERE / CHAINE LOURDE  
- MUSCLE STRIE PATHOLOGIQUE. FOETUS  
- CHAINE LEGERE. STRUCTURE PRIMAIRE. HPLC

**ETUDE DU POLYMORPHISME DE LA MOLECULE DE MYOSINE ET DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE LA CHAINE LEGERE DE PLUS HAUT POIDS MOLECULAIRE DE LA MYOSINE DE VENTRICULE GAUCHE DE CŒUR DE PORC**

## RESUME DE LA THESE

L'étude de la composition en chaînes légères de la myosine de différents types de muscles avait permis d'introduire la *notion d'isoenzymes de myosine*.

Pour vérifier cette notion, nous avons analysé la composition en chaînes légères pour (i) les myosines de différents types de muscle chez le porc (à l'état adulte et foetal), (ii) les myosines de muscles squelettiques pour différentes espèces (à l'état foetal, tumoral et normal), (iii) les myosines cardiaques au cours de l'évolution des espèces (des Amphibiens aux mammifères supérieurs). Nos résultats montrent clairement *le polymorphisme de la molécule de myosine* (au niveau chaînes légères) et que le porc est *un modèle particulièrement intéressant*.

Il nous avait apparu que cette notion d'isoenzymes puisse exister avec des différences se situant au niveau des chaînes lourdes. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons comparé les myosines provenant de ventricule gauche et de ventricule droit pour notre modèle, le porc. En utilisant des techniques très différentes (des mesures d'activités ATPasiques à l'étude d'hydrolysats par des agents chimiques, etc...), nous avons mis en évidence l'existence de plusieurs variants de myosine cardiaque de structure primaire distincte dont la répartition varie d'un ventricule à l'autre. Les myosines auriculaires et ventriculaires sont aussi différentes dans le cas du porc (au niveau des chaînes lourdes mais aussi des chaînes légères).

Une hétérogénéité de structure primaire de L<sup>27</sup> n'a pas été mise en évidence n'ayant étudié que les peptides majeurs purifiés par HPLC et déterminé que la partie C-terminale. *Les 2/3 de la séquence de la chaîne légère de plus haut poids moléculaire ont été néanmoins déterminés.*