

50376  
1988  
55

**THÈSE DE DOCTORAT D'ETAT**  
**ès Sciences Naturelles**  
**OPTION BIOCHIMIE**

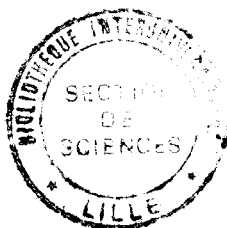
50376  
1988  
55

présentée à

L'UNIVERSITÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
DE LILLE-FLANDRES ARTOIS

par

**Daniel TETAERT**



**STRUCTURE ET ROLE DE LA CHAÎNE LÉGÈRE**  
**DITE ALCALINE**  
**DE LA MYOSINE VENTRICULAIRE**  
**DE CŒUR DE PORC**

soutenue le 2 février 1988 devant le Jury composé de

Président : Professeur J. MONTREUIL  
Rapporteurs : Professeur G. BISERTE  
Professeur R. KASSAB  
Professeur S. BOUQUELET  
Examineurs : Professeur P. DEGAND  
Professeur B. FOURNET

DOYENS HONORAIRES DE L'ANCIENNE FACULTE DES SCIENCES

MM. 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, DECUYPER, DEHEUVELS, DEHORS, DION, FAUVEL, FLEURY, P. GERMAIN, GLACET, GONTIER, KOURGANOFF, LAMOTTE, LASSERRE, LELONG, Mme LELONG, LHOMME, LIEBAERT, MARTINOT-LAGARDE, MAZET, MICHEL, PEREZ, ROIG, ROSEAU, ROUELLE, SCHILTZ, SAVARD, ZAMANSKI.

PROFESSEUR EMERITE

M. A. LEBRUN.

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

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

PRESIDENT DE L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
DE LILLE

M. J. CORTOIS.

PROFESSEURS - CLASSE EXCEPTIONNELLE

M. CONSTANT Eugène	Electronique
M. FOURET René	Physique du Solide
M. GABILLARD Robert	Electronique
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. BOUGHON Pierre	Algèbre
M. BOURIQUET Robert	Biologie Végétale
M. BREZINSKI Claude	Analyse numérique
M. CELET Paul	Géologie générale
M. CHAMLEY Hervé	Géotechnique
M. COEURE Gérard	Analyse
M. CORDONNIER Vincent	Informatique
M. DEBOURSE Jean Pierre	Gestion des entreprises
M. DYMENT Arthur	Mécanique
M. ESCAIG Bertrand	Physique du solide
M. FAURE Robert	Mécanique
M. FOCT Jacques	Métallurgie
M. GRANELLE Jean Jacques	Sciences Economiques
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. MIGNOT Fulbert	Analyse numérique
M. PAQUET Jacques	Géologie générale
M. PROUVOST Jean	Minéralogie
M. ROUSSEAU Jean-Paul	Physiologie animale
M. SALMER Georges	Electronique
M. SEGUIER Guy	Electrotechnique
M. SIMON Michel	Sociologie
M. STANKIEWICZ François	Sciences économiques
M. TILLIEU Jacques	Physique théorique
M. VIDAL Pierre	Automatique
M. ZEYTOUNIAN Radyadour	Mécanique

PROFESSEURS - 2ème Classe

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. BOSCOQ Denis	Probabilités
M. BRASSELET Jean-Paul	Géométrie et topologie

M. BRUYELLE Pierre	Géographie
M. CAPURON Alfred	Biologie animale
M. CARREZ Christian	Informatique
M. CAYATTE Jean-Louis	Sciences économiques
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. CROSNIER Yves	Electronique
M. CURGY Jean-Jacques	Biologie
Mle DACHARRY Monique	Géographie
M. DAUCHET Max	Informatique
M. DEBRABANT Pierre	Géologie appliquée
M. DEGAUQUE Pierre	Electronique
M. DELORME Pierre	Physiologie animale
M. DELORME Robert	Sciences économiques
M. DE MASSON D'AUTUME Antoine	Sciences économiques
M. DEMUNTER Paul	Sociologie
M. DENEL Jacques	Informatique
M. DE PARIS Jean-Claude	Analyse
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. DUPONT Christophe	Vie de la firme (I.P.A.)
M. FAKIR Sabah	Algèbre
M. FONTAINE Hubert	Dynamique des cristaux
M. FOUQUART Yves	Optique atmosphérique
M. FRONTIER Serge	Ecologie numérique
M. GAMBLIN André	Géographie urbaine, industrielle et démograph
M. GLORIEUX Pierre	Physique moléculaire et rayonnements atmosphé riques
M. GOBLOT Rémi	Algèbre
M. GOSSELIN Gabriel	Sociologie
M. GOUDMAND Pierre	Chimie physique
M. GREGORY Pierre	I.P.A.
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. JACOB Gérard	Informatique
M. JACOB Pierre	Probabilités et statistiques
M. JACQUILLAT Bertrand	Gestion
M. JEAN Raymond	Biologie des populations végétales
M. JOFFRE Patrick	Vie de la firme (I.P.A.)
M. JOURNEL Gérard	Spectroscopie hertzienne

M. KREMBEL Jean	Biochimie
M. LANGRAND Claude	Probabilités et statistiques
M. LATTEUX Michel	Informatique
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. LE MAROIS Henri	Vie de la firme (I.P.A.)
M. LHENAFF René	Géographie
M. LOCQUENEUX Robert	Physique théorique
M. LOSFELD Joseph	Informatique
M. LOUAGE Francis	Electronique
M. MACKE Bruno	Physique moléculaire et rayonnements atmosphériques
M. MAIZIERES Christian	Automatique
M. MESSELYN Jean	Physique atomique et moléculaire
M. MESSERLIN Patrick	Sciences économiques
M. MONTEL Marc	Physique du solide
Mme MOUNIER Yvonne	Physiologie des structures contractiles
Mme N'GUYEN VAN CHI Régine	Géographie
M. PARSY Fernand	Mécanique
M. PASZKOWSKI Stéphan	Analyse numérique
Mlle PAUPARDIN Colette	Biologie physiologie végétales
M. PERROT Pierre	Chimie appliquée
M. PERTUZON Emile	Physiologie animale
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. ROBINET Jean-Claude	E.U.D.I.L.
M. ROGALSKI Marc	Analyse
M. ROY Jean-Claude	Psychophysiologie
M. SCHAMPS Joël	Spectroscopie moléculaire
Mme SCHWARZBACH Yvette	Géométrie
M. SLIWA Henri	Chimie organique
M. SOMME Jean	Géographie
Mlle SPIK Geneviève	Biochimie
M. STAROSWIECKI Marcel	Informatique
M. STERBOUL François	Informatique
M. TAILLIEZ Roger	Génie alimentaire
Mme TJOTTA Jacqueline	Mathématiques
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	Génétique
M. WALLART Francis	Spectrochimie infrarouge et Raman
M. WARTEL Michel	Chimie inorganique
M. WATERLOT Michel	Géologie générale
Mme ZINN Justin Nicole	Algèbre

A MON EPOUSE

Pour son soutien constant

A CHRISTOPHE ET DELPHINE

Pour le moral

A MES PARENTS

Pour qui c'est la consécration

A MA FAMILLE

Ce travail a été réalisé sous la direction de Monsieur le Professeur G. BISERTE dans le cadre du laboratoire associé C.N.R.S. ( LA 268 ) au sein de l'unité INSERM N° 16 ( Directeur Monsieur le Professeur Ph. ROUSSEL ).

Monsieur le Professeur G. BISERTE, dès 1974 nous a fait l'honneur de nous orienter vers le groupe des " Protéines Fibreuses " ( dirigé par Monsieur K.K. HAN ). Il nous a donné la chance de bénéficier de sa haute compétence scientifique. La confiance qu'il nous a accordée et la gentillesse avec laquelle il nous a dirigé nous ont constamment encouragé dans la réalisation de ce travail jusqu'à ce qu'il soit mené à son terme puisqu'il a bien voulu accepter de présider le Jury de cette Thèse. Nous sommes heureux de lui exprimer notre profonde reconnaissance et nous le prions d'accepter le témoignage de notre vive gratitude.

Monsieur R. KASSAB nous a fait le grand honneur de juger notre Thèse. Nous lui sommes reconnaissant de l'excellent accueil à l'IBM CNRS de Montpellier et des encouragements qu'il nous a toujours réservés. Nous lui exprimons nos sentiments de très vive gratitude.

Monsieur le Professeur B. FOURNET nous a fait le grand honneur de s'intéresser à ce travail et de juger ce mémoire. Nous tenons à vous assurer de notre plus profond respect.

Monsieur le Professeur S. BOUQUELET nous a fait l'honneur de siéger dans le jury de notre Doctorat et nous en sommes très reconnaissant. Nous vous remercions de l'intérêt que vous avez pris à notre travail.

Monsieur le Professeur P. DEGAND, notre nouveau directeur de recherches, nous a fait l'honneur de juger notre Thèse. Nous le remercions vivement des conseils qu'il nous a prodigués et des nombreuses discussions enrichissantes. Nous lui prions d'accepter l'expression de notre profonde et respectueuse gratitude.

Monsieur le Professeur J. MONTREUIL nous a dispensé des enseignements de qualité au cours de nos études. Nous sommes heureux de lui exprimer l'expression de notre profonde reconnaissance.

Monsieur K.K. HAN nous a initié à l'étude de structure primaire des protéines en particulier des "myoglobines". Nous le prions d'accepter le témoignage de notre respectueuse gratitude.

Ce mémoire est, en partie, le fruit d'un travail mené en équipe. Nous adressons à cet égard, nos plus vifs remerciements à Messieurs X. GRANDIER-VAZEILLE et H.F. HILDEBRAND mais aussi à J.P. KERCKAERT et P. LEMAY.

Je tiens à témoigner ma profonde amitié à tous les membres de notre nouvelle équipe qui m'ont apporté leurs encouragements.

Je remercie aussi en particulier Monsieur J.P. AUBERT pour la réalisation des études par dichroïsme circulaire et de structure secondaire, Monsieur G. BRIAND pour la réalisations des séquences en acides aminés et Monsieur TARTAR pour la réalisation des calculs des moments hydrophobes.

Enfin, c'est pour nous un plaisir d'associer à une même pensée de reconnaissance Madame O. MOREAU, Mademoiselle D. BENAÏCHE et plus particulièrement à Mademoiselle B. HEMON pour leur aide technique précieuse et efficace, ainsi qu'à T. DHORNE et F. ROUSSEZ pour l'aide apportée pour le travail de dactylographie et aussi à Monsieur C. VANDEPERRE qui s'est chargé de la partie photographie du mémoire.



# TABLE DES MATIERES

<u>CHAPITRE I : GENERALITES</u>	1
A - INTRODUCTION	1
B - LES SYSTEMES MUSCULAIRES	1
C - ORGANISATION DES FIBRES MUSCULAIRES	2
I - LA FIBRE MUSCULAIRE STRIEE	2
II - LA FIBRE MUSCULAIRE LISSE	6
D - LES PROTEINES CONTRACTILES DU FILAMENT FIN	8
I - COMPOSITION DU FILAMENT FIN	8
II - L'ACTINE	8
III - LA TROPOMYOSINE	10
IV - LE COMPLEXE DES TROPONINES	12
1°) La Troponine T (TN T)	12
2°) La Troponine I (TN I)	14
3°) La Troponine C (TN C)	14
E - LES PROTEINES CONTRACTILES DU FILAMENT EPAIS	15
I - COMPOSITION DU FILAMENT EPAIS	15
II - LA MYOSINE	17
1°) Organisation générale de la molécule	17
2°) Données structurales	18
3°) Activités ATPasiques et myosine	19
4°) Autres propriétés physico-chimiques de la myosine	20
5°) Structure primaire des chaînes lourdes de la myosine	22
III - LES CHAINES LEGERES DE LA MYOSINE	24
1°) Dénomination des chaînes légères	24
2°) Notion d'isoenzymes de myosine dont les différences se situent au niveau des chaînes légères	25
3°) Structures primaires des chaînes légères	26
4°) Les chaînes légères alcalines et leurs gènes	27
5°) Role biologique des chaînes légères	29
6°) Reconnaissance Chaines légères-Chaines Lourdes	30
F - LES AUTRES PROTEINES CONTRACTILES...	33
CONCLUSION	33
<u>CHAPITRE II : PREPARATION DES CHAINES LEGERES ALCALINES DE MYOSINES DE DIFFERENTS TYPES DE MUSCLES</u>	35
A - INTRODUCTION	35
B - ETUDE DES CHAINES LEGERES DE TYPE ALCALINE DE MYOSINES DE MUSCLES LISSES	36
I - GENERALITES	36
II - PREPARATION DE LA CHAINE LEGERE ALCALINE DU MUSCLE LISSE DE VERTEBRE : L'UTERUS DE VACHE	36
1°) Introduction	36
2°) Résultats	37
III - PREPARATION DE LA CHAINE LEGERE ALCALINE DE LA MYOSINE DE MUSCLE D'INVERTEBRE : LE MUSCLE RETRACTEUR ANTERIEUR DU BYSSUS [ ABRM ] DE LA MOULE	37
1°) Introduction	37
2°) Préparation de la chaîne légère alcaline de la myosine d'ABRM de Moule	38
IV - CONCLUSION	41

C - ETUDE DES MYOSINES DE MUSCLES SQUELETTIQUES DE DIFFERENTES ESPECES	41
I - LES MYOSINES DE MUSCLES SQUELETTIQUES A L'ETAT ADULTE	43
1°) L'électrophorèse en présence de SDS à pH 8,4	43
2°) L'électrophorèse en présence d'urée 8 M	47
3°) Conclusion	47
II - LES MYOSINES DE MUSCLES SQUELETTIQUES A DIFFERENTS STADES DE LA DIFFERENCIATION	47
1°) La myosine foetale de Porc	47
2°) Les myosines foetales et tumorales de Lapin, de Rat et de l'Homme	49
3°) Conclusion	50
D - ETUDE DES CHAINES LEGERES DES MYOSINES CARDIAQUES	50
I - PREPARATION DE LA MYOSINE VENTRICULAIRE GAUCHE DE COEUR DE PORC	51
II - PREPARATION DES CHAINES LEGERES DE LA MYOSINE VENTRICULAIRE GAUCHE DE COEUR DE PORC	52
1°) La chromatographie d'échange d'ions	53
2°) La chromatographie de gel filtration	53
3°) La précipitation dite "isoélectrique"	53
4°) L'électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide	54
III - CONCLUSION	55
<u>CHAPITRE III</u> : ETUDE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE LA CHAINE LEGERE L <sub>27</sub> DE LA MYOSINE VENTRICULAIRE DE COEUR DE PORC	56
A - INTRODUCTION	56
B - STRATEGIE GENERALE	57
I - HYDROLYSES ENZYMATIQUES DE L'ALC-L <sub>27</sub>	58
II - LES METHODES CHIMIQUES	61
1°) Action du bromure de cyanogène	61
2°) Action de l'acide 2-nitro 5-thiocanatobenzoïque	61
3°) Action de la N-Bromosuccinimide	63
III - CONCLUSION	63
C - FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS DE L'ALC-L <sub>27</sub>	64
I - PAR LES METHODES DITES "CLASSIQUES"	64
1°) Fractionnement de l'hydrolysats obtenu après action du bromure de cyanogène	64
2°) Fractionnement de l'hydrolysats tryptique	67
3°) Fractionnement de l'hydrolysats chymotrypsique	72
4°) Fractionnement des autres hydrolysats	72
II - PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (HPLC)	72
1°) Fractionnement de l'hydrolysats obtenu après action du BrCN	72
2°) Fractionnement de l'hydrolysats tryptique de L'ALC-L <sub>27</sub> préalablement citraconylée	77
3°) Fractionnement de l'hydrolysats chymotrypsique	79
4°) Fractionnement des hydrolysats obtenus par d'autres types d'endopeptidases	86
5°) Conclusion	89
D - RESULTATS DE SEQUENCE	89
I - INTRODUCTION	89
II - PEPTIDES OBTENUS APRES ACTION DU BrCN (CB-PEPTIDES)	90
1°) Peptides obtenus après préfractionnement sur colonne semi-préparative de l'hydrolysats total	90
2°) Peptides obtenus par fractionnement sur colonne RO-Waters	90

III - PEPTIDES OBTENUS APRES ACTION DE LA TRYPSINE LIMITEE AUX LIAISONS ARGINYL ( Tc-PEPTIDES)	92
IV - PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES	98
1°) Les peptides obtenus à partir de l'hydrolysats total	98
2°) Les peptides chymotrypsiques obtenus après préfractionnement sur colonne de DEAE-Trisacryl	98
V - PEPTIDES OBTENUS APRES ACTION DE LA COLLAGENASE	100
VI - ETABLISSEMENT DE LA SEQUENCE PARTIELLE ET CONCLUSION	100
E - ETUDE STRUCTURALE DES REGIONS N- ET C-TERMINALES	104
I - ETUDE DE L'EXTREMITÉ C-TERMINALE ( 186-192 )	104
II - ETUDE DE LA SEQUENCE 102-114	104
III - ETUDE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE LA REGION N-TERMINALE ( POSITION 1 - 60 ) DE L'ALC-L <sub>27</sub>	107
1°) La stratégie utilisée	107
2°) Etude du fractionnement par RP-HPLC de l'hydrolysats trypsique	108
3°) Etude du fractionnement par RP-HPLC de l'hydrolysats chymotrypsique	111
4°) Conclusion : structure primaire probable de l'ALC-L <sub>27</sub>	113
 <u>CHAPITRE IV</u> : ETUDE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DE LA CHAÎNE LÈGÈRE L <sub>27</sub> DE LA MYOSINE VENTRICULAIRE DE COEUR DE PORC	
A - INTRODUCTION	116
B - PREDICTION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DE LA CHAÎNE LÈGÈRE ALC-L <sub>27</sub> PAR LA METHODE DE CHOU ET FASMAN	117
C - ETUDE PAR DICHROISME CIRCULAIRE	120
I - INTRODUCTION	120
II - ETUDE DES SPECTRES DICHROIQUES DE L'ALC-L <sub>27</sub>	120
1°) Le spectre dichroïque de l'ALC-L <sub>27</sub>	120
2°) Etude des interactions de l'ALC-L <sub>27</sub> par dichroïsme circulaire	122
III - ETUDE DES SPECTRES DICHROIQUES DU FRAGMENT N-TERMINAL DE L'ALC-L <sub>27</sub>	124
1°) Introduction	124
2°) Etude des spectres dichroïques du fragment N-terminal	124
3°) Etude par dichroïsme circulaire des interactions peptide CB <sub>1</sub> -Actine, peptide CB <sub>1</sub> -ions divalents	127
IV- CONCLUSION	127
 <u>CHAPITRE V</u> : PARTICULARITES DE L'ALC-L <sub>27</sub> ET PRESENTATION D'UN MODELE MOLECULAIRE	
A - COMPARAISON DES SEQUENCES AMINO-ACIDES DES CHAÎNES LÈGÈRES	129
I - COMPARAISON DES STRUCTURES DES DIFFÉRENTES ALC	129
II - COMPARAISON DES STRUCTURES PRIMAIRES D'ALC ET RLC	135
B - HYDROPHILIE ET HYDROPHOBIE	138
C - CONSTRUCTION DU MODELE MOLECULAIRE DE L'ALC-L <sub>27</sub> DE LA MYOSINE VENTRICULAIRE DE COEUR DE PORC	142
 CONCLUSION	 147
 BIBLIOGRAPHIE	 151

CE TRAVAIL A FAIT L'OBJET DES PUBLICATIONS SUIVANTES :

1°) Isolement et caractérisation de la chaîne légère L<sub>17</sub> de la myosine de muscle lisse d'utérus de Vache.

D.Tetaert, O. Moreau, K.K. Han, H.F. Hildebrand et G. Biserte  
Biochimie 59 ( 1977 ) 337-339.

2°) Isolement des chaînes légères de la myosine cardiaque de Porc par électrophorèse préparative et étude des polypeptides obtenus après action du bromure de cyanogène.

X. Grandier-Vazeille et D. Tetaert  
Biochimie 60 ( 1978 ) 409-415.

3°) Etude des filaments de paramyosine de muscle lisse de Mytilus edulis L : Ultrastructure, purification et interaction paramyosine-myosine.

H.F. Hildebrand, D. Tetaert et J. Gilloteaux  
C.R.Acad.Sci. ( PARIS ) 288 D ( 1979 ) 109-112.

4°) Pig cardiac myosin isoenzymes.

X. Grandier-Vazeille, D. Tetaert, H.F. Hildebrand et G. Biserte  
Eur.J. Cell Biol. 21 ( 1980 ) 116-121.

5°) Partial amino acid sequence of pig heart left ventricle myosin light chain " L<sub>27</sub> ".

X. Grandier-Vazeille, D. Tetaert, B. Hémon, K.K. Han et G. Biserte  
Protides Biol. Fluids Proc.Colloq. 28 ( 1980 ) 75-78.

6°) Ni<sub>3</sub>S<sub>2</sub>-induced leiomyosarcomas in rabbit skeletal muscle : Analysis of the tumoral myosin and its significance in the retrodifferentiation concept.

H.F. Hildebrand et D. Tetaert  
Oncodevelopmental Biol. Med. 2 ( 1981 ) 101-108.

7°) Evaluation of commercial RP-HPLC columns for the separation of peptides from porcine cardiac myosin light chain L<sub>27</sub>.

X. Grandier-Vazeille, D. Tetaert, B. Hémon et G. Biserte.  
Protides Biol. Fluids Proc.Colloq. 30 ( 1982 ) 717-721.

8°) Partial amino acid sequence of 27000-daltons light chain of pig left ventricular cardiac myosin : comparison with the primary structures of some high molecular weight myosin light chains.

D. Tetaert, X. Grandier-Vazeille, B. Hémon et G. Biserte  
J. Muscle Res. Cell Motility 3 ( 1982 ) 474-475.

9°) Phylogenetic studies of cardiac myosins from amphibia to mammals.

X. Grandier-Vazeille, D. Tetaert, B. Hémon et G. Biserte  
Comp. Biochem. Physiol. 76B ( 1983 ) 263-270.

10°) HPLC methodology for large hydrophobic peptides purification.

X. Grandier-Vazeille et D. Tetaert  
J. of Chromatogr. 296 ( 1984 ) 301-308.

#### EN PREPARATION

- Comparative electrophoretic study of myosin light chains in eight species from invertebrate to vertebrate skeletal muscle.
- Structural and conformational studies on pig alkali cardiac myosin light chain.

CE TRAVAIL A EGALEMENT ETE PRESENTE SOUS FORME D'AUTRES PUBLICATIONS,  
D'AUTRES COMMUNICATIONS ORALES OU PAR AFFICHES :

1°) Etude du filament épais du muscle lisse ABRM et PBRM de la Moule  
*Mytilus edulis* L.

H.F. Hildebrand et D.Tetaert

Journées Francophones du Muscle MONTPELLIER 15-16 septembre 1976

2°) Etude des chaînes légères de la myosine de muscle lisse d'utérus de  
Vache.

D. Tetaert, X. Grandier-Vazeille, K.K. Han et G. Biserte

Présentation orale Journées Francophones du Muscle MONTPELLIER 15  
septembre 1976

3°) Comparative ultrastructural and biochemical studies of adult, fetal  
and tumoral myosins of rat and rabbit skeletal muscle.

H.F. Hildebrand, J.P. Kerckaert, G. Biserte, X. Grandier-Vazeille et  
D. Tetaert

Proceedings of the VI<sup>th</sup> Meeting of the European Muscle Club SACLAY  
29-30 septembre 1977 pp 6.

4°) Isolement des chaînes légères de la myosine cardiaque de Porc par  
électrophorèse préparative et étude des polypeptides obtenus après  
action du bromure de cyanogène.

X. Grandier-Vazeille, D. Tetaert, H.F. Hildebrand et J.P. Kerckaert

Journées Francophones du Muscle LOUVAIN EN WOLUVE 10-11 mars 1978.

5°) La myosine : structure et rôle dans la contraction musculaire.

D. Tetaert, X. Grandier-Vazeille, O. Moreau, K.K. Han, H.F. Hildebrand  
et G. Biserte

Journées Biomédicales LILLE mai 1978.

6°) Myosines tumorales des rhabdomyosarcomes chimio-induits :  
comparaison avec les myosines des muscles foetaux et adultes du Rat et  
du Lapin

H.F. Hildebrand, J.P. Kerckaert, G. Biserte, X. Grandier-Vazeille et  
D. Tetaert

Forum des Jeunes Checheurs VILLENEUVE-D'ASCQ 27-29 juin 1978.

7°) Préparation et étude de la structure primaire des chaînes légères de la myosine cardiaque de Porc

X. Grandier-Vazeille, D. Tetaert, H.F. Hildebrand et J.P. Kerckaert

Forum des Jeunes Chercheurs VILLENEUVE D'ASCQ 27-29 juin 1978.

8°) Differences between left and right ventricular myosins : existence of pig cardiac myosin isoenzymes

X. Grandier-Vazeille, D. Tetaert, H.F. Hildebrand et G. Biserte

Proceedings of the VII<sup>th</sup> European Conference on Muscle and Cell Motility

VARSOVIE 29 juin-1 juillet 1978 pp 92-93.

9°) Perineal rhabdomyosarcoma of a new born child : clinical and biochemical studies with emphasis on diagnostical interest.

H.F. Hildebrand, I. Krivosik, G. Biserte, D. Tetaert et

X. Grandier-Vazeille

Proceedings of the VII<sup>th</sup> European Conference on Muscle and Cell Motility

VARSOVIE 29 juin- 1 juillet 1978 pp 99.

10°) Myosin of Ni<sub>3</sub>S<sub>2</sub>-induced rhabdomyosarcoma : a new oncofetal isoenzyme.

H.F. Hildebrand, J.P. Kerckaert, G. Biserte, X. Grandier-Vazeille

et D. Tetaert

Proceedings of the VI<sup>th</sup> Meeting International Research Group for

Carcino-embryonic Proteins MARBURG 17-21 septembre 1978.

11°) Quelques données de structure primaire des protéines contractiles

K.K. Han, D. Tetaert, X. Grandier-Vazeille et G. Biserte

Journée Francophone du Muscle LILLE 28 avril 1979

( Comité Organisateur : D. Tetaert, H.F. Hildebrand,

X. Grandier-Vazeille et G. Biserte ).

12°) New evidences of pig cardiac myosin isoenzymes

X. Grandier-Vazeille, D. Tetaert, B. Hémon et P. Lemay

Proceedings of the VIII<sup>th</sup> European Conference on Muscle and Cell Motility

HEIDELBERG 17-20 septembre 1979 pp 11.

13°) L'actine

D. Tetaert

Encycloepadia Universalis vol. 19 ( 1979 ) pp 15.

ABBREVIATIONS UTILISEES :

- ALC-L(27) = Chaîne légère de la myosine de type "alcaline" de poids moléculaire apparent (27000).
- RLC = Chaîne légère de la myosine de type "régulatrice".
- RP-HPLC = Chromatographie liquide haute performance effectuée sur colonne en phase inversée.
- RØ = Colonne HPLC en phase inversée du type phényl.
- BrCN = Bromure de cyanogène.
- ATP, ADP, AMP = Adénosine Tri, Di ou Monophosphate.
- SDS = Sodium Dodécyl Sulfate.
- NTCBA = Acide Nitrothiocyanatobenzoïque.
- NBS = N-Bromosuccinimide.
- TFA = Acide trifluoroacétique.
- PITC = Phényl-isothiocyanate.
- PTH = Phényl-thiohydantoïne.
- DNS-AA =  $\alpha$ -Dansyl amino acide.
- DEAE- = Diéthylaminoéthyl- .
- Tc-, CB-, T-, C-, Sp-peptides = Peptides libérés après action de la trypsine sur la chaîne légère citraconylée (Tc), après action du BrCN (CB), après action de la trypsine (T), après action de la chymotrypsine (C), après action de la protéase extraite de *Staphylococcus aureus* (Sp).
- SAV<sub>8</sub> = Endopeptidase extraite de *Staphylococcus aureus* V<sub>8</sub>.
- GSMS = Protéase extraite de la glande sous-maxillaire de Souris.
- $\alpha_n$  = Hélice  $\alpha$  dont la position n dépend de sa place dans la séquence.
- $\beta_n$  = Feuillet plissé  $\beta$ .
- ABRM = Muscle rétracteur antérieur du byssus ( de la Moule ).
- G- et F-Actine = Actine Globulaire et Actine Filamenteuse.
- TN T, TN I et TN C = Troponine T, I et C.
- LMM, HMM, HMM-S<sub>1</sub> = Méromyosine Légère, Méromyosine Lourde, Sous-fragment <sub>1</sub> de la Méromyosine Lourde.

Le code à une seule lettre des acides aminés a été adopté selon la nomenclature de :

IUPAC-IUB " Commission on Biochemical Nomenclature " ( 1968 )  
J.Biol.Chem. 243 3557-3559.



# **CHAPITRE I**

## **GENERALITES**

## A - INTRODUCTION

Parmi les nombreuses propriétés des cellules vivantes, la plus caractéristique, la plus générale, est la motilité. Elle se traduit par un changement " actif " de la structure cellulaire et cela, contrairement aux mouvements passifs des molécules liés à l'agitation thermique et qui se font parfaitement au hasard en ne consommant que de l'énergie cinétique. Les mouvements cellulaires, en effet, sont toujours associés au niveau moléculaire à deux protéines particulières encore appelées protéines fibreuses : la myosine et l'actine. L'interaction entre ces deux composants se traduit par une consommation d'énergie obtenue par hydrolyse de l'adénosine triphosphate ( ATP ). Chez les vertébrés, la motilité cellulaire est le fait de cellules spécialisées : les myocytes ou cellules musculaires.

## B - LES SYSTEMES MUSCULAIRES

Selon leur origine embryologique, la différenciation des myoblastes conduit à la formation de trois types fondamentaux de cellules ou fibres musculaires : les fibres musculaires lisses, striées cardiaques et striées de muscle squelettique. En général, les cellules s'associent et sont en rapport direct avec les éléments conjonctifs, les axes vasculaires et nerveux.

Relativement peu différenciées, les cellules musculaires lisses sont des éléments allongés de dimension microscopique, qui forment l'essentiel de la tunique musculaire des artères, des viscères et de leurs canaux excréteurs. Elles sont l'essentiel des sphincters. Les fibres musculaires lisses ont une contraction lente et soutenue.

Bien que d'origine mésenchymateuse, les cellules musculaires du myocarde sont cependant de type striées. Ce sont des cellules de petite taille, ramifiées et anastomosées en réseau syntical qui les distinguent ainsi des fibres striées de muscle squelettique.

D'origine épithéliale, le tissu musculaire strié de muscle squelettique est formé d'éléments indépendants très allongés ( plusieurs cm ). Ce sont de véritables cellules géantes responsables de l'activité contractile dont dépend la vie de relation. Elles constituent les fibres musculaires liées au squelette, fibres qui ont été particulièrement étudiées et parmi lesquelles deux types de fibres striées ont été mises en évidence selon leur abondance respective en myofibrilles et aussi en

fonction du contenu du sarcoplasme : les fibres rouges et les fibres blanches . Aujourd'hui, grâce à des méthodes immunohistochimiques, quatre types de fibres striées ont été caractérisées sur la base de leur propriétés enzymatiques et contractiles ( Gauthier et al 1982 [28] ) ( Tableau I ).

## C - ORGANISATION DES FIBRES MUSCULAIRES

### I - LA FIBRE MUSCULAIRE STRIEE :

Pour donner une description générale, nous nous référons à l'organisation de la fibre musculaire striée ( type IIB blanc à contraction rapide ) du muscle squelettique. Limitée par une membrane ( le sarcolemme ) , la fibre est une cellule multinuclée qui peut contenir jusqu'à plusieurs centaines de noyaux. Ces noyaux, très allongés, sont disposés en périphérie selon le grand axe de la fibre. Celle-ci comporte, en plus des noyaux, un cytoplasme ( le sarcoplasme ) où des éléments tels que des mitochondries, appareil de Golgi, grains de glycogène ... apparemment aussi repoussés en périphérie. La majeure partie de la cellule est structurée en colonnettes ( colonnettes de Leydig ) résultant de l'assemblage de plusieurs myofibrilles ( Fig. 1 )

Le long de chaque myofibrille, l'examen microscopique montre une alternance régulière de zones claires isotropes ( Bandes I ) et de zones sombres anisotropes ( Bandes A ). Les bandes A présentent à leur partie moyenne une bande transversale plus claire à limites floues, la strie de Hansen ( Bande H ). Dans la bande H est centrée une mince ligne transversale facilement colorable : la ligne M . La ligne M est elle-même encadrée par les sous-lignes H . Les bandes I sont séparées en deux par une cloison transversale très nette : la strie Amici ou strie Z ( Fig. 1 ). L'espace compris entre deux stries Z correspond au sarcomère, qui est l'unité contractile, et qui a été schématisé dans la figure 2. Une remarquable démonstration de cette striation a été donnée par l'étude de la structure filamentaire des myofibrilles par microscopie électronique : le système contractile d'un sarcomère se compose de filaments épais ( 16 nm ) et de filaments fins ( 5 nm ), disposés côte à côte dans un double réseau hexagonal ( Fig. 2 ).

Les filaments épais occupent la partie centrale du sarcomère à l'emplacement de la bande A. Ils présentent en leur milieu un renflement, marquant la ligne M. Les filaments fins s'insèrent sur les stries Z, ils occupent les bandes I et pénètrent entre les filaments

TYPE DE FIBRE	ROUGE I	ROUGE IIA	BLANCHE IIB	INTERMEDIAIRE IIA/IIB
*****				
V Max ( Vitesse de Racourcissement)	Faible	Elevée	Elevée	
Activité ATPasique spécifique	Faible	Elevée	Elevée	
Résistance à la Fatigue	Importante	Importance relative	Faible	
Temps de Contraction Isométrique	Prolongé	Courte	Courte	
EXEMPLES DE MUSCLE	Soléus ADL Sémilendi- nosus	Pectoralis (Région Rouge ) PDL	Psoas de Lapin	Diaphragme

TABLEAU I : LES DIFFERENTS TYPES DE FIBRES MUSCULAIRES  
( D'après Gauthier et al 1982 [28] )

ADL = Muscle Antérieur Dorsal Latissimus

PDL = Muscle Postérieur Dorsal Latissimus

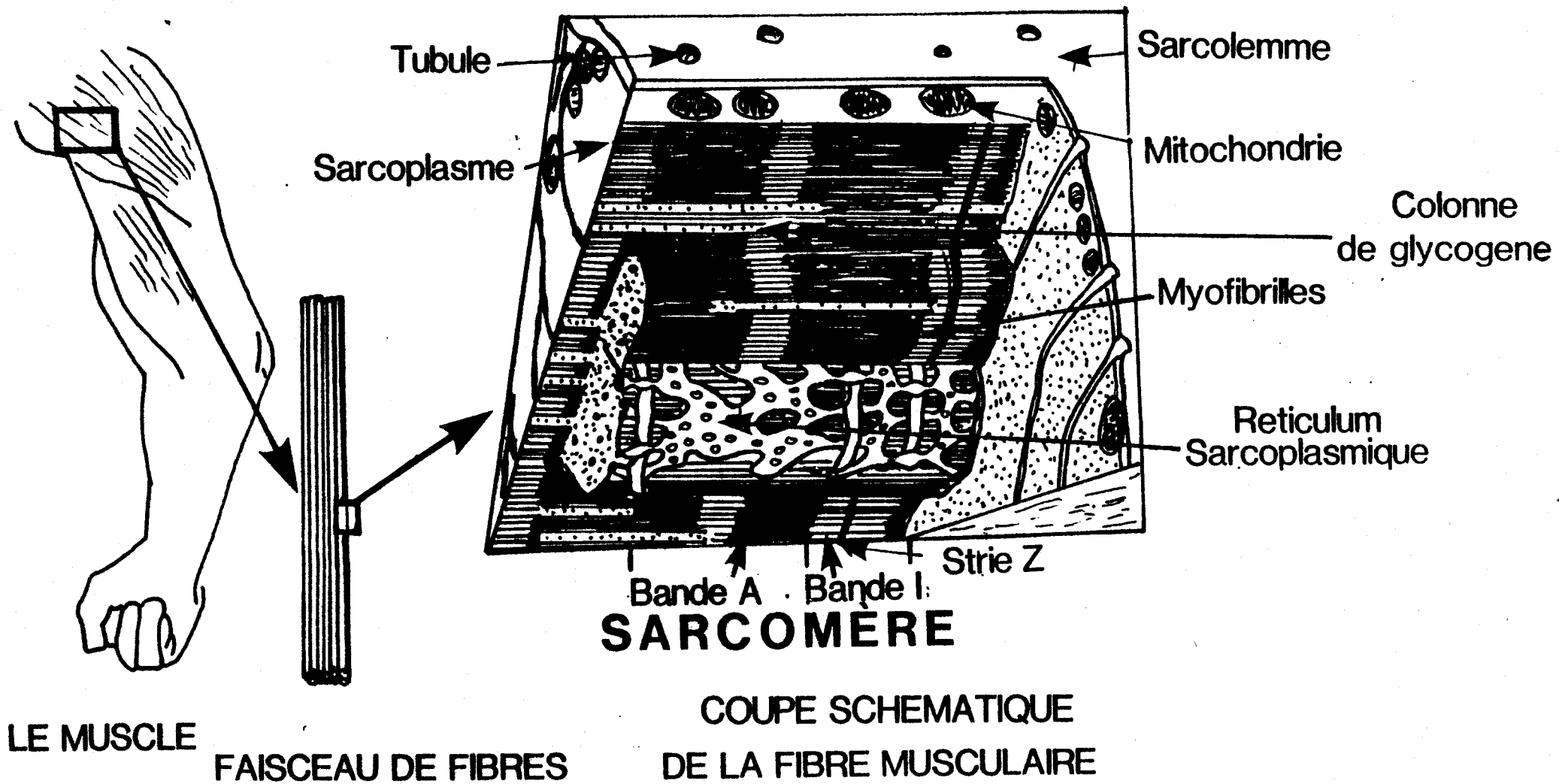


FIGURE I : LES NIVEAUX D'ORGANISATION DANS UN MUSCLE SQUELETTIQUE STRIE

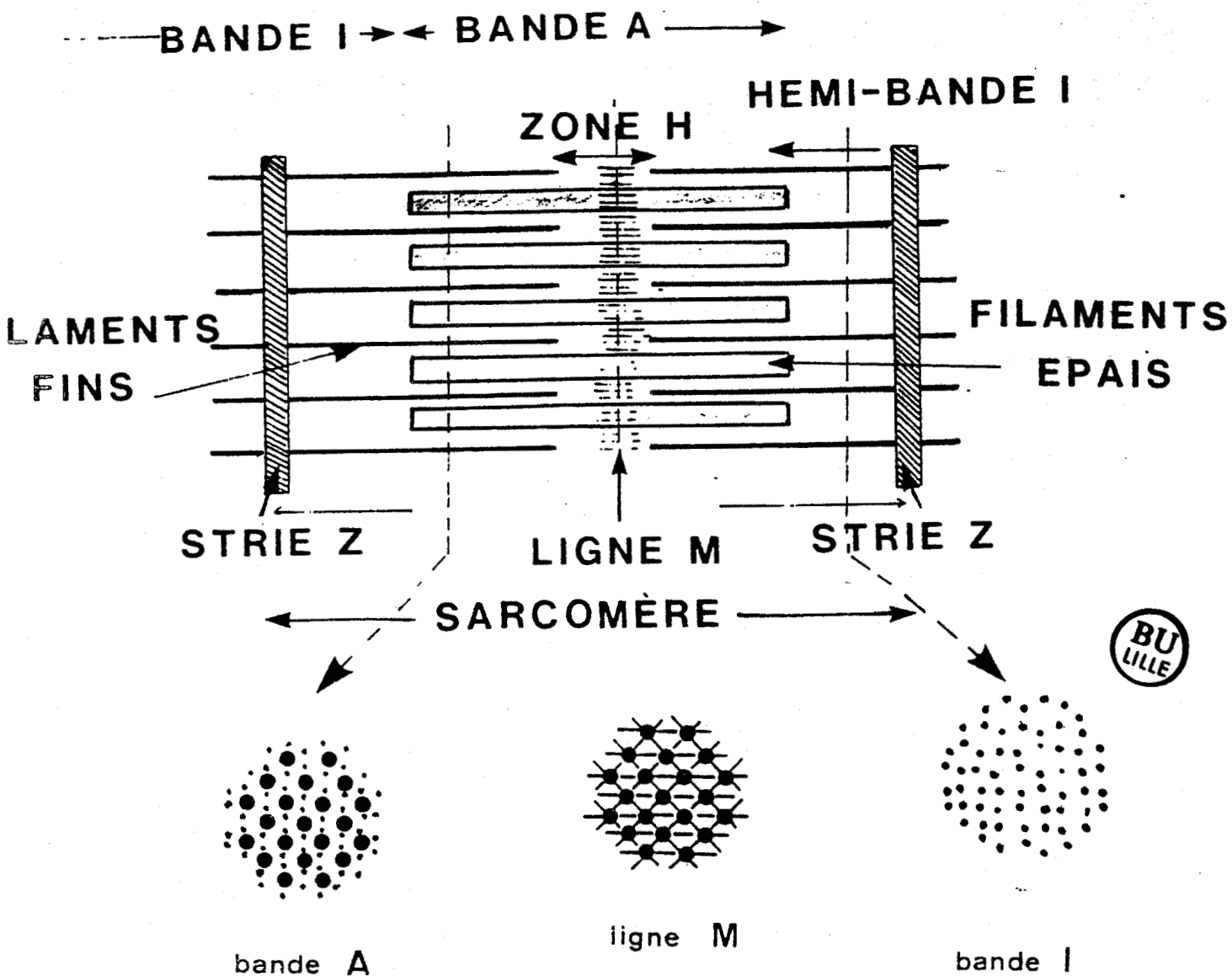


FIGURE 2 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'UNITE CONTRACTILE DU MUSCLE LE SARCOMERE

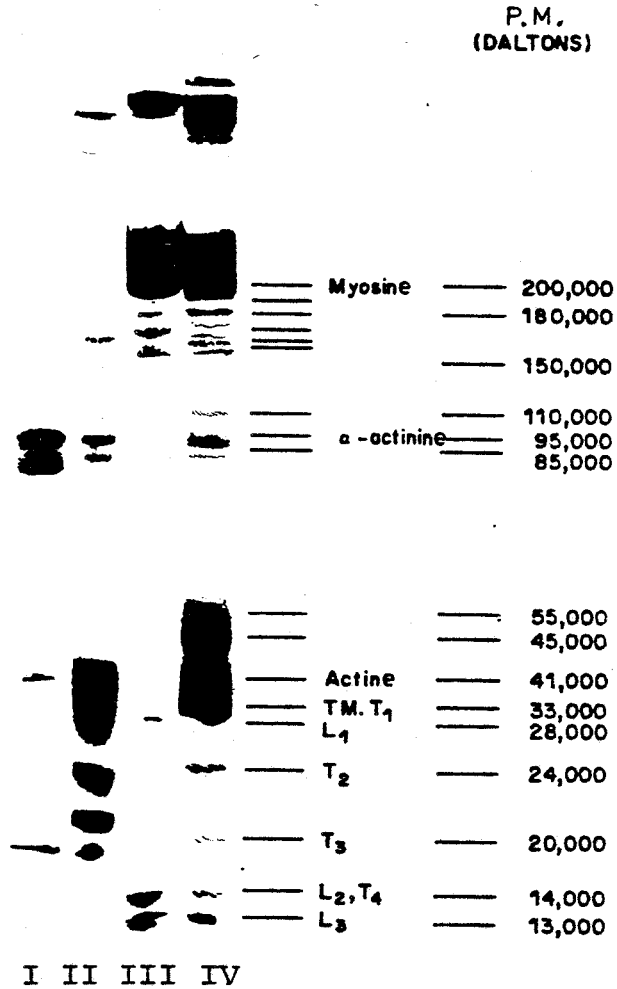
Des coupes transversales permettent de mettre en évidence l'organisation spatiales des myofilaments . Au niveau de la bande A, les filaments épais et fins se chevauchent, Au niveau de la bande I, les filaments fins d'actine sont seuls présents. Au niveau de la ligne M, les protéines M forment des ponts favorisant une meilleure cohésion des filaments épais.

épais pour former les parties latérales de la bande A. Leur absence dans la partie médiane de la bande A crée la zone plus claire H. Leurs extrémités s'interpénètrent avec celles des filaments fins du sarcomère voisin formant un double système de ponts à l'intérieur de la strie Z ( Fig. 2 ).

## II - LA FIBRE MUSCULAIRE LISSE :

Les fibres musculaires lisses sont sans striation visible au microscope à contraste de phase, lorsque le muscle est au repos, et elles ont des caractères tout à fait différents de ceux des fibres musculaires striées. Elles sont beaucoup plus courtes, plus fines et ont, en règle générale, la forme d'un fuseau effilé à ses extrémités. Elles ne possèdent qu'un seul noyau situé dans une partie renflée. 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. En microscopie électronique, la cellule lisse contient de nombreux filaments dont le calibre ( de 5 à 7 nm ) est identique à celui des myofilaments fins et épais de la fibre striée. Orientés selon le grand axe de la cellule, ils sont liés çà et là en petites gerbes au niveau de corps denses de forme oblonge ( les corps denses correspondent en quelque sorte aux stries Z du muscle strié ).

De nombreuses techniques comme l'extraction différentielle, les fractionnements sur gel, l'analyse biochimique, l'immunofluorescence etc..., les résultats ont montré que les filaments sont constitués principalement de myosine pour les filaments épais et d'actine pour les filaments fins. Cependant, l'analyse plus fine par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS met en évidence l'existence de nombreuses autres protéines myofibrillaires ( Fig. 3 ). Ces différentes protéines pour la plupart très bien " caractérisées " voient toutefois leur rôle encore mal défini. Dans les paragraphes suivants, nous avons tenté de centrer notre sujet en apportant une description des principales protéines contractiles et cela en distinguant filament fin et filament épais.



**FIGURE 3** : Analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS des protéines myofibrillaires de muscle squelettique de Lapin ( D'après Etlinger & Fishman 1972 ) [24 ]

Dans les conditions d'extraction utilisées par Etlinger & Fishman ( I à IV ), différentes protéines myofibrillaires sont obtenues : TM = Tropomyosine ; T<sub>1</sub> à T<sub>4</sub> = les Troponines ; L<sub>1</sub> , L<sub>2</sub> & L<sub>3</sub> = les trois chaînes légères de la myosine.



## D - LES PROTEINES CONTRACTILES DU FILAMENT FIN

### I - COMPOSITION DU FILAMENT FIN :

La structure du filament fin dans son détail a été obtenue grâce à des travaux de microscopie électronique et de diffraction aux rayons X. Au microscope électronique, le filament fin se présente ainsi sous la forme de deux brins torsadés en hélice dont le pas est de 72 nm. Les brins sont constitués d'éléments globulaires de 5,5 nm de diamètre ( Huxley 1963 [48] ) : les molécules de G-actine ( Fig. 4 ).

Par des méthodes immunochimiques, il a été possible de caractériser dans ce filament fin :

- un filament très fin de 2 nm de diamètre qui s'étend sur toute la longueur de la double hélice d'actine et qui y est logé dans sa gorge. Ce filament est constitué de tropomyosine contenant deux chaînes polypeptidiques très semblables s'enroulant l'une autour de l'autre. Ce filament de tropomyosine est long de 40 nm et il s'étend sur 7 molécules de G-actine ( Taylor 1972 [115] ).

- des molécules globulaires qui forment le complexe des troponines et qui sont réparties tous les 40 nm environ. Ce complexe est légèrement allongé et il est comparable en taille à celui de la G-actine ( 6,5 nm ). Ce complexe est constitué de trois chaînes polypeptidiques présentes approximativement en rapport équimolaire la troponine-T ( TN T ), la troponine-I ( TN I ) et la troponine-C ( TN C ). Ce complexe est lié au filament fin par les filaments de tropomyosine ( Taylor 1972 [115] ).

### II - L'ACTINE :

L'actine est une protéine ubiquitaire, " universelle " puisqu'elle a pu être identifiée jusqu'à présent dans le cytoplasme de plus de cinquante cellules eucaryotes différentes aussi bien animales que végétales : comme par exemple dans le cytoplasme de l'algue verte Nitella, l'enveloppe du virus Myxovirus influenza, dans les cellules nerveuses ( où elle pourrait assurer le transport axonal ) etc....

L'actine représente 25% des protéines myofibrillaires du muscle ( Porzio et Pearson 1977 [100] ) et elle est caractérisée comme un filament de 5 à 7 nm de diamètre, constituée par polymérisation de plusieurs monomères de G-actine. Le monomère de G-actine ( de poids moléculaire 43.000 environ ) est une chaîne polypeptidique de 374

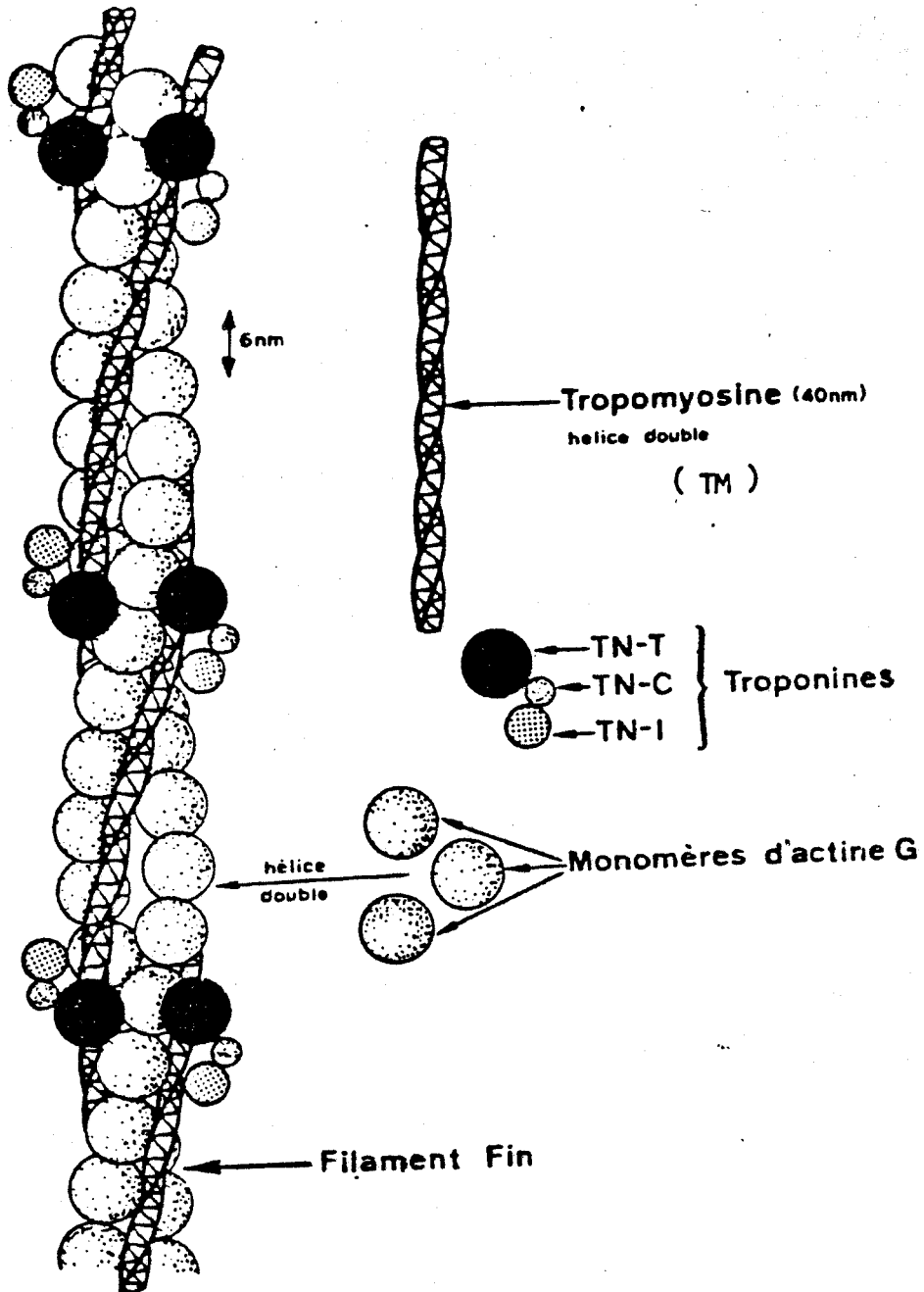


FIGURE 4 : Organisation des protéines du filament fin ( D'après Gillis 1975 [30] ).

résidus dont la structure primaire a été complètement déterminée pour le muscle squelettique de Lapin ( Elzinga et al. 1973 [22]). Les monomères de G-actine ont la capacité de se disposer par polymérisation de façon à former une torsade à double brins : la F-actine. Une caractéristique importante des molécules de G-actine est de ne pas être sphérique de façon symétrique, si bien qu'il est possible de distinguer une partie antérieure et une partie postérieure. Lorsque les molécules d'actine s'assemblent en filament de F-actine, il est donc possible de reconnaître une polarité au filament. L'élongation s'effectue toujours dans le même sens, c'est à dire que la partie antérieure du monomère s'assemble à la partie postérieure d'un autre monomère en respectant un certain angle et en donnant un aspect torsadé au filament fin.

L'actine participe à de nombreuses interactions moléculaires, mais celles-ci paraissent être des plus importantes dans la cellule musculaire ( Tetaert 1980 [116] ). Les principales interactions de l'actine musculaire sarcomérique sont sa liaison aux cations divalents (  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$  ), sa liaison avec les nucléotides (ATP et ADP ), son interaction avec le complexe tropomyosine-troponines et surtout son interaction avec la myosine. Cette dernière propriété est d'ailleurs un moyen de " caractériser " l'actine car il est possible de " décorer " les filaments avec des sous-fragments HMM-S<sub>1</sub> ( cf.paragraphe myosine ) de la myosine qui apparaissent alors en microscopie électronique organisés sous forme " d'épi " caractéristique.

### III - LA TROPOMYOSINE :

La tropomyosine ( de poids moléculaire 68.000 ) est une protéine complètement hélicoïdale formée de deux brins torsadés . En microscopie électronique, il nous a été possible de l'observer sous forme de paracristal caractéristique ( Fig. 5 ). Lors de l'étude de la structure de la tropomyosine de muscle squelettique de Lapin, il a été montré que l'action d'agents réducteurs permet la libération de deux chaînes polypeptidiques presque identiques ( Woods 1969 [139] ) : une forme  $\alpha$  ( poids moléculaire 36.000 ) qui contient un seul résidu de cystéine et une forme  $\beta$  ( poids moléculaire 32.000 ) qui contient deux résidus de cystéine. L'une des caractéristiques essentielles de ces deux formes  $\alpha$  et  $\beta$  est l'absence de résidu de proline dans leur composition en acides aminés ( Taylor 1972 [115]), ce qui donne à l'édifice moléculaire une structure tridimensionnelle complètement hélicoïdale.

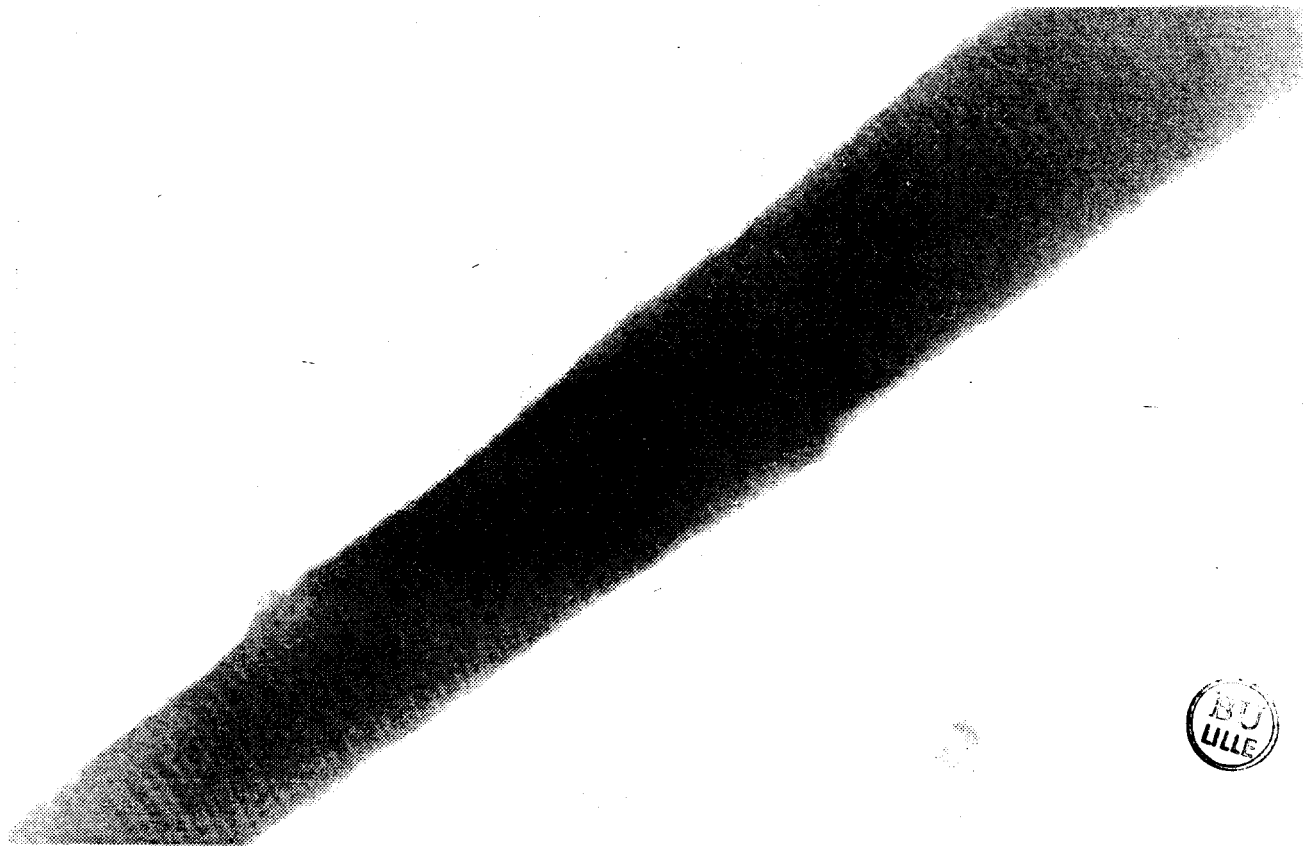


FIGURE 5 : Observation d'un paracristal de Tropomyosine en microscopie électronique de contraste de phase montrant sa striation caractéristique ( X 120,000 )

La répartition des deux formes  $\alpha$  et  $\beta$  varie en fonction de l'espèce et du muscle étudié. Les microhétérogénéités observées par isoélectrofocalisation ( Cummins et Perry 1973 [13] ) ont été attribuées aux formes phosphorylées des tropomyosines ( Lewis et Smillie 1980 [73] ).

#### IV - LE COMPLEXE DES TROPONINES :

Le complexe des troponines est constitué de trois protéines distinctes : la TN T capable de se lier à la tropomyosine, la TN I qui, une fois phosphorylée, inhibe l'activité ATPasique de l'actomyosine et la TN C qui fixe le calcium.

##### 1°) LA TROPONINE-T ( TN T ) :

Du complexe des troponines, la TN T est la protéine dont la taille moléculaire est la plus élevée. Cependant, de nombreuses études sur la TN T ont montré que selon les espèces, il existe une grande hétérogénéité concernant son poids moléculaire apparent :

par exemple, la TN T de muscle squelettique chez le Lapin possède un poids moléculaire d'environ 37.000 alors que chez le Poulet la TN T possède un poids moléculaire de 45.000 ( Weber et Murray 1973 [129] ; Hitchcock et al 1973 [44] ).

La structure de TN T la mieux connue est celle extraite de muscle squelettique de Lapin. Elle correspond à une chaîne polypeptidique de 259 résidus ( PM = 30.503 daltons ) dont le résidu en position N-terminale est N-bloqué ( acétyl-sérine ). La prédiction de structure secondaire selon la méthode de Chou et Fasman ( 1978 ) [10] a permis de construire un modèle moléculaire avec 37% d'hélice  $\alpha$  dont deux longs segments hélicoïdaux entre résidus ( 80-102 et 122-146 ). A partir de ce modèle moléculaire, Pearlstone et al ( 1976 [94] ) en ont déduit que ces deux régions hélicoïdales sont indispensables dans le phénomène d'interaction avec la tropomyosine ( Fig. 6 ). Ainsi, les sites de phosphorylation de la TN T en position N°1 et en position N°149 ou 150 peuvent-ils être nettement différenciés. Pour Pearlstone et al ( 1976 [94] ) :

\* le site 1 se trouve dans une région très acide correspondant de ce fait à la zone d'interaction TN T- TN I dont le caractère très basique serait l'élément favorisant le rapprochement et " l'accrochage " intermoléculaire.

\* le site 149/150 a lui une spécificité : l'interaction TN T - tropomyosine.

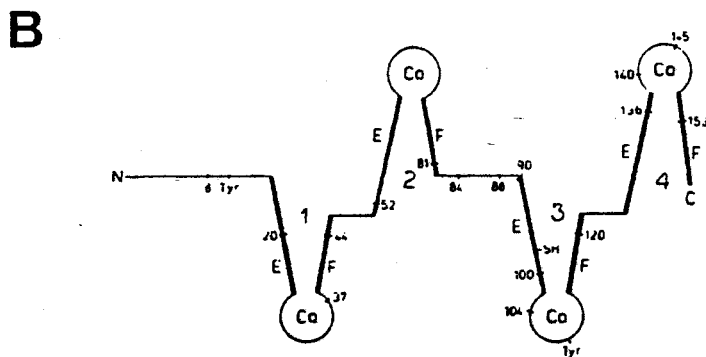
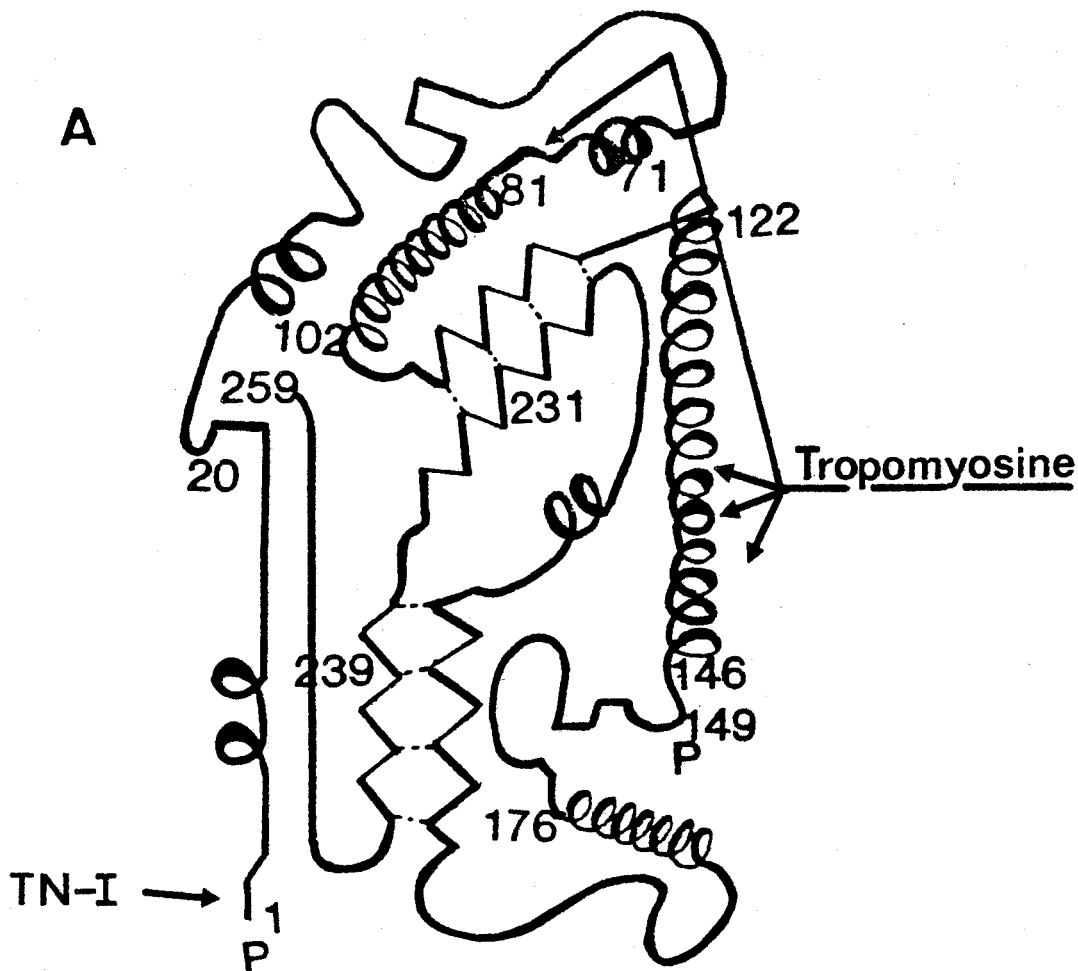


FIGURE 6 : STRUCTURE DES TROPONINES

( A ) Structure tridimensionnelle de la Troponine-T de muscle squelettique de Lapin ( D'après Pearlstone et al., 1976 [92] ). Dans le texte, nous décrivons les différentes interactions de la TN T avec les autres protéines du filament fin.

( B ) Structure secondaire de la Troponine C ( D'après Kretsinger et Nockolds 1973 [65] ). Les sites de fixation des ions calcium sont entourés de zones hélicoïdales ( E , F ) hydrophobes, apparaissant en trait plus marqué.

Dans cette étude, il est intéressant de souligner qu'à partir d'une prédiction de structure secondaire il est possible de déduire les probables interactions entre protéines contractiles.

### 2°) LA TROPONINE-I ( TN I ) :

La TN I apparaît sous de multiples formes moléculaires qui sont spécifiques des différents types de cellules musculaires striées ( Dhoot et al 1978 [16]). Comme pour de nombreuses protéines contractiles, l'extrémité N-terminale de la TN I est N-bloquée par un résidu de N-acétyl sérine. La comparaison des séquences de TN I de muscle squelettique de Lapin avec celle extraite de muscle squelettique de Poulet montre le caractère très conservatif de la structure des TN I : seulement 34 mutations sur 182 résidus et une délétion de trois résidus en position 152-154 . Par contre, la comparaison des séquences de TN I de muscle squelettique et de celle de muscle cardiaque révèle très peu d'homologie si ce n'est dans la région présumée de liaison avec l'actine, région responsable de l'inhibition de l'actomyosine ATPase. Ce fait est à rapprocher du caractère très conservatif de l'actine quelque soit le type de muscle envisagé. Les différences les plus importantes sont retrouvées dans la région N-terminale qui apparaît être le site le plus probable de fixation de la TN C ( Wilkinson et Grand 1978a [135] ).

Les sites majeurs de phosphorylation sont connus et sont le fait d'une phosphorylase kinase et d'une protéine kinase AMP-cyclique dépendante. Pour la TN I de muscle squelettique de Lapin il s'agit des résidus de thréonine ( position 37 ) et de sérine ( position 146 ) qui sont les sites phosphorylés ( Wilkinson et Grand 1978b [136] ).

### 3°) LA TROPONINE-C ( TN C ) :

La TN C possède un poids moléculaire variable selon le muscle étudié : de 20.000 daltons pour la TN C de muscle cardiaque et de 18.000 daltons pour celle de muscle squelettique ( Greaser et Gergely 1971 [37] ). La TN C est une protéine riche en résidus d'acides aminés chargés négativement qui sont souvent groupés en doublet ou en triplet. La comparaison des structures primaires de TN C avec celles des calcioprotéines ( la parvalbumine de Carpe par exemple ) a permis de proposer une structure tridimensionnelle ( Collins 1974 [11] ; Kretsinger et Barry 1975 [66] ) : la TN C apparaît constituée de quatre régions distinctes ( I à IV ) et dans chaque région sont retrouvés de nombreuses homologies de séquence en particulier dans le site de

fixation des ions calcium. Des régions hélicoïdales entourent chaque boucle du site calcique ( Fig. 6 ). Les sites I et II sont les sites spécifiques du calcium tandis que les sites III et IV sont des sites calcium-magnésium de faible affinité ( Leavis et Kraft 1978 [70] ).

## E - LES PROTEINES CONTRACTILES DU FILAMENT EPAIS

### I - COMPOSITION DU FILAMENT EPAIS:

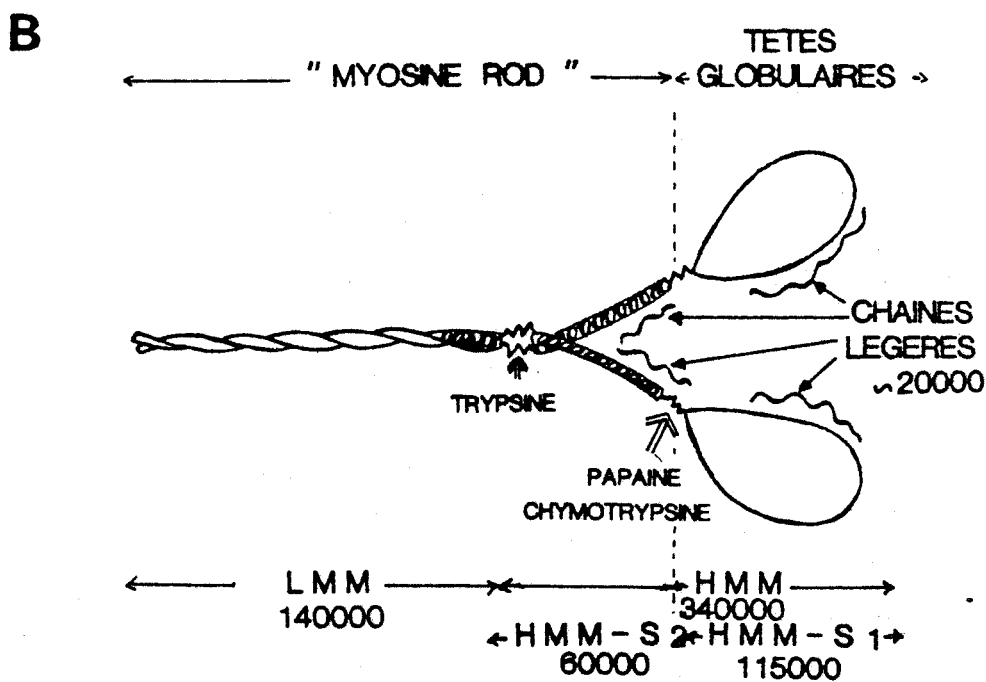
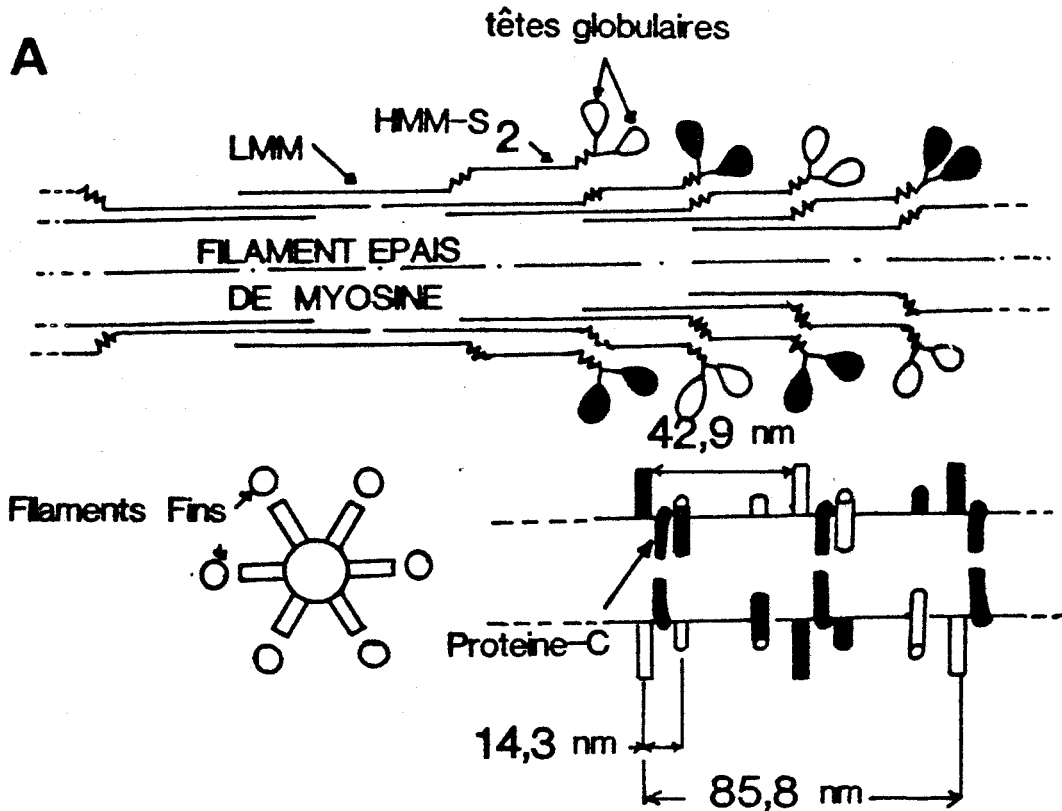
Les filaments épais de la fibre musculaire striée ont un diamètre de 13 nm et une longueur de 1.500 nm environ. Dans le cas du muscle lisse, les filaments épais ont une longueur variable, un diamètre de 10 à 35 nm mais n'apparaissent généralement en microscopie électronique que lorsque le muscle est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

Les filaments épais sont des filaments cylindriques aux extrémités coniques et sont principalement constitués de myosine. Ils ont dans la partie médiane un épaissement de 60 à 70 nm qui paraît plus dense en microscopie électronique ( la ligne M constituée de M-protéines ). De part et d'autre de la ligne M, les filaments épais sont décorés de projections latérales ( longues de 7 à 10 nm ) régulièrement arrangées qui correspondent aux têtes globulaires des molécules de la myosine ( Pepe et Drucker 1979 [95] ) et chaque plan est séparé du suivant de 14,3 nm ( Huxley et Brown 1967 [51] ). Les têtes globulaires ou projections sont disposées selon une hélice dont le pas est de 42,9 nm ( Fig. 7 ).

Une coupe transversale de la partie médiane du filament épais révèle l'existence d'autres protéines que la myosine ( Fig. 2 ) : les protéines M qui s'organisent en filament de 5 à 6 nm ( les filaments M ). Ces filaments M sont parallèles aux filaments épais de myosine auxquels ils sont reliés par des ponts ( les ponts M ) de 4 nm de diamètre. 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 des M-protéines est d'assurer la cohésion entre toutes les protéines du filament épais au niveau de la ligne M.

Deux types de M-protéines ont été caractérisées. Le premier composant adhère directement aux filaments épais ( Eaton et Pepe 1972 [17]; Mani et Kay 1978 [81] ). Cette M-protéine a une constante de sédimentation d'environ 5 S et un poids moléculaire de 165.000. C'est une protéine monocaténaire contenant 13% d'hélice  $\alpha$  et 35% de structure  $\beta$  ( Landon et Oriol 1975 [69] ).





BU LILLE

**FIGURE 7 : ORGANISATION DU FILAMENT EPAIS (A) & STRUCTURE GENERALE DE LA MOLECULE DE MYOSINE (B)**

Le second composant ( PM = 88.000 daltons se présentant sous forme de dimère ) a été identifié et possède une activité créatine-kinase ( Turner et al 1973 [119] ). Cette protéine pourrait aussi jouer un rôle d'agent de pontage entre les différentes molécules de myosine ( Walliman et al 1975 [126] ).

Au total les M-protéines auraient surtout pour rôle de maintenir les filaments épais dans leur propre alignement quand la distance inter-filamentaire augmente lors du raccourcissement du sarcomère ( Knappeis et Carlsen 1968 [63] ).

La protéine-C est une autre protéine qui assure la cohésion du filament épais ( Fig. 7 ). C'est une protéine monocaténaire de 140.000 daltons représentant 2% des protéines myofibrillaires. Des études de dichroïsme circulaire ont montré que son taux en hélice  $\alpha$  est nul, que sa structure secondaire est 50% en feuillets  $\beta$  et 50% en pelote statistique. Sa fonction exacte n'est pas bien définie, mais il semblerait qu'elle agisse comme une pince afin d'éviter la dislocation du filament épais au moment de la formation des complexes d'actomyosine. La protéine-C pourrait également avoir une fonction régulatrice bien qu'elle ne possède pas d'activité ATPasique et ne fixe pas les ions calcium en présence de magnésium ( Offer 1973 [92] ).

## II - LA MYOSINE:

Dans les cellules musculaires, la myosine est le constituant majeur du filament épais et elle représente 55 à 60% des protéines myofibrillaires totales. La myosine en catalysant l'hydrolyse de l'ATP procure l'énergie nécessaire aux systèmes contractiles. Le poids moléculaire de la myosine de muscle squelettique de Lapin, établi par ultracentrifugation analytique, est de 468.000 daltons ( Gershman et al 1969 [29] ).

### 1°) ORGANISATION GENERALE DE LA MOLECULE DE MYOSINE :

La myosine est une protéine fibreuse qui se présente sous la forme d'un long bâtonnet de 156 nm et de 2 nm de diamètre, terminé à l'une de ses extrémités par deux têtes globulaires ( Fig. 7 ). Par la technique de l'ombre tournante en microscopie électronique, la myosine ressemble à une canne de golf à deux têtes, chacune d'elles longues de 19 nm et plus larges vers son extrémité où elle atteint un diamètre de 6,4 nm ( Offer et Elliot 1978 [93] ). La plus grande partie de la molécule ( 85 à 90% )

est représentée par un dimère dont les chaînes polypeptidiques sont constituées par environ 1.800 à 2.000 résidus d'acides aminés ( les Chaînes Lourdes [HC] ). Ces deux chaînes, qui constituent " le manche de la canne de golf " ou encore " la queue du bâtonnet " de la myosine, sont enroulées à 90% en hélice  $\alpha$  et sont disposées parallèlement. Elles s'étendent jusque dans les têtes globulaires ( région N-terminale de la molécule ) où elles perdent pratiquement leur structure en hélice  $\alpha$  ( Fig. 7 ). Des sous-unités légères ( les chaînes légères ) liées de façon non covalente aux chaînes lourdes représentent 15% du poids de la myosine et sont situées exclusivement au niveau des têtes globulaires. Le nombre et le poids moléculaire des chaînes légères sont variables d'une espèce à l'autre, d'un type de muscle à l'autre. Ces notions sont détaillées ultérieurement en précisant les rapports structure-fonction biologique.

## 2°) DONNEES STRUCTURALES :

Comme lors des travaux de structure des immunoglobulines, la molécule de myosine a été connue et précisée à travers des hydrolyses enzymatiques limitées. Ainsi, après action de la trypsine, la myosine se scinde en deux fragments : les MEROMYOSINES ( Fig. 7 )

- La méromyosine légère ( ou LMM ) ( PM = 140.000 daltons ) d'une longueur de 84,5 nm très hélicoïdale et insoluble dans l'eau.
- La méromyosine lourde ( ou HMM ) ( PM = 340.000 daltons ) d'une longueur de 57,5 nm au contraire très soluble dans l'eau.

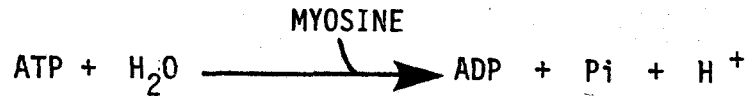
Après action de la papaïne, l'attaque enzymatique libère d'une part un sous-fragment 1 ( HMM-S<sub>1</sub> ou SF-1 ) de poids moléculaire 115.000 identifié exactement à la tête globulaire de la myosine où se trouvent les sites actifs, et, d'autre part un fragment appelé myosine-rod correspondant à la partie hélicoïdale de la molécule.

Par action prolongée de la papaïne ou de la trypsine, on peut obtenir le sous-fragment 2 ( HMM-S<sub>2</sub> ou SF-2 ) de poids moléculaire apparent de 60.000. Ce fragment parfois appelé " Hinge " est la région flexible de la myosine qui est considérée comme la pièce d'articulation myosine-actine.

Enfin, l'action limitée de la chymotrypsine permet une libération plus spécifique du fragment HMM-S<sub>1</sub> et avec de meilleurs rendements ( Weeds et Taylor 1975 [134] ).

### 3°) ACTIVITÉS ATPASIQUES ET MYOSINE :

L'adénosine triphosphate peut être hydrolysé par la myosine. La réaction produite peut s'écrire de façon simplifiée :



Cette transformation est exothermique et dans les conditions physiologiques la chaleur dégagée est d'environ 12 à 13 Kcal par mole. 5 Kcal proviennent de l'hydrolyse tandis que les 7 à 8 Kcal supplémentaires proviennent de la neutralisation du proton ( Morel et Pinset-Härström 1975 [88] ). Le mécanisme d'hydrolyse de l'ATP par la myosine est beaucoup plus complexe. De nombreuses revues générales ont été éditées à ce sujet et de nombreux mécanismes ont été décrits dans le détail (Mannherz et al 1973 [82] ; Shulka et al 1979 [107] ; Morel 1984 [87] ....).

Cette activité enzymatique ATPasique ( ou ATP-phosphohydrolase E.C. 3.6.1.3. ) de la myosine est fortement modifiée in vitro par toute une série de facteurs : force ionique élevée, présence de cations divalents, l'excès de substrat et même par des éléments du filament fin, en particulier l'actine. Aussi, il est possible de mesurer :

- L'activité ATPasique Ca<sup>2+</sup>-dépendante qui est l'activité propre de la myosine avec les ions calcium comme activateur ( activation obtenue pour des concentrations de l'ordre de 1-10 nmoles de CaCl<sub>2</sub> ).

- L'activité ATPasique Mg<sup>2+</sup>-dépendante qui est l'activité ATPasique du complexe d'actomyosine. Celle-ci est presque nulle lorsque les préparations de myosine sont pures mais en rajoutant de l'actine, en présence de calcium, il est possible d'activer la fonction ATPasique de la myosine ( Pope et al 1980 [98] ). On parle alors de l'activité ATPasique de la myosine activée par l'actine.

- L'activité ATPasique dépendante des ions monovalents ( Na<sup>+</sup> ; K<sup>+</sup> ; NH<sup>4+</sup> ... ) qui sont les activités ATPasiques non spécifiques des protéines myofibrillaires.

Les sites de l'activité ATPasique de la myosine sont situés au niveau des têtes globulaires et plus exactement les sites ( SH<sub>1</sub> et SH<sub>2</sub> ) se trouvent à proximité du point d'attache entre HMM-S<sub>1</sub> et HMM-S<sub>2</sub> à l'intérieur du HMM-S<sub>1</sub> ( d'après Mornet et al 1979 [89] ; Sutoh 1981 [111] ) interagissent fortement avec le substrat ( Ramirez et al 1979 [101] ).

#### 4°) AUTRES PROPRIETES PHYSICO-CHIMIQUES DE LA MYOSINE :

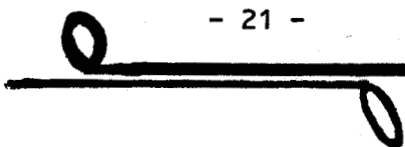
##### α ) La formation des filaments synthétiques :

Une des caractéristiques de la molécule de myosine est de s'assembler spontanément *in vitro* en filaments " synthétiques " qui ressemblent fortement aux filaments épais natifs ( Huxley 1969 [49] ). Les images de microscopie électronique en contraste négatif permettent d'obtenir de nombreux détails structuraux. Ainsi, dans les conditions proches des conditions physiologiques, les filaments formés apparaissent bipolaires. Les filaments sont constitués par assemblage tête-bêche antiparallèle dans le milieu du filament et par assemblage parallèle aux extrémités. Les têtes globulaires de la myosine étant à la périphérie sont symétriques par rapport au centre de symétrie du filament ( Fig. 8 ).

De nombreux facteurs tels l'ATP, le  $\text{CaCl}_2$  et le  $\text{MgCl}_2$ , l'absence de la chaîne légère régulatrice, le procédé utilisé etc... influencent la formation des filaments qui peuvent alors être plus ou moins long ( Pinset-Härström et Truffly 1979 [96] ; Grandier-Vazeille et al 1980 [34] ). On note là une relation certaine conformité moléculaire-fonction associative.

##### β ) Le polymorphisme de la molécule de myosine

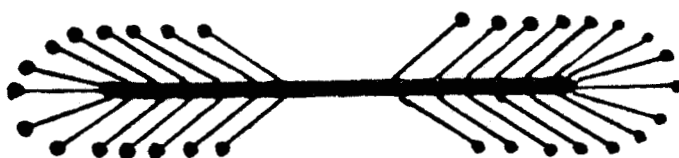
Avant même que les différences de composition en acides aminés entre les myosines extraites de différentes catégories de muscle aient été connues, il apparaissait clairement qu'à chaque type de muscle devait correspondre une myosine distincte. Ce sont à travers des études biochimiques et immunologiques très précises que différentes molécules de myosine ont pu être caractérisées au sein d'un même muscle. Ainsi, les myosines se définissent comme une famille de protéines polymorphes ( Hoh et al 1978 [45]; Lompré et al 1979 [74] ; d'Albis et al 1979 [14]). Les myosines diffèrent, on le sait aujourd'hui, aussi bien par la structure de leur chaînes lourdes ( comme l'ont montré les analyses par électrophorèse en gel de polyacrylamide en milieu non dissociant en présence de pyrophosphate appelées électrophorèse des myosines "natives"), par leur activités ATPasiques, que par leur composition en chaînes légères ( D'Albis et al 1979 [14] ; Grandier-Vazeille et al 1979 [33] ; Pliszka et al 1981 [97] ; Grandier-Vazeille et al 1983 [36] ).



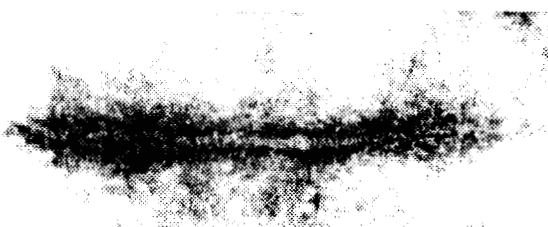
ASSOCIATION "TETE-QUEUE"



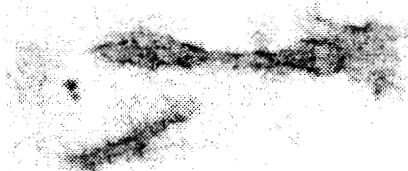
ASSOCIATION "TETE-BECHE"



a



b



c

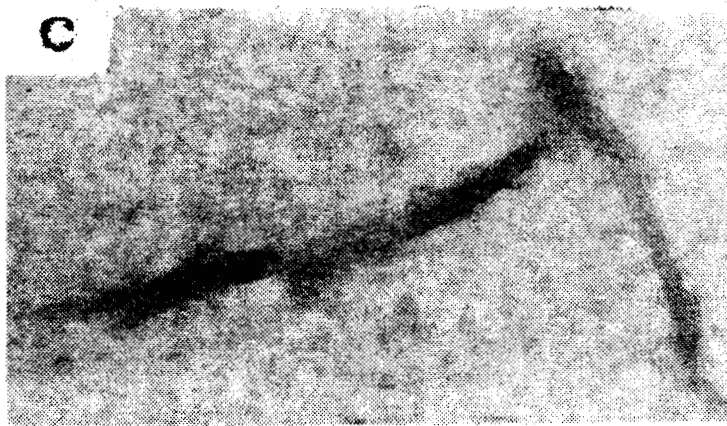


FIGURE 8 : FILAMENTS SYNTHETIQUES DE MYOSINES

Dans le haut de la figure, les deux modes d'association possible des molécules de myosine pour former les filaments in vitro.

La longueur des filaments dépend de la myosine étudiée (a) celle de muscle blanc squelettique de Lapin (b) celle de muscle lisse d'utérus de Vache (c) assemblage caractéristique " tête à queue " de myosine lisse.

### 5°) STRUCTURE PRIMAIRE DES CHAINES LOURDES DE LA MYOSINE :

Les compositions en acides aminés de la myosine extraite de différents types de muscle pour différentes espèces ont été établies ( Barany et al 1964 [3]; Huszar et Elzinga 1972 [47] ... ). La comparaison des compositions en acides aminés de myosine de muscle squelettique et cardiaque de Lapin par exemple révèle une certaine homologie, à l'exception toutefois de l'existence de résidus méthylés ( de 3-méthylhistidine et méthyllysine ) pour la myosine de muscle squelettique ( Huszar et Elzinga 1972 [47] ). Mais étant donné la taille importante de la molécule de myosine ( environ 2.000 résidus ) la seule étude des compositions en acides aminés ne donne pas de résultats suffisamment significatifs pour conclure à des différences ou à des identités.

Aussi, en dépit de la taille importante de la molécule, de nombreux auteurs se sont intéressés à l'étude de la structure primaire de la myosine, surtout celle de muscle blanc de Lapin : Biro et al 1973 [5] ; Fabian et Szilagyi 1978 [25] pour la partie C-terminale de la LMM ; Offer 1965 [91] ; Starr et Offer 1973 [110] pour la partie N-terminale ; Elzinga et Collins 1977 [23] pour le site ATPasique ; Mornet et al 1981 [89] pour l'organisation des différents peptides tryptiques dans le HMM-S<sub>1</sub> ( Fig. 9 ) ; Tong et Elzinga 1981 [118]; Elzinga 1983 [21] pour l'étude de la séquence en acides aminés des fragments HMM-S<sub>1</sub> et HMM-S<sub>2</sub>. Toutefois, sur le plan séquence plusieurs auteurs ont été confrontés au problème d'hétérogénéité de structure primaire, comme l'exemple très significatif des deux séquences N-terminales proposées par Offer 1965 [91]. D'ailleurs sans ce problème d'hétérogénéité de structure il y a longtemps que la séquence totale des chaînes lourdes de la myosine aurait été déterminée. Le point essentiel reste cependant que la structure primaire du site ATPasique ait pu être déterminée ( Fig. 10 ). Ceci a permis d'envisager au niveau moléculaire les interactions possibles myosine-ATP et d'expliquer le mécanisme d'hydrolyse de l'ATP au niveau de la tête globulaire de la myosine ( Ramirez et al 1979 [101] ).

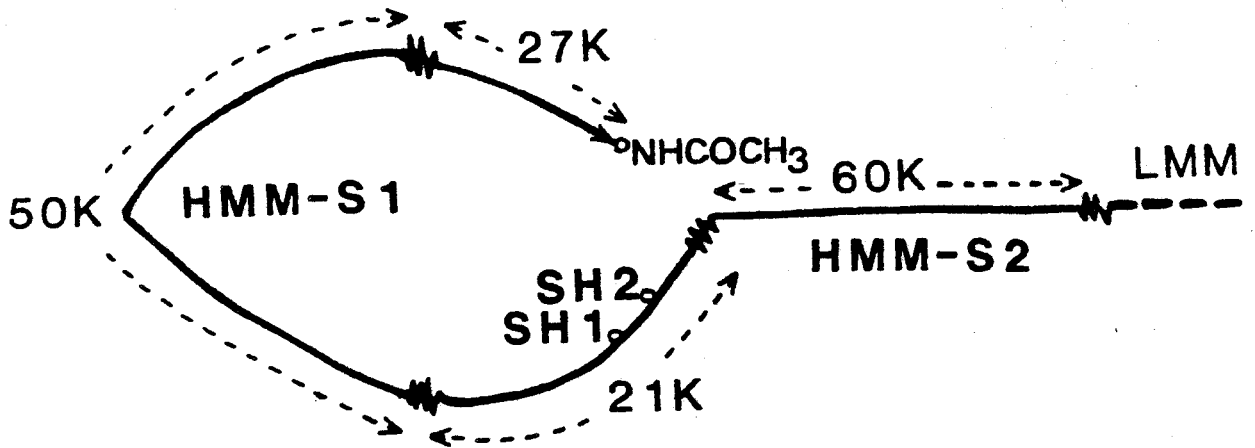


FIGURE 9 : LES DIFFERENTS DOMAINES DE LA TETE GLOBULAIRE DE LA MOLECULE DE MYOSINE DE MUSCLE SQUELETTIQUE DE LAPIN ( D'après Mornet et al 1981 [88] )  
Par hydrolyse trypsique ménagée, le HMM-S<sub>1</sub> est scindé spécifiquement en 3 fragments : le 27K ( N-terminal ) ; le 50K ( médian ) et le 21K ( où se trouve le site ATPasique ),  
LMM = Méromyosine Légère ; 60K = HMM-S<sub>2</sub> ,

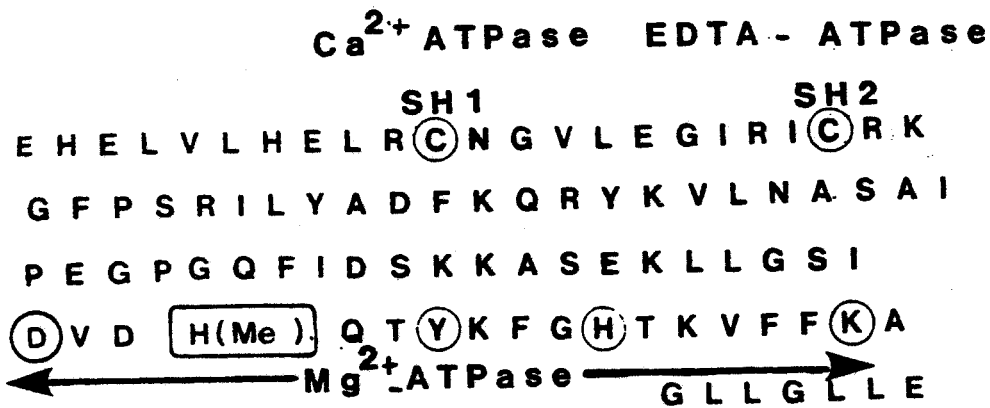
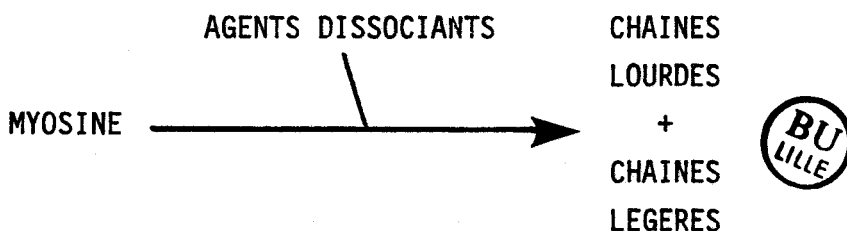


FIGURE 10 : SEQUENCE EN ACIDES AMINES DU SITE ATPasique DE LA MYOSINE DE MUSCLE SQUELETTIQUE DE LAPIN ( D'après Elzinga & Collins 1977 [23] )  
Les acides aminés encerclés sont essentiels.



### III - LES CHAINES LEGERES DE LA MYOSINE :

L'utilisation d'agents dissociants tels que l'urée 8 M, Le chlorhydrate de guanidine 6 M ou de SDS 1% permet la séparation du complexe hexamérique qui constitue la myosine :



Ceci indique que la liaison entre les différentes sous-unités est non covalente. L'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS a permis de montrer que les chaînes légères sont spécifiques de l'espèce et du type de muscle étudiés. Cependant, la dénomination et le poids moléculaire des chaînes légères varient selon les auteurs : ils dépendent du mode d'isolement, du muscle étudié, des conditions retenues pour l'électrophorèse en gel de polyacrylamide etc....

#### 1°) DENOMINATION DES CHAINES LEGERES :

La myosine de muscle squelettique de Lapin est la myosine la mieux connue car elle est très facile à isoler avec de bons rendements d'un muscle contenant essentiellement un seul type de fibre ( type II b Blanc à contraction rapide ). Cette myosine sert très souvent de myosine de référence pour des études physico-chimiques de protéines contractiles. Elle possède trois chaînes légères comme le révèle l'électrophorégramme obtenu en présence de SDS. Les chaînes légères de la myosine de muscle squelettique de Lapin peuvent être sélectivement dissociées des chaînes lourdes : en utilisant des conditions dénaturantes à pH alcalin deux chaînes légères sont dissociées ( les chaînes légères dites "alcalines" ), tandis qu'après action de l'acide 5-5'-dithionitrobenzoïque ( ou DTNB ) un autre type de chaîne légère est alors libérée ( chaîne légère DTNB ou Nbs-LC ) ( Weeds et Lowey 1971 [132] ). Cette DTNB-chaîne légère possède une forme phosphorylée, mise en évidence par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'urée 8 M ( Frearson et Perry 1975 [27] ).

Cependant, dans presque tous les cas ( par exemple, pour la myosine cardiaque ), il n'existe pas de procédé sélectif de dissociation des

chaînes légères, si bien que certains auteurs nomment aussi les chaînes légères selon leur mobilité électrophorétique croissante : LC-1, LC-2 et LC-3 et comme la LC-2 existe sous une forme phosphorylée elle est notée LC-2P ( Frearson et Perry 1975 [27] ). Pour illustrer leur appartenance à un muscle rapide ( comme dans le cas de la myosine de muscle squelettique de Lapin ), les chaînes légères sont également définies LC-1<sup>f</sup>, LC-2<sup>f</sup>, LC-2<sup>f</sup>-P et LC-3<sup>f</sup>. Enfin il existe aussi une terminologie qui relie la chaîne légère à son poids moléculaire apparent déterminé par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS à pH 8,4 selon la technique de Laemmli 1970 [68] : pour la myosine de muscle squelettique de Lapin, nous avons ainsi L<sub>25</sub> ; L<sub>18</sub> ; ( L<sub>18p</sub> ) et L<sub>16</sub>

Actuellement, les chaînes légères étant de mieux en mieux caractérisées dans leur structure et dans leur fonction ( en particulier, en ce qui concerne la chaîne légère qui possède une forme phosphorylée ), on classe désormais les chaînes légères des différentes myosines en chaînes légères régulatrices RLC ( L<sub>18</sub> ou LC-2<sup>f</sup>... ) et les autres types en chaînes légères alcalines ou chaînes légères dites essentielles ALC ( L<sub>25</sub> ou LC-1<sup>f</sup>... ). Cette terminologie permet de lever certaines ambiguïtés car il est souvent très difficile de savoir avec précision si l'extraction de la myosine a été effectuée à partir d'un muscle exclusivement rapide ou lent ( comme par exemple dans le cas du diaphragme de Rat ) ou de connaître avec exactitude le poids moléculaire de la chaîne légère.

## 2°) NOTION D'ISOENZYMES DE MYOSINE DONT LES DIFFERENCES SE SITUENT AU NIVEAU DES CHAINES LEGERES :

C'est à partir des différences observées dans la composition en chaînes légères des myosines qu'est née la notion d'isoenzymes de myosine. L'existence d'isoenzymes était évidente pour la myosine de muscle squelettique de Lapin qui possède trois chaînes légères avec des rapports non stochiométriques ( ALC-L<sub>25</sub> = 1,35; RLC-L<sub>18</sub> = 2,0 ; ALC-L<sub>16</sub> = 0,65 ) ( Weeds et Lowey 1971 [132] ). Pour le coeur, longtemps considéré comme une entité musculaire homogène, les myosines cardiaques auriculaires et ventriculaires ont des compositions en chaînes légères totalement différentes chez les Mammifères supérieurs. Par exemple, il a été possible de mettre en évidence au moins deux formes isoenzymiques de la myosine cardiaque entre ventricule et oreillette ( Grandier-Vazeille et al 1983 [36] ). Le nombre des isoenzymes de myosine dont les différences se situent au niveau de la composition en chaînes légères

est d'autant plus important lorsque la comparaison porte sur la composition en chaînes légères de myosines de différents types de muscles pour une même espèce ou encore des myosines d'un même muscle à différent stade de différenciation ( état tumoral ou état foetal, par exemple ( Grandier-Vazeille 1982 [31] ) ).

### 3°) STRUCTURES PRIMAIRES DES CHAINES LEGERES :

Les séquences en acides aminés de plusieurs chaînes légères de différentes myosines ont été complètement établies : pour le muscle squelettique Blanc de Lapin ( Frank et Weeds 1974 [26] ; Matsuda et al 1977a [84] ), chez le Poulet ( Matsuda et al 1977 [85] ) ; pour le muscle cardiaque de Poulet ( Maita et al 1980 [77] ; Matsuda et al 1981 [86] ) et pour le muscle lisse de gésier de Poulet ( Maita et al 1981a [78] ) ; pour la chaîne légère de Coquilles St Jacques ( Collins et al 1986 [ 11 ] ). Par contre, chez les Mammifères supérieurs ( Boeuf, Porc et Homme ) des difficultés sont apparues et uniquement des structures très partielles ont pu être proposées pour les ALC des myosines cardiaques ( Weeds 1975 [130] ; Grandier-Vazeille et al 1982 [36] ; Klotz et al 1982 [62] ).

Les chaînes légères sont des molécules d'environ 200 résidus d'acides aminés et elles sont caractérisées par :

- \* un comportement en électrophorèse qui dépend essentiellement de la séquence primaire de leur région N-terminale;

- \* une extrémité N-terminale N-bloquée

- par un résidu de triméthylalanine pour la plupart des chaînes légères de type "alcaline" ( Henry et al 1985 [40] )
- par un groupement acétyl pour les chaînes légères du type régulatrice;

- \* une région C-terminale constituée de 4 domaines. Chaque domaine est formé d'une région hydrophile encadrée par deux zones hydrophobes hélicoidales.

En plus, les chaînes légères ALC de plus haut poids moléculaire [ celle appelée  $A_1$  ( ALC-L<sub>25</sub> ) dans le cas de la myosine de muscle squelettique de Lapin ] possèdent une région N-terminale supplémentaire d'une quarantaine de résidus constituée d'une partie très basique interagissant avec l'actine ( Sutoh 1982 [112] ), suivie d'une partie presque uniquement formée de résidus de proline et d'alanine. Excepté ce segment N-terminal, la séquence du reste des molécules d'ALC ( ALC-L<sub>25</sub> ou  $A_1$  et ALC-L<sub>16</sub> ou  $A_2$  ) est identique.

Des études comparatives de structures primaires des chaînes légères de myosine avec celles des calciprotéines du système contractile ( Parvalbumine de Carpe [CPB] et Troponine C [TNC] ) ont permis en outre de mettre en évidence certaines analogies de séquence, ce qui indiquerait que ces protéines aient eu une protéine ancestrale commune ( Weeds et McLachlan 1974 [133] ; Tetaert et al 1982 [117] ; Herzberg et James 1985 [41] ; Collins et al 1986 [11] ). De plus, à partir de la structure tertiaire de la CPB déterminée par diffraction aux rayons X ( Kretzinger et Nockolds 1973 [65], Weeds et McLachlan 1974 [133] en ont déduit que la région C-terminale de la chaîne légère  $A_1$  de la myosine de muscle squelettique Blanc de Lapin doit adopter une conformation similaire à celles des calciprotéines ( Fig. 11 ).

#### 4°) LES CHAINES LEGERES ALCALINES ET LEURS GENES :

L'homologie de séquence des régions C-terminales trouvée pour les ALC (  $A_1$  et  $A_2$  ) de muscle squelettique Blanc de Lapin, mais aussi chez le Poulet ( Frank et Weeds 1972 [26] ; Matsuda et al 1981 [86] ) suggérerait qu'un gène unique est à l'origine de la biosynthèse des deux ALC de la myosine de muscle squelettique. Cette hypothèse a été confirmée :

(1) par clonage et l'étude du cADN, Nabeshima et al 1984 [90] ont démontré que les régions codantes en 3' pour  $A_1$  et  $A_2$  chez le Poulet sont homologues;

(2) l'isolement et l'étude de la séquence du gène chez la Souris ( Robert et al 1984 [102b] ) ont permis de décrire le schéma de biosynthèse des deux ALC.

Pour l'essentiel, deux ARN messagers fonctionnels sont produits après découpe spécifique du gène. En particulier, la portion de 141 résidus est codée par une série de 4 exons communs ( 5 à 8 ) tandis que les séquences spécifiques sont codées par 4 autres exons ( 1 et 4 pour  $A_1$  ; 2 et 3 pour  $A_2$  ), un intron de 10,8 kbases séparant les exons 1 et 2.

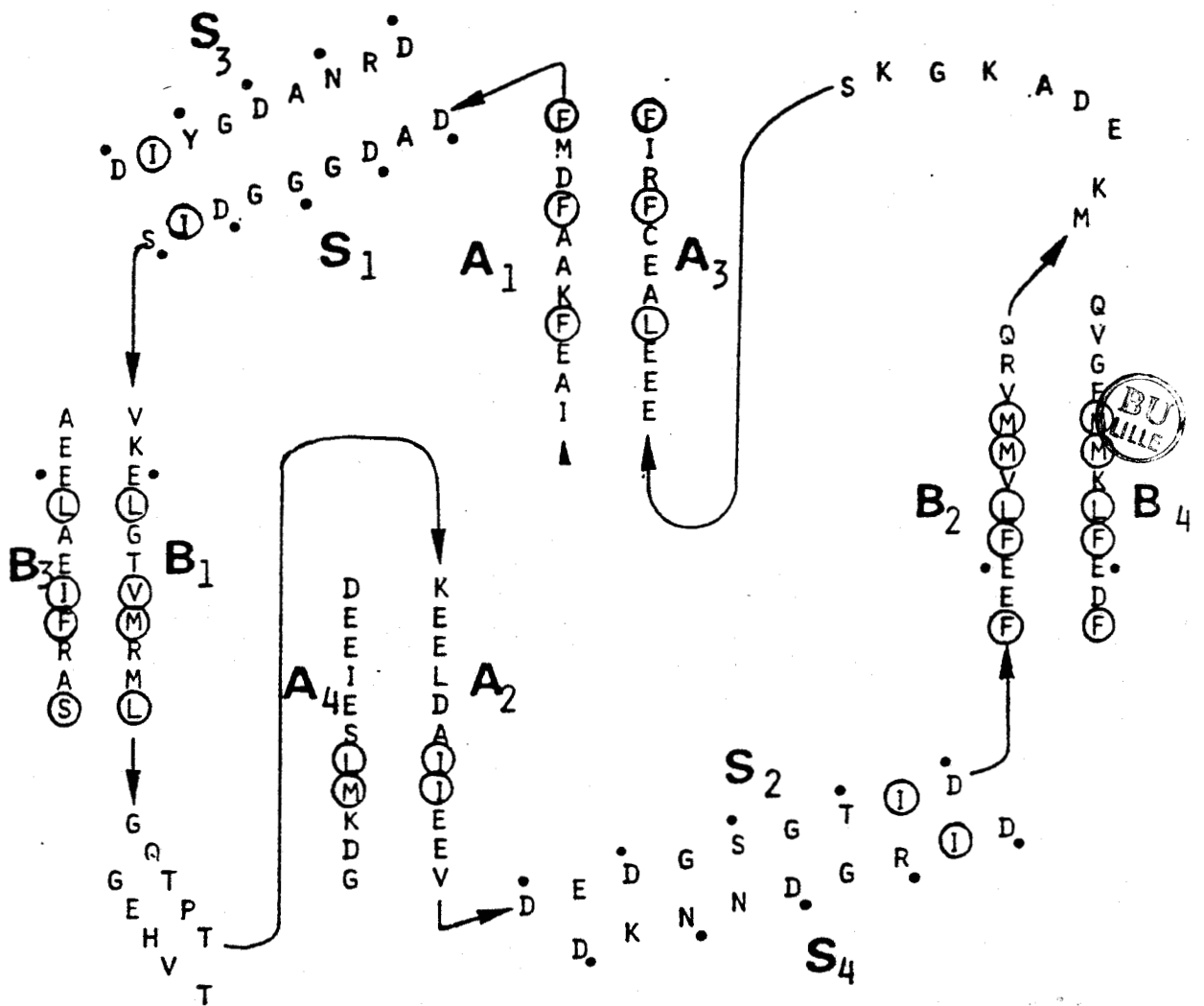
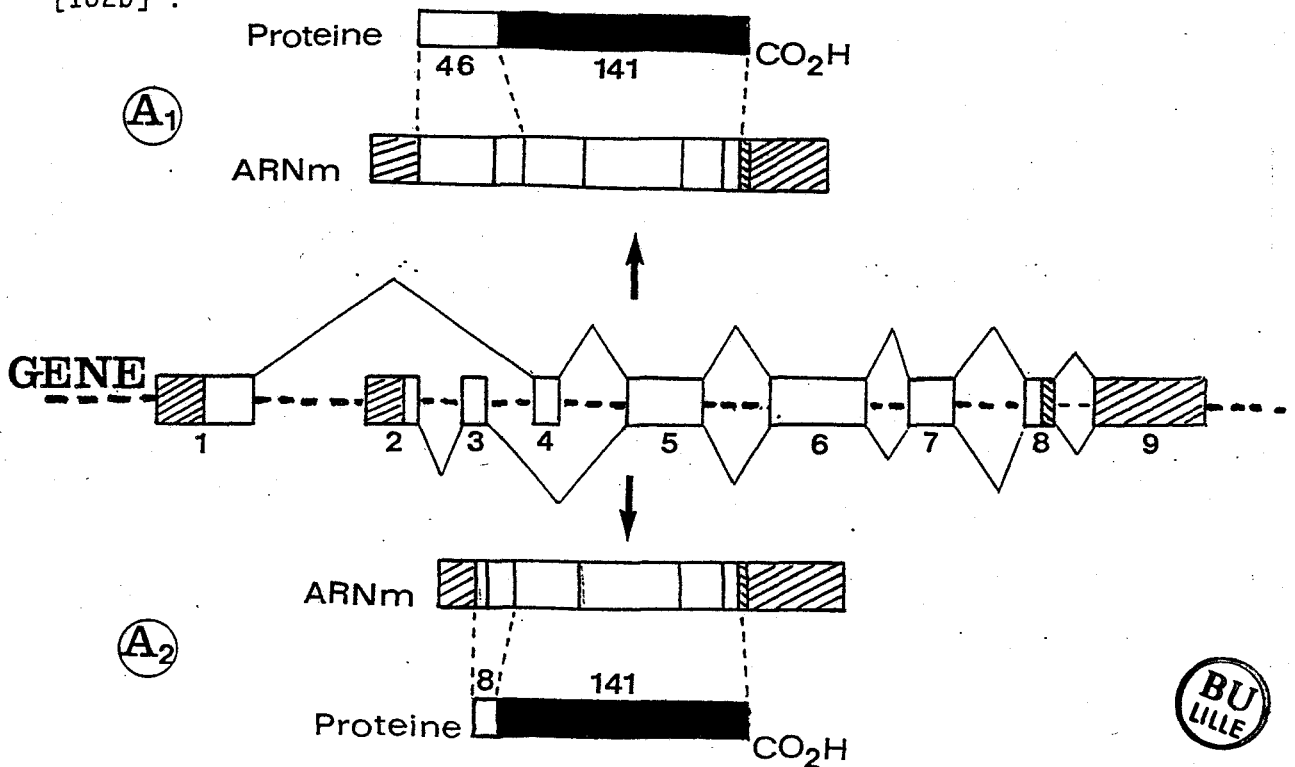


FIGURE 11 : STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE L'ALC-L<sub>25</sub> DE LA MYOSINE DE MUSCLE SQUELETTIQUE DE LAPIN ( D'après Weeds & McLachlan 1974 [132] ),

Cette structure est déduite à partir de la structure tridimensionnelle de la Parvalbumine de Carpe établie par étude de diffraction aux rayons X ( Kretsinger 1972 [64] ) et par comparaison des séquences en acides aminés de la Parvalbumine & la TN C de muscle squelettique de Lapin ( Collins 1974 [11] ). ( A & B ) sont les zones hélicoïdales hydrophobes présumées indispensables pour le maintien de cette structure. ( S ) sont les zones présumées sites de fixation des ions calcium. Les acides aminés encerclés sont les résidus hydrophobes impliqués pour le maintien de cette structure.

Nous avons représenté ici le schéma proposé par Robert et al 1984 [102b] :



Les pointillés représentent les introns.  
Les cadres pleins représentent les exons.  
Les zones hachurées ne sont pas traduites.  
Les parties peptidiques figurant en noir sont identiques pour A<sub>1</sub> et A<sub>2</sub>.

Ce processus de biosynthèse très complexe des ALC se retrouve être le même chez le Rat et aussi le Lapin. De plus, Barton et al 1985 [4b] ont démontré que les chaînes légères alcalines de myosine de muscle lent et de myosine ventriculaire, dont les régions N-terminales sont très spécifiques, sont également codées par un même gène, chez le Rat et la Souris.

##### 5°) ROLE BIOLOGIQUE DES CHAINES LEGERES :

Selon l'implication de leur chaînes légères dans la régulation de l'interaction actine-myosine, les myosines ont été classées en différents groupes :

(i) pour la myosine de myxomycète Physarum polycephalum, la chaîne légère, dont la structure est similaire à celle d'ALC de Mammifères,

possède un site spécifique de fixation du calcium. Cette "ALC" est très importante dans le processus de régulation par les ions calcium de la production d'énergie dans l'ectoplasme du plasmodium ( Kessler et al 1980 [59] ).

(ii) pour les myosines de mollusques, les chaînes légères sont dissociées sélectivement par l'EDTA ( la chaîne légère dite EDTA-LC ), ou des agents réducteurs ( la SH-LC ). La SH-LC est analogue aux RLC des myosines de Mammifères, elle transmet l'effet de fixation directe du calcium aux sites spécifiques de la myosine et régule ainsi l'interaction avec l'actine. Récemment, Okamoto et al 1986 [93b] ont démontré que la chaîne légère pouvant être considérée de type "alcaline" de myosine de Coquilles St Jacques, participe de façon active à la liaison de l'ATP sur les chaînes lourdes de myosine quelque soit leur origine.

(iii) pour les myosines de muscle lisse de vertébrés ou celles des cellules non musculaires, la phosphorylation des chaînes légères RLC par une phosphokinase-calmoduline dépendante est nécessaire pour l'interaction actine-myosine mais aussi pour l'assemblage des filaments de myosine ( Scholey et al 1981 [104] ).

(iv) pour les myosines de muscle strié de vertébrés, les chaînes légères ne semblent pas jouer un rôle régulateur, le complexe des troponines étant le principal facteur de la régulation de la contraction musculaire

#### 6°) RECONNAISSANCE CHAINES LEGERES-CHAINES LOURDES :

Il était important de connaître la situation exacte des chaînes légères au niveau des têtes globulaires des chaînes lourdes de myosine :

\* La partie C-terminale de la chaîne légère régulatrice ( RLC ) interagit avec le fragment 21 K, c'est à dire au niveau de la jonction du sous-fragment HMM-S<sub>1</sub> et HMM-S<sub>2</sub> ( Kendrick-Jones et Jakes 1976 [56] ).

\* Grâce aux réactifs bifonctionnels, la RLC a pu être placée à l'intérieur des chaînes lourdes au niveau de la région flexible des têtes globulaires ( le "hinge" ), comme le montre la Fig. 12 ( D'après Mornet et al 1981 [89] ).

\* Quant aux chaînes légères alcalines ( ALC ), elles ont été placées initialement au voisinage du fragment 27 K de l'HMM-S<sub>1</sub> ( Labbé et al 1981 [67] ) mais il a été démontré depuis que les ALC sont capables de modifier l'arrangement moléculaire de la région "hinge". De plus, il

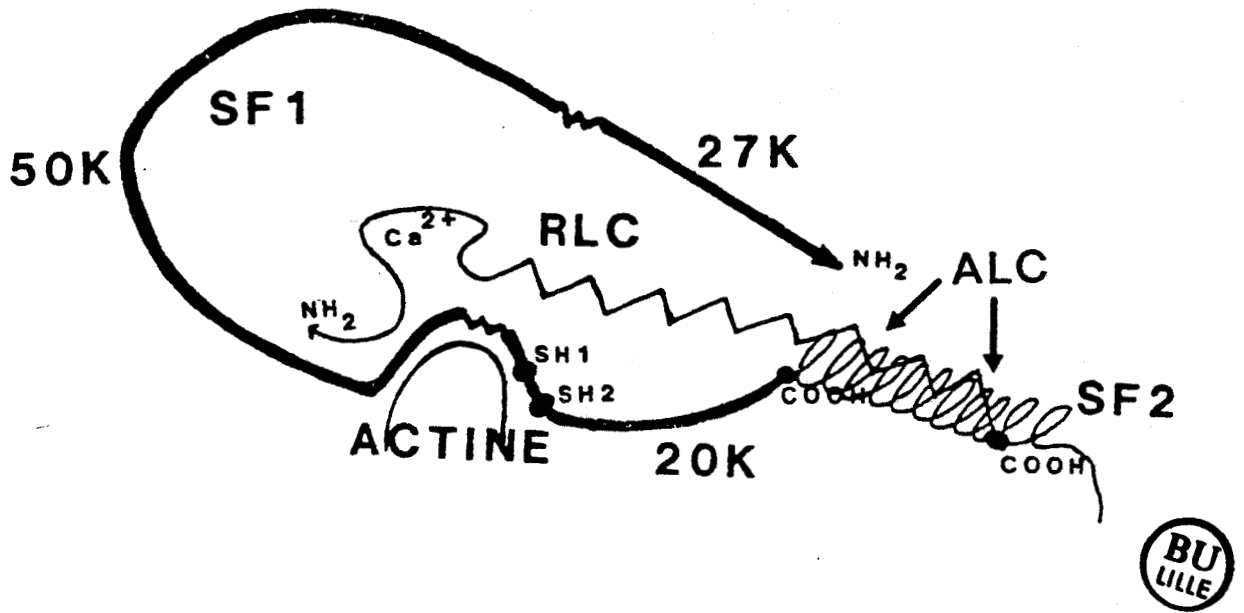


FIGURE 12 : POSITION DES CHAINES LEGERES A L'INTERIEUR DES CHAINES LOURDES DU SOUS-FRAGMENT-1 ( D'APRES Mornet et al . 1981 ). [88]

La partie C-terminale de la RLC interagit avec la région flexible SF<sub>1</sub>-SF<sub>2</sub> . SH<sub>1</sub> & SH<sub>2</sub> sont les sites ATPasiques décrit dans la Figure 7. Les fragments 27K , 50K & 20K sont les principaux domaines du SF<sub>1</sub> libérés par action limitée de la trypsine.

L'ALC interagit également au niveau de la région flexible SF<sub>1</sub>-SF<sub>2</sub> (↑)



existe des effets coopératifs entre ALC-RLC permettant une modulation de la flexibilité de la région intermédiaire entre le HMM-S<sub>1</sub> et le HMM-S<sub>2</sub> ( Craig et al 1980 [12] ; Burke et al 1983 [7] ; Winkelman et Lowey 1984 [138] ).

On le constate à travers cette synthèse de données acquises que des questions fondamentales sont encore à élucider tant en ce qui concerne la structure primaire d'ALC de myosine cardiaque chez les Mammifères supérieurs, que le rôle biologique exact des chaînes légères.

\* Les RLC sont phosphorylables, peuvent fixer le calcium et pourraient être responsable de l'élongation de la région entre la tête globulaire et le "rod" de la myosine ( Hardwicke et al 1983 [39] ).

\* Les ALC ont été longtemps considérées comme "essentiels", c'est à dire indispensables pour une activité ATPasique maximale de la tête globulaire de la myosine ( Wagner et Weeds 1977 [123] ). Cependant, de plus récents travaux suggèrent au contraire qu'elles ne sont pas du tout indispensables : le HMM-S<sub>1</sub> dépourvu totalement d'ALC posséderait une activité ATPasique maximale ( Wagner et Giniger 1981 [124] ; Sivaramakrishnan et Burke 1981 [108] ).

Néanmoins, on tente d'attribuer un rôle aux ALC qui s'enrouleraient autour de la région "hinge", assurant une certaine conformation du hinge et la protégeant de l'attaque des enzymes protéolytiques ( Winkelman et Lowey 1984 [137] ). D'autre part, des données récentes indiquent que les hétérodimères se forment au moment de la biosynthèse mais aussi par un échange rapide des sous-unités ( Waller et Lowey 1985 [125b] ). De plus, à l'échelle moléculaire, il apparait maintenant qu'au moment de l'interaction actine-myosine il y a intervention des chaînes légères : au niveau des domaines du HMM-S<sub>1</sub> qui ont été précisés ( fragment 21 K ), les RLC se rapprochent des ALC ( Hardwicke et Szent-Gyorgyi 1985 [39b] ); en relation directe avec l'ALC<sub>1</sub> ( région N-terminale très basique avec la triméthylalanine mais aussi sa portion C-terminale de 14 résidus ), les chaînes légères permettent la liaison de l'actine et d'ATP ( Ueno et al 1985 [120] ; Labbé et al 1986 [67b] ).

---

## F - LES AUTRES PROTEINES CONTRACTILES

L'analyse du comportement électrophorétique en gel de polyacrylamide en présence de SDS devient de plus en plus résolutive et sensible ( utilisation de gel gradient dans les conditions décrites par Laemmli 1970 [68], coloration avec des sels d'argent etc...). Plusieurs protéines myofibrillaires de haut poids moléculaire ont pu ainsi être caractérisées, comme l' $\alpha$ - et la  $\beta$ -actinine ( Suzuki et al 1976 [113] ; Masaki et Yoshizaki 1972 [83] ), la titine ( Wang et al 1979 [128] ) ou encore la filamine dans le muscle lisse de gésier de Poulet ( Wang et al 1975 [127]). A ces protéines peuvent également s'ajouter les nombreuses protéines du cytosquelette. Néanmoins, si toutes ces protéines ont été très bien caractérisées, leurs fonctions physiologiques et biologiques restent parfois mal connues.

Une autre protéine contractile la paramyosine joue un rôle très important dans le processus du " catch ", c'est à dire qu'elle permet le maintien d'une tension prolongée du muscle d'invertébrés ( Szent-Györgyi et al 1971 [114]). Elle a longtemps été considérée uniquement comme une protéine de structure, mais il apparaît que pour le muscle d'invertébrés elle interagit aussi avec la myosine ( Hildebrand et al 1979 [42] ).

### CONCLUSION

Cette revue bibliographique entérine le fait que :

1°) les molécules de myosine provenant de différents muscles ( squelettiques, lisses et cardiaques ) ne sont pas strictement identiques dans leur capacité à hydrolyser l'ATP.

2°) leurs propriétés physico-chimiques et structurales autorisent même à parler d'isoenzymes de la myosine.

3°) cette notion d'isoenzyme peut être retenue au sein d'un même type musculaire.

4°) enfin que cette diversité moléculaire des myosines s'exprime selon l'espèce.

On pourrait dire même qu'à chaque muscle correspondent des isomyosines et que cette diversité moléculaire relève pour une part essentielle de la qualité des chaînes légères de type alcaline.

Ainsi tout naturellement nous avons été orienté vers :

- l'étude de la structure primaire d'une ALC de la myosine ventriculaire de coeur de Porc;

- l'étude des relations structure-fonction à mesure de l'obtention des résultats de séquence primaire.

En cela notre travail est assimilable dans sa démarche au protocole suivi par les auteurs pour la TN T ( cf. paragraphe D-IV-1°). L'ALC de la myosine ventriculaire de coeur de Porc nous a permis la définition :

- de régions fonctionnelles privilégiées : par exemple les régions d'interactions avec les chaînes lourdes, l'actine ; autre exemple, des régions pouvant correspondre aux sites de fixation des ions calcium.

- de préciser le rôle relatif des ALC dans l'association actine-myosine.

# **CHAPITRE II**

## **PREPARATION**

**DES CHAINES LEGERES ALCALINES**

**DE MYOSINES**

**DE DIFFERENTS TYPES DE MUSCLES**

## A - INTRODUCTION

La connaissance précise de la structure primaire d'une chaîne légère, sa comparaison avec d'autres provenant de différentes myosines, la relation structure-fonction de ces entités moléculaires doivent contribuer à établir leur rôle biologique précis. En effet, les chaînes légères ALC étaient autrefois considérées comme essentielles pour la fonction enzymatique de la " tête " de la myosine ( Weeds 1973 [131] ), mais en réalité les ALC peuvent être dissociées des chaînes lourdes sans qu'il y ait perte de l'activité ATPasique-actine dépendante. De nombreuses questions restent alors posées quant au rôle des ALC, surtout que quelque soit le type de muscle , l'espèce étudiée et même dans le cas de la myosine "aberrante" d'Acanthamoeba ( ne possédant qu'une seule tête globulaire ), des chaînes légères de type ALC sont toujours associées aux chaînes lourdes.

Il existe de plus une hétérogénéité de taille moléculaire pour les ALC et il semble que cela soit très spécifique de la myosine étudiée : par exemple, l'ALC de myosine de muscle lisse de gésier de Poulet possède un poids moléculaire apparent de 17.000 tandis que celle de muscle cardiaque de ventricule de Porc atteint 27.000 daltons.

Le protocole général de préparation et de purification des myosines habituellement suivi comporte :

- 1- Une extraction des protéines myofibrillaires.
- 2- L'élimination des protéines solubles par cycles de dissolution-précipitation.
- 3- L'élimination des protéines du filament fin par une ultracentrifugation en présence d'ATP.
- 4- Une purification par relargage par le sulfate d'ammonium .

Une étape de chromatographie sur colonne de sépharose 6B permet parfois de parfaire la purification de la myosine. La gel filtration permet d'obtenir la myosine avec de meilleurs rendements que l'échange ionique ( Richards et al. 1967 [102] ).

Cependant, selon le type de muscle et les conditions de stabilité de la myosine, le protocole de préparation doit être adapté afin d'obtenir ultérieurement une libération quantitative des chaînes légères. Ainsi, l'étude des myosines a donc été entreprise pour des muscles d'origine aussi diverse , que celle de muscle lisse vascularisé ( Utérus de Vache ), de muscle lisse d'invertébré ( muscle rétracteur antérieur du byssus [ ABRM ] de Moule ), de muscles striés squelettiques et cardiaques de Mammifères.

L'isolement des ALC a ensuite été réalisé selon les cas en utilisant différentes approches techniques et cela restant en fonction des rendements obtenus et de l'intégrité des préparations pour permettre une étude ultérieure structure-fonction. Cette partie de notre travail longue, difficile nous a permis par comparaison de saisir des différences structurales mais aussi fonctionnelles des ALC.

## B - ETUDE DES CHAINES LEGERES DE TYPE ALCALINE DE MYOSINES DE MUSCLES LISSES

### I - GENERALITES

Les muscles lisses possèdent un contenu myofibrillaire agencé de façon très caractéristique. Jusqu'à ces dernières années, il était admis que quelque soit le muscle lisse étudié ( artère, estomac, gésier ou utérus ... ) il n'existait qu'un seul type de myosine lisse possédant deux chaînes légères de 20.000 et 17.000 daltons ( L<sub>20</sub> et L<sub>17</sub> ). De plus, cette forme moléculaire de myosine devait être également caractéristique des cellules non musculaires ( plaquettes sanguines, fibroblastes etc...) ( Pollard 1975 [99] ). Cependant, les électrophorèses en gel de polyacrylamide en présence de pyrophosphate des myosines lisses ont permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs types de myosines lisses correspondant aux différents tissus dont elles ont été extraites ( d'Albis 1983 [15] ).

L'étude des myosines lisses d'utérus de Vache et du muscle lisse rétracteur antérieur du byssus ( ABRM ) de la Moule nous a permis de confirmer l'existence de myosine caractéristique et spécifique du muscle lisse étudié.

## II- PREPARATION DE LA CHAINE LEGERE ALCALINE DU MUSCLE LISSE DE VERTEBRE ( D'UTERUS DE VACHE ):

### 1°) INTRODUCTION :

L'utérus est un muscle lisse vascularisé qui présente un intérêt très important du point de vue de la physiologie. Nous nous sommes donc intéressés à l'étude de la principale protéine contractile.

Les principaux résultats sur la myosine utérine sont décrits dans la publication ( PUBLICATION N° 1 ) :

\* " Isolement et caractérisation de la chaîne légère " L<sub>17</sub> " de la myosine de muscle lisse d'utérus de Vache "

Biochimie 59 ( 1977 ) 337-339.

## 2°) RESULTATS :

Le protocole de préparation et de purification, mis au point et utilisé, permet l'obtention de la myosine utérine avec des rendements dix fois supérieurs à ceux décrits dans la littérature ( Wachsberger et Pepe 1974 [122] ; Sobieszek et Bremel 1975 [109] ). Le choix d'une extraction à force ionique élevée en présence de pyrophosphate de potassium ( analogue de l'ATP ) et la purification par relargage au sulfate d'ammonium conduisent à une préparation dépourvue de la plupart des contaminants du filament fin. Néanmoins, si cette préparation de myosine utérine représente une source intéressante pour un isolement quantitatif de l'ALC-L<sub>17</sub> le protocole de purification demeure long et délicat , le rendement reste faible pour envisager une étude ultérieure de sa structure primaire.

D'autre part, nous pouvons signaler qu'il n'existe pas de traitements particuliers permettant de dissocier sélectivement les chaînes légères de la myosine utérine en comparaison de ce qui est réalisable pour le muscle squelettique Blanc de Lapin. Nous notons que la chaîne légère L<sub>17</sub> de type ALC possède un poids moléculaire inférieur à celle de type régulatrice ( L<sub>20</sub> ), cas différent de ce que nous observons pour d'autres myosines de muscles striés. La structure de l'ALC-L<sub>17</sub> apparaît en fait très particulière comme le révèle aussi son comportement en électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'urée 8 M : la mobilité électrophorétique de l'ALC-L<sub>17</sub> est alors inférieure à celle de la chaîne régulatrice RLC-L<sub>20</sub> qui possède la forme phosphorylée.

### III - PREPARATION DE LA CHAÎNE LÉGÈRE ALCALINE DE LA MYOSINE DE MUSCLE LISSE D'INVERTEBRÉ : LE MUSCLE RETRACTEUR ANTERIEUR DU BYSSUS [ ABRM ] DE LA MOULE

#### 1°) INTRODUCTION

Le muscle rétracteur antérieur du byssus ( ABRM ) de la Moule ( Mytilus edulis L ) est susceptible de maintenir une tension tonique pendant de longues périodes ( phénomène dit du " catch " ). Comme chez tous les invertébrés, l'organisation moléculaire du système contractile est beaucoup plus complexe. En particulier, les filaments épais sont constitués à la fois par la myosine mais aussi par la paramyosine. Ces deux protéines de structure interagissent fortement entre elles pour

former des filaments dont la structure " paracrystalline " est caractéristique. Dans la publication ( PUBLICATION N° 2 ) :

\* " Etude des filaments de paramyosine du muscle lisse de *Mytilus edulis* L : ultrastructure, purification et interaction paramyosine-myosine "

Comptes Rendus de l'Académie des Sciences ( Paris ) 288 D ( 1979 )  
109-112.

Nous avons décrit le protocole de préparation de la myosine de muscle lisse d'invertébré ainsi que l'étude de l'interaction paramyosine-myosine.

## 2°) PREPARATION DE LA CHAÎNE LEGERE ALCALINE DE LA MYOSINE D'ABRM DE MOULE :

### α) Caractérisation de myosine d'ABRM de Moule :

Au cours de la préparation de la myosine d'invertébré d'ABRM de Moule, les difficultés essentielles proviennent de l'existence de paramyosine dans le filament épais de ce muscle. Des modifications ont donc été apportées concernant la méthode d'extraction et de purification de la myosine par rapport au protocole généralement suivi. L'utilisation du pyrophosphate de potassium au lieu de l'ATP permet en particulier d'éviter de nombreuses étapes de précipitation-dissolution. Le pyrophosphate facilite une relaxation plus rapide du complexe actomyosinique et les filaments épais natifs sont ainsi obtenus sans contaminants du filament fin. La filtration sur sépharose 6B est employée afin d'obtenir la myosine dans un état de pureté satisfaisant ( élimination des nucléotides ), comme le révèle l'électrophorégramme ( Fig. 13 ) ainsi que l'examen en microscopie électronique ( Fig. 14 ).

### β) Isolément des chaînes légères

L'électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS de la myosine d'ABRM de Moule ne montre la présence que d'une seule bande protéique, au niveau des chaînes légères de poids moléculaire apparent de 18.000 daltons. Par contre, l'électrophorèse effectuée en présence d'urée révèle que la myosine lisse d'invertébré possède les deux types de chaînes légères ALC et RLC ( Fig. 15 ) : la bande protéique de mobilité électrophorétique similaire à celle de  $L_{18}$  correspondant à la chaîne légère de type ALC tandis que le doublet de mobilité électrophorétique très supérieure doit correspondre à la chaîne légère de type régulatrice possédant une forme phosphorylée.



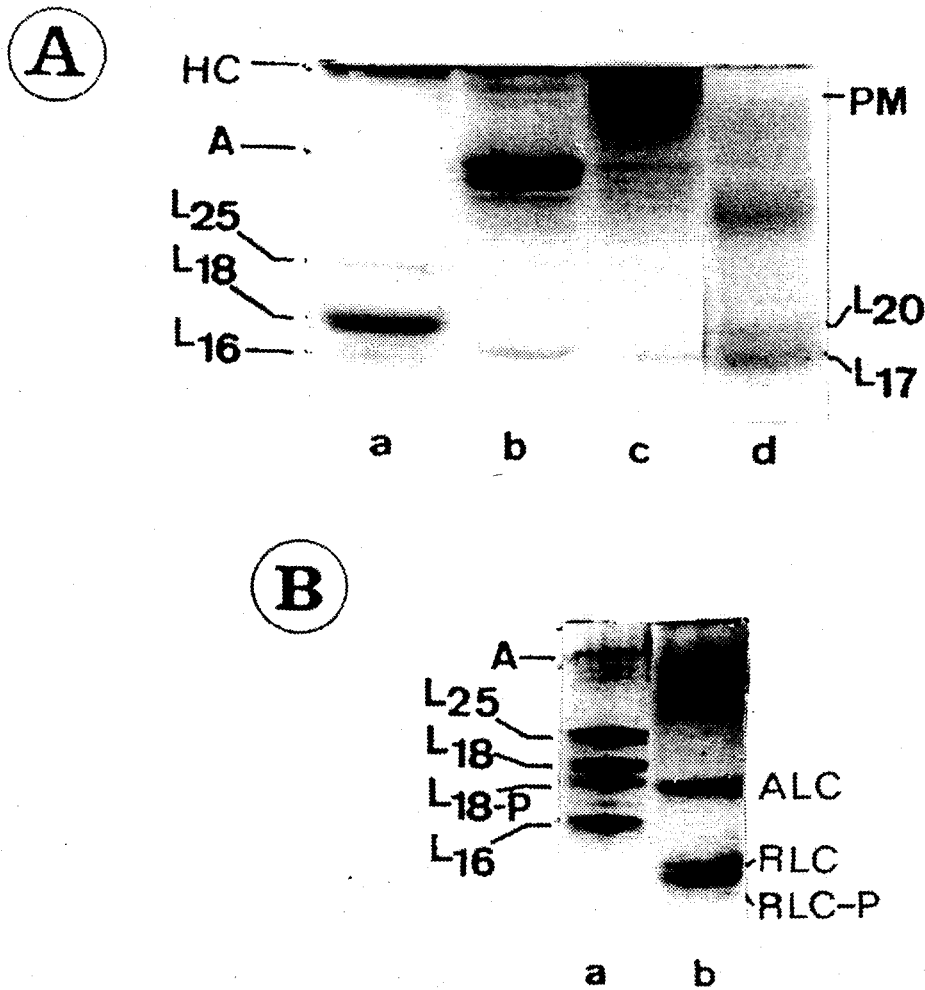


FIGURE 13 : ANALYSE PAR ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE DE LA MYOSINE D'ABRM DE MOULE EN PRESENCE DE SDS ET D'UREE.

A - Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS ( tampon Tris-borate de pH 7,0 ) : a ) Myosine de référence ( de muscle squelettique Blanc de Lapin ) ; b ) La fraction A obtenue par chromatographie de gel filtration sur colonne de sépharose 6B ; c ) La fraction correspondant à la myosine de muscle lisse d'ABRM de Moule ; d ) Myosine de muscle lisse d'utérus de Vache.

HC = Chaînes lourdes ; PM = Paramyosine ( 135.000 daltons ) ; A = Actine.

B - Electrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'urée 8 M : a ) Myosine de référence ( muscle squelettique Blanc de Lapin ) ; b ) Myosine d'ABRM de Moule.



FIGURE 14 : EXAMEN EN MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DES FILAMENTS SYNTHETIQUES DE LA MYOSINE D'ABRM DE MOULE ( Grossissement x 40000 et x 120000 )

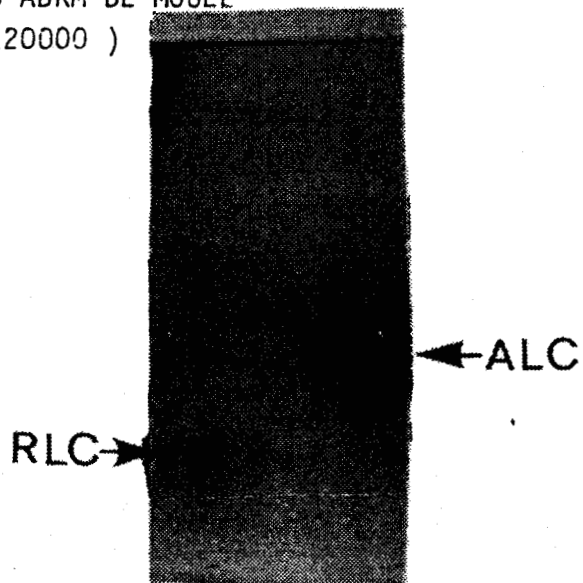


FIGURE 15 : ANALYSE PAR ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE D'UREE DES PREPARATIONS DE CHAINES LEGERES DE MYOSINE D'ABRM DE MOULE EFFECTUEES PAR ELECTROPHORESE PREPARATIVE.

Afin d'isoler sélectivement la chaîne légère de type ALC, deux protocoles ont été utilisés : (i) La dissociation par traitement alcalin, par l'acide 5-5'-dithionitrobenzoïque ( DTNB ) suivie d'une chromatographie de gel filtration sur séphadex G 150 ; (ii) L'électrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide en présence d'urée 8 M.

Les chaînes légères de type régulatrice ont été obtenues par dissociation par le DTNB et gel filtration sur G 150 tandis que ce n'est que par électrophorèse préparative, que l'ALC a pu être isolée ( Fig.15 ) Les rendements alors obtenus sont très faibles ( 5 mg d'ALC pour 300 g de muscle ABRM ). La composition en acides aminés et une étude de l'extrémité N-terminale ont seulement pu être envisagées ( Tableau II ).

#### IV - CONCLUSION

Les myosines de muscles lisses ont des propriétés physico-chimiques particulières avec principalement un caractère de plus grande solubilité. Pourtant, en raison du plus faible contenu en protéines myofibrillaires dans les muscles lisses, des difficultés de préparation et d'isolement avec de bons rendements de l'ALC, une étude de la structure primaire d'ALC de myosine lisse apparaît délicate. Il a été intéressant :

- . de caractériser l'ALC-L<sub>17</sub> de la myosine de muscle lisse vascularisé d'utérus

- . de mettre en évidence les chaînes légères de myosine de muscle lisse d'invertébré : les deux types de chaînes légères ( ALC et RLC ) possèdent un poids moléculaire apparent identique ( 18.000 daltons ) et ne peuvent être distinguées qu'en électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'urée.

#### C - ETUDE DES MYOSINES DE MUSCLES SQUELETTIQUES DE DIFFERENTES ESPECES

Nous aborderons successivement les myosines de muscles squelettiques puis les myosines de l'état foetal pour enfin envisager la particularité de ces mêmes myosines en tissu tumoral.

	24 h	72 h
Asx	11,2	11,9
Thr	4,8	4,7
Ser	6,2	5,6
Glx	21,7	22,3
Pro	3,4	5,3
Gly	8,0	7,0
Ala	8,9	9,3
Cys/2	0,9	-
Val	4,9	5,0
Met	1,4	1,7
Ile	3,3	3,8
Leu	8,3	7,4
Tyr	2,4	2,4
Phe	3,0	2,6
Lys	6,7	6,8
His	0,8	1,3
Arg	4,0	3,3
Trp	N.D	N.D
N-terminal	N-Bloqué	



TABLEAU II : COMPOSITION EN ACIDES AMINES ET EXTREMITÉ N-TERMINALE DE LA CHAÎNE LÉGÈRE ALC DE LA MYOSINE D'ABRM DE MOULE.

## I ) LES MYOSINES DE MUSCLES SQUELETTIQUES A L'ETAT ADULTE :

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

La myosine la mieux connue et la plus souvent prise comme référence par les auteurs est celle extraite du muscle squelettique Blanc de Lapin. Le protocole cité en introduction de ce chapitre, permet de l'obtenir avec de très bons rendements.

C'est en utilisant la même stratégie que nous avons préparé les myosines de muscles squelettiques à contraction rapide de différentes espèces des Décapodes aux Mammifères supérieurs ( Crabe, Grenouille, Poulet, Rat, Porc et Homme ). Les rendements obtenus sont de l'ordre de 5 à 10 mg par gramme de muscle et varient peu d'une espèce à l'autre. L'analyse comparative qualitative a été effectuée par électrophorèse en gel de polyacrylamide ( Fig.16 ). Deux conditions de migration apportent à la définition précise des formes moléculaires.

Chez le Lapin, la myosine de muscle Blanc possède trois chaînes légères dont les mobilités électrophorétiques correspondent à des poids moléculaires apparents de 25.000, 18.000 et 16.000 daltons respectivement, notées  $L_{25}$  ;  $L_{18}$  et  $L_{16}$  ( Fig.16 B ).

Chez le Crabe, la myosine de muscle squelettique ( peripoda pe1, pe2 et pe3 ) possède deux chaînes légères de 22.000 et 18.000 daltons respectivement ( LC1 et LC2 ). Lors de la préparation de cette myosine, l'élimination de l'actine est plus difficile même si au stade de l'ultracentrifugation nous atteignons des solutions de l'ordre de 10 mM d'ATP au lieu de 5 mM classiquement ajoutés. Comme dans le cas d'autres myosines de muscles d'invertébrés ( Kendrick-Jones et al 1976 [57] ), nous avons également noté une plus grande capacité de cette myosine à former des dimères: la bande de plus haut poids moléculaire que nous retrouvons sur l'électrophorégramme de myosine de Crabe doit correspondre à cette forme dimère ( Fig. 16 A ).

Chez la Grenouille, la myosine de muscle gastrocnémien possède aussi trois chaînes légères dont les poids moléculaires apparents sont similaires à ceux de la myosine de référence. Bien que cette myosine de muscle squelettique de Grenouille soit préparée dans les mêmes conditions que celles des autres myosines, il faut signaler une plus grande " labilité " des chaînes lourdes mais aussi de la chaîne légère  $L_{25}$  qui rapidement est dégradée en une forme  $L_{24}$  ( Fig. 16 D ). Cette

FIGURE 16 : COMPARAISON DE LA COMPOSITION EN CHAINES LEGERES DES  
MYOSINES DE MUSCLES SQUELETTIQUES : ANALYSE PAR ELECTROPHORESE  
EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

- A - Myosine de muscle peripoda de Crabe ( électrophorèse en présence de SDS )  
Std = Standard de protéines de différents poids moléculaire ; a) Extrait  
brut de myofibrilles; b) Actomyosine obtenue après ultracentrifugation ;  
c ) Actomyosine obtenue après relargage par le sulfate d'ammonium ( → ) montre  
la capacité de la myosine de Crabe à former des dimères.
- B - Myosines de muscles squelettiques pour différentes espèces : a & e ) Porc ;  
b ) Rat ; c ) Poulet ; d ) Lapin
- C - Myosines de muscles squelettiques pour différentes espèces dont l'analyse  
a été effectuée en présence d'urée 8 M : a ) Homme ; b & c ) Poulet; d ) Rat  
e ) Lapin ; f ) Grenouille ; g ) Porc.
- D - Myosine de muscle squelettique de Grenouille : comparaison avec la myosine  
ventriculaire de coeur de Porc (a) , b ) myosine préparée et déposée 2 heures  
après l'extraction des myofibrilles ; c ) myosine déposée sur le gel après  
4 heures.
- E - Schématisation de tous les résultats acquis sur le comportement des chaînes  
légères en électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS  
CPM = Crabe ; FSM = Grenouille ; CSM = Poulet ; RbSM = Lapin ; RaSM = Rat  
PSM = Porc ; HSM = Homme ; PCV = Porc cardiaque ventriculaire ; PCat = Porc  
cardiaque auriculaire.

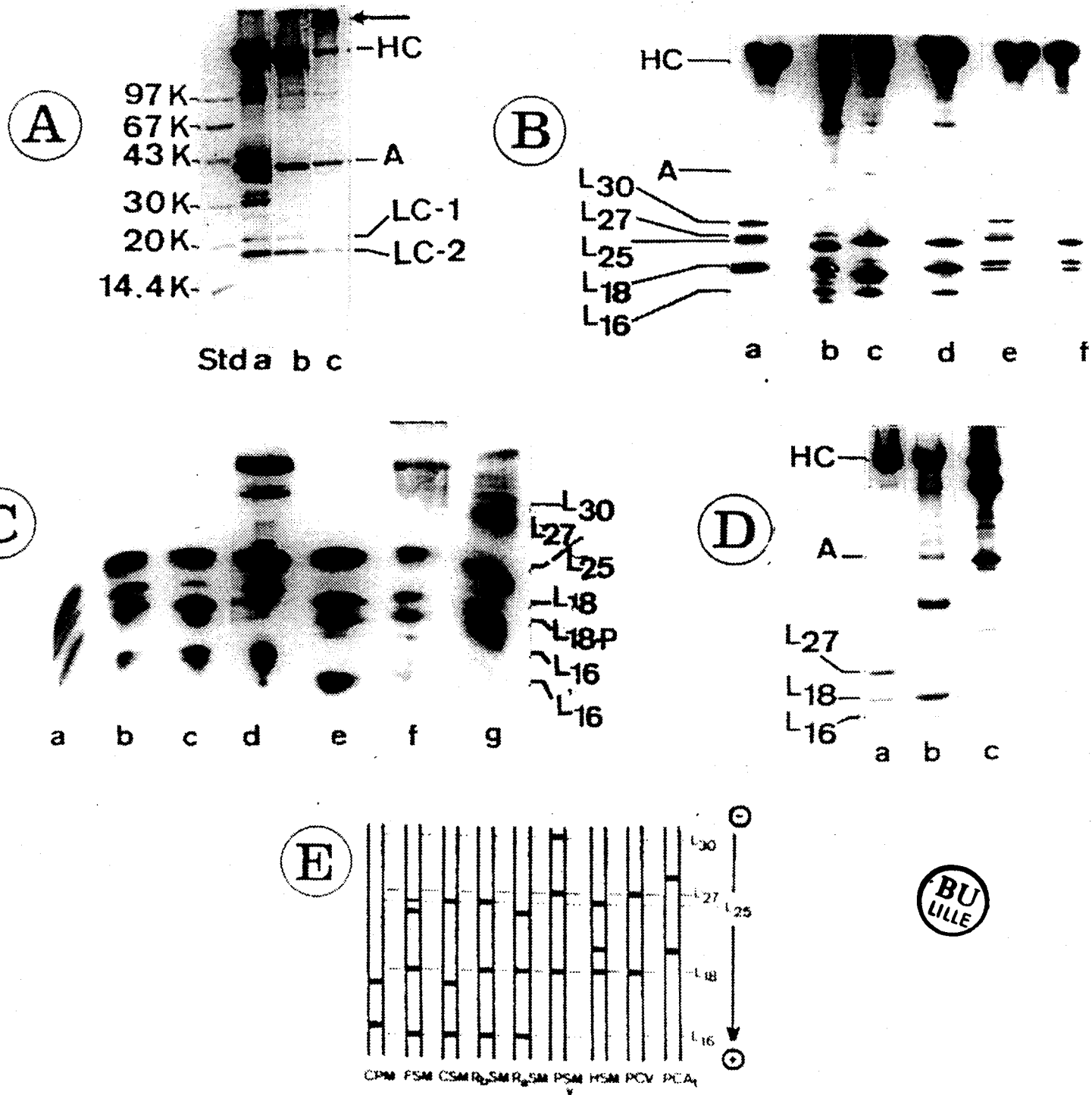


FIGURE 16

plus grande sensibilité à l'action des endoprotéases est d'ailleurs discutée par plusieurs auteurs sans qu'il soit donné d'explications satisfaisantes( Barany et al 1969 [4] ; Pliszka et al 1979 [97] ).

Chez le Poulet, la myosine de muscle gastrocnémien possède trois chaînes légères. La chaîne légère de plus faible poids moléculaire et celle de plus haut poids moléculaire sont respectivement identiques aux chaînes légères  $L_{25}$  et  $L_{16}$  de la myosine de référence. La troisième chaîne légère d'environ 17.000 daltons a une mobilité électrophorétique légèrement supérieure à celle de la chaîne légère  $L_{18}$  de la myosine de référence ( Fig. 16 B ).

Chez le Rat, la myosine du muscle gastrocnémien possède également trois chaînes légères . La seule différence obtenue avec la myosine de référence réside encore dans un comportement électrophorétique menant à une estimation de poids moléculaire de 24.000 pour l'une des chaînes légères qui est inférieure à la  $L_{25}$  de la myosine de référence. De plus, lors de la dissection des pattes du Rat, il est difficile de prélever uniquement le muscle rapide gastrocnémien. La préparation de myosine de muscle rapide est contaminée par de la myosine de muscle rouge lent ( Fig. 16 B ). En effet, sur l'électrophorégramme les bandes plus fines à 25.000 daltons , 17.000 daltons correspondent aux chaînes légères de myosine de muscle lent ( Sarkar et al 1971 [103] ).

Chez le Porc, la myosine de muscle rapide a été préparée à partir du diaphragme. Elle possède trois chaînes légères. La chaîne légère de plus faible poids moléculaire a un comportement électrophorétique similaire à la  $L_{18}$  de Lapin. Les deux autres chaînes légères ont des mobilités électrophorétiques inférieures à celle de plus haut poids moléculaire de la myosine de référence  $L_{25}$  ( Fig.16 B ).

Chez l'Homme enfin, la myosine du muscle quadriceps crural possède trois chaînes légères. Les chaînes légères de plus haut poids moléculaire et de plus faible poids moléculaire ont des mobilités électrophorétiques respectivement identiques aux chaînes légères  $L_{25}$  et  $L_{18}$  de la myosine de référence. La chaîne légère de poids moléculaire intermédiaire a une mobilité électrophorétique supérieure à la  $L_{24}$  du Rat et inférieure à la  $L_{18}$  de Lapin ( Fig. 16 B ).



## 2°) L'ELECTROPHORESE EN PRESENCE D'UREE 8 M

Comme le montre la Figure 16C, l'électrophorèse en présence d'urée permet de mettre en évidence la forme phosphorylée des chaînes légères de type régulatrice des différentes myosines. Elle permet également de confirmer l'existence d'une chaîne légère de très haut poids moléculaire ( environ 30.000 daltons ) pour la myosine de muscle squelettique de Porc.

## 3°) CONCLUSION

L'étude des myosines de muscles squelettiques a été effectuée pour sept espèces ( des Décapodes aux Mammifères supérieurs en passant par les Batraciens, les Oiseaux et les Rongeurs. ). Par électrophorèse en gel d'acrylamide ( en présence de SDS à pH 8,4 ) les myosines de muscles squelettiques possèdent trois chaînes légères dont les mobilités électrophorétiques diffèrent d'une espèce à l'autre comme nous l'avons schématisé dans la Figure 16 E. Par électrophorèse en gel d'acrylamide en présence d'urée, les myosines ont quatre chaînes légères dont l'une correspond à la forme phosphorylée de la chaîne légère RLC.

La comparaison du comportement électrophorétique des chaînes légères des myosines de muscles squelettiques à contraction rapide a permis de montrer que la variation de taille moléculaire intervient principalement pour les chaînes légères de type " alcalines ". Notons, qu'au cours de l'évolution des espèces, il y a augmentation du poids moléculaire apparent d'une des chaînes légères type ALC, celle de plus haut poids moléculaire. Cas limite, chez le Porc, on retiendra une ALC de poids moléculaire apparent très supérieur à 25.000 daltons : la L<sub>30</sub>.

## II - LES MYOSINES DE MUSCLES SQUELETTIQUES A DIFFERENTS STADES DE LA DIFFERENCIATION

### 1°) LA MYOSINE FOETALE DE PORC :

La nécessité de confirmer l'existence d'une chaîne légère de 30.000 daltons chez le Porc, exemple unique, nous a amené à connaître la composition en chaînes légères de la myosine de muscle squelettique de fœtus de Porc. Le protocole d'isolement suivi pour la myosine foetale est classique. L'analyse par électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS ( Fig. 17 ) montre qu'à l'état foetal la myosine de

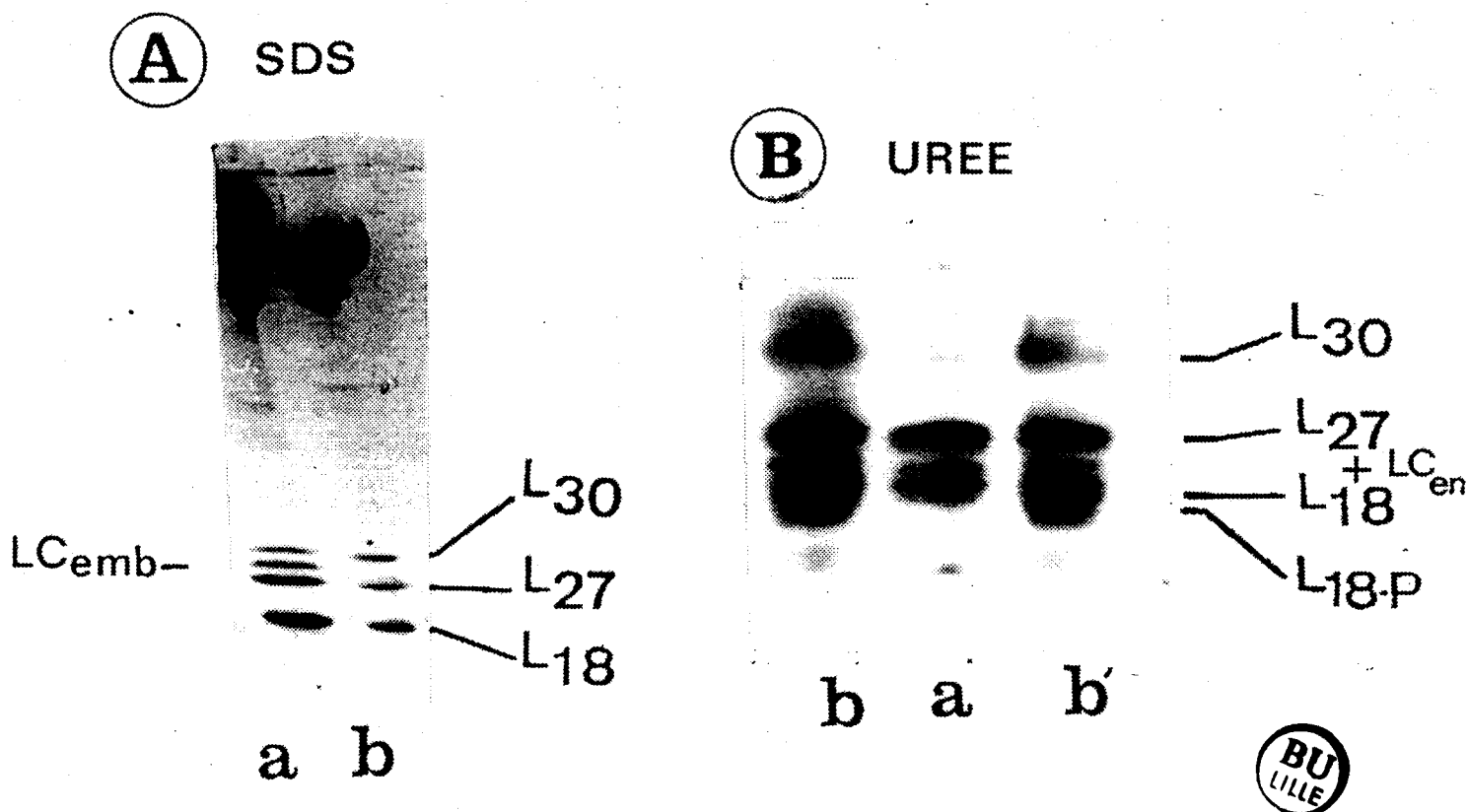


FIGURE 17 : COMPOSITION EN CHAINES LEGERES DE LA MYOSINE FOETALE DE MUSCLE SQUELETTIQUE DE PORC.

A - Analyse effectuée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS à pH 8,4 ( Laemmli ) : a ) myosine foetale ; b ) myosine de muscle squelettique de Porc adulte.

LCemb = chaîne légère de type embryonnaire.

B - Analyse effectuée par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'urée 8 M à pH 8,4 ( Frearson & Perry 1975 [27] ) : a ) myosine foetale b & b' ) myosine de muscle squelettique de Porc adulte (b) 40 µg (b') 20 µg.

L<sub>18P</sub> = Forme phosphorylée de la chaîne légère L<sub>18</sub>.

muscle squelettique possède déjà la  $L_{30}$  et les deux autres chaînes légères  $L_{27}$  et  $L_{18}$  avec en plus une chaîne légère de poids moléculaire apparent de 28.500 daltons. Cette présence d'une chaîne légère dite de type embryonnaire ( LCemb ) a déjà été décrite par plusieurs auteurs ( Wahlen et al 1979 [125] ; Katoh et Kubo 1978 [55] ), mais il est à souligner que celle de Porc avec un poids moléculaire apparent aussi élevé est une fois encore très caractéristique de l'espèce étudiée. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'urée 8 M révèle l'absence de la forme phosphorylée de la  $L_{18}$  ( Fig.17 ).

## 2°) LES MYOSINES FOETALES ET TUMORALES DE LAPIN, DE RAT ET DE L'HOMME

La composition en chaînes légères de la myosine de muscle squelettique chez le Lapin, le Rat et l'Homme a été étudiée et comparée pour l'état foetal, adulte et tumoral. Les résultats obtenus ont fait l'objet des publications ( PUBLICATION N° 3 ) :

\* " 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 20 ( 1980 ) 240-248.

( PUBLICATION N°4 ) :

\* " Peritoneal rhabdomyosarcoma in a newborn child : pathological and biochemical studies with emphasis on contractile proteins "

Journal of Clinical Pathology 33 ( 1980 ) 823-829.

( PUBLICATION N° 5 ) :

\* "  $Ni_3S_2$ -induced leiomyosarcomas in rabbit skeletal muscle : analysis of the tumoral myosin and its significance in the retrodifferentiation concept "

Oncodevelopmental Biology and Medicine 2 ( 1981 ) 101-108.

En résumé, ces études ont permis de montrer que la biosynthèse de la myosine est modifiée par des agents provoquant la cancérisation du muscle. La modification de l'agencement moléculaire est à l'origine de la chute de l'activité ATPasique spécifique de la myosine tumorale. Par contre, la myosine foetale voit son activité ATPasique augmenter qui est sans doute en relation avec l'existence d'une chaîne légère supplémentaire. Cette chaîne légère représente un promoteur essentiel.

### 3°) CONCLUSION :

La comparaison des myosines foetales avec les formes adultes de muscles squelettiques de quatre espèces ( Lapin, Rat, Porc et Homme ) a montré que les myosines possèdent une chaîne légère de type embryonnaire ( LCemb ) supplémentaire qui est caractéristique de l'espèce étudiée. De plus, à l'état foetal la forme phosphorylée de la chaîne légère de type régulatrice n'est jamais mise en évidence. Sans doute, les enzymes de phosphorylation ne sont pas encore présents dans les cellules à l'état foetal.

La comparaison des myosines tumorales des muscles squelettiques des trois espèces ( Lapin, Rat et Homme ) montre que les myosines possèdent deux chaînes légères quelle que soit l'espèce : celle de type ALC de plus haut poids moléculaire et celle de type régulatrice RLC sans sa forme phosphorylée.

Enfin, ces études ont permis de mettre en évidence un nouvel isoenzyme de myosine de muscle squelettique dont les différences se situent au niveau de la composition en chaîne légère : la myosine tumorale. La myosine tumorale est différente aussi bien de la myosine foetale que de la myosine de muscle squelettique adulte normal.

#### D - ETUDE DES CHAINES LEGERES DES MYOSINES CARDIAQUES

Pour compléter cette étude des myosines, nous avons également entrepris l'étude de la composition en chaînes légères du muscle strié cardiaque ceci dans différentes parties du myocarde et pour différentes espèces. Les principaux résultats obtenus figurent dans la publication ( PUBLICATION N°6 ) :

\* " Phylogenetic studies of cardiac myosins from Amphibia to Mammals " Comparative Biochemistry and Physiology 76B ( 1983 ) 263-270.

Cette étude comparative des myosines cardiaques montre comme pour les myosines de muscles squelettiques, que la composition en chaînes légères est très spécifique de l'espèce étudiée. Au cours de l'évolution des espèces, ce sont principalement les chaînes légères de type ALC dont la taille moléculaire a varié le plus tandis que la chaîne légère de type régulatrice possède un poids moléculaire plus stable proche de 18.000 daltons.

Cette diversité de taille moléculaire pour l'ALC doit sans aucun doute avoir une signification biologique et des éléments de réponse pourront nous être apportés par l'étude de la structure primaire des ALC. Or, l'étude de la structure primaire exige l'isolement par une technique simple d'une quantité relativement importante de protéine, dans un état de pureté élevé. Pour l'étude de la structure primaire d'une chaîne légère " alcaline " , notre intérêt s'est donc porté sur la myosine ventriculaire de coeur de Porc car :

- Le contenu en protéines contractiles d'un muscle strié est des plus élevés.

- Pour les Mammifères supérieurs, seules des structures partielles d'ALC de myosine cardiaque ( Boeuf et Homme ) ont pu être proposées.

- Enfin, il est bien connu que pour le Porc et l'Homme, la structure et les propriétés physico-chimiques de nombreuses molécules sont voisines.

Néanmoins, il fallait en première étape optimiser et standardiser le protocole de préparation de la myosine cardiaque et, ensuite, séparer les différentes sous-unités selon un procédé permettant un isolement quantitatif de la chaîne légère dite " alcaline " ALC-L<sub>27</sub>.

## I - PREPARATION DE LA MYOSINE VENTRICULAIRE DE COEUR DE PORC :

De nombreux protocoles de préparation de myosine cardiaque ont été décrits dans la littérature. La préparation de la myosine de ventricule gauche de coeur de Porc a été réalisé selon le protocole classique que nous avons modifié :

La préparation satisfait aux trois critères de pureté suivants :

- un rapport de densité optique  $A_{280} / A_{260}$  supérieur à 1,6 montrant l'absence de nucléotides.

- une activité ATPasique dépendante du magnésium presque nulle ( absence d'actine ).

- un électrophorégramme en gel de polyacrylamide effectué en présence de SDS ne révélant aucun contaminant du filament fin ( actine, tropomyosine et troponines ).

En utilisant un tel protocole, la myosine cardiaque de Porc obtenue est très pure, mais le rendement n'est que de 2 mg par gramme de muscle. L'étape de l'ultracentrifugation en présence d'ATP limite la quantité de muscle à partir de laquelle la myosine peut être extraite.

Le contaminant le plus gênant, le plus fréquemment retrouvé dans les préparations des chaînes légères est la Troponine C, dont les propriétés physico-chimiques et la structure sont voisines de celles des ALC. L'élimination de la Troponine C, qui est une protéine très soluble, est réalisée lors d'étapes de dissolution-précipitation et de relargage par le sulfate d'ammonium. La préparation " dite brute " de myosine ventriculaire de coeur de Porc est suffisamment pure pour l'isolement ultérieur des chaînes légères et elle est surtout obtenue avec de meilleurs rendements ( de l'ordre de 20 à 30 mg par gramme de muscle cardiaque ).

Cependant, les préparations de myosine ne peuvent être que difficilement stockées, ainsi :

(i) la myosine a tendance à s'agréger spontanément, même à force ionique élevée. Une préparation conservée sous forme lyophilisée devient très difficile à remettre en solution.

(ii) Les chaînes lourdes sont très sensibles à l'action des endoprotéases exogènes ( voir le paragraphe concernant la myosine de muscle squelettique de Grenouille ). Même en faible concentration dans le milieu, les endoprotéases libèrent des fragments dont le poids moléculaire est voisin de ceux des chaînes légères.

(iii) Les chaînes légères de la myosine cardiaque de Porc sont sensibles aux endoprotéases et elles peuvent être partiellement dégradées, même en présence d'actine dans la préparation ( actine connue pour avoir un rôle moléculaire protecteur ). De plus, la charge globale des chaînes légères se trouve modifier au cours du temps.

## II - PREPARATION DES CHAINES LEGERES DE LA MYOSINE VENTRICULAIRE GAUCHE DE COEUR DE PORC :

Comme aucun traitement chimique ne permet de dissocier sélectivement les chaînes légères de la myosine cardiaque, la dissociation chaînes lourdes-chaînes légères doit être effectuée par des agents puissants ( urée 8 M ; SDS 1% ; chlorhydrate de guanidine 6 M ) et en présence d'agents réducteurs ( 2-mercaptoéthanol ; dithiothréitol ). De nombreux essais ont été effectués et par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, les culots de chaînes lourdes ont été analysés. Nous avons ainsi noté que la réaction de dissociation chaînes lourdes-chaînes légères de la myosine cardiaque de Porc est plus

complète lorsque nous utilisons l'urée 8 M en présence de 1% de 2-mercaptoéthanol.

Différentes techniques ont ensuite été utilisées pour séparer chacune des chaînes légères :

### 1°) LA CHROMATOGRAPHIE D'ECHANGE D'IONS :

De nombreux auteurs ont réalisé la séparation des chaînes légères de la myosine cardiaque par chromatographie sur colonne d'échange d'ions de DEAE-cellulose ou de DEAE-Séphadex ( Weeds et Lowey 1971 [132] ; Klotz et al 1975 [60] ). Pour séparer les chaînes légères de la myosine cardiaque de Porc, nous avons utilisé la chromatographie d'échange d'ions sur colonne de DEAE- et QAE-Séphadex A 50. Si la séparation sur colonne de DEAE-Séphadex est quantitativement et qualitativement supérieure à celle effectuée sur colonne de QAE-Séphadex ou DEAE-cellulose, le rendement est néanmoins faible ( environ 9 mg de chacune des chaînes légères sont isolées par gramme de myosine ).

### 2°) LA CHROMATOGRAPHIE DE GEL FILTRATION :

En règle générale en chromatographie liquide, la chromatographie de gel filtration conduit à de meilleurs rendements, car au regard de la chromatographie d'échange d'ions les phénomènes d'adsorption non spécifique sur la matrice sont faibles. Ainsi, pour la myosine d'utérus de Vache, nous obtenons la chaîne légère L<sub>17</sub> avec des rendements de l'ordre de 25 mg par gramme de myosine.

Pour la myosine cardiaque de Porc, les phénomènes de réassociation chaînes légères-chaînes lourdes sont plus importants et il est plus difficile d'éliminer totalement les chaînes lourdes, même si la concentration en SDS est amenée à 5% pour effectuer la chromatographie sur colonne de Séphadex G 150.

La séparation des chaînes légères a également été effectuée par chromatographie de gel filtration sur colonne de Biogel A 1,5 M selon les conditions décrites par Klotz et al 1978 [61]. Nous obtenons une excellente séparation de chacune des chaînes légères. Cependant, étant donné la longueur de la colonne et les conditions d'élution, la méthode est très longue et ne se prête que difficilement à un préparatif.

### 3°) LA PRECIPITATION DITE " ISOELECTRIQUE " :

Nous avons également tenté de préparer les chaînes légères de la myosine cardiaque de Porc selon la méthode de la précipitation

isoélectrique décrite par Hiratsuka 1980 [43]. Lors de nos essais, les rendements obtenus ont toujours été nettement inférieurs à ceux qui ont été décrits car :

(i) Des phénomènes de réassociation chaînes légères-chaînes lourdes de la myosine cardiaque se produisent et une quantité importante de chaînes légères est perdue au cours de l'étape d'élimination des chaînes lourdes.

(ii) L'étape d'ultrafiltration provoque un abaissement du pH de la solution entraînant la précipitation non souhaitée de chaînes légères.

(iii) Lors de la précipitation isoélectrique à pH 5,3, la chaîne légère ALC-L<sub>27</sub> se retrouve non seulement dans le surnageant mais coprécipite pour une part importante avec la RLC-L<sub>18</sub>. Schlossler et al 1982 [105] travaillant sur les chaînes légères de la myosine cardiaque humaine confirment nos observations.

De plus, l'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'urée 8 M révèle d'importantes modifications de la charge et de la forme des chaînes légères préparées selon cette méthode de précipitation isoélectrique.

#### 4°) L'ELECTROPHORESE PREPARATIVE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE :

Cette technique d'électrophorèse préparative est celle que nous avons finalement retenue pour préparer l'ALC-L<sub>27</sub>. Le mode opératoire est très simple et très efficace, à l'inverse des systèmes d'électrophorèses préparatives déjà décrits ( Yasaki et al 1973 [141] ; Klotz et al 1975 [60] ). nous utilisons un appareillage peu coûteux ( celui décrit par Kerckaert 1978 [58] ) et un gel urée 8 M qui permet l'élution complète des bandes protéiques colorées à l'amidoschwarz. Ainsi, en une seule étape nous pouvons séparer les chaînes lourdes de chacune des chaînes légères, y compris la forme phosphorylée et l'ALC-L<sub>27</sub> est purifiée avec d'excellents rendements.

Le protocole de préparation, les critères de pureté et la caractérisation des chaînes légères apparaissent plus en détails dans la publication ( PUBLICATION N° 7 ) :

\* " Isolement des chaînes légères de la myosine cardiaque de Porc par électrophorèse préparative et étude des polypeptides obtenus après action du bromure de cyanogène "

Biochimie 60 ( 1978 ) 409-415.



## CONCLUSION

D'après notre étude des myosines extraites de muscles lisses, squelettiques et cardiaques, il apparaît clairement qu'à chaque type de muscle ou d'espèce correspond une myosine dont la composition en chaînes légères est spécifique et caractéristique. D'ailleurs d'autres méthodes ont permis de définir de façon plus précise différentes molécules de myosine conduisant à la notion d'isoenzymes de myosine ( Grandier-Vazeille et al 1979 [33] ; Hoh et al 1980 [45] ; d'Albis et al 1981 [14] ; Gauthier et al 1982 [28] ).

Cependant, au cours de l'évolution des espèces, il faut souligner que si des modifications de structure se produisent, c'est plus particulièrement en ce qui concerne les chaînes légères ALC de plus haut poids moléculaire. Du point de vue taille moléculaire, la chaîne légère de type ALC varie de 30.000 daltons ( muscle squelettique de Porc ) à 14.000 daltons ( muscle cardiaque de Grenouille ) tandis que la chaîne légère de type régulatrice RLC se présente sous forme d'un doublet ( due à la présence de forme phosphorylée ) d'un poids moléculaire de 20.000 ou 18.000 daltons. Cette modification de structure doit sans doute avoir une signification biologique et certaines explications peuvent nous être fournies par l'étude de la structure primaire et de l'organisation moléculaires de ces chaînes légères. Nous avons ainsi entrepris l'étude de la structure de l'ALC-L<sub>27</sub> de la myosine ventriculaire gauche de coeur de Porc, la seule qui pouvait être obtenue qualitativement et quantitativement de manière satisfaisante pour mener à bien ce sujet.

De plus, l'intérêt se justifiait en fonction :

1°) de l'étude par Weeds et McLachlan ( 1974 ) [133] qui a montré des analogies de structure entre chaîne légère ALC, la TN C et la parvalbumine.

2°) et du fait qu'il pourrait être intéressant de rechercher une deuxième molécule fixant le calcium à côté de la TN C.

## Isolement et caractérisation de la chaîne légère "L<sub>17</sub>" de la myosine de muscle lisse d'utérus de Vache.

Daniel TETAERT \*, Odile MOREAU \* Kia-Ki HAN, Hartmut F. HILDEBRAND \*\*  
et Gérard BISERTE \*\* ◇.

\* Unité des Protéines normales et Pathologiques, (U-16 — INSERM),  
Place de Verdun — 59045 Lille - Cédex.

\*\* Institut de Recherches sur le Cancer de Lille et Unité de Recherches  
Ultrastructurales et Biochimiques sur des Cellules normales et cancéreuses  
(U 124 — INSERM), B.P. 3567 — 59020 Lille - Cédex.

(28-9-1976).

### INTRODUCTION.

A l'heure actuelle, peu d'études ont porté sur le système contractile du muscle lisse d'utérus. Le faible rendement généralement obtenu lors des préparations de la myosine utérine (principale protéine contractile) après extraction à faible force ionique, ainsi que les propriétés très particulières de cette protéine sont sans doute les raisons pour lesquelles l'étude de ce muscle lisse a été considérablement gênée [1].

Les propriétés particulières de la myosine du muscle lisse d'utérus sont d'une part sa grande solubilité, d'autre part sa plus grande capacité à se réassocier fortement aux autres protéines contractiles [3] ainsi que sa composition en chaînes légères (deux types de chaînes légères : type I de 20 000 daltons (L<sub>20</sub>) et type II de 17 000 daltons (L<sub>17</sub>) [2] tandis que la myosine du muscle blanc de Lapin possède trois chaînes légères de 25 500 (L<sub>25</sub>), 18 000 (L<sub>18</sub>) et 15 500 daltons (L<sub>15</sub>). En présence d'urée 8 M, l'électrophorèse de la myosine utérine montre la présence de deux bandes protéiques L<sub>20</sub> et L<sub>17</sub> : les chaînes lourdes ne pénètrent pas dans le gel et la myosine ne présente pas de chaînes légères sous forme phosphorylée. Enfin, la présence d'une activité protéolytique lysosomale très importante du tissu utérin [4] représente une difficulté supplémentaire au cours de la préparation et la purification de la myosine de ce muscle.

Nous rapportons ici un protocole de préparation et de purification de la myosine d'utérus de Vache permettant l'obtention de cette myosine lisse avec des rendements dix fois supérieurs à ceux cités dans la littérature [1, 3]. Le choix d'une extraction à force ionique élevée en présence de pyrophosphate de potassium jusqu'à une concentration de 40 mM, la purification par un relargage au sulfate d'ammonium conduisent à une préparation dépourvue de la plupart des contaminants majeurs du filament fin. Cette préparation obtenue avec d'excellents rendements représente donc une source intéressante pour l'isolement quantitatif des chaînes légères de la myosine de muscle lisse d'utérus de Vache.

### MATÉRIELS ET MÉTHODES.

#### Préparation de la myosine de muscle blanc de Lapin.

La myosine est préparée selon le protocole décrit par Perry [5].

Ce travail est réalisé dans le cadre de L.A. 040-268 du CNRS.

◇ A qui toute correspondance doit être adressée.

#### Mesure de l'activité Ca<sup>2+</sup> ATPasique.

La mesure de l'activité Ca<sup>2+</sup> ATPasique de la myosine est réalisée dans les conditions préconisées par Driska et Hartshorne [6].

#### Electrophorèse sur gel d'acrylamide en présence d'urée 8 M et de SDS.

L'électrophorèse sur gel d'acrylamide est faite sur plaques (15 × 10 × 0,2 cm). A pH 8,3, en présence d'urée 8 M, nous avons utilisé la technique publiée par Perrie et Perry [7]. L'électrophorèse sur gel d'acrylamide en présence de SDS (dodécylsulfate de sodium) est réalisée selon le protocole de Klotz et coll. [8], en tampon Tris-Borate de pH 7,0.

#### Composition en acides aminés.

La composition en acides aminés est établie après hydrolyse totale en tube scellé (HCl 5,6 N à 110°C en présence de 2 gouttes d'une solution aqueuse de phénol à 1 p. cent (P/V). L'analyse quantitative est effectuée sur l'autoanalyseur JEOLCO AH 5. Le tryptophane est analysé directement par addition de 0,2 p. cent de tryptamine comme agent protecteur, selon la technique décrite par Liu et Chang [9].

#### Coefficient de sédimentation.

Le coefficient de sédimentation de L<sub>17</sub> en solution dans un tampon KCl 0,2 M, Tris-HCl 50 mMole de pH 7,5 est déterminé à l'ultracentrifugeuse Spinco, modèle E.

### RÉSULTATS.

#### Préparation de la myosine d'utérus de Vache.

Toutes les opérations sont effectuées à 4°C et le mercapto-2-éthanol (10 mM) est présent dans toutes les solutions. Après dissection de l'utérus, le myomètre est récupéré, lavé trois fois à l'eau distillée, découpé et homogénéisé avec un Ultra-Turrax (5 000 t. pendant une minute) dans un tampon phosphate de potassium 10 mM de pH 7,5 contenant du KCl 20 mM.

Les protéines solubles et les enzymes cytoplasmiques sont aussi éliminées par lavage et homogénéisation de l'utérus dans une solution de très faible force ionique ne contenant ni K<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, ni ATP. Après centrifugation à 10 000 g pendant 10 mn, la myosine est extraite du résidu par un tampon phosphate de potassium 50 mM de pH 7,5, KCl 0,4 M, K<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 40 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM au Waring Blendor (30 secondes). L'extraction est poursuivie 4 heures et suivie d'une centrifugation (10 000 g



pendant 10 mm) pour éliminer le résidu tandis que le surnageant est centrifugé à 120 000 g pendant 4 heures. En utilisant une solution d'extraction de force ionique élevée contenant un agent relaxant puissant ( $K_2P_2O_7$  à une concentration de 40 mM,) nous facilitons la libération des protéines contractiles et la centrifugation à 120 000 g permet d'éliminer les protéines du réticulum sarcoplasmique.

Le surnageant est alors dilué par dialyse toute une nuit contre 20 volumes de  $CaCl_2$  1 mM. La myosine précipitée est recueillie par centrifugation à 10 000 g pendant 10 minutes.

Afin d'éliminer les contaminants majeurs du filament fin (actine, tropomyosine) et des nucléotides, on effectue trois cycles de dissolution-précipitation (dissolution en présence de KCl 0,3 M et d'ATP 5 mM, centrifugation à 40 000 g pendant 30 minutes et précipitation par dilution avec 10 volumes d'eau pour obtenir une

concentration en KCl de 0,03 M) ainsi qu'un fractionnement par le sulfate d'ammonium (36-53 p. cent) en présence de  $K_2P_2O_7$  20 mM en tampon imidazole-HCl 20 mM de pH 7,5. On obtient ainsi la « myosine AS 50 » qui est ensuite dissoute dans un tampon de phosphate de potassium 50 mM de pH 7,5, KCl 0,3 M et ATP 10 mM, centrifugée à 120 000 g pendant une heure (élimination de l'actine) et finalement purifiée par gel filtration sur Sepharose 6 B (élimination des nucléotides [11] (fig. 1b). Ces deux étapes de purification supplémentaires ont été préférées à la chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex A 50 [12], qui donne un très faible rendement. L'activité  $Ca^{2+}$  ATPasique de la myosine utérine est de l'ordre de 80 nmoles  $Pi \cdot mg^{-1} \cdot mn^{-1}$ .

TABLE I.

Composition en acides aminés des chaînes légères de type II des myosines de muscle lisse.

	Gésier de poulet [20]	Estomac de vache [2]	L <sub>17</sub> Myosine d'utérus de vache	
			(a)	(b)
Asp .....	18,0	21,9	16,8	17
Thr .....	8,3	10,0	8,2	8
Ser .....	6,3	4,5	10,1	10
Glu .....	30,2	25,8	22,7	23
Pro .....	3,9	3,2	9,0	9
Gly .....	13,1	15,8	14,7	15
Ala .....	7,4	8,7	13,6	14
Cy/2 .....	3,0	2,6	2,2	2
Val .....	10,3	13,5	8,2	8
Met .....	7,2	3,2	2,2	2
Ile .....	4,1	4,3	4,7	5
Leu .....	12,0	14,0	12,0	12
Tyr .....	3,0	3,3	3,1	3
Phe .....	7,8	7,5	7,2	7
Lys .....	9,1	9,0	11,3	11
His .....	2,0	2,8	2,2	2
Arg .....	5,0	4,8	5,9	6
Trp .....			0	0

(a) Valeurs moyennes pour 12 analyses 24 et 72 heures.

(b) Valeurs arrondies.

#### Préparation de la chaîne légère L<sub>17</sub>.

L'isolement des chaînes légères de la myosine est généralement effectué en présence de dénaturants puissants (urée 4 M, chlorhydrate de guanidine 5 M ou SDS 1 p. cent) et la séparation est réalisée sur colonne de DEAE-cellulose ou DEAE-Sephadex [10, 11, 13, 14]. Ces méthodes ne nous apparaissent pas satisfaisantes pour la myosine utérine, car le rendement est très faible (1 à 3 mg/300 g d'utérus).

Les chaînes légères de la myosine utérine (obtenue après relargage au sulfate d'ammonium) sont donc libérées par traitement alcalin par l'urée 4 M ou par le chlorhydrate de guanidine 5 M, ou par l'action de l'acide 5,5'-dithionitro-benzoïque. Les solutions contenant les chaînes légères sont dialysées contre l'eau et lyophilisées. 30 mg d'échantillon sont traités pendant 2 heures à 50°C dans 3 ml de tampon Tris-HCl 20 mM de pH 8,0 contenant 0,5 p. cent de SDS et chromatographiés sur une colonne de Sephadex G 150 (2,5 × 45 cm) avec le même tampon à un débit de 6 ml/h. Des fractions de 4 ml sont recueillies sur collecteur.

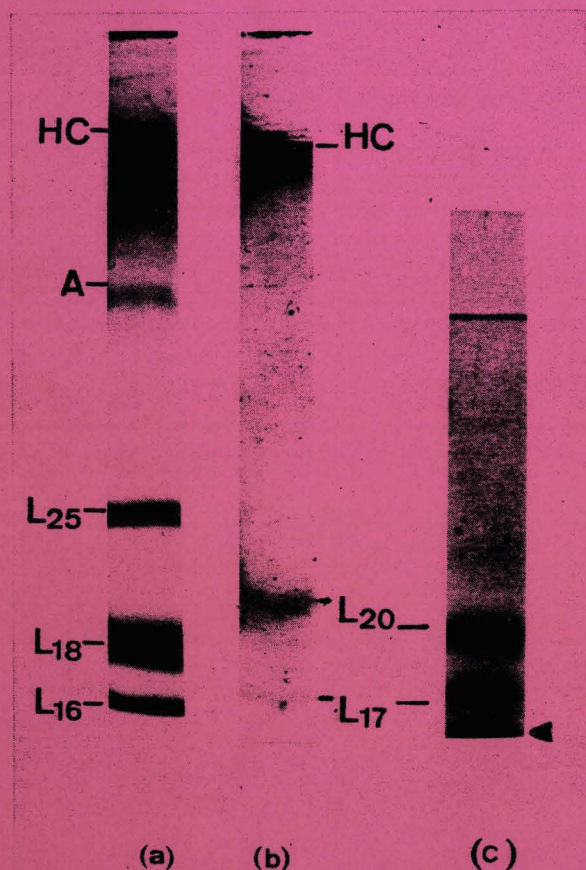


Fig. 1. — (a) et (b) : Electrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS ; gel à 15 p. cent (P/V) d'acrylamide ; tampon Tris-Borate 0,16 M, pH 7,0.

(a) myosine de muscle blanc de lapin.

(b) myosine utérine purifiée.

(c) Electrophorèse en gel d'acrylamide en présence d'urée 8 M à pH alcalin ; gel à 12 p. cent (P/V) d'acrylamide ; tampon Tris-Glycine 0,025 M, pH 8,3.

Les chaînes légères de la myosine utérine purifiée entrent dans le gel. La flèche indique le front de la migration.

Le profil d'éluion établi à l'aide de la réaction de Lowry permet de distinguer deux fractions : A et B (fig. 2). Les fractions « B » sont dialysées, lyophilisées et rechromatographiées dans les mêmes conditions. La fraction « C » ainsi obtenue est dialysée, de façon exhaustive contre l'eau contenant des résines Dowex 1 × 0 et Dowex 50 × 8, afin d'éliminer le Tris et le SDS : elle contient, à l'état pur, la chaîne légère L<sub>17</sub> (fig. 2). La gel filtration sur colonne de Sephadex G 150 conduit d'autre part à de meilleurs résultats : 10 à 20 mg de la chaîne légère L<sub>17</sub> pour 300 g d'utérus.

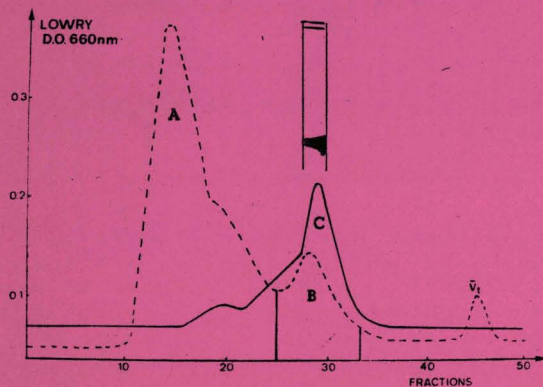


FIG. 2. — Gel filtration des chaînes légères de la myosine utérine après dissociation soit par traitement alcalin ou par réaction au DTNB sur colonne de Sephadex G 150.

— Gel filtration initiale — — — recyclage du pic « B » Vt : DTNB. Au-dessus du pic « C », l'électrophorèse en gel d'acrylamide en présence de SDS de la fraction correspondante.

L'homogénéité de L<sub>17</sub> contrôlée par électrophorèse en gel d'acrylamide est confirmée par ultracentrifugation analytique qui donne un seul pic avec un coefficient de sédimentation de 1,4 S.

D'autre part, on sait que Weeds et Lowey [15] ont montré l'existence de deux types de chaînes légères de la myosine de muscle squelettique : celles libérées sélectivement par traitement alcalin (chaînes alcali 1 et 2 (L<sub>25</sub> et L<sub>10</sub>) protégeant les sites ATPasiques de la myosine) et celles libérées par réaction du DTNB (L<sub>15</sub>) possédant une forme phosphorylée. Nous avons donc effectué ces deux traitements sur la myosine utérine, mais dans les deux cas, nous retrouvons la chaîne L<sub>17</sub> dans la fraction « C » avec approximativement le même rendement. Le fait que la chaîne légère L<sub>20</sub> soit présente dans la fraction « A » après l'une ou l'autre des dissociations, nous permet de penser que les chaînes légères de la myosine utérine ne sont réellement sensibles à ces différents agents et, comme pour la myosine cardiaque [16] aucun procédé ne semble efficace pour une libération sélective de l'une ou l'autre des chaînes légères.

La composition en acides aminés de L<sub>17</sub> a été établie et comparée aux chaînes légères de type II d'autres muscles lisses (gésier et estomac). Les différences les plus significatives concernent le taux de méthionine (plus faible) et de proline (plus élevé).

#### CONCLUSION.

Rares sont les études entreprises actuellement sur la myosine utérine. Nombreuses, par contre, sont les diffi-

cultés rencontrées lors de la préparation de la myosine lisse et plus particulièrement de celle de muscle utérin. De nombreux auteurs ont d'ailleurs renoncé à une étude plus approfondie de la myosine utérine, qui est pourtant la principale protéine contractile de ce muscle lisse, à cause uniquement du faible rendement généralement obtenu lors de la préparation.

L'extraction à faible force ionique (I = 0,075), préconisée par Needham [17], Laszt et Hamoir [18], Huriaux et coll. [19], permet d'isoler ce que l'on appelle la « tonoactomyosine I = 0,075 ». Cependant, quelque soit le mode d'extraction choisi (à force ionique I = 0,4 ou I = 0,075) aucune différence ne peut être constatée entre les préparations de myosine utérine, si ce n'est que du point de vue rendement et de l'extraction sélective de la myosine. Par exemple, notre protocole de préparation permet d'obtenir avec des rendements dix fois supérieur une myosine d'utérus de Vache qui possède cependant les mêmes caractéristiques que celle extraite à faible force ionique, à savoir : deux types de chaînes légères et une activité spécifique de la Ca<sup>2+</sup> ATPase faible.

La contribution des chaînes légères à l'activité ATPasique et la localisation des sites actifs de la myosine restent des problèmes importants.

Pour essayer d'élucider le rôle biologique des chaînes légères, notre travail actuel consiste à isoler et à caractériser la chaîne L<sub>20</sub> afin d'établir ultérieurement les structures primaires de L<sub>17</sub> et de L<sub>20</sub>.

#### BIBLIOGRAPHIE.

1. Wachsberger, P. R. & Pepe, F. A. (1974) *J. Mol. Biol.*, **88**, 385-391.
2. Léger, J. J. & Focant, B. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, **328**, 166-172.
3. Sobieszek, A. & Bremel, R. D. (1975) *Europ. J. Biochem.*, **55**, 49-50.
4. Goodall, F. R. (1965) *Arch. Biochem. Biophys.*, **112**, 403-410.
5. Perry, S. V. (1955) in « *Methods in Enzymology* » (Colowick, S. P. et Kaplan, N. O., Ed) vol. 2, 582-588 — Academic Press, New-York.
6. Driskal, S. & Hartshorne, D. J. (1975) *Arch. Biochem. Biophys.*, **167**, 203-212.
7. Perrie, W. T. & Perry, S. V. (1970) *Biochem. J.*, **119**, 31-38.
8. Klotz, C., Berson, G. & Swynghedauw, B. (1973) *Ann. Biol. Clin.*, **31**, 413-419.
9. Liu, T. Y. & Chang, Y. K. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 2842-2846.
10. Lowey, S., Slayter, M. S., Weeds, A. G. & Baker, H. (1969) *J. Mol. Biol.*, **42**, 1-29.
11. Yagi, K., Okamoto, Y. & Yazawa, Y. (1975) *J. Biochem. (Japan)* **77**, 333-342.
12. Richards, E. G., Chung, C. S., Menzel, D. B. & Olcott, H. S. (1966) *Biochemistry*, **6**, 528-540.
13. Gershman, L. C., Dreizen, P. & Stracher, A. (1966) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **56**, 966-973.
14. Gazith, J., Himmelfarb, S. & Harrington, W. F. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 15-22.
15. Weeds, A. G. & Lowey, S. (1971) *J. Mol. Biol.*, **61**, 701-725.
16. Kendrick Jones, J., Szentkiralyi, E. M. & Szentgyorgi, A. G. (1976) *J. Mol. Biol.*, **104**, 747-775.
17. Needham, D. M. & Williams, J. M. (1963) *Biochem. J.*, **89**, 552-561.
18. Laszt, L. & Hamoir, G. (1961) *Biochim. Biophys. Acta*, **50**, 430-449.
19. Huriaux, F., Hamoir, G. & Oppenheimer, H. (1967) *Arch. Biochem. Biophys.*, **120**, 274-284.
20. Kendrick-Jones, J. (1973) *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B*, **265**, 183-189.

CYTOPHYSIOLOGIE. — *Étude des filaments de paramyosine du muscle lisse de Mytilus edulis L. : ultrastructure, purification et interaction paramyosine-myosine.* Note (\*) de Hartmut F. Hildebrand, Daniel Tetaert et Jacques Gilloteaux <sup>(1)</sup>, transmise par Maurice Durchon.

La paramyosine de l'ABRM de *Mytilus edulis L.* est isolée par une filtration sur gel à l'aide d'une colonne de « Sephadex G 200 ». L'interaction de la paramyosine et de la myosine est effectuée *in vitro*. La microscopie électronique révèle que la myosine fait partie intégrante des cofilaments et qu'elle ne se trouve pas simplement à sa surface.

*The ABRM paramyosin from Mytilus edulis L. has been isolated by "Sephadex G 200" gel filtration. The paramyosin-myosin interaction has been performed in vitro. The ultrastructural observations revealed that myosin has to be integrated into co-filaments with paramyosin and that myosin is not simply localized upon the paramyosin surface.*

INTRODUCTION. — Le muscle rétracteur antérieur du byssus (ABRM) de *Mytilus edulis L.* est un muscle lisse susceptible de maintenir une tension tonique importante pendant de longues périodes, sans consommation excessive d'énergie : phénomène appelé le « catch » <sup>(2)</sup>.

Afin d'élucider ce phénomène, de nombreuses études ont porté sur les propriétés mécaniques [<sup>(3)</sup>, <sup>(4)</sup>] et l'organisation moléculaire du système contractile [<sup>(5)</sup> à <sup>(8)</sup>] de ce muscle.

Des travaux antérieurs ont montré que l'on peut trouver la myosine à la surface du filament épais de l'ABRM [<sup>(6)</sup>, <sup>(9)</sup>, <sup>(11)</sup>] et qu'il y a fusion des filaments épais lors du « catch » [<sup>(10)</sup> à <sup>(13)</sup>]. Ces deux observations nous semblent contradictoires et expliquent sans doute les nombreuses hypothèses émises, sauf si la myosine jouait un rôle encore plus important dans le « catch ».

Dans ce travail, nous étudions l'aspect ultrastructural du filament épais de *M. edulis* et en particulier, la réassociation de la paramyosine purifiée avec la myosine du même muscle.

MATÉRIELS ET MÉTHODES. — *Isolement du filament épais.* — Les filaments épais natifs de l'ABRM de *Mytilus edulis L.* ont été isolés en utilisant une solution de force ionique 0,28, pH 7,0 selon Baguet <sup>(3)</sup>, avec ou sans ATP (0,005 M) sans passer par un stade soluble.

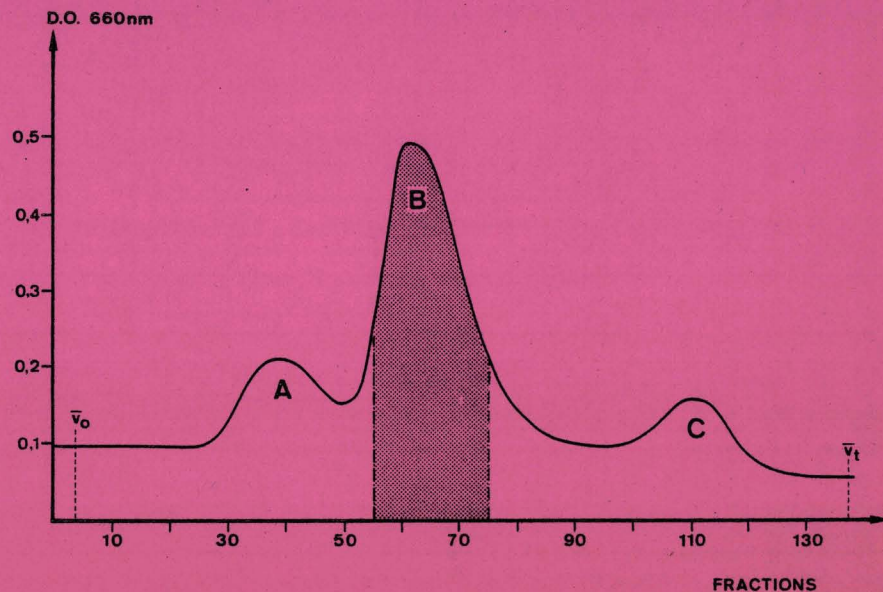
2. *Extraction de la paramyosine brute.* — La paramyosine est extraite suivant la méthode de Szent-Györgyi et coll. <sup>(14)</sup>. Toutefois, nous avons utilisé  $K_4P_2O_7$  0,01 M au lieu de l'ATP 0,005 M.

3. *Extraction et purification de la myosine.* — La myosine est extraite à partir de la préparation de paramyosine brute. Son extraction à force ionique élevée et sa purification ont été effectuées suivant la méthode décrite précédemment <sup>(15)</sup>.

4. *Purification de la paramyosine.* — Après extraction de la myosine, la paramyosine est extraite pendant 20 mn par un tampon phosphate de potassium 0,0075 M de pH 6,5, KCl 0,6 M,  $K_4P_2O_7$  0,01 M, mercapto-2-éthanol 0,005 M, puis précipitée par 10 volumes d'eau et recueillie par centrifugation à 10 000 g pendant 15 mn. 100 mg de cette paramyosine sont alors dissous dans 5 ml d'un tampon Tris borate 0,16 M de pH 7,0, SDS 0,1 %. La solution est dialysée contre ce tampon et centrifugée. Le surnageant est déposé sur une colonne de « Sephadex G 200 » (2,5 × 200 cm), la chromatographie est réalisée à un débit de 6 ml/h et des fractions de 4 ml sont recueillies. Le profil d'élution établi à l'aide de la réaction de Lowry permet de distinguer trois fractions : A, B et C (fig.) qui sont dialysées de façon exhaustive contre l'eau.

5. *Précipitation et formation des filaments synthétiques.* — Les filaments synthétiques sont obtenus à partir de paramyosine dissoute (1 mg/ml) dans du tampon phosphate de potassium 0,01 M de pH 7,0,  $MgCl_2$  0,01 M, KCl 0,6 M et précipités par dilution rapide avec du tampon phosphate de potassium 0,01 M et de  $MgCl_2$  0,01 M pour obtenir une concentration finale en KCl de 0,1 M. Les filaments sont examinés par la technique de contraste négatif au microscope électronique « Philips 300 » (<sup>16</sup>).

6. *Interaction paramyosine-myosine.* — Les cofilaments paramyosine-myosine sont formés par dilution rapide en ajoutant au tampon du  $CaCl_2$   $10^{-6}$  M. Cependant, la coprécipitation ne peut avoir lieu qu'en présence d'ATP 0,015 M et pour un mélange paramyosine-myosine dans le rapport 1 : 1 (p/p), sachant que les concentrations en protéines sont de 1 mg/ml.



Filtration sur gel de la paramyosine à l'aide d'une colonne de « Sephadex G 200 ».  
 $\bar{V}_0$ , volume mort de la colonne;  $\bar{V}_t$ , volume total de la colonne.

RÉSULTATS. — Les préparations de filaments épais natifs de l'ABRM de *M. edulis* contiennent des filaments épais paramyosiniques et des filaments fins d'actine. En présence d'ATP, les filaments épais natifs présentent un aspect rugueux dû à des projections à leur

#### EXPLICATION DES PLANCHES

##### Planche I

Fig. 1 à 3. — Filaments épais natifs. Les préparations sont contaminées par de l'actine (flèches).

Fig. 1. — Filaments après extraction en présence d'ATP 0,005 M. La striation est peu évidente et on note la présence de nombreuses projections à la surface du filament ( $G \times 94\,000$ ).

Fig. 2. — Filament après extraction sans ATP. Le filament est sans projection. On reconnaît la striation transversale de 145 Å ( $G \times 130\,000$ ).

Fig. 3. — Filament après extraction sans ATP avec l'image typique d'un treillage régulier (Bear-Selby type) ( $G \times 145\,000$ ).

Fig. 4. — Filament de paramyosine brute après extraction en présence de  $K_4P_2O_7$  0,01 M. Le filament possède la striation transversale caractéristique ( $G \times 120\,000$ ).

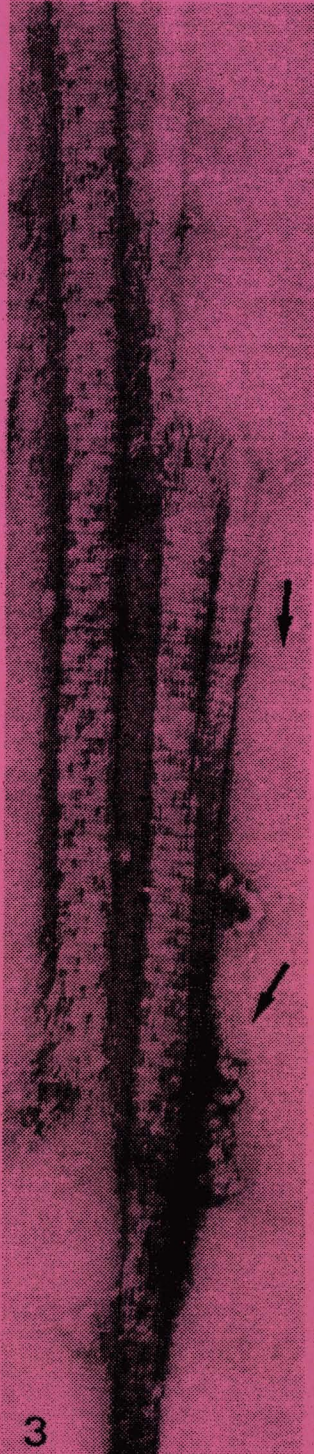
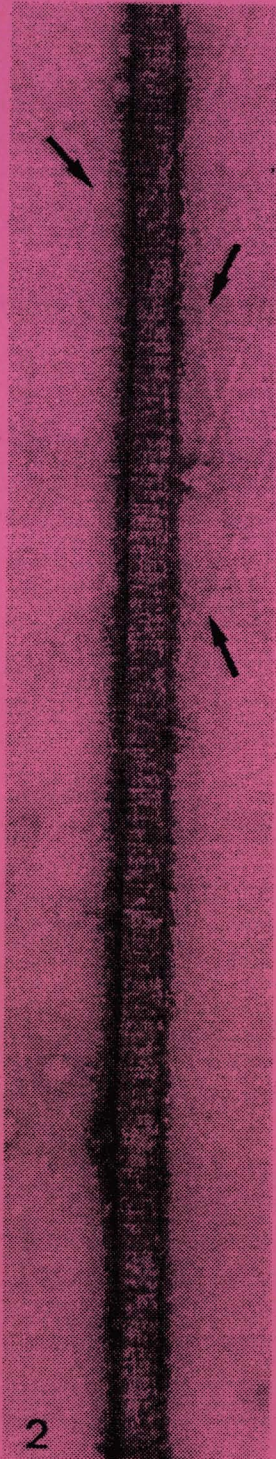
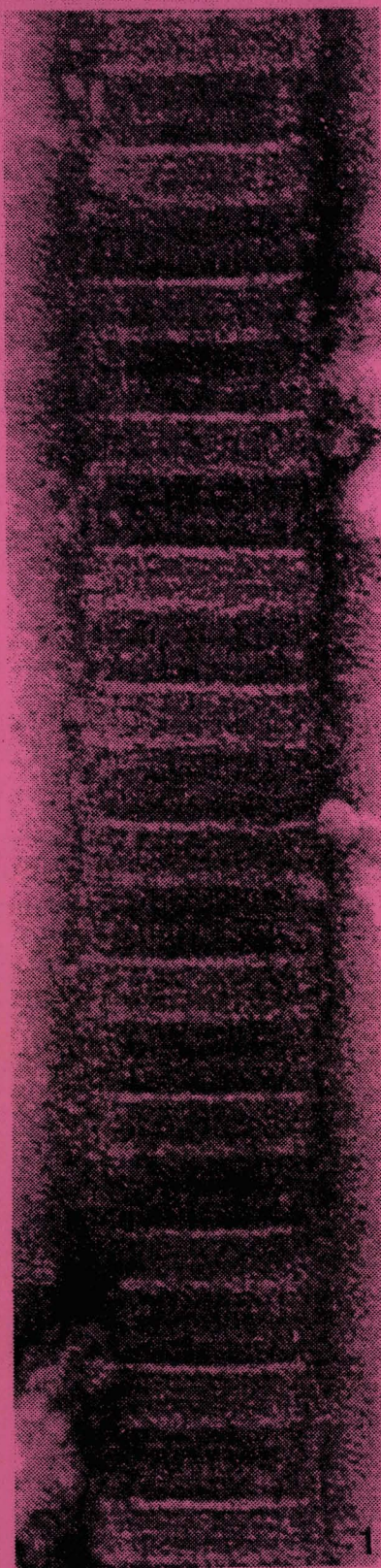


PLANCHE II





## Planche II

Fig. 1. — Fort grossissement d'un filament synthétique de la paramyosine purifiée par filtration sur gel de « Sephadex G 200 » ( $G \times 360\ 000$ ).

Fig. 2. — Cofilament paramyosine-myosine précipité par dilution rapide. La parenthèse indique une région avec des périodes à striations obliques ( $G \times 120\ 000$ ).

Fig. 3. — Fort grossissement d'un cofilament paramyosine-myosine ( $G \times 360\ 000$ ).

surface. La striation transversale du filament épais est peu évidente (pl. I, fig. 1). Sans ATP les projections disparaissent. Nous observons alors deux types : l'un étant caractérisé par une striation de 145 Å (pl. I, fig. 2) et l'autre par un treillage régulier (Bear-Selby type) (pl. I, fig. 3). Après extraction de la myosine, la paramyosine possède sa structure moléculaire caractéristique. Il faut noter qu'en remplaçant l'ATP par le pyrophosphate, on élimine davantage de contaminants myofibrillaires (pl. I, fig. 4).

Après passage de la paramyosine sur colonne de « Sephadex G 200 », nous observons trois pics (fig.). Ces trois pics ont été examinés en microscopie électronique. Le pic A contient des agrégats filamenteux, le pic C présente des éléments du filament fin contaminés par la myosine et le pic B ne contient que des filaments de paramyosine, qui montrent une périodicité axiale de 530 Å (pl. II, fig. 1). Une période comprend deux régions principales, la seconde étant constituée de plusieurs sous-unités. Ce paracristal montre une largeur très homogène de 0,1  $\mu$ .

Les cofilaments paramyosine-myosine possèdent par contre une périodicité totalement différente de 580 Å (pl. II, fig. 3) : une zone plus sombre et homogène de 166 Å et une autre plus large de 414 Å. Cette dernière zone est constituée de 9 bandes d'égale épaisseur (46 Å) et alternativement claires et sombres. Le cofilament possède généralement des régions de 12 à 13 périodes de striations orthogonales et, en alternance, de plus petites régions de 5 à 6 périodes de striations obliques. La longueur de ces dernières périodes est d'ailleurs assez hétérogène et nous constatons qu'il existe plusieurs périodes dont la partie striée est de 380 Å au lieu de 414 Å. Dans ce cas, la striation est moins nette. De plus, elle est moins bien définie sur sa périphérie sur une largeur de 100 à 200 Å. Il est intéressant de remarquer que la largeur du cofilament est plus irrégulière allant de 0,1 à 0,13  $\mu$  (pl. II, fig. 2).

CONCLUSION. — Des modifications ont été apportées concernant la méthode d'extraction et de purification de la paramyosine. L'utilisation du  $K_4P_2O_7$  au lieu de l'ATP permet d'éviter de nombreuses étapes de recrystallisation, celui-ci facilitant une relaxation plus rapide du complexe actomyosinique <sup>(15)</sup>.

La filtration sur gel est employée afin d'obtenir une paramyosine pure sans précipitation éthanolique <sup>(10)</sup>. De plus, cette paramyosine peut alors s'associer à la myosine, mais leur réassociation semble être imparfaite comme l'indique l'irrégularité de la périodicité du cofilament synthétique. Néanmoins, le changement dans la périodicité des cofilaments révèle que l'interaction de la myosine n'est pas simple mais doit vraisemblablement s'effectuer au sein d'une matrice axiale paramyosinique. De plus, l'association est aussi dépendante de la présence d'ATP, cette observation rejoint d'ailleurs celle de Nonomura <sup>(8)</sup>. A première vue, il se pourrait que la myosine, présente à la surface des filaments épais, soit un obstacle à l'interaction paramyosinique. Par conséquent, si la myosine doit s'immiscer plus intimement au filament épais, on comprend plus aisément qu'il y ait une possibilité de rapprochement étroit ou même fusion des filaments épais, favorisé par une obligatoire interaction

actomyosinique<sup>(17)</sup>. Dès lors, nos résultats appuieraient l'Hypothèse dite « paramyosin hypothesis » [(<sup>10</sup>), (<sup>11</sup>)].

(\*) Séance du 11 décembre 1978.

(<sup>1</sup>) J. Gilloteaux a reçu l'aide financière de la Fondation Universitaire (Rapport 1976) et de l'European Molecular Biology Organization. Certains résultats faisaient en outre partie de sa Dissertation doctorale présentée et reçue à Louvain (1974).

(<sup>2</sup>) F. BAGUET et J. M. GILLIS, *J. Physiol. (Lond.)*, 198, 1968, p. 127.

(<sup>3</sup>) F. BAGUET, *Pflügers Arch.*, 340, 1973, p. 19.

(<sup>4</sup>) B. R. JEWELL, *J. Physiol. (Lond.)*, 149, 1959, p. 154.

(<sup>5</sup>) C. COHEN, A. G. SZENT-GYÖRGYI et J. KENDRICK-JONES, *J. Mol. Biol.*, 56, 1971, p. 223.

(<sup>6</sup>) H. F. EPSTEIN, B. J. ARONOW et H. E. HARRIS, *J. Supramol. Struct.*, 3, 1975, p. 354.

(<sup>7</sup>) J. GILLOTEAUX et F. BAGUET, *J. Microscopie*, 20, 1974, p. 53 a.

(<sup>8</sup>) Y. NONOMURA, *J. Mol. Biol.*, 88, 1974, p. 445.

(<sup>9</sup>) J. LOWY et B. M. MILLMAN, *Phil. Trans. B.*, 246, 1963, p. 106.

(<sup>10</sup>) W. H. JOHNSON, S. J. KAHN et A. G. SZENT-GYÖRGYI, *Science*, 130, 1959, p. 160.

(<sup>11</sup>) J. C. RÜEGG, *Physiol. Rev.*, 51, 1971, p. 201.

(<sup>12</sup>) A. ELLIOTT, *Proc. Roy. Soc. B.*, 186, 1974, p. 53.

(<sup>13</sup>) J. HANSON et J. LOWY, *Proc. Roy. Soc. B.*, 154, 1961, p. 173.

(<sup>14</sup>) A. G. SZENT-GYÖRGYI, C. COHEN et J. HENDRICK-JONES, *J. Mol. Biol.*, 56, 1971, p. 239.

(<sup>15</sup>) D. TETAERT, O. MOREAU, K. K. HAN, H. F. HILDEBRAND et G. BISERTE, *Biochimie*, 59, 1977, p. 337.

(<sup>16</sup>) C. ORIOL, M. F. LANDON et H. F. HILDEBRAND, *Cytobiologie*, 14, 1977, p. 350.

(<sup>17</sup>) J. GILLOTEAUX et F. BAGUET, *Cytobiologie*, 15, 1977, p. 192.

H. F. H. : *Institut de Recherches sur le Cancer de Lille*  
et Unité 124 de l'I.N.S.E.R.M., B.P. n° 3567, 59020 Lille Cedex;

D. T. : Unité 16 de l'I.N.S.E.R.M., place de Verdun, 59045 Lille Cedex;

J. G. : *Department of Physiology, Upstate Medical Center,*  
*State University of New York, Syracuse NY 13210, U.S.A.*  
et Département de Neuropathologie, Faculté de Médecine,  
Université de Louvain, Belgique.

## Tumoral myosins of Ni<sub>3</sub>S<sub>2</sub>-induced rhabdomyosarcomas in rat and rabbit: comparative studies with adult and fetal myosins of skeletal muscle

Hartmut F. Hildebrand<sup>1</sup>), Jean-Pierre Kerckaert, Gérard Biserte

Institut de Recherches sur le Cancer de Lille and Unité 124 de l'I.N.S.E.R.M., Lille/France

Daniel Tetaert, Xavier Grandier-Vazeille

Unité de Recherches sur les Protéines (U. 16 de l'I.N.S.E.R.M.), Lille/France

Received June 22, 1979

Accepted October 10, 1979

*Myosin — synthetic filaments — myosin light chain composition — SDS/Urea PAGE — ATPase activity — isoenzymes*

Tumoral myosins were isolated from rat and rabbit rhabdomyosarcomas and compared with normal adult and fetal skeletal myosins. The synthetic filaments, the light-chain composition and the Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity were studied.

In the presence of Mg<sup>2+</sup>, normal myosins precipitated as bipolar filaments (0.5 μm), fetal and tumoral myosins, however, precipitated as long fusiform filaments (1 to 10 μm). SDS-PAGE revealed that tumoral myosins contain the same light-chains as fetal myosin (25 000 and 18 000 daltons, L<sub>25</sub>-L<sub>18</sub>). The third light-chain of the normal muscle myosin (16 000 daltons, L<sub>16</sub>) was absent. In addition, Urea-PAGE revealed the absence of the phosphorylated form of the L<sub>18</sub> in fetal and tumoral myosins.

Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity measurements performed in function of the Ca<sup>2+</sup> concentration showed similarities between fetal and adult muscle myosins. The Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity of tumoral myosins, however, was very low and slightly activated by increasing the Ca<sup>2+</sup> concentration (0.01 to 10 mM).

The investigation has shown that fetal and tumoral myosins are identical concerning the ultrastructure of their synthetic filaments and their light-chain composition. This was not so in regard to the Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity. This is probably the result of the expression of a new myosin -or of one of its polypeptides-, which has a different Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity.

### Introduction

Rhabdomyosarcoma, the malignant tumor of skeletal muscle is estimated to be the most common of all soft tissue sarcomas in childhood [23]. In animals this tumor can be induced experimentally by Moloney sarcoma virus [25], by implantation of organic substances [2], or by intramuscular injection of various heavy metals and their compounds [11, 12]. One of the most specific substances inducing rhabdomyosarcomas is

the nickel-subsulphide Ni<sub>3</sub>S<sub>2</sub> [12]. Morphologists and biochemists prefer the induction of rhabdomyosarcomas by intramuscular injection of this compound to other models [3, 4, 5, 12, 36].

The prominent characteristics of the tumoral muscle fibers are recognized in the differentiation of myofilaments and the assembly and organization of myofibrils. In contrast to normal muscle, myofibrils are oriented at random in the cytoplasm and regular alignment of myofibrils sometimes occurs [4, 9, 14, 16]. Without regard to the morphological differences between rhabdomyosarcomas and normal striated muscle, one of the most typical characteristics of the tumor is its immobility. Rhabdomyoblasts grown in culture, undergo fusion and myofibrillar differentiation and develop transverse striation showing very little motility and contraction [12]. Embryonic or neonatal myoblasts grown under the same conditions, however, display motility and contract.

The problem of the immobility of tumoral myoblasts seems to be very important. Thus the study of the structure and the macromolecular organization of the contractile proteins appears to be essential for a better comprehension of the inhibition of contraction in muscle tumors. This problem can be approached by studying, in particular, the myosin of tumoral muscle and comparing it with myosin of normal adult muscle and especially with that of embryonic muscle. For instance, myosin of normal adult muscle has three light-chains of different molecular weight [22]; myosin of fetal muscle, however, has only two light-chains [6, 24].

First studies on tumoral contractile proteins have recently been carried out demonstrating that their presence in tumor cells may be of potential importance in evaluating malignant growth [10]. On the other hand, Adelstein and Conti [1] have shown that one tumoral myosin light chain can be phosphorylated.

In this investigation, we at first induced rhabdomyosarcomas in Wistar Rats [14]. We then induced muscle tumors in rabbits [16], since rabbit white muscle proteins are the most usual references for biochemical and biophysical studies on contractile proteins.

<sup>1</sup>) Dr. Hartmut F. Hildebrand, Institut de Recherches sur le Cancer de Lille and Unité 124 de l'INSERM, B.P. 3567, F-59020 Lille Cédex/France.

This report deals with the study of normal, fetal and tumoral myosins of rat and rabbit. The ultrastructure of the myosin synthetic filaments and the light-chain composition of these myosins will be described.  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase activity analyses have been carried out to allow a more direct approach to the study of the immobility of rhabdomyoblasts.

#### Materials and methods

##### *Tumor production*

Tumors were induced by implantation of 20 mg of  $\text{Ni}_3\text{S}_2$  into the thigh muscle of 3-month-old Wistar Rats and of 80 mg into the thigh



Fig. 1. Synthetic filaments of rabbit myosins formed by rapid dilution. Normal adult myosin precipitates as short bipolar filaments in the absence (a) as well as in the presence (b) of 8 mM  $\text{MgCl}_2$ . Normal fetal myosin forms short bipolar filaments without  $\text{MgCl}_2$  (c) but

long fusiform filaments when  $\text{MgCl}_2$  is added (d). The same result is obtained with myosins of rhabdomyosarcomas in the absence (e) or in the presence (f) of  $\text{Mg}^{2+}$  ions. — 100 000  $\times$ .

muscle of 6-month-old rabbits as described previously [14, 15]. Tumors were obtained in rats after four to six months, in rabbits after eight months to two years. All tumors used for this work were examined by light and electron microscopy and have been identified as pleomorphic rhabdomyosarcomas previously described [14, 16].

#### *Myosin preparations*

Normal adult rat and rabbit muscles as control were taken from the healthy thigh of the tumor-bearing animals as well as from tumor free animals. Fetal muscles were taken from 14-day-old rat fetuses and 20-day-old rabbit fetuses. Normal, fetal and tumoral muscles were fragmented in a Waring-Blender homogenizer for 2 min at high speed. The homogenates were suspended in 0.6 M KCl, 10 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8 containing 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM K<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 2 mM EGTA (ethylene-glycol-tetraacetic acid). The suspension was made to a volume of 5 ml/g of muscle. The homogenates were extracted for 90 min. All solutions contained 10 mM β-mercaptoethanol and all preparations were carried out at 4 °C. After extraction, the homogenates were sedimented at 10000 g for 10 min. The supernatants were then precipitated by dialysis against 10 volumes of 1 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8, and collected by centrifugation at 10000 g for 15 min. From these pellets myosins were purified by suspension-precipitation cycles [29] and by ammonium sulfate fractionation using the 40 to 50% saturated ammonium sulfate fraction. 40 mM K<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> was added in all purification steps.

Protein concentrations were determined by the biuret method. Protein concentrations determined with the molar extinction coefficient  $E_{1\%}^{280} = 5.60$  were compared with values obtained with the biuret method and found to be accurate when the  $A_{280nm}/A_{260nm}$  ratio was 1.40 or greater.

#### *Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis*

SDS-gel electrophoresis using the Laemmli's buffer system [20] and the apparatus described by Kerckaert [19] was performed on 10 to 25% acrylamide gradient slab gels (15 × 10 × 0.1 cm). The ratio acrylamide/bis-acrylamide was constant: 30:0.8. For molecular weight determination the following standard proteins were electrophoresed simultaneously: bovine serum albumin (68000), IgG heavy-chain (50500), ovalbumin (43000), IgG light-chain (23500), hemoglobin (15500) and insulin (5700). The gels were scanned at a wavelength of 550 nm on a Joyce-Loebl micro-densitometer.

#### *Urea-polyacrylamide gel electrophoresis*

Polyacrylamide gel electrophoresis in 8 M urea, 20 mM tris-glycine, pH 8.4 was performed as described by Perrie and Perry [28]. The acrylamide concentration of the gel was 10% (bis-acrylamide 0.26%). Electrophoresis was carried out in tubes (0.5 × 12 cm) or on slabs (15 × 10 × 0.1 cm) in the apparatus indicated above [19]. Electrophoresis was performed for approximately 5 h at 130 V.

#### *Polyacrylamide gel electrophoresis in presence of Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>*

The general procedure for the electrophoresis of intact myosins in pyrophosphate gels has been carried out according to Hoh [17]. Gels were prepared with total acrylamide concentration of 4.5% (C=4.5%). Slab gels used (15 × 10 × 0.1 cm) were loaded with 200 μg myosin and electrophoresis was carried out at 40 V for 24 h at 4 °C with recirculation of the electrode buffer.

#### *Ca<sup>2+</sup> ATPase activity measurements*

For the kinetic study of myosin-ATPase activity P<sub>i</sub> liberation was measured at different Ca<sup>2+</sup> concentrations. The reaction mixture (2 ml) contained 0.5 M KCl, 0.05 M tris-HCl buffer, pH 7.5, 2.5 mM ATP (Sigma Chemical), and CaCl<sub>2</sub> the concentration of which varied

from 0.01 mM to 10 mM. The reaction mixture was agitated in a water-bath at 25 °C for 5 min [13]. Then 0.1 ml or 0.05 ml of 1 mg/ml myosin in 0.5 M KCl and 0.05 M tris-HCl buffer pH 7.5 was added. The reaction (ATP-hydrolysis) was stopped after 5 min by addition of 1 ml of 15% TCA (tetra-chloroacetic acid). After sedimentation of the TCA-myosin precipitate, the liberated P<sub>i</sub> was measured using the colorimetric method of Fiske and Subbarow [7].

#### *Electron microscopy*

Myosins dissolved (1 mg/ml) in 0.5 M KCl, 10 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8 were precipitated with 4 volumes of 10 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8 with or without 10 mM MgCl<sub>2</sub>. Thus the final salt concentration of the filament suspension was 0.1 M KCl, 10 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8 with or without 8 mM MgCl<sub>2</sub>. The final protein concentration was 0.2 mg/ml.

One drop of the filament containing solution was applied to a 200-mesh grid coated with a Pioloform F film [35]. The grid was rinsed with a 0.1 M KCl, 10 mM potassium phosphate buffer, pH 6.8 with or without 8 mM MgCl<sub>2</sub>. The wash was followed immediately by 0.5% (wt/vol) uranyl acetate solution in 50% (vol/vol) ethanol for negative staining [27]. The samples were examined in a Philips EM 300 electron microscope at an accelerating voltage of 80 KV using a 50 μm objective aperture. Photographs were taken on Kodak 2792 electron image plates at a magnification of 40000.

## **Results**

### *Myosin extraction and purification*

By using the purification method of Perry [30] followed by ammonium sulfate fractionation, we easily could extract and purify the myosins of normal rat and rabbit skeletal muscles. The yield of fetal and tumoral myosins extracted by these methods was so low, however, that we had to change the procedure. For tumoral myosins, not only the prolongation (90 min instead of 10 min) of the extraction time was needed, but the ionic strength of extraction buffer also had to be increased (I=0.6 instead of I=0.3). In addition, a strong relaxing agent was necessary: potassium pyrophosphate at high concentration [38]. These three modifications facilitated the liberation of the tumoral contractile proteins and increased the yield considerably. 40 mM K<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> was also added in the final myosin solution destined for the ammonium sulfate fractionation. For fetal myosins, it was sufficient to prolong the extraction time up to 90 min. For comparative purposes all myosins were always extracted and purified under the same conditions.

### *Synthetic filaments*

Synthetic filaments of the different myosins were formed either by dialysis or by rapid dilution in the KCl/phosphate buffer with an ionic strength of I=0.1 and pH 6.8, with or without 8 mM MgCl<sub>2</sub>. The length of the filaments was very heterogeneous when precipitation by dialysis was performed [32]. Thus, for comparative purposes, all the myosins described in this work have been precipitated by rapid dilution using a myosin solution of constant concentration (1 mg/ml) which was diluted to a concentration of 0.2 mg of myosin in 1 ml.

*Myosins of normal adult muscles.* The synthetic filaments of rabbit white skeletal muscle myosin formed in the KCl/phosphate buffer with or without MgCl<sub>2</sub> had generally the



Fig. 2. Synthetic filaments of rat myosins formed by rapid dilution. Normal adult myosin precipitates as short bipolar filaments without (a) and with (b) 8 mM  $MgCl_2$ . Normal fetal myosin forms short bipolar filaments in the absence (c) but long fusiform filaments in the presence of  $MgCl_2$  (d). Tumoral myosins precipitate under the same

conditions like fetal myosin: short bipolar filaments are obtained without  $MgCl_2$  (e) and long fusiform filaments after addition of  $Mg^{2+}$  ions (f). From approximately 20% of rat rhabdomyosarcomas myosins were extracted precipitating as monopolar filaments in the absence of  $MgCl_2$  (g). — 100000  $\times$ .

bipolar aspect described by Huxley [18] (Figs. 1a and b). These filaments were very homogeneous in length and width. They had a regular length of 0.5  $\mu\text{m}$ , a width of approximately 15 nm at their bare zone and of about 50 nm at their extremities. The filament length was somewhat less homogeneous when the myosin was precipitated in the absence of  $\text{Mg}^{2+}$  ions.

Bipolar filaments were also obtained in the absence as well as in the presence of  $\text{Mg}^{2+}$  ions when rat skeletal muscle myosin was precipitated (Figs. 2a, b). The length of the filaments was not totally homogeneous varying from 0.3 to 0.5  $\mu\text{m}$ . The presence of  $\text{MgCl}_2$  had no appreciable effect on the filament length.

*Myosins of fetal muscles.* Fetal myosins precipitated in the KCl/phosphate buffer without  $\text{Mg}^{2+}$  ions formed bipolar filaments with a clear bare zone. These filaments had very heterogeneous lengths varying from 0.2 to 0.6  $\mu\text{m}$  in preparations of rabbit and rat fetal myosins (Figs. 1c, 2c). However, fetal myosins precipitated in the  $\text{Mg}^{2+}$  ions containing buffer produced exclusively long fusiform filaments. Although the filaments of fetal rat myosin had a width of some 25 nm only (Fig. 2d), those of fetal rabbit myosin had an average width of about 50 nm (Fig. 1d). The length of the filaments was quite variable for both fetal muscle myosins. The smallest filaments measured 0.6  $\mu\text{m}$ , the longest 10  $\mu\text{m}$  and more. The majority of the filaments did not exceed 2  $\mu\text{m}$ .

*Myosins of rhabdomyosarcomas.* The synthetic filaments of tumoral myosins formed in the KCl/phosphate buffer, without  $\text{MgCl}_2$ , generally had the bipolar conformation (Figs. 1e, 2e). We extracted myosin precipitating as monopolar filaments in the absence of  $\text{MgCl}_2$  from approximately 20% of rat rhabdomyosarcomas (Fig. 2f). This type of filaments were

exclusively formed in these preparations. All the synthetic filaments of tumoral myosins were found to have an average width of 15 nm at their bare zone.

When the tumoral myosins were precipitated in the  $\text{MgCl}_2$  containing buffer long fusiform filaments were obtained (Figs. 1f, 2g). They were identical to those produced by fetal myosins precipitated under the same conditions. Their average size was 1 to 2  $\mu\text{m}$ , however, filaments attaining a length of 10  $\mu\text{m}$  and more were found. Rat tumoral myosins precipitating as monopolar filaments in the absence of  $\text{MgCl}_2$  always produced long fusiform filaments when  $\text{MgCl}_2$  was added to the precipitation buffer.

#### Light chain composition of the different myosins

The aim of this study was to determine the light-chain composition of the adult, fetal and tumoral myosins of rabbit and rat. Polyacrylamide gel electrophoresis was performed either in the presence of SDS or in the presence of 8 M urea at pH 8.4.

The SDS-acrylamide gel pattern of adult rabbit skeletal myosin (Fig. 3a) reveals the heavy chains as well as the three light chains of 25 000, 18 000 and 16 000 daltons [22], which we called  $L_{25}$ ,  $L_{18}$  and  $L_{16}$  [38]. The gel of adult rat skeletal myosin displays the same bands (Fig. 3d). In addition, this gel shows the heterogeneity of rat skeletal myosin light chains. This heterogeneity has previously been evidenced by Lowey and Risby [22] who demonstrated that myosin preparations from rat skeletal muscle contain two types of myosin: red muscle and white muscle myosins.

The fetal myosins of rabbit and rat muscle (Figs. 3c and e) possess only two light-chains:  $L_{25}$  and  $L_{18}$ . The fetal rat myosin displays the same heterogeneity in its light-chains composition as the adult myosin. In these preparations,  $L_{16}$  is visible as a rather faint band. At the time where fetuses were taken, muscle differentiation was at a state where adult myosin appears. Otherwise, it is very difficult to determine exactly the age of fetuses and an error of plus or minus 12 hours is possible.

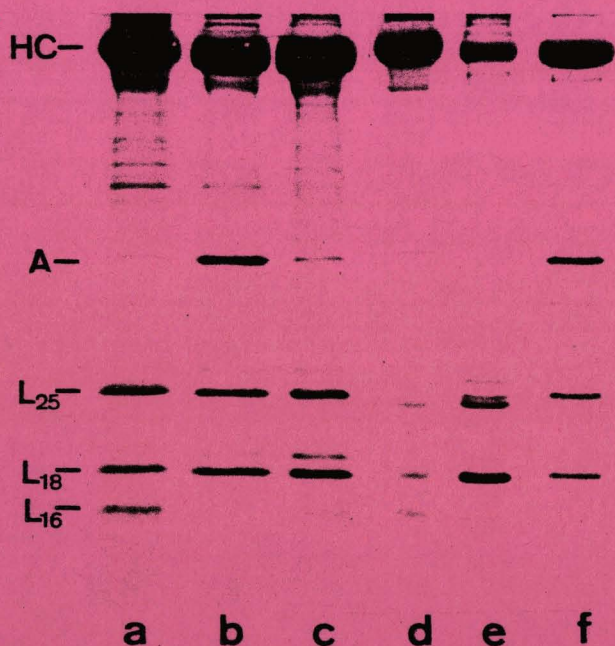


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (10–25% gradient gel slab) of rabbit normal (a), tumoral (b) and fetal (c) myosins and of rat normal (d), fetal (e) and tumoral (f) myosins. — HC Heavy chains. — A Actin. — L Light chains.

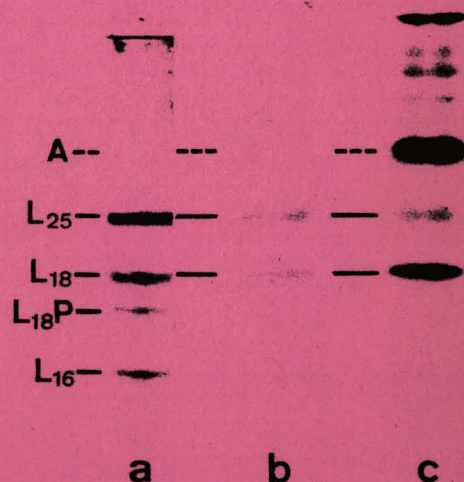


Fig. 4. Urea-polyacrylamide gel electrophoresis at pH 8.4 of rabbit normal (a), fetal (b) and tumoral (c) myosins. — A Actin. — L Light chains. —  $L_{18}P$  Phosphorylated form of  $L_{18}$ .

The SDS-acrylamide gel patterns of the tumoral rabbit and rat myosins reveal the same light-chain composition as that observed for fetal myosins (Figs. 3b, f). The light chain with the lowest molecular weight,  $L_{16}$ , is always absent. Although a relaxing agent was used during the extraction and the purification cycles, tumoral myosins were always contaminated by actin. Even when purification cycles were performed in the presence of 10 mM ATP [34], no further actin could be eliminated. Nevertheless, it is noteworthy, that this contamination does not exceed 5 to 6% as has been calculated by scanning densitometry.

Urea acrylamide gel electrophoresis at pH 8.4 was carried out in order to reveal the phosphorylated form of  $L_{18}$  ( $L_{18}P$ ) usually existing in normal adult skeletal muscle myosins (Figs. 4a, 5a). In fetal as well as in tumoral myosins, however, the phosphorylated form of this light chain does not appear (Figs. 4b, c, 5b, c). Urea acrylamide gel electrophoresis again reveals the light chain heterogeneity of rat skeletal muscle myosins (Figs. 5a, b) and confirms at the same time the absence of  $L_{16}$  in fetal and tumoral myosins of rabbit and rat.

#### $Ca^{2+}$ ATPase activity

Kinetics of the myosin ATPase activity of the six different myosins were carried out by increasing the  $Ca^{2+}$  concentra-

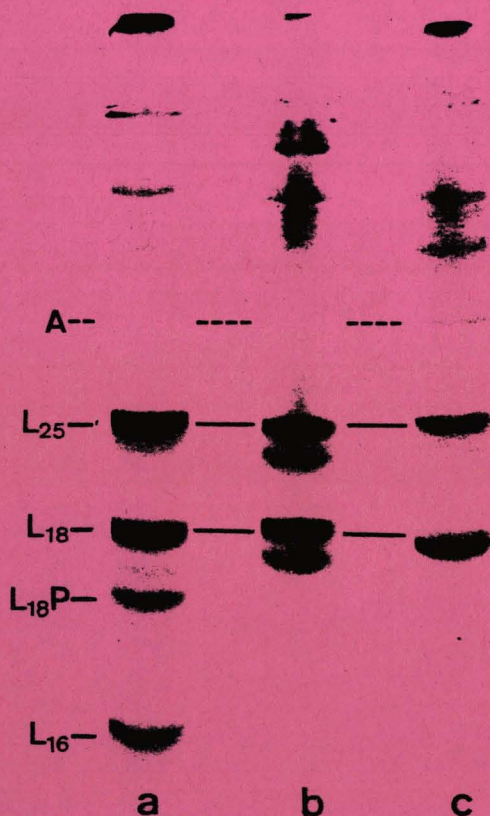


Fig. 5. Urea-polyacrylamide gel electrophoresis at pH 8.4 of rat normal (a), fetal (b) and tumoral (c) myosins. — A Actin. — L Light chains. —  $L_{18}P$  Phosphorylated form of  $L_{18}$ .

tion from 0.01 mM to 10 mM. The curves established after measurements of  $Ca^{2+}$  ATPase activity of adult and fetal rabbit myosins were parallel, the fetal myosin having a generally lower ATPase activity (Fig. 6). The enzymatic activity of tumoral rabbit myosin, however, was not measurable at low  $Ca^{2+}$  concentration and increased slightly at high  $Ca^{2+}$  concentration (10 mM liberating only  $30 \pm 40$  nmoles  $P_i$   $min^{-1} mg^{-1}$  (Fig. 6). At this concentration, the specific ATPase activities of adult and fetal rabbit myosins were approximately 20 times higher (Tab. I). The values measured for the specific activity of rabbit adult myosin ( $546 \pm 48$  nmoles  $P_i$   $min^{-1} mg^{-1}$ ) were in accord with those of Leger et al. [21]:  $567 \pm 150$  nmoles  $P_i$   $min^{-1} mg^{-1}$ .

Practically the same results were obtained after measurements of the  $Ca^{2+}$  ATPase activity of adult, fetal and tumoral rat myosins (Fig. 7). In this case, the fetal myosin ATPase activity was somewhat higher than that of adult muscle myosin. The specific ATPase activity of the tumoral myosin was also very low and could be compared to the ATPase activity of the tumoral rabbit myosin (Tab. I). Since the ATPase activities of both tumoral myosins were very low, the observed differences were not significant. A potential trivial explanation for this observation cannot, however, be excluded: the isolation methods for the fetal muscle and for the tumoral muscle were essentially identical, so differences due to isolation technology can be excluded, but the possibility remains that there is a factor in the cytoplasm of the sarcoma which destroys the myosin ATPase activity during its isolation. In order to provide compelling evidence that no modification of the tumoral enzyme occurred during the isolation process, we carried out an experiment whereby fetal and tumoral myosins were exposed to exactly the same isolation environment. We took rat fetal muscle and rat rhabdomyosarcoma tissue and mixed them (20 g of each) at homogenization and then isolated the myosins together. The values measured for the specific ATPase activity of the resulting material were  $230 \pm 17$  nmoles  $P_i$   $min^{-1} mg^{-1}$  (Tab. I). This is evidence that no modification of the enzyme occurred during its isolation.

Measurements of  $Mg^{2+}$  ATPase activity and of its actin activation were also performed and we observed that tumoral as well as fetal myosins were activated 10 to 20 times in the presence of actin. Since the measurements on actomyosin ATPase have been made at low ionic strength [27] (under these conditions myosin often forms aggregates), the results were rather heterogeneous and should be repeated with HMM or HMM-S, only. Our yields of tumoral myosin, however, were not important enough for the preparation of these myosin sub-units. Nevertheless, the obtained values show clearly that tumoral and fetal myosins can be actin-activated like normal myosins.

#### Differences in native fetal and tumoral myosins

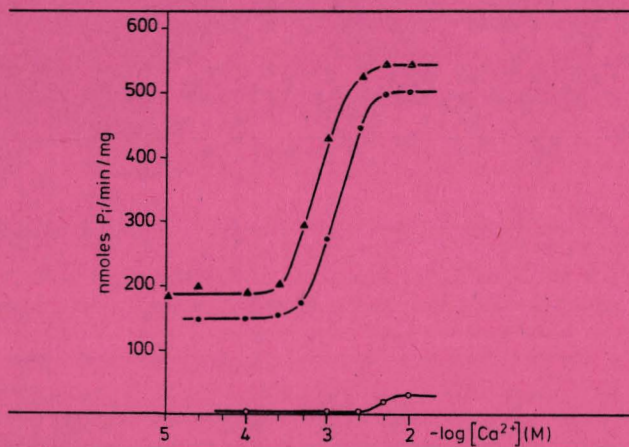
Although the light chain composition of fetal and tumoral myosins was identical,  $Ca^{2+}$  ATPase activity was completely different. This fact strongly suggested the existence of different heavy chain species of fetal and tumoral myosins. With the aim to reveal eventual differences, we electrophorized on pyrophosphate polyacrylamide slab gels the myosins isolated from the previously mixed rat fetal muscle and rat rhabdo-



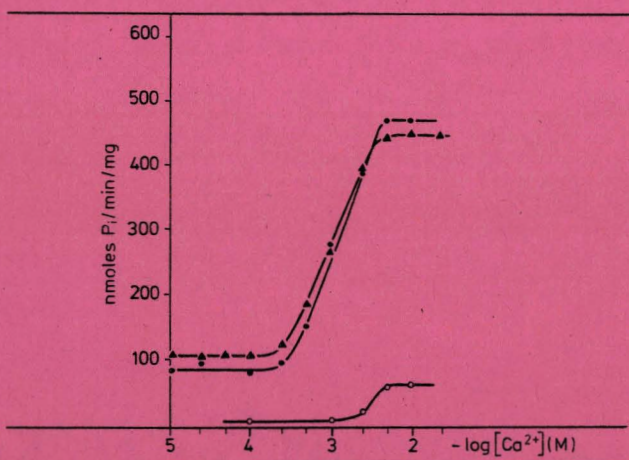
**Tab. I.** Maximal values of  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase activity of the different normal, fetal and tumoral myosins of rabbit and rat.

Animals	Myosins	No. of exp.	Maximal values
Rabbit	normal	6	nmole Pi/min/mg 546 ± 48 567 ± 150*
	fetal	3	510 ± 35
	tumoral	5	30 ± 10
Rat	normal	7	450 ± 60
	fetal	5	470 ± 21
	tumoral	5	60 ± 20
	fetal + tumoral	2	230 ± 17

Consult the text for experimental design. The maximal values are given in nmoles of inorganic phosphorus (Pi) liberated per mg of myosin per minute. — \*Leger et al., 1975 [20].

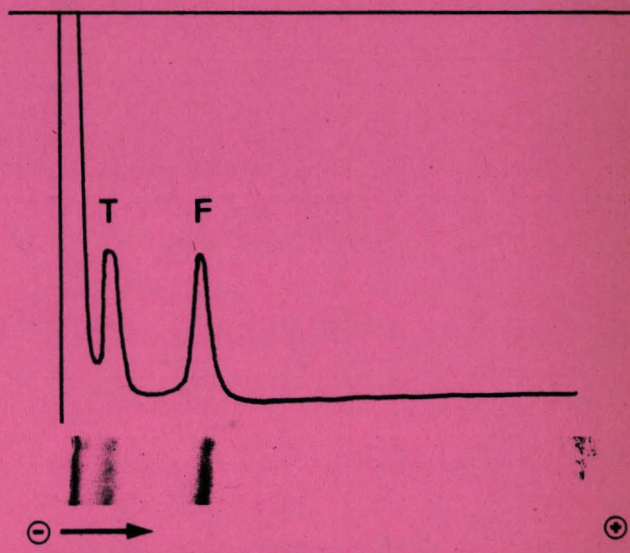


**Fig. 6.** Kinetics of  $\text{Ca}^{2+}$  dependent ATPase activity of rabbit myosins of normal adult muscle ( $\blacktriangle$ ), of fetal muscle ( $\bullet$ ) and of rhabdomyosarcomas ( $\circ$ ).



**Fig. 7.** Kinetics of  $\text{Ca}^{2+}$  dependent ATPase activity of rat myosins of normal adult muscle ( $\blacktriangle$ ), of fetal muscle ( $\bullet$ ) and of rhabdomyosarcomas ( $\circ$ ).

myosarcoma tissue used for  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase activity measurements. The myosin mixture displayed two components on pyrophosphate gel electrophoresis (Fig. 8) the fastest of which is fetal myosin as was revealed when fetal myosin was electrophorized alone. Densitometric recording (Fig. 8) showed that the two myosins are present in practically equal concentrations. This explains the decrease of the specific  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase activity of the mixture to a half of fetal myosin  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase activity (Tab. I).



**Fig. 8.**  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -polyacrylamide gel electrophoresis and its densitometric enregistrement of myosins extracted from previously mixed rat fetal muscle (F) and rat rhabdomyosarcoma tissue (T).

## Discussion

Myosins of normal adult rabbit and rat skeletal muscle could easily be extracted by using the method of Perry [29]. Concerning the extraction of fetal myosins and in particular tumoral myosins, we met with difficulty at the outset when using the same method. We at first considerably prolonged the extraction time in order to facilitate the liberation of myofibrillar proteins. Although this prolongation was sufficient to quantitatively extract fetal actomyosin, no gain was perceptible for the yield of tumoral actomyosin. The first real improvement for the extraction of tumoral actomyosin was obtained by increasing the ionic strength to  $I=0.6$ , but the best yield resulted when a strong relaxing agent at high concentration such as 40 mM  $\text{K}_2\text{P}_4\text{O}_7$  was used.

The difficulty encountered for the extraction of tumoral myosins was probably related to the supercontracted state of sarcomeres in rhabdomyosarcomas [14]. Indeed, at low concentrations of ATP and of  $\text{Ca}^{2+}$ , myosin interacted with actin to form actomyosin that could only be extracted from muscle by using a high ionic strength [34, 37]. In the supercontracted sarcomeres of rhabdomyosarcomas we thus find the actomyosin complex. We could not yet reveal the lack of ATP, but we observed [14] in the sarcoplasmic reticulum

amorphous precipitations and microcrystals which were identified as calcium phosphate (unpublished results). Thus the concentration of free cellular  $\text{Ca}^{2+}$  is very low and its regulatory role is consequently decreased.

The formation of the actomyosin complex and the supercontracted sarcomere seems to be irreversible in the tumor. Only the presence of a relaxing agent allowed the extraction of actomyosin with a sufficient yield. This would suggest that the immobility of the tumor cell is not caused by an inhibited contraction but rather by an inhibition of relaxation, which could also be due to some modifications in the regulatory system. The hypothesis of an inhibited relaxation is the more probable because actomyosin ATPase seems to be normal.

The synthetic filaments of skeletal muscle myosin were similar in structure to the native thick filaments [18, 31, 32], the length of which varies between 0.8 and 1.5  $\mu\text{m}$ . It may be possible that the length variation of the synthetic filaments depends on the C-protein contamination [26]. A systematic study, however, has never been undertaken in order to understand the action of C-protein on the formation of synthetic filaments.

Moreover, Sanger [32] has demonstrated that filament length depended on several factors such as pH, ionic strength, the presence of different cations ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ), the dielectric constant, the preparation method and the precipitation procedure. Thus precipitation by dialysis produced longer filaments than precipitation by rapid dilution. Wachsbarger and Pepe [39] reported that bivalent cations ( $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ) induced a better formation of bipolar synthetic filaments and determined their length. The precipitation of our myosins has always been undertaken under the conditions of these authors [39] which were easily reproducible.

When  $\text{Mg}^{2+}$  was added to the precipitation buffer, skeletal myosin always produced bipolar filaments of constant length. In contrast, fetal and tumoral myosins precipitated under these conditions as fusiform filaments without any specific length.  $\text{Mg}^{2+}$  ions thus seem to have no specific action on these myosins.

We observed at first a similarity between fetal and tumoral myosins concerning the fine structure of their synthetic filaments. In our opinion, the similarity that we found in the light chain composition of the molecules is more significant. Both, fetal and tumoral myosins are lacking the same light chains:  $\text{L}_{16}$  and  $\text{L}_{18}\text{P}$ . The absence of  $\text{L}_{18}\text{P}$  may be the result of the method of preparation. It must be underlined, however, that  $\text{L}_{18}\text{P}$  always could be observed in normal muscle myosin which was extracted under the same conditions as fetal and tumoral myosins. On the other hand, this does not mean that  $\text{L}_{18}$  cannot be phosphorylated, especially since Adelstein and Conti [1] have realized the phosphorylation of one tumoral light chain.

This investigation documents that the precipitation properties and light chain content of the myosin from rhabdomyosarcoma are the same as those of embryonic muscle. The enzymatic properties, on the other hand, are clearly different: the tumoral muscle myosin has a lower ATPase activity. It is evident that the reason for the decrease of ATPase activity is not the absence of  $\text{L}_{18}\text{P}$  and  $\text{L}_{16}$ , otherwise fetal myosin ATPase activity would also be low. The isolation methods for the fetal muscle and for the tumor muscle are essentially

identical, so differences due to isolation technology can be excluded. Especially since fetal myosin and tumoral myosin were exposed to exactly the same isolation environment by taking fetal muscle and rhabdomyosarcoma tissue and mixing them at homogenization: thus the two myosins were isolated together.

Structural differences between the two myosins exist perhaps on the light chains but certainly on the heavy chains. We must admit that the anomaly of tumoral myosins is not the result of degradation, since it is observed in all rhabdomyosarcoma myosins. The most probable explanation is a perturbed biosynthesis of myosin heavy chains in muscle tumors leading to a conformational change and to the formation of inactive heavy chains instead of active heavy chains such as those found in tumor myosins. This hypothesis is confirmed by the recent works of Flink and Morkin [8] who described changes of heavy chain biosynthesis in other pathological cases. It is not yet clear, however, whether the conformational modifications are due to a specific tumoral gene or whether they are post-transcriptional.

The ultrastructural and electrophoretic similarities between fetal and tumoral myosins suggest the existence of a carcino-embryonic structural protein. Nevertheless, when the enzymatic activities and the mobilities of the native myosin on pyrophosphate gel electrophoresis are compared, no resemblance can be established. These observations necessarily imply the existence of an abnormal isoenzyme of the embryonic type and it has been demonstrated here that the tumoral protein is not quite the same as the embryonic protein. Corresponding results could be obtained on other representative enzymes of normal muscle such as creatine kinase, aldolase and lactic dehydrogenase [33]. In addition to that, this is the first time that a structural and cytoskeletal protein is shown to have a carcino-embryonic character. Hence, the embryonic character of these tumors is not only at the tissue or at the enzyme level but also at the molecular level of at least one structural protein. The modification of tumoral myosin described in the present work may help to explain the supercontracted state of tumoral sarcomeres as well as the immobility of rhabdomyoblasts.

*Acknowledgements.* We are grateful to Dr. R. Marusyk (Muscular Distrophy Laboratory, University of Alberta, Edmonton, Canada) for help in the revision of this manuscript. We are indebted to Dr. M. F. Landon and Dr. C. Oriol (Collège de France, Paris) for their help in the measurement of actomyosin ATPase activity. We thank Dr. D. Dewally (Laboratoire de Chimie Minérale Appliquée, Université de Lille) for supplying the nickel-subsulphide, Mrs. S. Quief and Mrs. O. Hannedouche for their excellent technical assistance, and Mrs. M. T. Garet for her expert photographic work.

This work was supported by grants of the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (U 124 and ATP 38.76.70) and the Centre National de la Recherche Scientifique (LA n° 04268).

## References

- [1] Adelstein, R. S., M. A. Conti: The effect of phosphorylation on platelet myosin and studies on substrates for platelet myosin light-chain kinase. In: Cell Motility - Book B - Actin, Myosin and Associated Proteins Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, Vol. 3, p. 725-738, Cold Spring Harbor Laboratory, 1976.
- [2] Allen, J. A., I. C. Hsu, L. A. Carstens: Dehydroretronecine-induced rhabdomyosarcoma in rats. *Cancer* 35, 997-1002 (1975).



- [3] Basrur, P. K., A. K. Sykes, J. P. W. Gilman: Changes in mitochondrial ultrastructure in nickel-sulfid induced rhabdomyosarcoma. *Cancer* **25**, 1142-1152 (1970).
- [4] Bruni, C., J. N. Rust: Fine structure of dividing cells and of non-dividing differentiating cells of nickel-sulfid induced rhabdomyosarcomas. *J. Nat. Cancer Inst.* **54**, 687-696 (1975).
- [5] Corbell, L. B.: Antigenicity of rhabdomyosarcomas induced by nickel sulfide ( $\text{Ni}_3\text{S}_2$ ). *Cancer* **21**, 184-189 (1968).
- [6] Dow, J., A. Stracher: Identification of the essential light chains of myosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **68**, 1107-1110 (1971).
- [7] Fiske, C. H., Y. Subbarow: The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**, 375-400 (1925).
- [8] Flink, I. L., E. Morkin: Evidence for a new cardiac myosin species in thyrotoxic rabbit. *FEBS-Letters* **81**, 391-394 (1977).
- [9] Friedman, I., E. S. Bird: Electron microscope investigation of experimental rhabdomyosarcoma. *J. Pathol.* **97**, 375-382 (1969).
- [10] Gabbiani, G., J. Csank-Brassert, J. C. Schneeberger, Y. Kapaneci, P. Trenchev, E. J. Holborow: Contractile proteins in human cancer cells. Immunofluorescent and electron microscopic study. *Am. J. Pathol.* **83**, 457-474 (1976).
- [11] Gilman, J. P. W.: Metal carcinogenesis. II. A study on the carcinogenic activity of cobalt, copper, iron and nickel compounds. *Cancer Res.* **22**, 158-162 (1962).
- [12] Gilman, J. P. W.: Muscle tumorigenesis. In: Canadian Cancer Conference, Proc. VIth Can. Cancer Res. Conf., Harvey Harbour, Ontario, 1964, p. 209-223, Pergamon Press, 1965.
- [13] Green, I., W. F. H. M. Mommaerts: Adenosinetriphosphatase systems of muscle. I. An electrotitrimetric method of measurement. *J. Biol. Chem.* **202**, 541-549 (1953).
- [14] Hildebrand, H. F., G. Biserte: Ultrastructural investigation of  $\text{Ni}_3\text{S}_2$ -induced rhabdomyosarcoma in Wistar-rat. Comparative study with emphasis on myofibrillar differentiation and cilial formation. *Cancer* **42**, 528-554 (1978).
- [15] Hildebrand, H. F., G. Biserte: Nickel sub-sulphide-induced leiomyosarcoma in rabbit white skeletal muscle. A light microscopical and ultrastructural study. *Cancer* **43**, 1358-1374 (1979).
- [16] Hildebrand, H. F., G. Biserte: Cylindrical laminated bodies in nickel-subsulphide-induced rhabdomyosarcoma in rabbit. *Eur. J. Cell Biol. (formerly Cytobiologie)* **19**, 276-280 (1979).
- [17] Hoh, J. F. Y.: Light chain distribution of chicken skeletal muscle myosin isoenzymes. *FEBS-Letters* **90**, 297-300 (1978).
- [18] Huxley, H. E.: Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. *J. Mol. Biol.* **7**, 281-308 (1963).
- [19] Kerckaert, J. P.: Highly simplified analytical or preparative slab gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **84**, 354-360 (1978).
- [20] Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature (Lond)* **227**, 680-685 (1970).
- [21] Leger, J. J., G. Berson, C. Delcayre, C. Klotz, K. Schwartz, J. Leger, M. Stephens, B. Swynghedauw: Heart contractile proteins. *Biochimie* **57**, 1249-1273.
- [22] Lowey, S., D. Risby: Light chains from fast and slow muscle myosins. *Nature (Lond)* **234**, 81-85 (1971).
- [23] Mahour, G. H., E. H. Soulé, S. D. Mills, H. B. Lynn: Rhabdomyosarcoma in infants and children: a clinicopathologic study of 75 cases. *J. Pediatr. Surg.* **2**, 402-409 (1967).
- [24] Masaki, T., C. Yoshizaki: Differentiation of myosin in chick embryos. *J. Biochem.* **76**, 123-131 (1974).
- [25] Moloney, J. B.: A virus-induced rhabdomyosarcoma of mice. *Natl. Cancer Inst. Monograph.* **22**, 139-142 (1966).
- [26] Offer, G., C. Moos: C-protein and the periodicity in the thick filaments of vertebrate skeletal muscle. In: *The Mechanism of Muscle Contraction*, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, Vol. 37, p. 87-95, Cold Spring Harbor Laboratory, 1973.
- [27] Oriol, C., M. F. Landon, H. F. Hildebrand: Physico-chemical studies of Straub- and KI-Actin. *Cytobiologie* **14**, 350-361 (1977).
- [28] Perrie, W. T., S. V. Perry: An electrophoretic study of the low molecular weight components of myosin. *Biochem. J.* **119**, 31-38 (1970).
- [29] Perry, S. V.: Myosin adenosinetriphosphatase. In: *Methods in Enzymology* (S. P. Colowick & N. O. Kaplan, eds.), Vol. 2, p. 582-588, Academic Press, New York, 1955.
- [30] Perry, S. V.: Phosphorylation of muscle proteins in relation to regulation. XXVII Intern. Congr. of Physiol. Sciences. Heidelberg-Louvain Satellite Symposium on excitation-contraction coupling in smooth muscle. Heidelberg, July 1977.
- [31] Pollard, T. D.: Electron microscopy of synthetic myosin filaments. Evidence for cross-bridge flexibility and copolymer formation. *J. Cell Biol.* **67**, 93-104 (1975).
- [32] Sanger, J. B.: Formation of synthetic myosin filaments. Influence of pH, ionic strength, cation substitution, dielectric constant and method of preparation. *Cytobiologie* **4**, 450-466 (1971).
- [33] Shapira, F., C. Micheau, C. Junien: Fetal enzyme pattern of two alveolar rhabdomyosarcomas. *Rev. Europ. Etudes Clin. Biol.* **17**, 896-899 (1972).
- [34] Shiverick, K. T., L. L. Thomas, N. R. Alpert: Preparation of cardiac myosin: application to hypertrophied myocardium. *Biochem. Biophys. Acta* **393**, 124-133 (1975).
- [35] Stockem, W.: Die Eignung von Pioloform F für die Herstellung elektronenmikroskopischer Trägerfilme. *Mikroskopie* **26**, 185-189 (1970).
- [36] Sunderman, F. W., T. J. Lau, L. J. Cralley: Inhibitory effect of manganese upon muscle tumorigenesis by nickel subsulphide. *Cancer Res.* **34**, 92-95 (1974).
- [37] Swynghedauw, B., P. Bouveret: L'adénosine triphosphate et la superprécipitation de l'actomyosine du myocarde et du muscle squelettique blanc. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **52**, 721-740 (1970).
- [38] Tetaert, D., O. Moreau, K. K. Han, H. F. Hildebrand, G. Biserte: Isolement et caractérisation de la chaîne légère L<sub>17</sub> de la myosine de muscle lisse d'utérus de Vache. *Biochimie* **59**, 337-339 (1977).
- [39] Wachsberger, P. R., F. A. Pepe: Purification of uterin myosin and synthetic filament formation. *J. Mol. Biol.* **88**, 385-391 (1974).

## Perineal rhabdomyosarcoma in a newborn child: pathological and biochemical studies with emphasis on contractile proteins

HF HILDEBRAND,\* I KRIVOSIC,† X GRANDIER-VAZEILLE,‡ D TETAERT,‡ AND G BISERTE\*

From the \*Institut de Recherches sur le Cancer de Lille et Unité 124 de l'INSERM, Lille, France, †Laboratoire d'Anatomie Pathologique de l'Université de Lille II, France, and ‡Unité de Recherches sur les Protéines (U 16 de l'INSERM), Lille, France

**SUMMARY** Histological and ultrastructural studies have been undertaken on a perineal rhabdomyosarcoma from a newborn child. The spontaneous tumour has the typical feature of mesenchymoma. The recurrent tumour, however, displays some rhabdopoietic characteristics.

The myosin of the recurrent tumour has been extracted and compared with human fetal myosin. These two myosins are identical in their synthetic filaments and their light-chain composition. Nevertheless, whereas the ATPase activity of fetal myosin can be stimulated considerably by increasing the  $Ca^{2+}$  concentration, that of tumoral myosin remains very low.

These results show that there are isoenzymes of myosins and there must be differences in the myosin heavy chains, particularly in the active sites. These findings are identical with those seen in experimental rhabdomyosarcoma.

Human rhabdomyosarcoma is considered to be a relatively rare tumour. Investigation of this tumour during the last 15 to 20 years has shown, however, that embryonic and alveolar rhabdomyosarcomas are the two soft tissue tumours seen most frequently in children. In childhood, rhabdomyosarcoma accounts for 12 to 56% of all soft tissue tumours.<sup>1-10</sup> The tumours may appear at any age in childhood, but the majority are seen in infants from 3 to 4 years of age.<sup>9</sup> In children aged 10 to 12 years, rhabdomyosarcomas are less common, but they occur more frequently in adolescents 15 to 18 years old.<sup>3,5</sup> Rhabdomyosarcomas are exceptional in the newborn. The high incidence of this tumour in these reported series reflects the greater confidence with which the diagnosis can now be made. This is to a great extent the result of electron microscopy.

Normal myoblasts grown *in vitro* display mobility and contract. This is not so with rhabdomyoblasts grown in culture;<sup>11</sup> although one of the most typical characteristics of the tumour is lack of contractility,<sup>11</sup> little attention has been paid to their contractile proteins.<sup>12-14</sup> In previous investigations,<sup>14,15</sup> tumoral myosins isolated from  $Ni_3S_2$ -induced rhabdomyosarcomas in rats and rabbits were analysed and

compared with normal and fetal skeletal myosins. Tumoral myosin was found to be a new isoenzyme with oncofetal character. The present report deals with the study of myosin from a spontaneous human tumour and compares it to myosin from experimentally induced tumours.

### Case report

The tumour was seen in a full-term newborn girl weighing 3 kg at birth. She was the first child, and the parents had no genetic abnormalities. A vulvoperineal tumour, 10 cm in diameter, was found at birth. The tumour pushed back the labia majora. In addition, the left tibia showed a focus of osteolysis. The tumour was excised on the fifth day of life. It was hard and vascularised and had a lobulated structure. During surgery the bladder, vagina, and rectum were completely freed from the tumour which weighed 180 g. The infant died aged 3 months with a local recurrence of the same size as the primary tumour, which was excised immediately after death.

### Material and methods

#### LIGHT MICROSCOPY

Portions of tissue were taken and fixed in Dubosc-

Brasil's fluid and in formaldehyde. The fixed material was embedded in paraffin, and sections 5-8  $\mu\text{m}$  thick were stained with haematoxylin and eosin, Masson's trichrome, Mallory's phosphotungstic acid haematoxylin, Wilder's reticulin, and Heidenhain's azan.

#### ELECTRON MICROSCOPY

The primary tumour was cut into serial sections which were fixed in formalin for 72 hours. Small pieces were then minced into 1 mm cubes and placed in 10% Millonig's buffered formalin. Small tissue portions (about 1 mm<sup>3</sup>) of the recurrent tumour were fixed for 1 hour in 5% glutaraldehyde in Millonig's buffer. The samples of both tumours were then postfixed for 1 hour in 2% Millonig's buffered OsO<sub>4</sub>, dehydrated in a graded series of ethanols, and embedded in styrene-methacrylate as described by Stockem and Komnick.<sup>16</sup> Thin sections were cut on a LKB ultratome III and placed on Pioloform F coated copper grids.<sup>17</sup> After staining with uranyl acetate and lead citrate, sections were examined with a Philips 300 electron microscope at an accelerating voltage of 80 kV.

#### MYOSIN PREPARATIONS

Normal adult rabbit muscles as controls were taken from the thigh of healthy animals. For comparative purposes, fetal muscles were taken from 3-month-old human fetuses. Normal, fetal, and tumoral muscles were fragmented in a Waring-Blender homogeniser for 2 minutes at high speed. The myosins were extracted with a modified Hasselbach-Schneider solution at high ionic strength and in the presence of 40 mM K<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>.<sup>18</sup> They were then purified by suspension-reprecipitation cycles<sup>19</sup> and by ammonium sulphate fractionation using the 40 to 50% saturated ammonium sulphate fraction.<sup>20</sup> All details were described in a previous investigation.<sup>15</sup>

Protein concentrations were determined by the biuret method as well as with the molar extinction coefficient  $E_{1\%}^{280} = 5.60$ . The latter values were compared with those obtained by the biuret method and found to be accurate when the  $A_{280\text{nm}}/A_{260\text{nm}}$  ratio was 1.40 or greater.

Reprecipitated or synthetic filaments were obtained by rapid dilution from 500 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6.8, to 100 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6.8, and examined in a Philips 300 electron microscope after negative staining with uranyl acetate.<sup>21</sup>

Sodium dodecyl sulphate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis using Laemmli's<sup>22</sup> buffer system and Kerckaert's apparatus<sup>23</sup> was performed on 10 to 25% acrylamide gradient slab gel (15 × 10 × 0.1 cm).

The conditions for Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity measurements were those described previously.<sup>15</sup>

#### Results

##### MORPHOLOGY OF PRIMARY TUMOUR

Histologically, the neoplasm displayed mesenchymatous features. Most of the tumour was composed of undifferentiated spindle-celled elements (Fig. 1), the character of which could not be determined: possibly fibroblastic cells, tumour cells of smooth muscle origin, transformed Schwann cells, or elongated rhabdomyoblasts. After exhaustive examination of histological sections, different regions were found which indicated a rhabdomyosarcomatous origin. There were areas with an appearance of undifferentiated embryonic rhabdomyosarcoma and others of the botryoïd type (Fig. 2). The low frequency of rhabdomyoblasts was confirmed by electron microscopy, where only few cells with myofibrillar differentiation were found (Fig. 3).



Fig. 1 General histological appearance of the primary tumour. 90% of the examined surface displays undifferentiated spindle-like cells. Haematoxylin and eosin × 200.

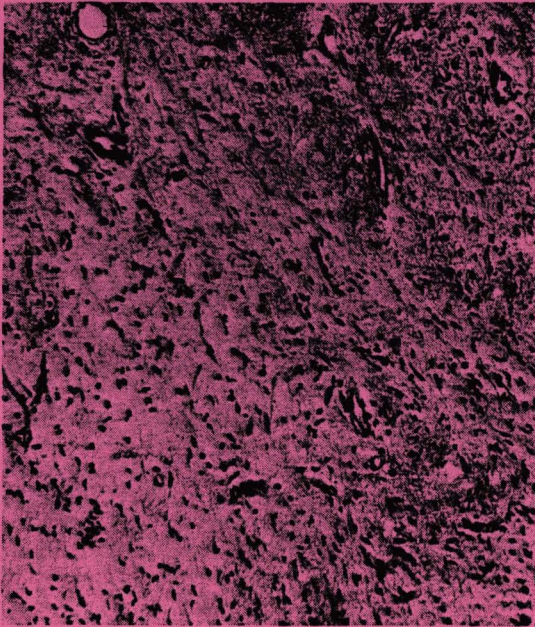


Fig. 2 Botryoid type region of embryonic rhabdomyosarcoma in the primary tumour. H and E  $\times 100$ .

#### MORPHOLOGY OF RECURRENT TUMOUR

The same histological features occurred in the recurrent tumour but in different proportions. Botryoid areas of embryonic rhabdomyosarcoma were particularly developed at the periphery of the tumour; in the centre, the undifferentiated type, characterized by the presence of long fusiform cells (Masson's myocytes) and large polymorphic cells (Masson's myoblasts) (Fig. 4), was prominent. The latter cells displayed a fibrillar network in their cytoplasm.

Electron microscopy revealed the existence of myofibrillar structures in practically all the cells. The most differentiated stage that could be observed showed only myofilament alignment in the form of myofibrils without precise orientation. Z-lines were very hypertrophied. Sarcomeres were very irregular and generally found to be in a supercontracted state. M-lines were not observed. Large quantities of glycogen were present, especially in the vicinity of Z-lines. The nuclei often contained nuclear bodies of fibrillar and/or granular structure. An electron dense, amorphous material was frequently observed in the sarcoplasmic reticulum.

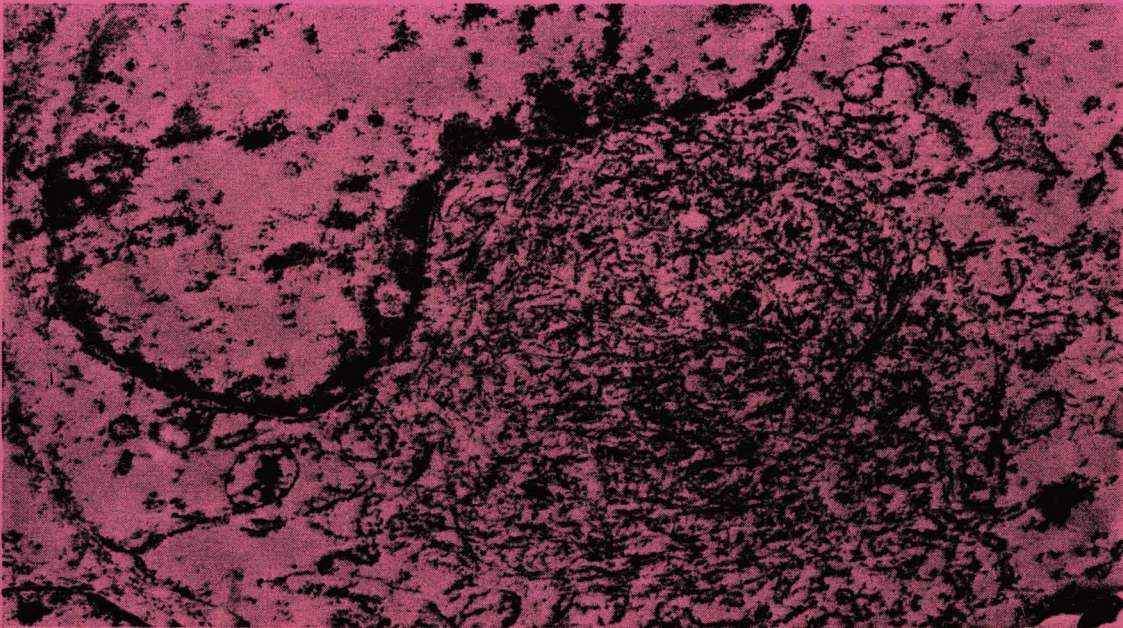


Fig. 3 Rare rhabdomyoblast of the primary tumour with myofibrillar differentiation. Myofilaments have no precise orientation.  $\times 13\ 700$ .

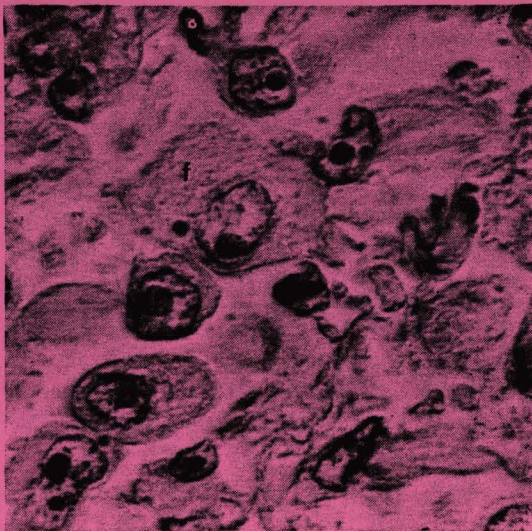


Fig. 4 Immature rhabdomyoblasts of the recurrent tumour. Note the presence of fibrillar structures in some cells (f). The nuclei display very large nucleoli. (Masson's trichrome)  $\times 800$ .

#### TUMORAL AND FETAL MYOSINS

Tumoral myosin was extracted from 80 g of the recurrent tumour. Fetal myosin was isolated from 60 g fresh human fetal muscle.

#### The synthetic filaments

In classical terminology, reprecipitated myosin filaments are called synthetic filaments.<sup>24</sup> The myosins were precipitated by rapid dilution in the absence and in the presence of 10 mM  $MgCl_2$ . The two myosins formed in the absence of  $MgCl_2$  were seen to be exclusively short bipolar filaments (Fig. 5a, b) such as myosin of normal skeletal muscle of rat and rabbit precipitated under the same conditions.<sup>24</sup> The filaments varied in length from 0.3 to 0.6  $\mu m$ .

The width was about 15 nm at the bare zone and approximately 50 nm at the extremities. In the presence of  $MgCl_2$ , however, the tumoral and fetal myosins precipitated essentially as long fusiform filaments with an average width of 25 nm (Fig. 5c, d). The length of the filaments was quite variable for both myosins. The smallest filaments measured 0.6  $\mu m$ , the longest 10  $\mu m$  or greater. The majority of the filaments did not exceed 2  $\mu m$ . There was no possibility of isolating myosin from normal human adult skeletal muscle.

#### Analytical gel electrophoresis

The tumoral and fetal human myosins were analysed by SDS-gel electrophoresis and compared with

rabbit white skeletal muscle myosin.

In the gel of rabbit myosin (Fig. 6a), myosin heavy chains, M-proteins, C-protein, actin, the three light chains of 25 000, 18 000, and 16 000 daltons, and troponin-T, tropomyosin, and troponin-I as contaminants could be recognised. The human tumoral myosin (Fig. 6b) as well as the human fetal myosin (Fig. 6c) contained only two light chains. Other proteins, such as  $\beta$ -actinine and troponin C, could be observed in these gels. The 27 000 daltons protein of human tumoral myosin and the 17 000 daltons protein of human fetal myosin could not be identified.

Furthermore, the gel of tumoral human myosin (Fig. 6b) revealed various proteins, the molecular size of which was found to be between 140 000 and 45 000 daltons and between 34 000 and 25 000 daltons. These proteins were probably polypeptic fragments of the heavy chains. Indeed, many proteolytic enzymes are known to exist in tumours.

#### $Ca^{2+}$ -ATPase activity

Measurements of the specific  $Ca^{2+}$ -ATPase activity of the two different human myosins were performed and the results compared with the specific  $Ca^{2+}$ -ATPase activity of rabbit white muscle myosin and of rat red muscle myosin. The comparison with rat red muscle myosin seemed to be necessary as human muscle is also a red muscle. Human fetal myosin has a specific activity of  $Ca^{2+}$ -ATPase somewhat lower than that of rat myosin (Table). The specific  $Ca^{2+}$ -ATPase activity of human tumoral myosin was very much decreased. These results are in agreement with the values found for  $Ca^{2+}$ -ATPase activity of rabbit and rat tumoral myosins.<sup>14, 15</sup>

#### Discussion

In the rhabdomyosarcoma examined in this investigation, the essential morphological characteristics that have already been described thus far for chemically induced muscle tumours in rats<sup>25-28</sup> and rabbits<sup>29</sup> or for spontaneous human rhabdomyosarcomas<sup>30</sup> have been observed.

In contrast to the recurrent tumour, myofibrils were extremely rare in the primary tumour, and only a careful examination of many histological sections established its rhabdomyosarcomatous nature. Light microscopy and the ultrastructure of the recurrent tumour confirmed its nature. Nevertheless it is difficult to understand why in the recurrent tumour only one predominant cell type, muscle cells, can be observed.

As described previously in chemically induced rhabdomyosarcomas, irregularly arranged myofibrils with supercontracted sarcomeres were obser-





Fig. 5 Synthetic filaments of human fetal and tumoral myosins (negative staining). In the absence of  $MgCl_2$ , fetal (a) and tumoral (b) myosins form bipolar filaments. When  $MgCl_2$  is added, fetal (c) as well as tumoral (d) myosins precipitate as long fusiform filaments. All micrographs: original magnification  $\times 120\,000$ .



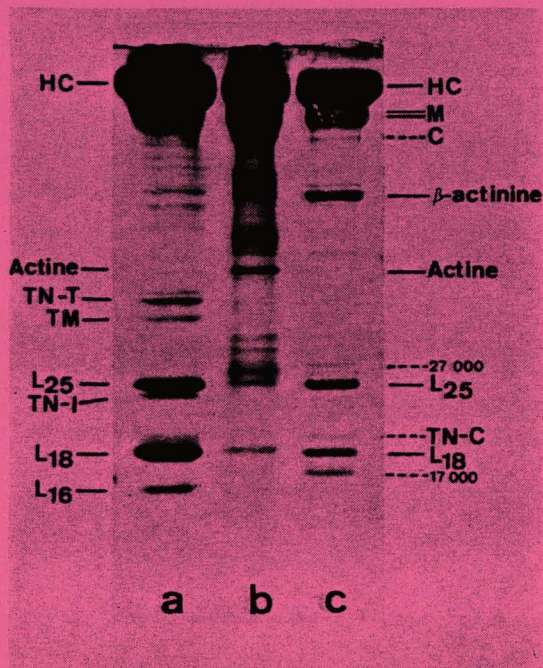


Fig. 6 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of normal rabbit (a), human tumoral (b), and human fetal (c) myosins. Note absence of 16 000 daltons light chain in human fetal and tumoral myosins. HC = heavy chains; M = M-protein; C = C-protein; TN-T = tropomyosin binding troponin factor; TN-C = calcium binding troponin factor; TN-I = inhibitory troponin factor; TM = tropomyosin; L<sub>25</sub>, L<sub>18</sub>, L<sub>16</sub> = light chains with a molecular size of 25 000, 18 000, and 16 000 daltons respectively.

Maximal values of Ca<sup>2+</sup> ATPase activity of different normal, fetal, and tumoral myosins

Material	Myosins	Maximal values (nmol Pi/mg/min)
Human	Fetal	414 ± 10
	Tumoral	90 ± 8
Rat*	Normal	450 ± 60
	Fetal	470 ± 21
Rabbit*	Tumoral	60 ± 10
	Normal	546 ± 48
	Fetal	510 ± 35
	Tumoral	30 ± 10

\*From Hildebrand *et al.*<sup>14</sup>  
Pi = inorganic phosphorus.

ved.<sup>28, 29</sup> The absence of the M-line, necessary for the maintenance of the sarcomere,<sup>31</sup> revealed a deficiency of M-protein synthesis. The function of the granular precipitate in the sarcoplasmic reticulum was not clear. The precipitate was believed to be a calcium carbonate or phosphate salt and has been observed in other

rhabdomyosarcomas<sup>28</sup> as well as in Ni<sub>3</sub>S<sub>2</sub>-induced leiomyosarcomas.<sup>32</sup> The presence of this substance in the cisternae may be related to a defect in calcium transport which prevents normal muscle contractile function. It is noteworthy that Gilman<sup>11</sup> has demonstrated that myoblasts grown *in vitro* from nickel-induced rhabdomyosarcoma fail to achieve contractility. The role of calcium in triggering or potentiating normal and neoplastic cell division in relation to an alternative role in neuromyotransmission and contraction was shown previously by Balk.<sup>33</sup>

Human fetal and tumoral myosins can be compared with those of fetuses and Ni<sub>3</sub>S<sub>2</sub>-induced rhabdomyosarcomas of rat and rabbit.<sup>14, 15</sup> The same synthetic filaments are observed in both myosins precipitated as short bipolar filaments without MgCl<sub>2</sub> in the precipitating buffer but as long fusiform filaments when MgCl<sub>2</sub> is added. Moreover, analogies are found in the light-chain composition: the two myosins possess two light chains with a molecular size of 25 000 and 18 000 daltons, whereas normal muscle myosin has three light chains. A clear difference is finally observed between the specific activities of Ca<sup>2+</sup>ATPase of human fetal and tumoral myosins. Thus myosin of human spontaneous rhabdomyosarcomas can be considered as an isoenzyme comparable to the myosins of experimentally induced rhabdomyosarcomas of rat and rabbit.

The experimental model seems to be convenient for further studies in molecular biology on the control of synthesis of tumoral myofibrillar proteins. On a more general level, one can believe that the molecular mechanisms occurring in spontaneous or chemically induced tumoral transformation are comparable.

It is noteworthy that these biochemical results can be obtained in less than three days, and they may be useful for diagnostic purposes, especially in embryonic rhabdomyosarcomas, the diagnosis of which is often rather difficult. In addition, the method may be used to distinguish undifferentiated rhabdomyosarcomas from fibrosarcomas because of the different light chain composition of the myosins of these tumours: rhabdomyosarcoma myosin possesses two light chains of skeletal myosin (25 000 and 18 000 daltons); fibrosarcoma myosin, however, has two light chains completely different (20 000 and 15 000 daltons) similar to fibroblast myosin.<sup>12</sup>

We are deeply indebted to Professor Dr A Clay for his interest and critical reading of this manuscript, and to Professor Dr R Marusyk for his help in its revision. We thank Miss M Soltysiak and Mrs S Queif for skilful technical assistance, and Mrs M-T Garet for expert photographic work.

This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM U 124 and ATP 38.76.70) and the Centre National de la Recherche Scientifique (LA No. 04 268).

## References

- <sup>1</sup> Dito WR, Batsakis JG. Rhabdomyosarcoma of the head and neck. *Arch Surg* 1962;**84**:582-8.
- <sup>2</sup> Mahour GH, Soule FH, Mills SD, Lynn HB. Rhabdomyosarcoma in infants and children: a clinicopathologic study of 75 cases. *J Pediatr Surg* 1967;**2**:402-9.
- <sup>3</sup> Enzinger FM, Shiraki M. Alveolar rhabdomyosarcoma: an analysis of 110 cases. *Cancer* 1969;**24**:18-31.
- <sup>4</sup> Sinkovics JG, Shirato E, Cabiness JR, Martin RG. Rhabdomyosarcoma after puberty. Clinical, tissue culture and immunological studies. *J Med (Basel)* 1970;**1**:313-26.
- <sup>5</sup> Sutow WW, Sullivan MP, Ried HL, Taylor HG, Griffith KM. Prognosis in childhood rhabdomyosarcoma. *Cancer* 1970;**25**:1384-90.
- <sup>6</sup> Donaldson SS, Castro JR, Wilbur JR, Jesse RH, Jr. Rhabdomyosarcoma of head and neck in children. Combination, treatment by surgery, irradiation, and chemotherapy. *Cancer* 1973;**31**:26-35.
- <sup>7</sup> Bale PM, Reye RDK. Rhabdomyosarcoma in childhood. *Pathology* 1975;**7**:101-11.
- <sup>8</sup> Liebner EJ. Embryonal rhabdomyosarcoma of head and neck in children. Correlation of stage, radiation dose, local control, and survival. *Cancer* 1976;**37**:2777-86.
- <sup>9</sup> Weichert KA, Bove KC, Aron BS, Lampkin B. Rhabdomyosarcoma in children. A clinico-pathological study of 35 patients. *Amer J Clin Pathol* 1976;**66**:692-701.
- <sup>10</sup> Raney RB, Hays DM, Lawrence W, Jr, Soule EH, Tefft M, Donaldson MH. Paratesticular rhabdomyosarcoma in childhood. *Cancer* 1978;**42**:729-36.
- <sup>11</sup> Gilman JPW. Muscle tumorigenesis. In: *Canadian Cancer Conference: Proceedings of the VIth Canadian Research Conference, Honey Harbour, Ontario*. New York: Pergamon Press, 1965:209-23.
- <sup>12</sup> Adelstein RS, Conti MA. The effect of phosphorylation on platelet myosin and studies on substrates for platelet myosin light-chain kinase. In: Goldman R, Pollard T, Rosenbaum J, eds. *Cell Motility—Book B—Actin, Myosin and Associated Proteins*. (Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, Vol. 3). Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 1976:725-38.
- <sup>13</sup> Gabbiani G, Csank-Brassert J, Schneeberger JC, Kapanci Y, Trenchev P, Holborow EJ. Contractile proteins in human cancer cells. Immunofluorescent and electron microscopic study. *Amer J Pathol* 1976;**83**:457-74.
- <sup>14</sup> Hildebrand HF, Kerckaert JP, Biserte G, Grandier-Vazeille X, Tetaert D. Myosin of Ni<sub>3</sub>S<sub>2</sub>-induced rhabdomyosarcomas: A new onco-fetal isoenzyme. In: Lehmann FG, ed. *Carcino-embryonic Proteins*, Vol. 2. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press B.V, 1979; 717-22.
- <sup>15</sup> Hildebrand HF, Kerckaert JP, Biserte G, Tetaert D, Grandier-Vazeille X. Tumoral myosins of Ni<sub>3</sub>S<sub>2</sub>-induced rhabdomyosarcomas in rat and rabbit: comparative studies with adult and fetal myosins of skeletal muscle. *Eur J Cell Biol* 1980;**20**:240-8.
- <sup>16</sup> Stockem W, Komnick H. Erfahrungen mit der Styrol-Methacrylat-Einbettung als Routine-methode für die Licht- und Elektronenmikroskopie. *Mikroskopie* 1970;**26**:199-203.
- <sup>17</sup> Stockem W. Die Eignung von Pioloform F für die Herstellung elektronenmikroskopischer Trägerfilme. *Mikroskopie* 1970;**26**:185-9.
- <sup>18</sup> Tetaert D, Moreau O, Han KK, Hildebrand HF, Biserte G. Isolement et caractérisation de la chaîne légère L<sub>17</sub> de la myosine de muscle lisse d'utérus de vache. *Biochimie* 1977;**59**:337-9.
- <sup>19</sup> Perry SV. Myosin adenosinetriphosphatase. In: Colowick SP, Kaplan NO, eds. *Methods in Enzymology*, Vol. 2. New York: Academic Press, 1955:582-8.
- <sup>20</sup> Offer G, Moos C, Starr RL. A new protein of the thick filaments of vertebrate skeletal myofibrils. Extractions, purification, characterization. *J Mol Biol* 1973;**74**: 653-76.
- <sup>21</sup> Oriol C, Landon MF, Hildebrand HF. Physico-chemical studies of Straub- and KI-Actin. *Cytobiologie* 1977;**14**:350-61.
- <sup>22</sup> Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond)* 1970;**227**:680-5.
- <sup>23</sup> Kerckaert JP. Highly simplified analytical or preparative slab gel electrophoresis. *Anal Biochem* 1978;**84**:354-60.
- <sup>24</sup> Huxley HE. Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. *J Mol Biol* 1963;**7**:281-308.
- <sup>25</sup> Basrur PK, Sykes AK, Gilman JPW. Changes in mitochondrial ultrastructure in nickel sulfide induced rhabdomyosarcoma. *Cancer* 1970;**25**:1142-52.
- <sup>26</sup> Bruni C, Rust JN. Fine structure of dividing cells and of nondividing differentiating cells of nickel sulfide induced rhabdomyosarcomas. *J Nat Cancer Inst* 1975;**54**:687-96.
- <sup>27</sup> Friedmann I, Bird ES. Electron-microscope investigation of experimental rhabdomyosarcoma. *J Pathol* 1969;**97**:375-82.
- <sup>28</sup> Hildebrand HF, Biserte G. Ultrastructural investigation of Ni<sub>3</sub>S<sub>2</sub>-induced rhabdomyosarcoma in Wistar rat. Comparative study with emphasis on myofibrillar differentiation and ciliar formation. *Cancer* 1978;**42**: 528-54.
- <sup>29</sup> Hildebrand HF, Biserte G. Cylindrical laminated bodies in nickel-sulphide-induced rhabdomyosarcoma in rabbits. *Eur J Cell Biol* 1979;**19**:276-80.
- <sup>30</sup> Sarkar K, Tolnai G, McKay DE. Embryonal rhabdomyosarcoma of the prostate. An ultrastructural study. *Cancer* 1973;**31**:442-8.
- <sup>31</sup> Knappeis GG, Carlsen F. The ultrastructure of the M line in skeletal muscle. *J Cell Biol* 1968;**38**:202-11.
- <sup>32</sup> Hildebrand HF, Biserte G. Nickel sub-sulphide-induced leiomyosarcoma in rabbit white skeletal muscle. A light microscopical and ultrastructural study. *Cancer* 1979;**43**:1358-74.
- <sup>33</sup> Balk SD. Calcium as regulator of the proliferation of normal, but not of transformed, chicken fibroblasts in a plasma-containing medium. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971;**68**:271-5.

Requests for reprints to: Dr Hartmut Hildebrand, Institut de Recherches sur le Cancer et Unité 124 de l'INSERM, BP 3567, F-59020 Lille Cédex, France.

## **Ni<sub>3</sub>S<sub>2</sub>-INDUCED LEIOMYOSARCOMAS IN RABBIT SKELETAL MUSCLE: ANALYSIS OF THE TUMORAL MYOSIN AND ITS SIGNIFICANCE IN THE RETRODIFFERENTIATION CONCEPT**

H.F. HILDEBRAND<sup>1</sup> and D. TETAERT<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Institut de Recherche sur le Cancer de Lille and Unité 124 de l'INSERM, BP 311, 59020 LILLE Cédex (France)* and <sup>2</sup>*Unité de Recherche sur les Protéines (U. 16 de l'INSERM), LILLE (France)*

(Accepted 6 October 1980)

Leiomyosarcomas were induced in rabbit skeletal muscle by Ni<sub>3</sub>S<sub>2</sub> implantation. Tumor myosin was isolated and compared with normal adult skeletal muscle myosin and cow uterine smooth muscle myosin. This study has shown that this leiomyosarcoma myosin precipitates as long fusiform filaments and possesses two light-chains of 25 000 and 18 000 daltons as does the onco-fetal type. The biochemical findings demonstrate that tumoral stem myoblasts originate from retrodifferentiated muscle cells.

Experimental leiomyosarcoma  
Myosin light-chains  
Retrodifferentiation

Synthetic filaments  
Tumor myosin



### INTRODUCTION

Nickel-subsulphide, Ni<sub>3</sub>S<sub>2</sub>, is a well known carcinogenic agent inducing specifically rhabdomyosarcomas in rats after intramuscular injection (Gilman, 1965). The rabbit, however, was considered to be refractory to Ni<sub>3</sub>S<sub>2</sub> tumorigenesis (Gilman, 1965) and only Hueper (1955) has reported the induction of fibrosarcomas in rabbits with powdered metallic nickel.

In our experimental series on Nickel-carcinogenesis, we implanted large quantities of pure Ni<sub>3</sub>S<sub>2</sub> in rabbit thigh muscle and obtained a large number of rhabdomyosarcomas (Hildebrand and Biserte, 1979b) and three leiomyosarcomas (Hildebrand and Biserte, 1979a). After studying the histological and ultrastructural features of these smooth muscle tumors (Hildebrand and Biserte, 1979a), our attention was directed to their contractile proteins, especially to myosin. It is well established that myosin of normal

Correspondence to be sent to: Dr. H.F. Hildebrand, Institut de Recherche sur le Cancer de Lille and Unité 124 INSERM, BP 311, F-59020 Lille Cédex (France). Tel. (20) 95.43.59.

adult muscle has three light-chains with molecular weights of 25 000, 18 000 and 16 000 daltons (Lowey and Risby, 1971). Myosin of smooth muscle, however, has only two light-chains of 20 000 and 17 000 daltons (Perrie and Perry, 1970).

Other studies on tumoral contractile proteins have demonstrated that their presence in tumor cells may be of potential importance in evaluating malignancy (Gabbiani et al., 1976). In addition, Adelstein and Conti (1976) have shown that one tumoral myosin light-chain can be phosphorylated. Recent investigations have shown that myosin of rhabdomyosarcomas and of fetal muscle are identical with respect to the fine structure of their synthetic filaments and their light-chain composition but are different in regard to their calcium-ATPase activity (Hildebrand et al., 1980). The analysis of myosin of leiomyosarcomas appearing in skeletal muscle seems to be important not only to know whether this myosin has smooth or fetal muscle characters, but also for better comprehension of the origin of tumoral myoblasts i.e. whether they differentiate from pre-existing mesenchymal cells or whether they arise from retrodifferentiated muscle cells.

#### MATERIALS AND METHODS

Leiomyosarcomas were induced by implantation of 80 mg of  $\text{Ni}_3\text{S}_2$  into the thighs of rabbits (Hildebrand and Biserte, 1979a). Tumors were obtained at the implantation site after eight months to two years. Myosins of tumors and of normal adult rabbit muscles were extracted with a modified Hasselbach-Schneider solution at high ionic strength in the presence of 40 mM  $\text{K}_4\text{P}_2\text{O}_7$ . They were then purified by precipitation cycles and by ammonium sulfate fractionation using the 40 to 50% fraction of crude myosin. The details of the method are described elsewhere (Hildebrand et al., 1980). Myosin of cow uterine smooth muscle was prepared as described previously (Tetaert et al., 1977). This method allowed an extraction with a very high yield. Synthetic filaments were precipitated by rapid dilution from 10 mM phosphate buffer pH 6.8 with 500 mM KCl to 10 mM phosphate buffer pH 6.8 with 100 mM KCl and with or without 10 mM  $\text{MgCl}_2$  and examined in a Philips 300 electron microscope after negative staining with uranyl acetate (Hildebrand et al., 1980). Sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis was carried out using the Tris-borate buffer system on 15% acrylamide slab gels (Figs. 2a, b) or Laemmli's (1970) buffer system on 10 to 25% acrylamide gradient slab gels (Figs. 2c, d). The two gel systems were used for the reason that electrophoresis was performed at different times and for different purposes.

#### RESULTS

The histological and ultrastructural features of the  $\text{Ni}_3\text{S}_2$ -induced leiomyosarcomas were similar to the spontaneous leiomyosarcomas described by Kay and Still (1969). Tumoral myoblasts had the same fibrillar network as normal smooth muscle cells, i.e. 7 nm and 10 nm fibrils and so-called dense bodies (Fig. 1). Since these tumors arise in skeletal muscle (Hildebrand and Biserte, 1979a), we have compared tumoral myosin with normal smooth muscle myosin as well as with normal skeletal muscle myosin.

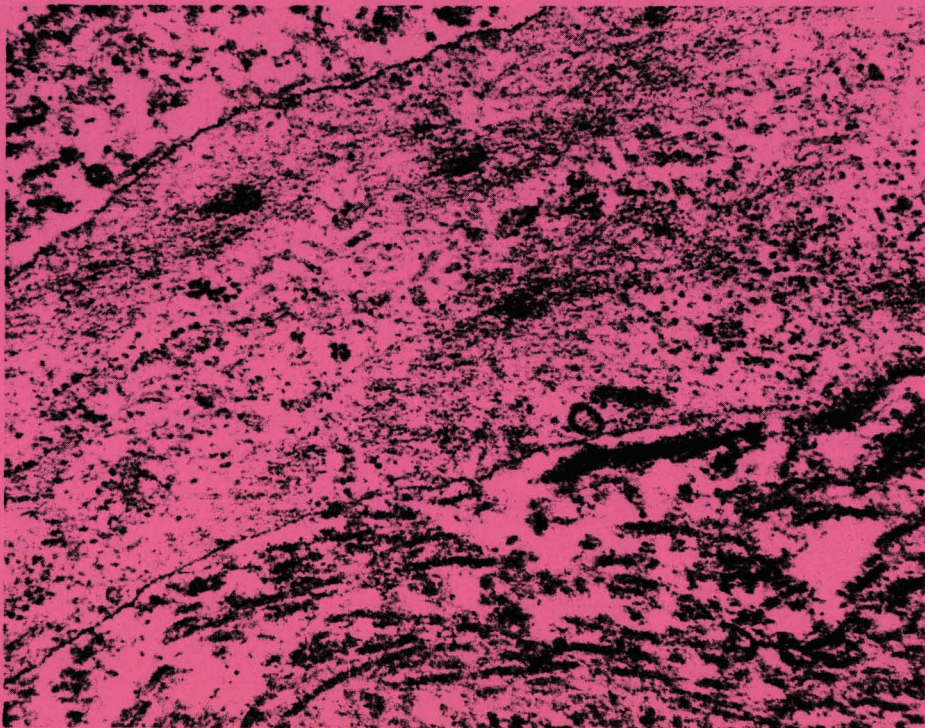


Fig. 1. Tumoral smooth muscle cell showing the microfilaments linked together by cross-bridges and joining in dense bodies. Between the bundles of microfilaments exist many microtubules and a lot of 10 nm fibrils. ( $\times 43\,000$ ).

We studied first the ultrastructure of the synthetic filaments. When purified smooth muscle myosin was precipitated by rapid dilution, it formed bipolar filaments with an average length of  $0.5\ \mu\text{m}$  in the presence or absence of  $\text{Mg}^{2+}$  (Figs. 2a, b). The same results were obtained for skeletal muscle myosins (Hildebrand et al., 1980). By contrast, tumoral myosin precipitated, under the same conditions, as bipolar filaments ( $0.4\ \mu\text{m}$ ) when  $\text{Mg}^{2+}$  was absent (Fig. 2c) and as fusiform filaments without any specific length (1 to  $10\ \mu\text{m}$ ) when  $\text{Mg}^{2+}$  was added (Fig. 2d).  $\text{Mg}^{2+}$  ions, thus, seem to have a contrary action on this myosin. Similar observations were made on synthetic filaments of fetal and rhabdomyosarcoma myosins (Hildebrand et al., 1980).

Another property distinguishing the different myosin isoenzymes is their light-chain composition. To determine if differences exist between the myosins from skeletal, smooth and tumoral muscle, we performed SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The gels revealed the three light-chains of 25 000, 18 000 and 16 000 daltons of skeletal muscle myosin (Figs. 3a, c) and the two light-chains of 20 000 and 17 000 daltons of smooth muscle myosin (Fig. 3b). The leiomyosarcoma myosin, however, did not present the light-chain pattern of smooth muscle myosin as one could expect, but showed the



Fig. 2. Synthetic filaments of myosins formed by rapid dilution. Cow uterine smooth muscle myosin precipitates as short bipolar filaments in the absence (a) as well as in the presence (b) of  $Mg^{2+}$  ions. Leiomyosarcoma myosin forms short bipolar filaments without  $Mg^{2+}$  (c) but long fusiform filaments when  $Mg^{2+}$  is added (d). Bar  $0.2 \mu m$ .

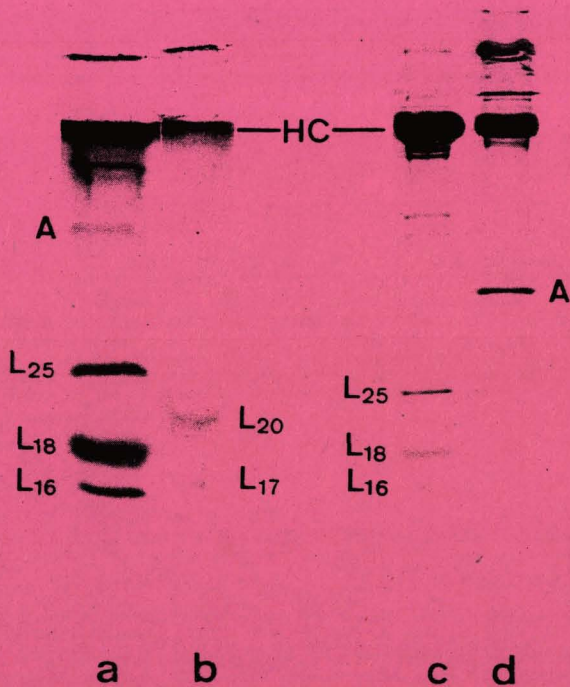


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of normal rabbit skeletal (a, c), normal smooth (b) and leiomyosarcoma (d) myosins. HC: heavy chains, A: actin,  $L_{25}$ ,  $L_{20}$ ,  $L_{18}$ ,  $L_{17}$ ,  $L_{16}$ : light-chains of 25 000, 20 000, 18 000, 17 000 and 16 000 daltons, respectively.

two highest molecular weight light-chains of skeletal muscle myosin (25 000 and 18 000 daltons) (Fig. 3d), the presence of which is also characteristic of fetal muscle myosin (Dow and Stracher, 1971; Hildebrand et al., 1980). By contrast, myosins of leiomyosarcoma and of leiomyoma arising spontaneously in the human uterus have the same light-chains as normal uterine smooth muscle myosin (unpublished results) and as fetal smooth muscle myosin (Kato and Kubo, 1978).

## DISCUSSION

Similarities between fetal and tumoral myosins concerning the fine structure of their synthetic filaments and the light-chain composition of the molecules were described in a recent investigation on rhabdomyosarcoma myosin (Hildebrand et al., 1980). These results can give some indication of the origin of the tumoral stem myoblast.

Since numerous studies of muscle tumors have been undertaken, the origin of tumoral stem myoblast is largely discussed. It is still unknown whether they are mononucleated cells which differentiate from mesenchymal cells, as in the embryo (Friedman and Bird, 1969), or are derived from altered preexisting multinucleated myofibers, as may occur during muscle regeneration (Reznik, 1973). Some authors have suggested that myoblasts arise from the proliferation of preexisting satellite cells (Bruni, 1979; Moss and Leblond, 1970; Pierce et al., 1977). Since satellite cells have been observed in human rhabdomyoma (Cornog and Gonatas, 1967) and in nickel-induced rhabdomyosarcoma (Bruni, 1979), they may be the origin of the tumoral myoblast. In our series of experimental rhabdomyosarcoma, however, none of these cells was observed (Hildebrand and Biserte, 1978).

At the actual stage of investigation the ideas on the origin of tumoral stem cells have crystallized into two main hypotheses, the first one indicating that tumoral stem myoblasts derive from mononucleated cells (Pierce and Johnson, 1971; Pierce et al., 1977). As long as biochemical studies are not undertaken to ascertain the precise origin of tumoral stem myoblasts, this hypothesis must be accepted for rhabdomyosarcoma. The second hypothesis, however, which suggests that tumoral stem myoblasts arise by retrodifferentiation (Uriel, 1976, 1979), seems to be confirmed by our results on  $\text{Ni}_3\text{S}_2$ -induced leiomyosarcoma. These tumors were induced in skeletal muscle such as the previously reported rhabdomyosarcomas (Hildebrand and Biserte, 1979b). Although different in regard to their myofibrillar network, both tumors possess the same oncofetal type of myosin.

These biochemical results on contractile proteins such as those of Ferron et al. (1972) on aldolase and pyruvate kinase isozymes in rhabdomyosarcoma lend support to the retrodifferentiation hypothesis (Uriel, 1976, 1979). During  $\text{Ni}_3\text{S}_2$ -induced preneoplastic development, skeletal muscle cells first retrodifferentiated but the process of redifferentiation started for the tumors described here in the smooth muscle direction rather than in the original striated muscle direction as observed in the case of rhabdomyosarcomas. Nevertheless, the neoplastic cell conserves some properties of the original cell, for instance some characteristics of skeletal muscle myosin although histological and ultrastructural



development is completely different. Katoh and Kubo (1978) showed that fetal smooth muscle myosin, has the same light-chains as adult smooth muscle myosin (20 000 and 17 000 daltons) with an additional fetal light-chain of 23 000 daltons. Their investigation confirms the skeletal muscle origin of the leiomyoblasts described here since they display the fetal-type myosin of skeletal muscle and not the fetal-type myosin of smooth muscle. Our biochemical studies also show that these tumors did not originate in smooth muscle cells of blood vessels as one would expect. Otherwise, their tumoral myosin would show the light-chains of 20 000 and 17 000 daltons. As for spontaneous leiomyosarcomas in human uterus, however, tumoral stem myoblasts should arise from retro-differentiated smooth muscle cells, since they possess the same type of myosin as normal adult smooth muscle or fetal smooth muscle (Katoh and Kubo, 1978). Further investigations of the three types of smooth muscle myosin are needed to define either the fetal-type or the adult-type character of the tumoral smooth muscle myosin.

The phenomenon of retrodifferentiation in cancer occurs not only at the tissue or enzyme level (Uriel, 1976, 1979), but also appears at the level of structural i.e. cytoskeletal proteins as is shown in this work. In addition, these results demonstrate that biochemical investigations are sometimes necessary to ascertain the real origin of neoplastic cells rather than morphological studies only. This investigation gives an indication of the source of muscle tumors, which generally were considered to be satellite cells (Bruni, 1979) or of muscle tumors, which generally were considered to be satellite cells (Hildebrand and Biserte, 1979a). These latter hypotheses should be discarded, for it is less probable that these cells differentiate after neoplastic transformation in two different directions at the same time, i.e. the smooth muscle as well as the striated skeletal muscle direction. On the other hand, rhabdomyoblasts probably do not arise from residual fetal cells, for it has been demonstrated previously (Hildebrand et al., 1980) that fetal and tumoral myosins are different with regard to their Calcium-ATPase activity and to their heavy-chains (different migration behavior of these myosins in  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ -polyacrylamide gel electrophoresis).

The observation of leiomyosarcoma in heart (Bearman, 1974) lends additional support to the retrodifferentiation concept in muscle tumorigenesis. Both cardiac as well as smooth muscle cells belong to the visceral musculature arising from splanchnic mesoderm which in the course of development applies itself as an outer coat around the primary epithelial lining of hollow internal organs. Thus it is clear that retrodifferentiated myocardial cells may redifferentiate after neoplastic transformation in the direction of smooth muscle to give leiomyosarcomas.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We are deeply indebted to Dr. J. Uriel for his interest and critical reading of this manuscript, to Prof. C. Bruni for helpful discussion and to Prof. G. Biserte for his encouragement in this work. We are grateful to Dr. D. Dewally (Laboratoire de Chimie Minérale Appliquée, Université de Lille I) for supplying the nickel sub-sulphide. This work was supported by grants of the Institut National de la Santé et de la



Recherche Médicale (U. 124, U. 16 and ATP 38.76.70) and the Centre National de la Recherche Scientifique (LA no. 04.268).

#### REFERENCES

- Adelstein, R.S. and Conti, M.A. (1976): The effect of phosphorylation on platelet myosin and studies on substrates for platelet myosin light-chain kinase. In: *Cell Motility -Book B-Actin, Myosin and Associated Proteins*. Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation, Vol. 3, pp. 725-738. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Bearman, R.M. (1974): Primary leiomyosarcoma of the heart. *Arch. Pathol.* 98, 62-65.
- Bruni, C. (1979): Mitotic activity of muscle satellite cells during the early stages of rhabdomyosarcomas induction with nickel subsulphide. In: *Muscle Regeneration* (Mauro, A. et al., eds.), pp. 265-273. Raven Press, New York.
- Cornog, J.L. and Gonatas, N.K. (1967): Ultrastructure of rhabdomyoma. *J. Ultrastruct. Res.* 20, 433-450.
- Dow, J. and Stracher, A. (1971): Identification of the essential light-chains of myosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 68, 1107-1110.
- Farron, F., Hsu, H.H.T. and Knox, W.E. (1972): Fetal-type isoenzymes in hepatic and nonhepatic rat tumors. *Cancer Res.* 32, 302-308.
- Friedman, I. and Bird, I.S. (1969): Electron microscope investigation of experimental rhabdomyosarcoma. *J. Pathol.* 97, 375-382.
- Gabbiani, G., Csank-Brassert, J., Schneeberger, J.C., Kapanci, Y., Trenchev, P. and Holborow, E.J. (1976): Contractile proteins in human cancer cells. Immunofluorescent and electron microscopic study. *Am. J. Pathol.* 83, 457-474.
- Gilman, J.P.W. (1965): Muscle tumorigenesis. In: *Canadian Cancer Conference, Proc. Vith Can. Cancer Res. Conf., Honey Harbour, Ontario, 1964*, pp. 209-223. Pergamon Press, London - New York.
- Hildebrand, H.F. and Biserte, G. (1978): Ultrastructural investigation of  $Ni_3S_2$ -induced rhabdomyosarcoma in Wistar-rat. Comparative study with emphasis on myofibrillar differentiation and ciliar formation. *Cancer* 42, 528-554.
- Hildebrand, H.F. and Biserte, G. (1979a): Nickel-subsulphide induced leiomyosarcoma in rabbit white skeletal muscle. A light microscopical and ultrastructural study. *Cancer* 43, 1358-1374.
- Hildebrand, H.F. and Biserte, G. (1979b): Cylindrical laminated bodies in nickel-subsulphide-induced rhabdomyosarcoma in rabbits. *Eur. J. Cell Biol.* 19, 276-280.
- Hildebrand, H.F., Kerckaert, J.P., Biserte, G., Tetaert, D. and Grandier-Vazeille, X. (1980): Tumoral myosins of  $Ni_3S_2$ -induced rhabdomyosarcomas in rat and rabbit: comparative studies with adult and fetal myosins of skeletal muscle. *Eur. J. Cell Biol.* 20, 240-248.
- Hueper, W.C. (1955): Experimental studies in metal carcinogenesis. IV: Cancer produced by parenterally introduced nickel. *J. Natl. Cancer Inst.* 16, 55-73.
- Katoh, N. and Kubo, S. (1978): Light-chains of chicken embryonic gizzard myosin. *Biochim. Biophys. Acta* 535, 401-411.
- Kay, S. and Still, W.J.S. (1969): A comparative electron microscopic study of a leiomyosarcoma and bizarre leiomyoma (leiomyoblastoma) of the stomach. *Am. J. Clin. Pathol.* 52, 403-413.
- Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227, 680-685.
- Lowey, S. and Risby, D. (1971): Light-chains from fast and slow muscle myosins. *Nature (London)* 234, 81-85.
- Moss, F.P. and Leblond, C.P. (1970): Nature of dividing nuclei in skeletal muscle of growing rats. *J. Cell Biol.* 44, 459-462.

- Perrie, W.T. and Perry, S.V. (1970): An electrophoretic study of the low molecular weight components of myosin. *Biochem. J.* 119, 31-38.
- Pierce, G.B. and Johnson, L.D. (1971): Differentiation and Cancer. *In Vitro* 7, 140-145.
- Pierce, G.B., Nakane, P.K., Martinez-Hernandez, A. and Ward, J.M. (1977): Ultrastructural comparison of differentiation of stem cells of murine adenocarcinomas of colon and breast with their normal counterparts. *J. Natl. Cancer Inst.* 58, 1329-1345.
- Reznik, M. (1973): Current concepts of skeletal muscle regeneration. In: *Monographs in Pathology*, Vol. 12 (C.M. Pearson and F.K. Mostofi, eds.), pp. 185-225. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Tetaert, D., Moreau, O., Han, K.K., Hildebrand, H.F. and Biserte, G. (1977): Isolement et caractérisation de la chaîne légère L<sub>17</sub> de la myosine de muscle lisse d'utérus de Vache. *Biochimie*, 59, 337-339.
- Uriel, J. (1976): Cancer, retrodifferentiation and the myth of Faust. *Cancer Res.* 36, 4269-4275.
- Uriel, J. (1979): Retrodifferentiation and the fetal patterns of gene expression in cancer. *Adv. Cancer Res.* 29, 127-174.

## PHYLOGENETIC STUDIES OF CARDIAC MYOSINS FROM AMPHIBIA TO MAMMALS

XAVIER GRANDIER-VAZEILLE, DANIEL TETAERT,\* BRIGITTE HEMON and GERARD BISERTE

Unite Inserm No. 16 and L.A. CNRS 268 Place de Verdun 59045 Lille Cedex, France  
(Tel: 20-97-26-15)

(Received 17 February 1983)

**Abstract**—1. Comparison between pig atrial and ventricular myosins was performed on the light chains (using SDS-PAGE) and on the heavy chains (using  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase measurements and NTCBA peptide mapping).

2. Light chain composition of pig cardiac myosins was compared to three other species ones (frog, chicken and human).

3. Up to birds, atrial and ventricular myosin light chain composition was identical whereas in mammals atrial and ventricular myosin light chain composition was different; likewise the heavy chains.

4. Six cardiac myosin isoenzymes have been thus characterized.

5. No correlation can be established between cardiac myosin light chain pattern and species evolution.

### INTRODUCTION

Myosin, a major contractile protein, is present in multiple forms in avian and mammalian hearts (Hoh *et al.*, 1977; Sartore *et al.*, 1978; Clark *et al.*, 1982). The cardiac myosin molecule in its native state contains two heavy and light subunits non-covalently bound together. Heterogeneity in at least one of the subunits gives rise to polymorphic forms of myosin which have been called isoenzymes. For instance, beef cardiac ventricular and atrial myosins differed in their light chain LC-1 (Wikman-Coffelt and Srivastava, 1979) and in their heavy-chain (Flink *et al.*, 1978). On the other hand, differences have been shown in the heavy-chain of chicken ventricular and atrial myosins although the pattern of light chain was similar (Dalla-Libera *et al.*, 1979).

In addition, comparisons between dog ventricular myosins have revealed differences in the pattern of light chain: same electrophoretic mobility but differences in the light chain ratio (Wikman-Coffelt *et al.*, 1975). In the dog and rabbit left ventricle, heterogeneity of LC-1 myosin light chain have been observed (Ueda and Yazaki, 1981). Structural differences between pig left and right ventricular myosin heavy chain have also been reported (Grandier-Vazeille *et al.*, 1980a). These differences have been attributed to the existence of cardiac myosin isoenzymes and to a different repartition in each ventricle (Grandier-Vazeille *et al.*, 1980b).

In the same ventricle from different species though no myosin heterogeneity has been detected by native-gel electrophoresis, differences have been found by immunological reactions (Clark *et al.*, 1982).

Such data and the fact that the heart changes considerably in the course of species evolution have stimulated us to compare the light chain composition of cardiac myosins (left and right atrial and ventricular myosins) from various species following the

phylogenetic tree (from amphibia to mammals). The differences observed in the pattern of pig atrial and ventricular light chains have led us to compare their heavy-chains. As no reports have been published on atrial and ventricular myosin from amphibian heart, the present study was also undertaken to determine whether the structural characteristics of atrial and ventricular myosins differ from one species to another, from amphibia to higher vertebrates, and from one part of the heart to the other. A first indication of the degree and the nature of variations will be thus provided for a contractile protein during the evolution processes.

### MATERIALS AND METHODS

After sacrificing about 100 frogs (adult *Rana esculenta*), the hearts were excised, the ventricles dissected and immersed in 3 vol of a relaxing solution (0.025 M KCl; 0.04 M sodium tetraborate; 0.005 M ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) pH 7.0) for at least 20 min. Atria were prepared free of ventricle and arterial bulb and washed in the relaxing solution.

Fresh pig (*Sus domesticus*) and chicken (*Gallus domesticus*) hearts were obtained from a slaughter house. The right and left ventricles free wall, right and left atria were carefully dissected and immersed in the relaxing solution.

Human heart from a 50-year-old male (*Homo sapiens*) was obtained from autopsy material 6-12 hr after death. Each part of the heart was also dissected and immersed in the relaxing solution.

Myosin from the washed muscles was then isolated. Further myosin purifications were performed as previously described (Grandier-Vazeille and Tetaert, 1978). When a muscle was collected in small amount, precipitation of myosin was carried out by dialysis against 10 vol of 0.001 M  $\text{NaHCO}_3$ ; 0.005 M  $\text{CaCl}_2$ .

Myosin concentrations were determined with the molecular extinction coefficient  $E_{1\%}^{280\text{nm}} = 5.60$  (Small *et al.*, 1961) in a ZEISS PM Q II spectrophotometer and also by the biuret method.

$\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity was measured at 25°C in a mixture containing 0.4 M KCl; 0.0125 M Tris-HCl at pH 8.0;

\*Address correspondence to D. Tetaert.



Na<sub>2</sub>-adenosine triphosphate (Na<sub>2</sub>-ATP) 0.0025 M; 0.010 M CaCl<sub>2</sub> in a final volume of 2 ml. The reaction was initiated by addition of 0.1 mg myosin. The assays were stopped after 7 min, by addition of 1 ml of 15% trichloroacetic acid, and inorganic phosphate was measured by the method of Fiske and Subbarow.

In the case of pig cardiac myosins, chemical cleavage at cysteine residues was carried out as follows. Myosins (20 mg/ml) were dissolved in 0.5 M KCl; 0.003 M EDTA; 0.01 M Tris-HCl at pH 8.2. Dissociation of non-covalent bonds was carried out at 25°C and pH 8.2, by addition of dry urea and Tris-HCl to a final concentration of 8 and 0.1 M respectively. For reduction of disulfide bonds, D.L. dithiothreitol (Sigma) was added in 10-fold excess over the number of cysteine residues in myosin. To ensure that all thiol groups were completely reduced, the mixture was stirred under dry nitrogen for 4 hr at room temperature. In some experiments, 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) was used as the dissociating agent and 2-mercaptoethanol as the reducing agent. The cleavage at the cysteine residues was performed by addition of 2-nitrothiocyanato-benzoic acid (NTCBA) (Eastman Kodak) 40-fold in excess on a molar basis over the total number of thiol groups present. The reaction mixture was then incubated at 37°C and was stirred under dry nitrogen for 40 hr. The reaction was stopped by desalting the digest on a column (2.5 × 40 cm) of Sephadex G-15 equilibrated and developed in NH<sub>4</sub>OH 0.1 M. The desalting digest was concentrated by lyophilization.

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using the Laemmli buffer (Laemmli, 1970) or 0.16 M Tris-borate pH 7.0 buffer (Tetaert *et al.*, 1977) and the apparatus described by Kerckaert (1978), was performed on 5–30% acrylamide gradient slab gels (15 × 10 × 0.075 cm). Molecular weights were determined from the electrophoretic mobilities on gel, using phosphorylase b (94,000); ovalbumin (43,000); carbonic anhydrase (30,000); trypsin inhibitor (20,100) and α-lactalbumin (14,400) as standard proteins.

Slab PAGE in the presence of 8 M urea; 0.02 M Tris-HCl pH 8.4 was performed as described by Perrie and Perry (1970). The acrylamide concentration of the gel was 20% (bis acrylamide 0.26%). Electrophoresis was carried out on slab (15 × 10 × 0.2 cm). The gels were densitometrically scanned with a Vernon model PH I-6 spectrophotometer.

## RESULTS

### Comparison of pig cardiac myosin light chains by electrophoresis

Myosin from the free wall right and left ventricle and from right and left atria of pig myocardium, electrophoresed on the same slab at pH 8.4 in presence of SDS, were separated in three bands: one of higher molecular weight corresponds to the heavy chains (HC), the two others corresponding to the light chains. The right and left pig ventricular myosins have a similar pattern. The ventricular light chain subunits which were referred to as L<sub>27</sub><sup>V</sup> and L<sub>18</sub><sup>V</sup> migrated with molecular weights of approximately 27,000 and 18,000 respectively, as determined by comparison with standards of known molecular weight (Fig. 1). Right and left pig atrial myosins have also a similar pattern. The atrial light chain subunits were referred to as L<sup>a1</sup> and L<sup>a2</sup>.

Comparison between ventricular and atrial myosins revealed differences in the electrophoretic mobilities of the light chains; L<sub>18</sub><sup>V</sup> migrated slightly faster than L<sup>a2</sup> whereas L<sub>27</sub><sup>V</sup> migrated slightly faster than L<sup>a1</sup> and largely slower than L<sup>a2</sup>. These differences were confirmed by coelectrophoresis experiments (Fig. 1).

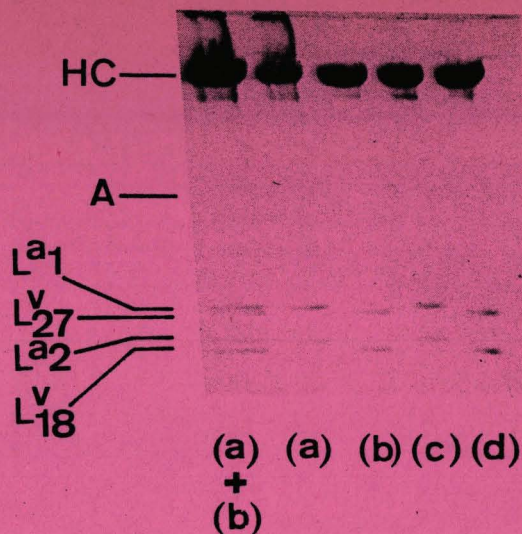


Fig. 1. Comparison of pig left and right atrial and ventricular myosin by slab SDS-PAGE at pH 8.4 (Laemmli buffer). (a) Left atrial myosin, (b) left ventricular myosin, (c) right atrial myosin, (d) right ventricular myosin. HC, myosin heavy chains; A, actin position; L<sup>x</sup>, myosin light chains.

When the myosins were run under the other electrophoretic conditions i.e. pH 7.0 instead of pH 8.4, no change was noticed in the electrophoretic patterns of right and left pig ventricular myosins and in the electrophoretic patterns of right and left pig atrial myosins; L<sub>27</sub><sup>V</sup> migrated also faster than L<sup>a1</sup> while L<sub>18</sub><sup>V</sup> migrated significantly faster than L<sup>a2</sup> (Fig. 2). For pig cardiac myosins, we observed that the increasing electrophoretic mobilities were always L<sup>a1</sup>, L<sub>27</sub><sup>V</sup>, L<sup>a2</sup> and L<sub>18</sub><sup>V</sup>, whatever the PAGE buffer system used.

Analysis by slab PAGE, in presence of urea at pH 8.4, of pig cardiac myosins (Fig. 3) revealed just the

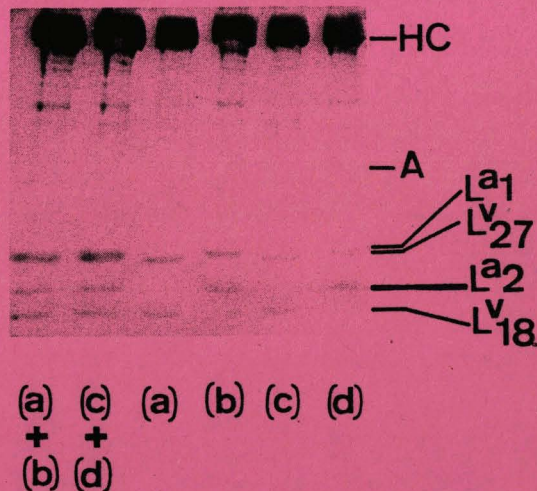


Fig. 2. Comparison of pig left and right atrial and ventricular myosins by slab SDS-PAGE at pH 7.0 (0.16 M Tris-borate buffer). (a) Left ventricular myosin, (b) left atrial myosin, (c) right ventricular myosin, (d) right atrial myosin.

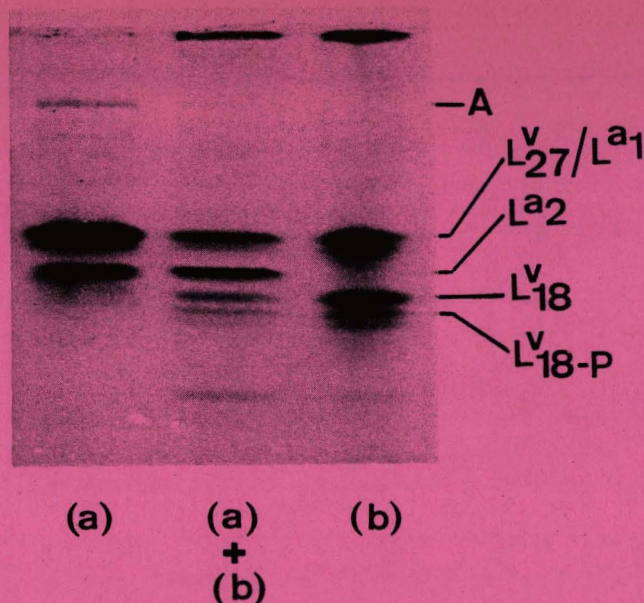


Fig. 3. Comparison of pig atrial and ventricular myosins by slab urea PAGE at pH 8.4, (a) Left or right atrial myosin, (b) left or right ventricular myosin.

presence of the light chains, the heavy chains did not enter the gel. For left and right ventricular myosins the patterns were similar. Three bands were observed: the first band corresponded to  $L_{27}^V$ , the two others corresponded to  $L_{18}^V$  ( $L_{18}^V$  and its phosphorylated form  $L_{18-P}^V$ ). The left and right atrial myosin patterns were similar but different from that of ventricular myosins; the atrial myosins displayed only two light chains: in our conditions,  $L_{27}^V$  and  $L^{a1}$  had the same electrophoretic mobility;  $L^{a2}$  probably in the unphosphorylated form had a smaller electrophoretic mobility than  $L_{18}^V$ . These results have been confirmed by coelectrophoresis of atrial and ventricular myosins.

#### Comparison of pig cardiac myosin heavy chains

Because the differences observed in the light chain composition could be associated with differences in the heavy chains structure,  $Ca^{2+}$ -ATPase mea-

surements and chemical cleavage of cardiac myosins have been performed.

The measures of  $Ca^{2+}$ -ATPase have been carried out at 10 mM  $CaCl_2$  because at this concentration the ATP hydrolysis rate is maximum (Grandier-Vazeille *et al.*, 1980a). Comparison between left and right ventricular myosins revealed differences of about 20% (Table 1) as previously described (Grandier-Vazeille *et al.*, 1980a). The same comparison between left and right atrial myosins revealed analogous differences (Table 1). However, more significant differences were obtained when atrial and ventricular myosins  $Ca^{2+}$ -ATPases were compared (Table 1).

As myosin heavy chain is not well resolved by SDS-PAGE even on a 5–30% gel gradient, another approach has been developed by studying myosin heavy chain hydrolyzates. The use of NTCBA, cleaving specifically the peptide bonds at the  $NH_2$ -terminus of cysteine residues and the study by 5–30% gradient SDS-PAGE of the digests allowed us to detect differences between pig left cardiac atrial myosin heavy chain and pig right cardiac ventricular myosin heavy chain (Fig. 4). Indeed, the patterns showed that the myosins possess several common polypeptides, in addition to a number of distinct ones. For instance, higher molecular weight polypeptides were produced in pig left atrial myosin heavy chain and the atrial myosin light chain  $L^{a2}$  might have a high sensitivity to NTCBA.

#### Comparison of cardiac myosin light chain from pig to other species

In comparison to the pig cardiac myosins, it was interesting to study the light chain composition of other cardiac myosins from other species (man, chicken and frog). To achieve a satisfactory resolution of the light chains, samples of different cardiac myosins were analyzed by SDS-PAGE at pH 8.4 using the same gradient slab gel.

Table 1. Maximal values of  $Ca^{2+}$ -ATPase activity of the different pig cardiac myosins

Myosins		Maximum value (nmol Pi/min/mg)
Ventricle	Left	101 ± 12
	Right	127 ± 0
Atrium	Left	360 ± 40
	Right	427 ± 45

Abbreviations: Pi, Inorganic phosphorus; LC-1, myosin light chain of higher molecular weight; LC-2, myosin light chain of smaller molecular weight;  $L_{27}^V$ ;  $L_{18}^V$ , pig ventricular myosin light chain of about 27000 and 18000 daltons respectively;  $L^{a1}$ ;  $L^{a2}$ , pig atrial myosin light chains. EDTA, ethylene-diamine-tetracetic acid; NTCBA, 2-Nitro-5-thiocyanatobenzoic acid; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; SDS, sodium dodecyl sulfate.



Fig. 4. Analysis of NTCBA digests from pig cardiac myosins by SDS-PAGE at pH 8.4 (Laemmli buffer). (a) Right ventricular myosin digest (b) left atrial myosin digest. → Indicate the principal different polypeptides.

Human cardiac myosins from right and left ventricle and atria displayed two light chains (Fig. 5). No difference was observed in the electrophoretic pattern of left and right ventricular myosins. No difference

was also found between left and right atrial myosins. However, between human ventricular and atrial myosins, differences in the light chain electrophoretic patterns were detected. The electrophoretic mobilities of low molecular weight myosin light chain were for human ventricular myosin, similar to  $L_{18}^V$ , and, for human atrial myosin, similar to  $L^A$ . The high molecular weight myosin light chain from the human ventricle and atria migrated faster than the homologous  $L_{27}^V$  and  $L^A$  from pig. In addition, the high molecular weight human ventricular myosin light chain migrated faster than the human atrial one. These differences between human and pig cardiac myosins were confirmed by coelectrophoresis experiments (Fig. 5).

Chicken cardiac myosins from right and left ventricles and from right and left atria were analyzed by SDS-PAGE at pH 8.4 and 7.0 (Fig. 6). The same patterns were obtained for the four myosins whatever the buffer system used and confirmed by coelectrophoresis experiments the low molecular weight light chain had an electrophoretic mobility similar to  $L_{18}^V$  whereas the high molecular weight light chain migrated faster than  $L_{27}^V$ .

SDS-PAGE pattern of frog ventricular and right and left atrial myosins were undistinguishable. Frog cardiac myosins displayed two light chains: the low molecular weight subunit (LC-2) migrated largely faster than  $L_{18}^V$  whereas the electrophoretic mobility of the high molecular weight one (LC-1) was between  $L_{27}^V$  and  $L^A$ , as confirmed by coelectrophoresis (Fig. 7). In addition, after the densitometric scanning, the ratio between the two frog cardiac myosin light chain LC-1:LC-2 was about 80:20.

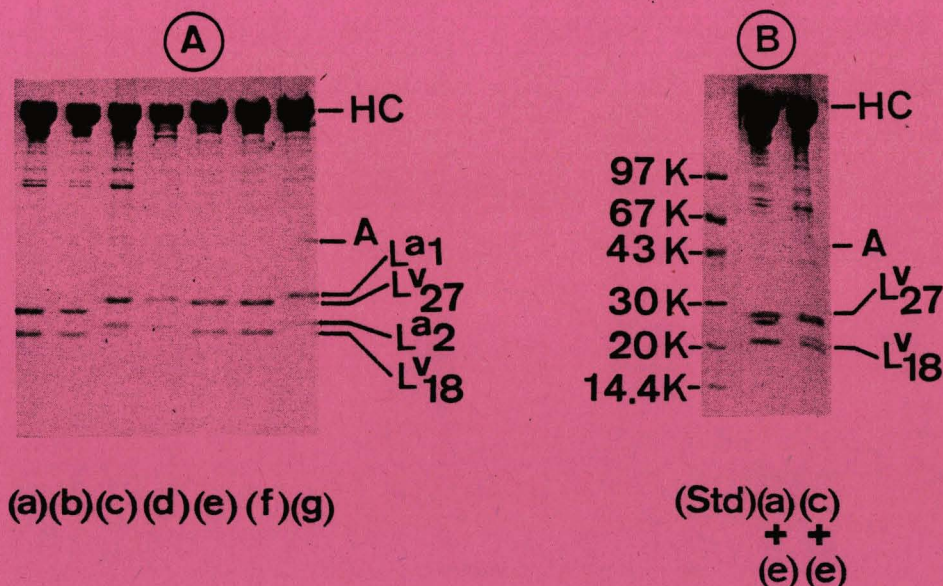


Fig. 5. Comparison of cardiac myosin light chains from different part of pig and human heart by SDS-PAGE at pH 8.4 (Laemmli buffer). (A) Comparison between pig and human cardiac myosins: (a) human left ventricular myosin, (b) human right ventricular myosin, (c) human left atrial myosin, (d) human right atrial myosin, (e) pig left ventricular myosin, (f) pig right ventricular myosin, (g) pig left atrial myosin. (B) Coelectrophoresis of human and pig cardiac myosins: (a) human ventricular myosin, (c) pig atrial myosin, (d) human atrial myosin, (Std) standard protein markers.

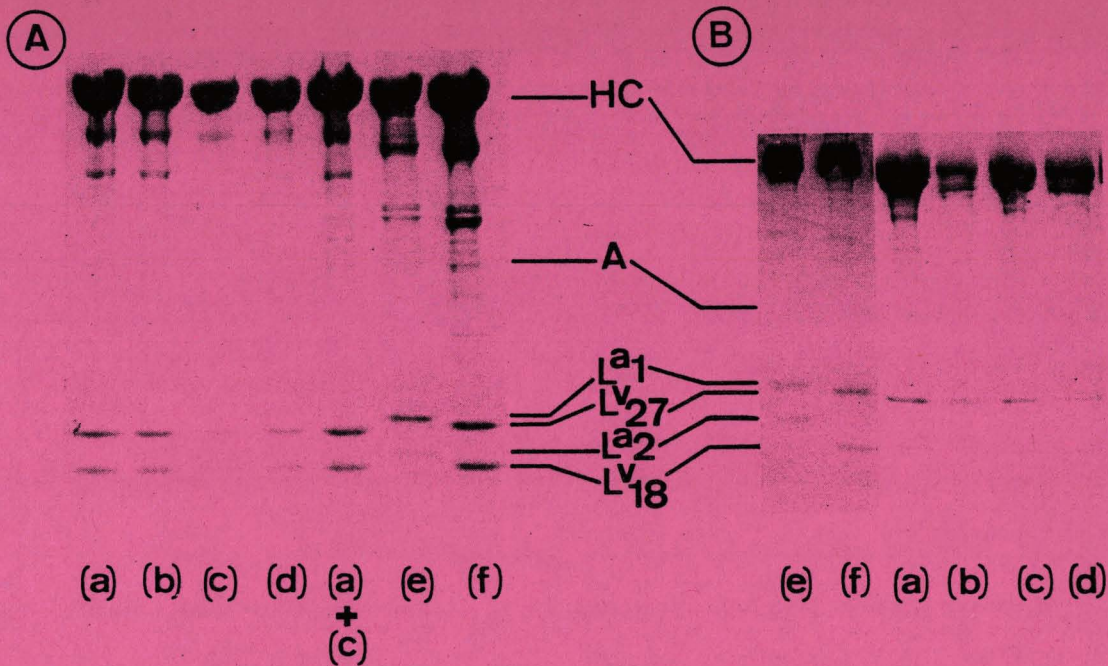


Fig. 6. Comparison of cardiac myosin light chains from different parts of pig and chicken heart by SDS-PAGE. (A) Electrophoretic patterns of pig and chicken cardiac myosins by SDS-PAGE at pH 8.4 (Laemmli buffer). (a) Chicken right ventricular myosin, (b) chicken left ventricular myosin, (c) chicken right atrial myosin, (d) chicken left atrial myosin, (e) pig right atrial myosin, (f) pig left ventricular myosin. (B) Electrophoretic patterns of pig and chicken cardiac myosins by SDS-PAGE at pH 7.0 (0.16 M Tris-borate buffer). (a) Chicken right ventricular myosin, (b) chicken left ventricular myosin, (c) chicken right atrial myosin, (d) chicken left atrial myosin, (e) pig right atrial myosin, (f) pig right ventricular myosin.

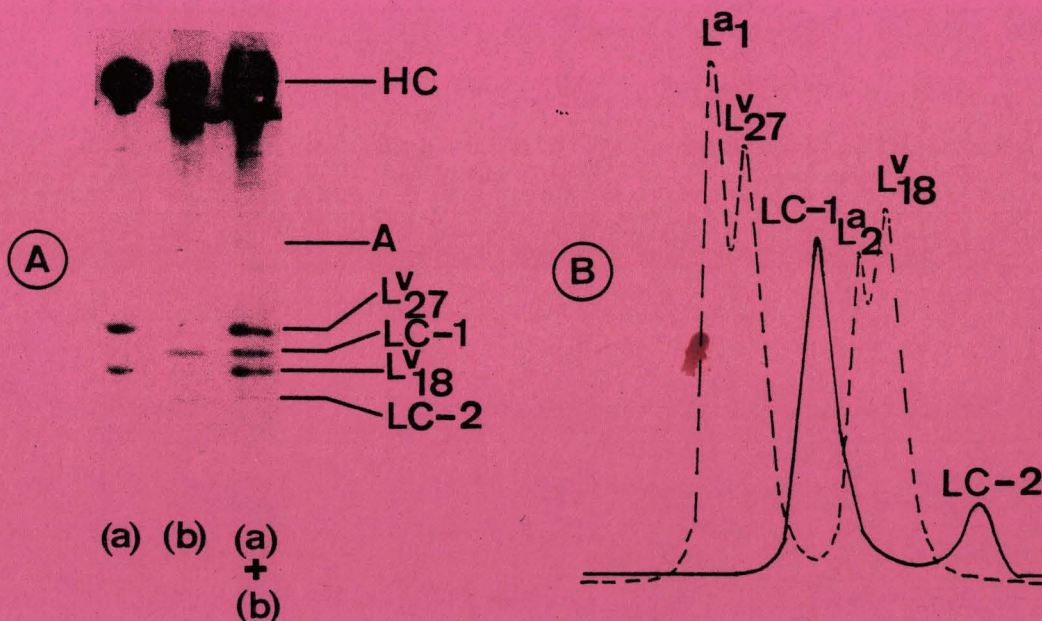


Fig. 7. Comparison of cardiac myosin light chains from pig and frog heart. (A) Electrophoretic patterns of pig and frog cardiac myosins by SDS-PAGE at pH 8.4 (Laemmli buffer). (a) Pig left ventricular myosin, (b) frog ventricular myosin (frog atrial myosins have the same pattern). (B) Densitometric scanning of frog and pig atrial and ventricular myosin light chains after coelectrophoresis experiment (-----) pig cardiac myosin light chains ( $L^{a1}$  and  $L^{a2}$  correspond to pig atrial myosin light chains,  $L^{v27}$  and  $L^{v18}$  correspond to pig ventricular myosin light chains); (—) frog cardiac myosin light chains (LC-1 and LC-2).

## DISCUSSION AND CONCLUSION

Early studies by a number of investigators showed that the electrophoretic pattern of ventricular myosin light subunits display invariably two bands with the same molecular weight (approximately 27,000 and 18,000 daltons) in all the species studied (Sarkar *et al.*, 1971; Leger *et al.*, 1975). However, ventricular myosin light subunits have been shown to have different amino acid composition in rabbit, pig, human and beef heart (Klotz *et al.*, 1975) and differences have also been found in the primary sequence of chicken, beef, pig and human cardiac myosin light chain  $L_{27}^V$  (Maita *et al.*, 1980; Grandier-Vazeille *et al.*, 1982; Klotz *et al.*, 1982). In addition, it is now well established that atrial and ventricular myosins from mammalian heart differ clearly in the relative molecular weight of their light chains (Long *et al.*, 1977; Syrový *et al.*, 1979).

Differences in the heavy chain structure of atrial and ventricular chicken myosins have also been observed although light subunits were electrophoretically identical (Dalla-Libera *et al.*, 1979). Similar results have been shown between left and right ventricular myosins for a higher vertebrate such as the pig (Grandier-Vazeille *et al.*, 1980a). It was thus of interest to study the light and heavy chains from atrial and ventricular myosins, for this species, and to determine if a possible correlation between differences in the light chain composition and larger differences in the heavy chain structure exist.

The gradient slab SDS-PAGE at pH 8.4 is a very efficient technique to compare myosin light chain composition, but it is not appropriate to resolve the fine structure of myosin heavy chain. The N-terminal parts of myosin heavy chains, the globular heads, contain the ATPase sites. To compare the heavy chains, the  $Ca^{2+}$ -ATPase activities and peptide maps after NTCBA cleavage of myosins were studied. Between left atrial and right ventricular myosin NTCBA digests, we have noted several common polypeptides and additional ones. Common polypeptides in a digest, (i.e. with the same electrophoretic mobility) are not present at the same concentration. Likewise from one digest to the other, the amount of common polypeptides are not identical. These results, in agreement with those described previously (Grandier-Vazeille *et al.*, 1980a) confirm the existence of pig cardiac myosin heavy chain isoenzymes. Some of them are present as well in atria as in ventricles, but at different concentration. Furthermore, a relationship between the formation of high molecular weight NTCBA polypeptides and high  $Ca^{2+}$ -ATPase activity seems to exist. Such a relationship has already been expected between pig left and right ventricular myosins (Grandier-Vazeille *et al.*, 1980a, b).

We have also shown that multiple forms of myosin heavy chains exist and that they are associated to different light chains. For example, heavy chains of left and right ventricular myosins possess always  $L_{27}^V$  and  $L_{18}^V$ , whereas heavy chains of left and right atrial myosins possess always  $L^{A1}$  and  $L^{A2}$ . It seems thus that the major component to identify the myosin of the different parts of the heart would be the light chains.

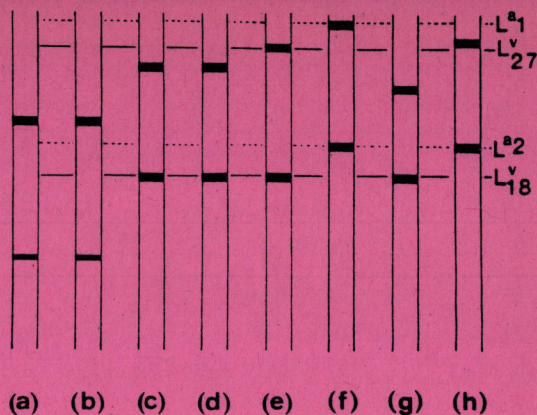


Fig. 8. Schematic representation of the pattern obtained upon SDS-PAGE at pH 8.4 (Laemmli buffer) of cardiac myosin light chains from the four species. Only the scale-map of light chain is presented according to their relative electrophoretic mobilities. The light chains are placed by comparison to the pig atrial myosin light chains  $L^{A1}$  and  $L^{A2}$  and to pig ventricular ones  $L_{27}^V$  and  $L_{18}^V$ . (a) Frog atrial myosin, (b) frog ventricular myosin, (c) chicken ventricular myosin, (d) chicken atrial myosin, (e) pig ventricular myosin, (f) pig atrial myosin, (g) human ventricular myosin, (h) human atrial myosin.

With these observations in mind, the comparison of the light chain composition seems to be sufficient for a phylogenetic study of cardiac myosins. Because the heart morphology change from agnathes to mammals (one ventricle and one atria for lamprey; one ventricle and two atria for frog, and two ventricles and two atria from birds), the present work compares the light subunits of left and right atrial and ventricular myosins of four species (frog, chicken, pig and human).

For comparison purposes, only the light chain composition of the different cardiac myosins has been schematically presented in Fig. 8. It is important to point out that right and left parts (atria and ventricle) possess the same light chain composition, whatever the species. Up to birds, atrial and ventricular myosin light chains are similar even for a heart with three chambers such as frog heart. We have just noted an increase in the molecular weight of the light chains. The results obtained for chicken heart myosins were in agreement with those described by Dalla-Libera *et al.*, 1979: a complete identity in the light chain composition between atrial and ventricular myosin is always found whatever the electrophoresis buffer used.

It must be underlined that our knowledge of contractile proteins of amphibian muscles is rather poor and, for the first time, the electrophoretic properties of myosin light chains from amphibian heart were investigated. Frog cardiac myosin light chains are completely different from those of avian and mammalian ones and from frog skeletal muscle ones (our unpublished results). At this stage of heart development, frog cardiac myosin possesses particular light chains whereas frog skeletal muscle myosin is very similar to myosin from slow skeletal muscle of



other species (our unpublished results; Pliszka *et al.*, 1981). No equivalent electrophoretic pattern of myosin light chain has ever been reported, even for non-muscle myosin (Hesketh *et al.*, 1978), for skeletal muscle myosin from fish (Focant and Huriaux, 1976) or lobster (Siemankowski *et al.*, 1980). Thus, we have now described a new cardiac myosin isoenzyme.

From birds, the heart is composed of four cavities. If the chicken atrial and ventricular myosin light chain compositions are similar, the mammalian atrial and ventricular myosins show distinct light chain pattern, whatever the buffer used. Between the three species studied (chicken, pig and human), only the smaller molecular weight ventricular myosin light chain, with the electrophoretic mobility identical to  $L_{18}^V$ , is common (Fig. 8). On the other hand, the comparison between mammalian cardiac myosins reveals that the smaller molecular weight light chains of atrial and ventricular myosin ( $L^2$  and  $L_{18}^V$ ) are common, but no identity has been observed concerning the larger ones.

Our findings are in agreement with those described by Dalla-Libera *et al.* (1979) on chicken cardiac myosins and with those described by Price *et al.* (1980) on human cardiac myosins. In contrast, our results on pig cardiac myosins are different from those described by Syrový *et al.* (1979). Although Syrový *et al.* (1979) reported some differences between pig atrial and ventricular myosin light chains, the relative electrophoretic mobilities given seem to us rather wrong. Indeed, using tube gels with different migration time it is impossible to compare accurately the myosin light chain electrophoretic mobilities. Our present findings obtained on the same slab gel using gradient (5–30%) SDS-PAGE, in the Laemmli system (noted for its high degree of resolution) have been confirmed by coelectrophoresis experiments and by comparative migration at pH 7.0. Although differences are observed in the apparent molecular weight of the light chains when different pH buffer system are used, we always obtained for pig cardiac myosin light chains the increased electrophoretic mobilities such as  $L^1$ ;  $L_{27}^V$ ;  $L^2$ ;  $L_{18}^V$  but never  $L_{27}^V$ ;  $L^1$ ;  $L^2$ ;  $L_{18}^V$  as described by Syrový *et al.* (1979).

With the other types of cardiac myosins described by Long *et al.* (1977) (dog and beef), Dalla-Libera and Sartore (1981) (rabbit), it seems that the cardiac myosin light chains are species-specific, but no relationship between myosin light chain composition and species evolution has been found. These results are a complement to the recent investigations, by Clark *et al.* (1982), on cardiac myosin heavy chains from different species. For the common species studied (chicken, pig and human), the differences found in the myosin light chain composition cannot explain the mobility of myosins on native-gel electrophoresis. For instance, if the electrophoretic mobility of chicken ventricular myosin light chain of higher molecular weight is intermediate between pig and human one, chicken myosin migrate faster on native-gel electrophoresis. In addition, to multiple forms of heavy chain are associated identical light chains. This is confirmed by the presence of two bands for atrial myosin (on native-gel electrophoresis) and only two light chains  $L^1$  and  $L^2$  (on SDS-PAGE).

In conclusion, multiple forms of cardiac myosin

have been identified by analysis of the light chain patterns and the heavy chain structure. In the course of evolution, the light chain composition changes between atrial and ventricular myosin but no difference is observed between left and right parts. Multiple forms of myosin heavy chain have also been identified. The different types of heavy chain could be associated to identical and/or different light chain. However, the light chain composition characterizes the myosin studied from ventricles or atria. In the course of evolution, the molecular forms, the distribution in the different parts of the heart, the properties of cardiac myosin isoenzymes appeared to change significantly, apparently as a result of adaptation of the heart muscle. Nevertheless, if the notion of myosin polymorphism is now well established, the precise role of the heavy and light chain myosin isoenzymes is so far not clearly understood.

*Acknowledgements*—We are indebted to Dr R. Kassab (Centre de biochimie macromoléculaire CNRS, Montpellier, France) for critical review of the manuscript.

#### REFERENCES

- Clark W. A., Chizzonite R. A., Everett A. W., Rabinowitz M. and Zak R. (1982) Species correlations between cardiac isomyosins. *J. biol. Chem.* **257**, 5449–5454.
- Dalla-Libera L. and Sartore S. (1981) Immunological and biochemical evidence for atrial-like isomyosin in thyrotoxic rabbit ventricle. *Biochim. biophys. Acta.* **669**, 84–92.
- Dalla-Libera L., Sartore S. and Schiaffino S. (1979) Comparative analysis of chicken atrial and ventricular myosins. *Biochim. biophys. Acta* **581**, 283–294.
- Flink I. L., Rader J. H., Banerjee S. K. and Morkin E. (1978) Atrial and ventricular cardiac myosins contain different heavy chain species. *FEBS Lett.* **94**, 125–130.
- Focant B. and Huriaux F. (1976) Light chains of carp and pike skeletal muscle myosins. Isolation and characterization of the most anodic light chain on alkaline pH electrophoresis. *FEBS Lett.* **65**, 16–19.
- Grandier-Vazeille X. and Tetaert D. (1978) Isolement des chaînes légères de la myosine cardiaque de porc par électrophorèse préparative et étude des peptides obtenus après action du bromure de cyanogène. *Biochimie* **60**, 409–415.
- Grandier-Vazeille X., Tetaert D., Hildebrand H. F. and Biserte G. (1980a) Pig cardiac myosin isoenzymes. *Eur. J. Cell Biol.* **21**, 116–121.
- Grandier-Vazeille X., Tetaert D., Hemon B. and Lemay P. (1980b) New evidences of pig cardiac isoenzymes. *J. Muscle Res. Cell Motility* **1**, 235.
- Grandier-Vazeille X., Tetaert D., Hemon B. and Biserte G. (1982) Evaluation of commercial RP-HPLC columns for the separation of peptides from porcine cardiac myosin light chain  $L_{27}^V$ . *Protides biol. Fluids* **30**, 717–721.
- Hesketh J. E., Aunis D., Mandel P. and Devilliers G. (1978) Biochemical and morphological studies of bovine adrenal medullary myosin. *Biol. Cell.* **33**, 199–208.
- Hoh J. F. Y., McGrath M. A. and Hale P. T. (1977) Electrophoretic analysis of multiple forms of rat cardiac myosin: effect of hypophysectomy and thyroxine replacement. *J. molec. Cell Cardiol.* **10**, 1053–1076.
- Kerckaert J. P. (1978) Highly simplified analytical or preparative slab gel electrophoresis. *Analyt. Biochem.* **84**, 354–360.
- Klotz C., Aumont M. C., Leger J. J. and Swynghedauw B. (1975) Human heart myosin ATPase and light subunits. *Biochim biophys. Acta* **336**, 461–469.
- Klotz C., Leger J. J. and Elzinga M. (1982) Comparative sequence of myosin light chain from normal and hypertrophied human hearts. *Circulation Res.* **50**, 201–209.

- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature, Lond.* **227**, 680-685.
- Leger J. J., Berson G., Delcayre C., Klotz C., Schwartz K., Leger Joc., Stephen M. and Swynghedauw B. (1975) Heart contractile proteins. *Biochimie* **57**, 1249-1273.
- Long L., Fabian F., Mason D. T. and Wikman-Coffelt J. (1977) A new cardiac myosin characterized from the canine atria. *Biochem. biophys. Res. Commun.* **76**, 626-635.
- Maita T., Umegame T., Kato Y. and Matsuda G. (1980) Amino acid sequence of the L-1 light chain of chicken cardiac muscle myosin. *Eur. J. Biochem.* **107**, 565-575.
- Perrie W. T. and Perry S. V. (1970) An electrophoretic study of the low molecular weight components of myosin. *Biochem. J.* **119**, 31-38.
- Pliszka B., Strzelecka-Golaszewska H., Pantaloni C. and D'Albis A. (1981) Comparison of myosin isoenzymes from slow-tonic and fast-twitch fibers of frog muscle. *Eur. J. Cell Biol.* **25**, 144-149.
- Price K. M., Littler W. A. and Cummins P. (1980) Human atrial and ventricular myosin light chain subunits in the adult and during the development. *Biochem. J.* **191**, 571-580.
- Sarkar S., Sreter F. A. and Gergely J. (1971) Light chains of myosins from white, red and cardiac muscles. *Proc. natn. Acad. Sci. U.S.A.* **68**, 946-950.
- Sartore S., Pierobon-Bormioli S. and Schiaffino S. (1978) Immunohistochemical evidence for myosin polymorphism in the chicken heart. *Nature, Lond.* **274**, 82-83.
- Siemankowski R. F., Zobel C. R. and Manuel H. (1980) Comparative studies on the structure and aggregative properties of the molecule II. The substructure of the lobster myosin molecule. *Biochim. biophys. Acta* **622**, 25-35.
- Small P. A., Harrington W. F. and Kielly W. W. (1961) The electrophoretic homogeneity of the myosin subunits. *Biochim. biophys. Acta* **49**, 462-470.
- Syrový I., Delcayre C. and Swynghedauw B. (1979) Comparison of ATPase activity and light subunits in myosins from left and right ventricles and atria in seven mammalian species. *J. molec. Cell Cardiol.* **11**, 1129-1135.
- Tetaert D., Moreau O., Han K. K., Hildebrand H. F. and Biserte G. (1977) Isolement et caractérisation de la chaîne légère "L<sub>17</sub>" de la myosine lisse d'utérus de Vache. *Biochimie* **59**, 337-339.
- Ueda S. and Yazaki Y. (1981) Heterogeneity of 27,000 daltons light chain of cardiac ventricular myosin. *J. Biochem.* **90**, 555-558.
- Wikman-Coffelt J. and Srivastava S. (1979) Differences in atrial and ventricular myosin light chain LC-1. *FEBS Lett.* **106**, 207-212.
- Wikman-Coffelt J., Fenner C., Smith A. and Mason D. T. (1975) Comparative analyses of the kinetics and subunits of myosins from canine skeletal muscle and cardiac tissue. *J. biol. Chem.* **250**, 1257-1262.

## Isolement des chaînes légères de la myosine cardiaque de porc par électrophorèse préparative et étude des polypeptides obtenus après action du bromure de cyanogène.

Xavier GRANDIER-VAZEILLE  
et Daniel TETAERT (\*) ◇.

(27-12-1977).

Unité des Protéines Normales et Pathologiques  
(U-16 INSERM)

Place de Verdun — F 59045 Lille Cédex.

### Summary.

*A simple, rapid and efficient procedure is developed to isolate proteins with identical or different isoelectric points such as pig cardiac myosin light chains.*

*Preparative electrophoresis on discontinuous polyacrylamide slab gels in the presence of urea allows a very good separation of each light chain ( $L_{27}$  and  $L_{18}$ ) and heavy chain from highly purified myosin.*

*An original elution procedure of the proteins fixed and localized by amido schwarz allows the isolation of the  $L_{27}$  and  $L_{18}$  light chains in quantities sufficient to carry out structural studies.*

*Homogeneity of light chains thus isolated is checked by the analysis of cyanogen bromide peptides. Structural similarities can be demonstrated between myosin light chains of beef and pig heart.*

### Introduction.

La myosine, principale protéine contractile, possède deux chaînes lourdes de poids moléculaire élevé auxquelles sont associées de façon non

covalente des chaînes légères d'environ 20.000 daltons [1, 2]. La répartition en chaînes légères de la myosine varie selon le type de muscle envisagé : par exemple, on sait que la myosine du muscle cardiaque contient deux types de chaînes légères : type I de 27.000 daltons ( $L_{27}$ ) et type II de 18.000 daltons ( $L_{18}$ ) [3], tandis que la myosine de muscle squelettique de Lapin en possède trois ( $L_{25}$ ,  $L_{18}$  et  $L_{16}$ ) et la myosine de muscle lisse, deux ( $L_{20}$  et  $L_{17}$ ) [4].

Les difficultés généralement rencontrées au cours de la purification de la myosine cardiaque (c'est-à-dire l'élimination des protéines du filament fin) sont à l'heure actuelle surmontées. En effet, les nombreux protocoles de purification de la myosine avec un haut degré de pureté conduisent tous à de bons rendements [5, 6, 7].

Mais, jusqu'à présent, contrairement au problème de la myosine de muscle blanc de Lapin, il n'existe pas de procédé très sélectif de dissociation de l'une ou l'autre des chaînes légères de la myosine cardiaque, que ce soit l'action du D.T.N.B. (\*) ou un traitement alcalin [8]. La dissociation des chaînes légères de la myosine cardiaque est habituellement effectuée par l'urée 4 M [9] et la séparation des chaînes ( $L_{27}$  et  $L_{18}$ ) est réalisée par chromatographie d'échange d'ions, mais avec de faibles rendements [10].

Dans cette note, nous présentons un mode opératoire permettant de séparer en *une seule étape* les chaînes lourdes de chacune des chaînes légères de la myosine cardiaque de Porc. Par une technique simple d'électrophorèse préparative sur gel de polyacrylamide en présence d'urée 8 M, les quantités de chaînes légères ( $L_{27}$  et  $L_{18}$ ) isolées, sont suffisantes pour permettre de réaliser des études structurales. Nous avons pu ainsi démon-

(\*) Avec la collaboration technique d'Odile MOREAU.

Ce travail est réalisé dans le cadre du L.A. 040-268 du CNRS, Directeur : Professeur Gérard Biserte ◇, Institut de Recherches sur le Cancer de Lille et Unité 124 INSERM, B.P. n°3567, 59020 Lille Cédex.

◇ A qui toute correspondance doit être adressée.

(\*) D.T.N.B. : acide 5,5'-Dithionitrobenzoïque.

trer une certaine ressemblance de structure entre les chaînes  $L_{27}$  de la myosine cardiaque de Bœuf

[11] et de Porc, par l'étude des peptides obtenus après action du bromure de cyanogène.

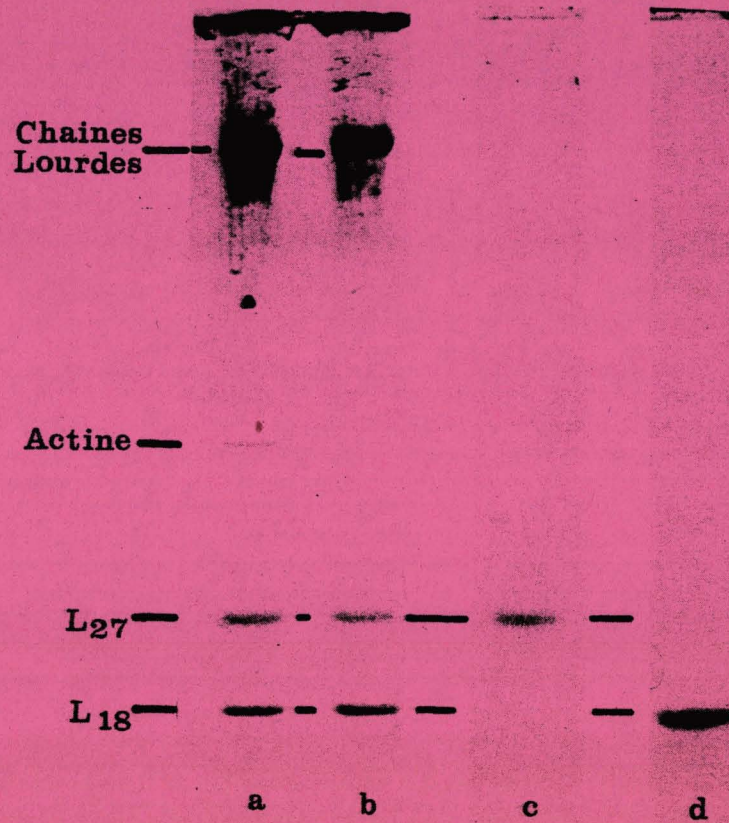


FIG. 1. — *Electrophorèse en gel gradient d'acrylamide en présence de SDS.*  
 (a) Myosine cardiaque de Porc obtenue après l'action de l'ATP.  
 (b) Myosine cardiaque de Porc obtenue après relargage par le sulfate d'ammonium (38-45 p. cent).  
 (c) Chaîne légère  $L_{27}$ .  
 (d) Chaîne légère  $L_{18}$ .

**Matériels et Méthodes.**

*Préparation de la myosine cardiaque de Porc.*

La myosine cardiaque de Porc est préparée et purifiée selon le protocole décrit par Léger et coll. [10], mais nous avons apporté les modifications suivantes :

— L'action du tampon phosphate de potassium 0,015 M de pH 6,8 ; KCl 0,3 M ;  $K_2P_2O_7$  0,01 M ;  $MgCl_2$  0,001 M ; mercapto-2-éthanol 0,01 M [12] est réduite à un temps de 7 minutes. Ceci limite, en effet, l'extraction des protéines autres que la myosine.

— Sur l'extrait brut de myosine dissous dans un tampon imidazole-HCl 0,02 M de pH 6,8 ; KCl 0,3 M ;  $MgCl_2$  0,005 M ; mercapto-2-éthanol 0,01 M [13], nous laissons agir le sel disodique de l'adénosine-5'-triphosphate ( $Na_2$ -ATP) à une concentration finale 0,005 M pendant au moins 20 minutes en maintenant le pH supérieur à 6,8. Cette réaction, qui permet une dissociation plus complète du complexe actomyosinique, est suivie d'une centrifugation à 105.000 g pendant 2 heures. Cette étape permet de mieux éliminer l'actine et les contaminants du filament fin (fig. 1a).

— La fraction recueillie par relargage entre 38 et 45 p. cent de saturation par le sulfate d'ammonium de la myosine en solution dans le KCl 0,3 M ;  $K_2P_2O_7$  0,02 M et le mercapto-2-éthanol 0,01 M, est alors exemptée de tout contaminant et principalement de nucléotides (fig. 1b).

La préparation, dissoute dans un tampon Tris-HCl 0,05 M de pH 7,5 ; KCl 0,5 M ; mercapto-2-éthanol 0,01 M, est ensuite débarrassée du sulfate d'ammonium par une dialyse d'une nuit contre 20 volumes de ce même tampon. La myosine, précipitée par addition de 10 volumes d'eau froide est alors centrifugée à 10.000 g pendant 10 minutes.

*Préparation des chaînes légères par électrophorèse préparative.*

La séparation des chaînes légères par électrophorèse préparative est effectuée sur 2 g de myosine cardiaque de Porc préalablement dissociée dans 200 ml d'une solution d'urée 8 M contenant du mercapto-2-éthanol à 1 p. cent (v/v), pendant 16 heures à température ambiante. L'appareillage d'électrophorèse employé est celui décrit par Kerckaert [14], auquel nous avons apporté les modifications suivantes :

— un système de 8 plaques (200 × 160 × 6 cm) ;

— un gel d'acrylamide en gradient discontinu en présence d'urée 8 M polymérisé selon les conditions de Perrie et Perry [15] (11 cm de gel à 20 p. cent et 5 cm à 15 p. cent de réticulation pour les gels de séparation de pH 8,3 ; 3 cm de gel de concentration à 2,5 p. cent de réticulation et de pH 6,7) ;

— une migration de 72 heures sous 50 mA, 35 V par plaque, dans un tampon Tris-glycine 0,025 M de pH 8,3 ;

— une système de régulation de température des tampons à 20°C ;

— une coloration et une fixation des bandes protéiques par l'Amido-schwarz à 1 p. cent dans un mélange acide acétique/éthanol/eau (1:5:5) pendant 10 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'éluat des protéines est réalisée par une agitation de 20 minutes

à température ambiante dans un tampon Tris-HCl 0,025 M/urée 4 M, suivie d'une centrifugation à 10.000 g pendant 15 minutes. Les extractions sont ar-

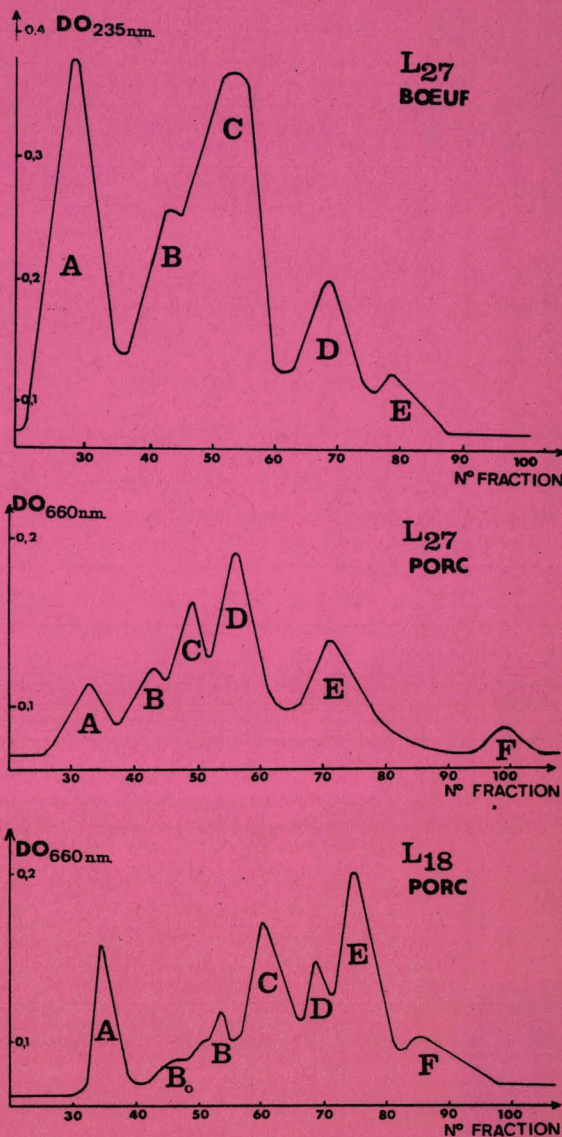


FIG. 2. — Gel filtration sur colonne de Sephadex G 50 des hydrolysats par le CNBr de :

- (a) la chaîne légère  $L_{27}$  de la myosine cardiaque de Bœuf d'après Weeds [11] ;
- (b) la chaîne légère  $L_{27}$  de la myosine cardiaque de Porc ;
- (c) la chaîne légère  $L_{18}$  de la myosine cardiaque de Porc.

rêtées quand la densité optique à 280 nm de l'éluat est voisine de zéro. L'éluat dialysé est ensuite lyophilisé.

La pureté des chaînes légères ainsi isolées est confirmée par électrophorèse analytique en gel d'acrylamide en présence de SDS (\*) (fig. 1 c et d).

#### Mesure de la concentration en protéines.

La concentration en myosine est mesurée soit par la méthode du biuret [16], soit par spectrophotométrie en utilisant comme valeur du coefficient d'extinction molaire  $E_{280}^{1\%} = 5,60$  [6], car pour toutes nos préparations, le rapport des densités optiques à 280 nm et à 260 nm est toujours supérieur à 1,5. Les valeurs de concentration en protéines obtenues par ces deux méthodes sont alors comparables.

#### Electrophorèse analytique sur gel d'acrylamide en présence de SDS.

L'électrophorèse sur gel en gradient d'acrylamide (6 à 20 p. cent) et en présence de SDS est faite sur plaque (150 × 150 × 1 mm) selon la technique de Laemmli [17]. Les échantillons sont préalablement traités par une solution de SDS à 5 p. cent et de mercapto-2-éthanol 10 p. cent pendant 3 minutes à 100°C.

CNBr est ensuite accomplie à 30°C pendant 6 heures selon la technique décrite par Han et coll. [19].

#### Fractionnement des hydrolysats sur Sephadex G 50.

Les hydrolysats de chaînes légères sont fractionnés sur une colonne de Sephadex G 50 de 150 × 2,5 cm (à un débit de 25 ml/heure), équilibrée dans un tampon Tris-HCl 0,05 M de pH 9,5 ; propionate de sodium 1 M. Des fractions de 5 ml sont recueillies sur collecteur et le profil d'éluion est établi à l'aide de la réaction de Lowry (fig. 2). Les fractions d'un même pic d'éluion sont regroupées, lyophilisées, dessalées sur une colonne de Sephadex G 10 (40 × 2,5 cm) équilibrée en solution ammoniacale 0,1 M et à nouveau lyophilisées.

#### Composition en acides aminés.

La composition en acides aminés est établie après hydrolyse totale 24 et 72 heures en tube scellé (HCl 5,6 N à 110°C en présence de 2 gouttes d'une solution aqueuse de phénol à 1 p. cent (p/v)). L'analyse quantitative est effectuée sur un autoanalyseur Jeolco 5 AH. Le tryptophane est analysé directement par addi-

TABLEAU I.  
Composition en acides aminés des chaînes légères de myosine.

	a (*)	b (9)	c (11)	d (*)	e (23, 24)
Asp	18	20	18	18	23
Thr	10	7	11	7	10
Ser	6	8	5	10	5
Glu	28	29	28	32	23
Pro	14	13	17	4	6
Gly	13	12	14	12	13
Ala	17	23	18	17	14
Cy/2	1	1	3	1	2
Val	8	11	9	8	9
Met	7	6	7	7	6
Ileu	6	9	7	7	10
Leu	13	14	14	15	9
Tyr	3	3	3	3	2
Phe	8	8	10	4	12
His	3	2	3	1	1
Lys	15	20	20	14	16
Arg	6	4	5	6	6
Trp	0	0	0	0	1

a  $L_{27}$  de la myosine de muscle cardiaque de Porc.

b  $L_{26}$  de la myosine de muscle squelettique de Lapin.

c  $L_{27}$  de la myosine de muscle cardiaque de Bœuf.

d  $L_{18}$  de la myosine de muscle cardiaque de Porc.

e  $L_{18}$  de la myosine de muscle squelettique de Lapin.

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

#### S-aminoéthylation et hydrolyse par le CNBr des chaînes légères.

Pour protéger les résidus de cystéine, les chaînes légères sont soumises à l'action de l'éthylène-imine à pH 8,6 (Easley et Putman, [18]). L'hydrolyse par le

tion de 0,2 p. cent de tryptamine comme agent protecteur selon la technique décrite par Liu et Chang [20].

#### Détermination des acides aminés en position N-terminale.

Les extrémités N-terminales sont déterminées par la méthode des dansyl-amino-acides en utilisant la technique de Gros et Labouesse [21].

(\*) SDS = sodium dodecyl sulfate.



Résultats.

*Isolement des chaînes légères de la myosine cardiaque de Porc.*

L'étude de la structure primaire d'une protéine exige l'isolement par une technique simple d'une quantité relativement importante de cette protéine, dans un état de pureté très élevé. Pour séparer les chaînes légères de la myosine cardiaque, de nombreux auteurs effectuent habituellement une dissociation chaînes lourdes-chaînes légères, suivie d'une chromatographie d'échange d'ions [3, 9, 12]. Le rendement de cette séparation, en général faible [4, 22], conduit à environ 9 mg de l'une des chaînes légères par gramme de myosine cardiaque de Porc. La technique d'électrophorèse préparative sur gel d'acrylamide que nous avons décrite permet au contraire une séparation quantitative des chaînes L<sub>27</sub> (fig. 1c) et L<sub>18</sub> (fig. 1d)

Les compositions en acides aminés des chaînes légères de la myosine cardiaque de Porc ainsi isolées, ont donc pu être établies (tableau I). D'autre part, nous n'avons pas identifié de dansyl amino-acide : ces chaînes légères possèdent en position N-terminale un acide aminé N-bloqué comme les chaînes légères de la myosine d'autres muscles dont la structure a déjà été établie (les chaînes L<sub>25</sub>, L<sub>16</sub> et L<sub>18</sub> de la myosine de muscle squelettique de Lapin ; la chaîne L<sub>27</sub> de la myosine cardiaque de Bœuf [9, 12, 23]).

*Etude des fractionnements des hydrolysats par le CNBr de L<sub>27</sub> et L<sub>18</sub>.*

Le fractionnement des hydrolysats de chaînes légères (chaîne L<sub>25</sub> de la myosine de muscle squelettique de Lapin et chaîne L<sub>27</sub> de la myosine cardiaque de Bœuf) après action du CNBr est classiquement réalisé sur colonne de Sephadex G 50 [9, 12]. Cependant, les différentes fractions obtenues,

TABLEAU II.  
Composition en acides aminés et extrémité N-terminale de la fraction A.

	(a) (*)	(b) (11)	(c) (9)	(d) (*)	(e) (24)
Asp	3	3	3	6	5
Thr	1	2	0	2	4
Ser	1	2	2	3	1
Glu	9	9	7	14	10
Pro	12	10	10	0	2
Gly	1	1	0	1	5
Ala	11	8	13	7	2
Cy/2	0	1	0	1	1
Val	1	1	1	2	2
Met	(1)	(1)	(1)	(1)	(1)
Ileu	3	2	3	2	3
Leu	1	1	1	6	5
Tyr	0	0	0	1	0
Phe	1	3	1	1	4
His	0	0	0	0	0
Lys	9	8	9	5	8
Arg	0	1	0	2	1
Trp	0	0	0	0	0
Acide aminé en position N-terminale	N-bloqué	N-bloqué	N-bloqué	Phe	Phe

- (a) de la chaîne L<sub>27</sub> de la myosine du muscle cardiaque de Porc.
- (b) de la chaîne L<sub>27</sub> de la myosine du muscle cardiaque de Bœuf.
- (c) de la chaîne L<sub>25</sub> de la myosine du muscle squelettique de Lapin.
- (d) de la chaîne L<sub>25</sub> de la myosine du muscle cardiaque de Porc.
- (e) de la chaîne L<sub>18</sub> de la myosine du muscle squelettique de Lapin.

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

de la myosine cardiaque de Porc (80 à 100 mg de l'ensemble des chaînes légères, isolées séparément, par gramme de myosine).

nues, sauf la fraction A correspondant au peptide de plus haut poids moléculaire, doivent être repurifiées. La chaîne légère L<sub>27</sub> de la myosine cardia-

que de Porc a donc été soumise à l'action du CNBr. La méthode de dansylation a permis alors d'identifier dans l'hydrolysate cinq acides aminés en position N-terminale (acide aspartique, glycine, alanine, leucine et lysine) et le fractionnement sur colonne de Sephadex G 50 permet l'isolement de six fractions (fig. 2b). En particulier, la fraction A qui correspond au peptide de plus haut poids moléculaire a été isolée et analysée : ce peptide n'a pas d'extrémité N-terminale dansylable et la composition en acides aminés est caractérisée par un taux de proline, d'acide glutamique, d'alanine et de lysine élevé tandis que celui de glycine est faible (tableau II).

Des comparaisons d'ordre structural sur les chaînes  $L_{25}$  de la myosine de muscle squelettique de Lapin,  $L_{27}$  de la myosine cardiaque de Bœuf et  $L_{27}$  de la myosine cardiaque de Porc ont été faites. C'est ainsi que leur composition en acides aminés (tableau I), leur fractionnement sur colonne de Sephadex G 50 de leur hydrolysate obtenu après action du CNBr (figs. 2a et 2b), l'analyse de la composition en acides aminés du peptide de plus haut poids moléculaire alors obtenu et la dansylation ont été réalisés (tableau II).

Une étude analogue est réalisée sur la chaîne  $L_{18}$  de la myosine cardiaque de Porc. Après hydrolyse par le CNBr, le fractionnement de l'hydrolysate met en évidence 7 fragments (fig. 2c) et les extrémités N-terminales suivantes : acide aspartique, glycine, leucine, phénylalanine et lysine). De plus, la fraction A de la chaîne  $L_{18}$  de la myosine cardiaque de Porc possède comme son homologue  $L_{18}$  de la myosine de muscle squelettique de Lapin [23], la phénylalanine en position N-terminale mais une composition en acides aminés différente (tableau II) : le taux de proline est nul, le taux d'alanine et d'acide glutamique est plus élevé tandis que celui de glyco-colle, de phénylalanine et de lysine est plus faible.

## Discussion et Conclusion.

L'électrophorèse en gel discontinu d'acrylamide en présence d'urée 8 M à pH alcalin présente de nombreux avantages par rapport à la technique qui se fait en présence de SDS : (i) Les chaînes lourdes de la myosine ne pénétrant pas dans le gel urée permettent de faire un dépôt plus important de myosine dissociée par l'urée 8 M/mercapto-2-éthanol ; (ii) l'utilisation du gel discontinu d'acrylamide (2,5 à 20 p. cent) empêche la diffu-

sion, améliore la séparation des bandes protéiques de poids moléculaire voisin et facilite la manipulation des gels (iii) à pH alcalin (tampon Tris-glycine de pH 8,3), cette méthode permet la séparation des deux chaînes légères de la myosine cardiaque de Porc ( $L_{27}$  et  $L_{18}$ ) et des chaînes lourdes en une seule étape.

Chacune des bandes protéiques est éluée par le tampon Tris-HCl 0,025 M de pH 8,0 ; urée 4 M à partir des bandes localisées de façon parfaite après coloration et fixation par l'Amido-schwarz. Nous avons utilisé une solution d'éluion en urée 4 M à cause de la réversibilité de son action dissociante et parce que l'élimination de l'urée est relativement facile par dialyse. En outre, le pouvoir dissociant élevé de l'urée permet une éluion plus complète des protéines contenues dans les gels (éluion suivie par lecture de la densité optique à 280 nm). La présence du colorant sert également d'indicateur d'éluion. Notre expérience nous a montré que l'Amido-schwarz ne gêne pas pour les études structurales ultérieures (dansylation ou action du CNBr). De plus, ce colorant est éliminé lors de l'étape de fractionnement sur Sephadex G 50 car il s'adsorbe de façon non spécifique sur le gel de Sephadex.

Cette technique d'électrophorèse préparative sur gel d'acrylamide est applicable à toutes les protéines de différents poids moléculaire [15]. L'utilisation du gel en milieu urée permet de plus la séparation de protéines de même poids moléculaire, mais de point isoélectrique différent. C'est ainsi que nous pouvons isoler les deux formes de la chaîne  $L_{18}$  de la myosine cardiaque de Porc (chaîne phosphorylée et chaîne non phosphorylée), ainsi que les chaînes légères dites EDTA-chaîne légère et SH-chaîne légère de la myosine de muscle lisse de l'« A.B.R.M. (\*) » de moule *Mytilus dulis* de poids moléculaire de 18.000 daltons (résultats non publiés).

L'électrophorèse analytique en gel d'acrylamide en présence de SDS est certes un excellent critère d'homogénéité des chaînes légères isolées. L'absence de contamination d'une chaîne légère par l'autre est aussi démontrée par l'analyse des fractions A de  $L_{27}$  et de  $L_{18}$  de la myosine cardiaque de Porc, dont le poids moléculaire est voisin. En effet, les différences au niveau de ces deux fractions homogènes sont extrêmement significatives entre leur extrémité N-terminale (l'une possède un acide aminé N-bloqué, l'autre la phénylalanine) et

(\*) Anterior Byssus Retractor Muscle.



leur composition en acides aminés (taux de proline très élevé pour l'une, nul pour l'autre).

A la suite de notre expérimentation, nous pouvons dire que le peptide A de la chaîne L<sub>27</sub> de la myosine cardiaque de Porc a une composition en acides aminés comparable à celle du peptide A de la chaîne L<sub>25</sub> de la myosine de muscle squelettique de Lapin et de la chaîne L<sub>27</sub> de la myosine cardiaque de Bœuf (tableau II). Cette ressemblance de structure traduit bien le rôle biologique précis des chaînes légères de la myosine (protection du site actif, régulation de la fixation à l'actine, etc...), rôle dû à la présence d'enchaînement en acides aminés particulier, qui est une condition essentielle pour l'existence d'activités physiologiques spécialisées.

#### Remerciements.

Ce travail a été réalisé dans le cadre du contrat INSERM CRL 75.5.090.3 et du contrat DGRST n° 77.7.A031 (Resp. Dr K. K. Han).

Les auteurs expriment tous leurs remerciements à Monsieur J. P. Kerckaert pour ses conseils ainsi qu'à Monsieur le Professeur G. Biserte pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

#### BIBLIOGRAPHIE.

- Gershman, L. C., Stracher, A. & Dreizen, P. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 2726-2736.
- Gazith, J., Himmelfarb, S. & Harrington, W. F. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 15-22.
- Weeds, A. G. & Lowey, S. (1971) *J. Mol. Biol.*, **61**, 701-725.
- Tetaert, D., Moreau, O., Han, K. K., Hildebrand, H. F. & Biserte, G. (1977) *Biochimie*, **59**, 377-339.
- Frearson, N. & Perry, S. V. (1975) *Biochem. J.*, **151**, 99-107.
- Shiverick, K. T., Thomas, L. L. & Alpert, N. R. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **393**, 124-133.
- Wikman-Coffelt, J., Zelis, R., Fenner, C. & Mason, D. J. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **51**, 1097-1104.
- Kendrick-Jones, J., Szentiralyi, E. M. & Szent-Györgyi, A. G. (1976) *J. Mol. Biol.*, **104**, 747-775.
- Frank, G. & Weeds, A. G. (1974) *Eur. J. Biochem.*, **44**, 317-334.
- Leger, J. J., Berson, G., Delcayre, C., Klotz, C., Schwartz, K., Leger, J., Stephens, M. & Swynghedauw, B. (1975) *Biochimie*, **57**, 1249-1273.
- Weeds, A. G. (1975) *FEBS Letters*, **59**, 203-208.
- Hasselbach, W. & Schneider, G. (1951) *Biochem. Z.*, **321**, 462-475.
- Ebashi, S. (1976) *J. Biochem.*, **79**, 229-231.
- Kerckaert, J. P. (1978) *Analytical Biochem.*, **84**, 354-360.
- Perrie, W. T. & Perry, S. V. (1970) *Biochem. J.*, **119**, 31-38.
- Goa, J. (1953) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **5**, 218-222.
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature*, **227**, 680-681.
- Easley, C. W. & Putman, F. W. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 3671-3678.
- Han, K. K., Tetaert, D., Moschetto, Y., Dautrevaux, M. & Kopeyan, C. (1972) *Eur. J. Biochem.*, **27**, 585-592.
- Liu, T. Y. & Chang, Y. R. (1969) *J. Biol. Chem.*, **246**, 2842-2846.
- Gros, G. & Labouesse, B. (1969) *Eur. J. Biochem.*, **7**, 463-470.
- Leger, J. J. & Elzinga, M. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 1390-1396.
- Collins, J. H. (1976) *Nature*, **259**, 699-700.
- Matsuda, G., Matsa, T., Suzuyama, Y., Setoguchi, M. & Umegane, T. (1977) *J. Biochem.*, **81**, 809-811.

# CHAPITRE III

ETUDE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE  
DE LA CHAÎNE LÉGÈRE L<sub>27</sub>  
DE LA MYOSINE VENTRICULAIRE  
DE COEUR DE PORC

## A - INTRODUCTION

Au tout début de notre étude de l'ALC-L<sub>27</sub> de la myosine ventriculaire gauche de coeur de Porc, seules les structures primaires de l'ALC-L<sub>25</sub> et l'ALC-L<sub>16</sub> de la myosine de muscle squelettique Blanc de Lapin ( Frank et Weeds 1974 [26] ) et la structure partielle de l'ALC-L<sub>27</sub> de la myosine de coeur de Boeuf ( Weeds 1975 [130] ) étaient connues. Depuis d'autres structures primaires de chaînes légères de myosine ont été déterminées :

- RLC-L<sub>18</sub> de muscle squelettique Blanc de Lapin et de Poulet ( Matsuda et al 1977a [84] ; Matsuda et al 1977b [85] ).

- ALC-L<sub>27</sub> de muscle cardiaque de Poulet ( Maita et al 1980 [77] ).

- ALC-L<sub>25</sub> de muscle squelettique Blanc de Poulet ( Umegame et al 1982 [121] ).

- ALC-L<sub>16</sub> de muscle squelettique Blanc de Poulet ( Maita et al 1981b [79] ).

- RLC-L<sub>20</sub> de muscle lisse de gésier de Poulet ( Maita et al 1981a [78] ).

- RLC-L<sub>18</sub> de muscle cardiaque de Poulet et ALC-L<sub>17</sub> de muscle lisse de gésier de Poulet ( Matsuda et al 1981 [86] ).

- RLC de muscles striés adducteur d'invertébré ( Coquilles St Jacques ) ( Maita et al 1984 [80] ).

Ces études de structure primaire ont été réalisées sur des modèles éloignés des Mammifères supérieurs. Ceci s'explique facilement par les difficultés techniques considérables rencontrées au cours des études des chaînes légères ALC ou RLC des myosines cardiaques bovine et humaine, où seules des séquences primaires très partielles ont été proposées ( Weeds 1975 [130]; Léger et Elzinga 1977 [72] ). Ces difficultés proviennent essentiellement de la structure très particulière de la région N-terminale N-bloquée et riche en résidus de proline et alanine.

D'autre part, la comparaison des structures primaires d'ALC de myosines à celles de protéines contractiles liant le calcium ( troponine C et parvalbumine ) a permis de montrer certaines analogies de séquence ( Weeds et McLachland 1976 [133] ; Matsuda et al 1981 [86] ; Tetaert et al 1982 [117] ) suggérant que les chaînes légères dites alcalines de la myosine peuvent adopter une structure tridimensionnelle voisines ou comparables à celle des calcioprotéines.

Notre étude de la structure primaire de l'ALC-L<sub>27</sub> de la myosine cardiaque de Porc a donc été entreprise afin d'obtenir davantage d'informations concernant :

- \* la structure d'ALC de Mammifères supérieurs,
- \* le rôle des ALC,
- \* leur capacité à fixer le calcium,
- \* enfin le rôle et les caractéristiques de leur région N-terminale.

## B - STRATEGIE GENERALE

En chimie des protéines, la spécificité d'action des agents chimiques et des endoprotéases est l'un des points primordiaux. Pour aborder l'étude de la structure primaire d'une protéine, les deux types d'hydrolyse les plus couramment utilisés sont :

- l'hydrolyse par le bromure de cyanogène ( BrCN ) en raison de sa grande spécificité vis à vis des liaisons méthionyl et qui permet généralement l'obtention de fragments polypeptidiques importants du fait du nombre limité de ce résidu amino-acide dans les protéines.

- l'hydrolyse par la trypsine, très spécifique des liaisons lysyl et arginyl, qui conduit souvent à la formation de plusieurs peptides de petite taille souvent complémentaires du fait des rendements variables de clivage enzymatique d'un site à l'autre.

En fonction des résultats obtenus, des hydrolyses combinant l'action d'autres endopeptidases et de coupures par agents chimiques sont utilisées afin d'effectuer les recouvrements de séquence toujours indispensables.

La séparation des peptides est l'autre point essentiel. Nous disposons à l'heure actuelle d'un grand nombre de possibilités : la chromatographie liquide de gel filtration, d'échange ionique ou d'affinité etc...; l'électrophorèse sur différents supports. Plus récemment, la chromatographie liquide haute pression ou haute performance ( HPLC ) est apparu comme l'une des méthodes des plus efficaces pour séparer les hydrolysats peptidiques et pour obtenir quantitativement les peptides dans un état de pureté très élevé. De nombreux plans de fractionnements des hydrolysats de l'ALC-L<sub>27</sub> ont été utilisés pour purifier les peptides de l'ALC-L<sub>27</sub>, auxquels nous pourrions nous reporter ( Fig. 34 ). ( cf, Page 103 ).

## I - HYDROLYSES ENZYMATIQUES DE L'ALC-L<sub>27</sub> :

Des hydrolyses de la chaîne légère ALC-L<sub>27</sub> de la myosine ventriculaire gauche de coeur de Porc ont été effectuées avec différents enzymes en faisant varier différents paramètres comme la température, le pH ou le rapport Enzyme/Substrat. Les principales conditions utilisées ont été regroupées dans le Tableau III. La vitesse d'hydrolyse est suivie, en analysant par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS, des aliquots prélevés à des temps variant de 2 à 150 minutes ( Fig. 18 ). Cette analyse permet en outre d'apprécier le nombre et la taille moléculaire des fragments libérés tout en consommant le minimum de matériel protéique. Le point isoélectrique des fragments s'ils s'avèrent peu nombreux peut être précisé par approche électrophorétique en isoélectrofocalisation.

L'étude des cinétiques d'action des endopeptidases sur la chaîne légère ALC-L<sub>27</sub> nous a surtout permis de montrer que de nombreuses endopeptidases sont sans action sur la chaîne légère même si leur spécificité est très large, par exemple la pronase qui hydrolyse de nombreuses liaisons peptidiques ou encore la pepsine qui hydrolyse les liaisons peptidiques au niveau des résidus hydrophobes nombreux dans les protéines ( Tableau III ). Au contraire, la collagénase, plus spécifique du collagène, hydrolyse l'ALC-L<sub>27</sub> et donne toute une série de peptides de taille variable, à priori utilisables sur séquenceur automatique mais peut être difficiles à purifier en fonction de leur nombre élevé ( Fig. 18 ). La chymotrypsine hydrolyse l'ALC-L<sub>27</sub> très rapidement et très complètement même à 4°C et à pH 7,0 qui n'est pas son pH optimum d'action. L'analyse électrophorétique montre pour l'essentiel l'apparition d'une bande peptidique fortement colorée par le bleu Commassie, de poids moléculaire apparent compris entre 14.000 et 18.000 daltons, mais dont l'hétérogénéité ne peut être appréciée totalement sur le gel en fonction des conditions techniques retenues qui sont limitées pour analyser en dessous de 15.000 à 20.000 daltons de poids moléculaire. Enfin, l'ALC-L<sub>27</sub> vis à vis de l'action de la trypsine est plus résistante puisque dans les conditions " normales " ( c'est à dire à pH 8,75 en tampon bicarbonate 50mM, à 37°C et avec un rapport E/S de 1% ), la libération de " petits peptides " se fait très lentement ( plus de 4 heures ). D'ailleurs même si nous augmentons le rapport Enzyme/Substrat à 8%, la libération de petits fragments ne se produit qu'incomplètement en 20 minutes et surtout se forme alors un agrégat

ENZYME	Trypsine	Chymo- trypsin	SAV <sub>8</sub>	GSMS	Elastase	Pepsine	Pronase	Thermo- lysine	Thrombine	Protéase du Pancréas	Papaïne	Collagénase
RAPPORT ENZYME/ SUBSTRAT	4% 8%	0,05%-8%	2-8%	2%	1% 8%	1%	4% 1%	2% 8%	105 U 310 U	1%	2% 4%	1% 0,5% 0,5%
TEMPERATURE	38°C	37° à 4°C	37°C	37°C	4°C 25°C	37°C	40°C	37°C	37°C	37°C	37°C	37°C 4°C
pH	8,75	8,75 à 7,0	7,8	8,0	8,0	2,0	7,4	8,0	7,9	8,78	7,1	7,4 8,0
DEBUT D'HYDROLYSE EN MINUTES	20 10	2	900	30	20	720	30	720	20	720	720	2

TABLEAU III : CINETIQUES D'ACTION PAR LES ENDOPEPTIDASES SUR L'ALC-L<sub>27</sub> .

Différentes conditions d'hydrolyse ont été testées en changeant le rapport Enzyme/Substrat (E/S) ; la température et le pH pour différentes endopeptidases. Le début de l'hydrolyse a été contrôlé par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS à pH 8,4 ( pourcentage de réticulation en acrylamide de 18 à 30% ).

SAV<sub>8</sub> = Endopeptidase extraite de Staphylococcus aureus V<sub>8</sub>, GSMS = Endopeptidase de la glande sous-maxillaire de Souris.



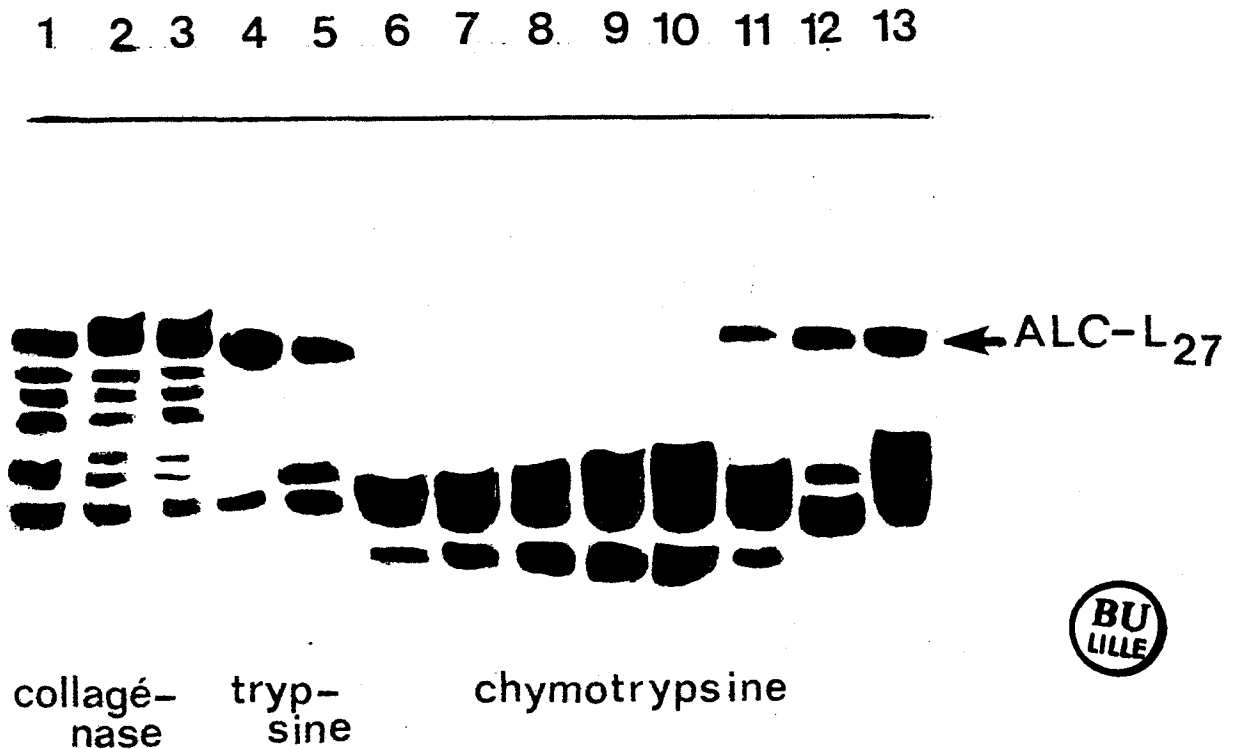


FIGURE 18 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'ANALYSE  
PAR ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE EN PRESENCE  
DE SDS ( Gradient de réticulation 18 à 30% ) DES CINETIQUES  
D'HYDROLYSE DE L'ALC-L<sub>27</sub> PAR DES ENDOPEPTIDASES DANS DIFFERENTES  
CONDITIONS.

- 1 - 3 : Par la collagénase : 1) E/S = 1% à 37°C au temps t=2min. 2) E/S = 0,5%  
à 37°C au temps t=2 min. ; 3) E/S = 0,5% à 4°C pH 8,0 au temps t= 2 min.  
4 - 5 : Par la trypsin : 4) E/S 4% au temps 20 min. 5) E/S = 8% au temps 240 min.  
6 - 13 : Par la chymotrypsine : 6 à 10) E/S = 8% à 37°C respectivement aux temps  
2 min., 4 min. , 10 min. , 20 min. , 30 min. 11) E/S = 0,05% à 37°C  
au temps 2 min. 12) E/S = 0,05% à 37°C pH 7,0 au temps 2 min.  
13). E/S = 0,05% à 4°C pH 7,0 au temps 2 min.

insoluble devenant de plus en plus dense au cours de l'hydrolyse.

Au total, pour obtenir des fragments peptidiques de taille plus importante et éviter la formation d'insoluble lors de l'hydrolyse trypsique, l'ALC-L<sub>27</sub> a été préalablement citraconylée. Le traitement par citraconylation bloque les groupements  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> des résidus de lysine et limite l'action de la trypsine aux seuls résidus d'arginine moins nombreux dans la molécule. Cette réaction est réversible et les  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> peuvent être en grande partie régénérées en plaçant l'hydrolysate dans l'acide formique 5%. Cette modification chimique a été très utile et a permis en particulier d'effectuer des recouvrements de séquence.

## II - LES METHODES CHIMIQUES :

### 1°) ACTION DU BROMURE DE CYANOGENE :

La chaîne légère ALC-L<sub>27</sub> contenant sept résidus de méthionine, nous l'avons soumise à l'action du bromure de cyanogène ( BrCN ) qui doit en théorie permettre la libération de huit fragments. L'ALC-L<sub>27</sub>, préalablement réduite et alkylée ( par l'éthylène-imine ou l'iodoacétamide ) est hydrolysée selon les conditions décrites par Han et al 1972 [38]. L'analyse par électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS permet de vérifier qu'après 24 heures d'action, l'hydrolyse de l'ALC-L<sub>27</sub> est totale. Comme pour le traitement trypsique, on constate la formation d'un insoluble devenant de plus en plus dense. Des fragments de nature très hydrophobe sont donc apparus et leur nature insoluble limite d'autant leur utilisation à des fins de séquence, d'où la nécessité de recherche d'autres agents chimiques.

### 2°) ACTION DE L'ACIDE 2-NITRO 5-THIOCYANATOBENZOIQUE :

L'acide 2-nitro 5-thiocyanatobenzoïque ( NTCBA ) hydrolyse de façon très spécifique les liaisons peptidiques intéressant la fonction NH<sub>2</sub> des résidus de cystéine. Au cours de la réaction se forme un résidu d'iminothiazolidine à l'extrémité N-terminale des peptides par un mécanisme de cyclisation ( Fig. 19 ). Les peptides libérés ne sont toutefois pas séquençables car N-bloqués, les réactions de dansylation ou de dégradation récurrente de Edman sont impossibles. L'hydrolyse de l'ALC-L<sub>27</sub> par le NTCBA permet la libération de trois peptides de taille différente ( 101; 77 et 14 résidus ) qui ont été séparés par chromatographie de gel filtration sur colonne de Séphadex G 50. Sur ces peptides, des essais d'élimination du résidu d'iminothiazoline ont été



NTCBA ( C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>S )

H<sup>+</sup>

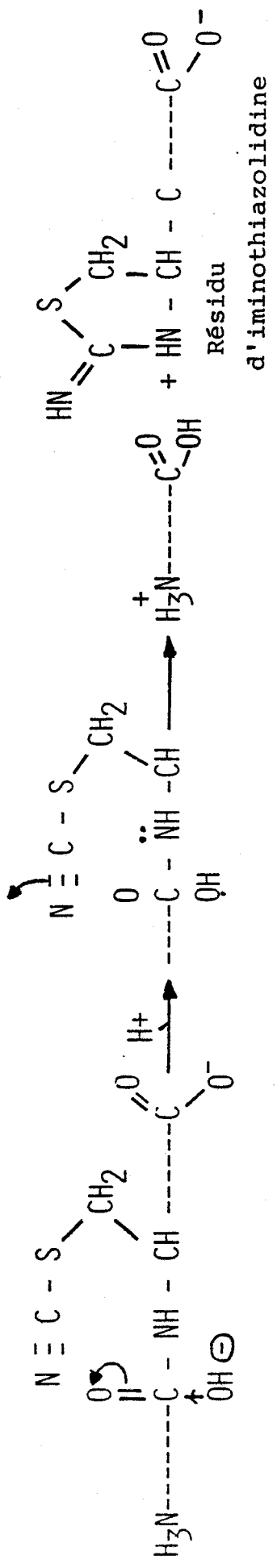


FIGURE 19 : Mécanisme d'action de l'acide 2-nitro 5-thiocyanatobenzoïque ( NTCBA )  
d'après Jacobson et al. (1973) [52]



effectués par hydrogénation catalytique en présence de nickel de Raney. Il est apparu que la réaction d'élimination s'effectue avec des rendements faibles, inférieurs à 10%. Cette impossibilité de retrouver des peptides directement utilisables nous a conduit à des recoups spécifiques : l'obtention de sous-peptides dont l'un demeure N-bloqué étant alors directement utilisable sans fractionnement préalable dans la coupelle du séquenceur. L'hydrolyse par le BrCN a ainsi été réalisé sur le peptide de 77 résidus, mais le plus petit peptide n'a pas pu être retrouvé.

### 3°) ACTION DE LA N-BROMOSUCCINIMIDE ( NBS ) :

La composition en acides aminés de l'ALC-L<sub>27</sub> ne révélant pas de résidu de tryptophane, l'action de la N-bromosuccinimide ( NBS ) a été effectuée dans les conditions décrites par Wilson et Cohen 1963 [137], limitant l'action de la NBS aux liaisons tyrosyl. Deux constats : tout d'abord, au cours de la réaction, un important insoluble est apparu et, d'autre part, l'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de SDS a montré que le clivage protéique était incomplet.

### III - CONCLUSION :

A l'issue de cette étude préliminaire, où nous avons envisagé et testé un grand nombre de coupures enzymatiques et chimiques de la chaîne légère ALC-L<sub>27</sub> de la myosine ventriculaire de coeur de Porc, plusieurs remarques peuvent être formulées :

(i) l'ALC-L<sub>27</sub> doit posséder une configuration toute particulière car nous avons pu noter la formation d'insolubles et d'agrégats par précipitation et réassociation des peptides au cours de l'hydrolyse.

(ii) Peu d'endopeptidases hydrolysent quantitativement l'ALC-L<sub>27</sub> bien que de nombreuses liaisons peptidiques soient susceptibles d'être clivées. On retiendra par exemple, l'action de la trypsine ou de la chymotrypsine.

(iii) Enfin, en fonction de l'hydrophobie des fragments, la séparation et la purification des peptides par les méthodes dites "classiques" de gel filtration ou de chromatographie d'échanges d'ions sur résines se sont avérées délicates tant sur le plan de la qualité de régénération que sur celui du rendement en peptides après élution.

L'apparition de la chromatographie liquide haute performance (HPLC), l'utilisation de solvants capables de dissoudre de larges peptides ( Mahoney et Hermodson 1980 [76] ) et aussi des conditions de

fractionnement faisant intervenir justement le caractère hydrophobe relatif des peptides ont permis enfin une obtention quantitative des peptides des hydrolysats de l'ALC-L<sub>27</sub>. Les deux étapes techniques avant et après HPLC sont présentées. Elles illustrent les difficultés de ce travail.

C - FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS DE L'ALC-L<sub>27</sub> :

I - PAR LES METHODES DITES " CLASSIQUES " :

1°) FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT OBTENU APRES ACTION DU BrCN

α) Par gel filtration :

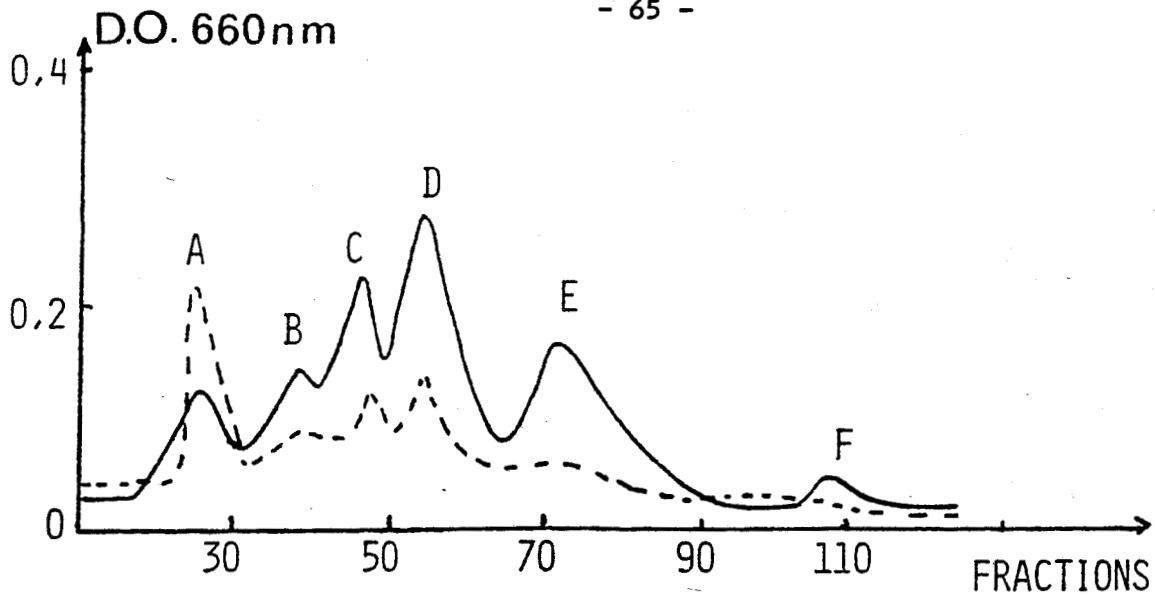
Après action du BrCN, l'hydrolysat de l'ALC-L<sub>27</sub> est peu soluble en milieu acide, aussi différentes conditions de fractionnement par chromatographie de gel filtration à pH basique ont-elles été envisagées et testées :

\* filtration en tampon propionate de sodium 1 M Tris-HCl de pH 9,5 sur colonne de Séphadex G 50 dans les conditions décrites par Weeds 1975 [129]. L'hydrolysat est soluble à 80% mais une étape de dessalage sur colonne de Séphadex G 10 en ammoniacque 0,1 M est ensuite nécessaire.

\* Filtration en tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM de pH 8,8 sur colonne de Séphadex G 50. Le tampon est plus volatil mais l'hydrolysat n'est soluble qu'à 50%.

\* Filtration en tampon bicarbonate d'ammonium 0,1 M de pH 8,8 contenant 10% de 1-propanol sur colonne de Séphadex G 75 et G 50. L'addition de propanol augmente la solubilité de l'hydrolysat ( 75% ).

Cependant, les fractionnements réalisés en présence de bicarbonate d'ammonium ne donnent pas de bonnes séparations et seulement deux à trois fractions très hétérogènes sont alors obtenues. Par contre, par chromatographie sur colonne de Séphadex G 50 en tampon propionate, l'hydrolysat BrCN de l'ALC-L<sub>27</sub> apparaît mieux séparé et livre six fractions ( A à F ) ( Fig. 20 ). Enfin, la citraconylation préalable de l'hydrolysat ( l'anhydride citraconique modifiant réversiblement les groupements  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> des lysines et modifiant donc les charges ) diminue les phénomènes d'agrégation et d'insolubilité ( Fig. 20 ). Notons que la plus homogène et en proportion relative, la fraction A exclue du gel paraît correspondre au matériel protéique de plus faible solubilité.



**FIGURE 20 :** Gels filtration sur colonne de sēphadex G 50 de l'hydrolysat de L<sub>27</sub> obtenu aprēs action du bromure de cyanogène.

(—) partie soluble de l'hydrolysate . (-----) hydrolysate préala-blement citraconylé. Les profils d'élution sont établis à l'aide de la réaction de Lowry.

	(a)	(b)
Asp	3	3
Thr	2	1
Ser	2	1
Glu	11	9
Pro	12	12
Gly	0	1
Ala	14	11
Cy/2	0	0
Val	1	1
Met	(1)	(1)
Ile	2	3
Leu	2	1
Tyr	1	0
Phe	5	1
His	0	0
Lys	9	9
Arg	1	0
<b>TOTAL</b>	<b>66</b>	<b>54</b>



**TABLEAU IV :** Composition en acides aminés de la fraction A  
 (a) aprēs purification par rechromatographie sur colonne de sēphadex G 50 et calculée sur la base de 66 résidus ( Matsuda et al 1981 ) [86]  
 (b) calculée sur la base de 55 résidus selon Weeds 1975 [130]

Notons aussi que l'apparence générale des pics ( B à E ) tend à laisser supposer une grande hétérogénéité justifiant d'autres étapes de purification.

β) Purification des fractions :

Les fractions A à F de l'hydrolysate BrCN de l'ALC-L<sub>27</sub> préalablement citraconylée obtenues par chromatographie de gel filtration sur colonne de Séphadex G 50 en tampon propionate ( Fig. 20 ) ont été dessalées, décitraconylées ( en présence d'acide formique 5% pendant 16 heures ) et caractérisées par l'étude de leur composition en acides aminés et l'identification du résidu amino-acide en position N-terminale ( Tableau IV ).

Seule la fraction A correspondant au peptide de plus haut poids moléculaire et devant correspondre à l'extrémité N-terminale N-bloquée de l'ALC-L<sub>27</sub> est homogène : la composition en acides aminés révèle la présence d'un résidu d'homosérine, un taux élevé en résidus de proline, d'alanine, de lysine, d'acide glutamique ou de glutamine ; l'identification du résidu amino-acide en position N-terminale ( après dansylation ou par dégradation récurrente de Edman ) ne donne aucun résultat ( extrémité N-bloquée ).

Au contraire, les autres fractions sont hétérogènes et plusieurs α-dansyl amino-acides ont été caractérisés pour chaque fraction. Des essais de purification ont donc été réalisés :

\* Par électrophorèse préparative sur papier :

Les fractions E et F correspondant aux peptides de faible poids moléculaire sont séparées par électrophorèse préparative à haut voltage sur papier ou/et par chromatographie préparative sur papier. Après coloration à la ninhydrine diluée ( 3 pour 10.000 ), les bandes sont découpées puis les peptides sont élués par de l'acide acétique à 10%. Malheureusement, les quantités de peptides ainsi récupérées sont très faibles. Les peptides sont le plus souvent contaminés, malgré les précautions prises, par des impuretés provenant de l'eau, de l'acide acétique et surtout du support papier.

\* Par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de Sulfopropyl-Séphadex C 25 :

En utilisant un gradient concave de formiate et de chlorure d'ammonium, les fractions B, C et D sont séparées en plusieurs sous-fractions. Les peptides obtenus ne sont purifiés qu'avec des rendements de l'ordre de 10%.

\* Par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de résine

"Chromobeads P " :

Les peptides de faible poids moléculaire ont été déposés sur colonne de résine d'échange de cations " Chromobeads P ". Ainsi, la fraction E de G 50 donne sept sous-fractions qui réagissent à la ninhydrine dont cinq ne correspondent pas à des fractions peptidiques mais vraisemblablement à des sels. La fraction F donne dans les mêmes conditions trois sous-fractions.

En règle générale, quelque soit le protocole, les différentes sous-fractions sont obtenues avec des rendements très faibles, les peptides ayant tendance à s'agréger à nouveau ou à s'adsorber de façon non spécifique sur les supports utilisés ( papier, résine ).

Cependant, au cours de l'analyse des différentes sous-fractions, il nous a été possible de préparer en quantité suffisante l'une des sous-fractions de la fraction F dont la composition en acides aminés montre la présence d'alanine et de sérine en rapport équimolaire, l'absence d'homosérine, la caractérisation d'un résidu d'alanine en position N-terminale ( DNS-Ala ) qui pourrait désigner Ala-Ser comme séquence ultime de l'ALC-L<sub>27</sub>. Cette séquence possible C-terminale de ce dipeptide a surtout été confirmée ultérieurement par l'étude d'autres peptides.

2°) FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE :

Seule la partie "soluble" de l'hydrolysat trypsique de l'ALC-L<sub>27</sub> a pu être fractionnée en utilisant la chromatographie d'échange d'ions sur colonne de résine "Chromobeads P" dans les conditions de gradient décrit par Han et al 1972 [38]. Le profil d'éluion établi par réaction à la ninhydrine révèle une trentaine de pics ( Fig. 21 ). La qualité du fractionnement, bonne pour l'ensemble, est moins intéressante au début de l'éluion et pour tenter d'améliorer la séparation des premières fractions de multiples modifications du système gradient ont été testées, mais il faut l'admettre sans succès. Ce fait est sans nul doute à rapprocher de l'observation en tête de colonne lors de l'arrivée du tampon formiate de pyridine de pH 2,9, de la formation d'un flocculat demeurant en surface de la résine. Ce flocculat ne pénètre pas la résine et ne disparaît que lors de la régénération de la colonne par la soude 0,2 N. Le matériel n'est plus utilisable en fonction des coupures peptidiques qui se sont sans doute produites.

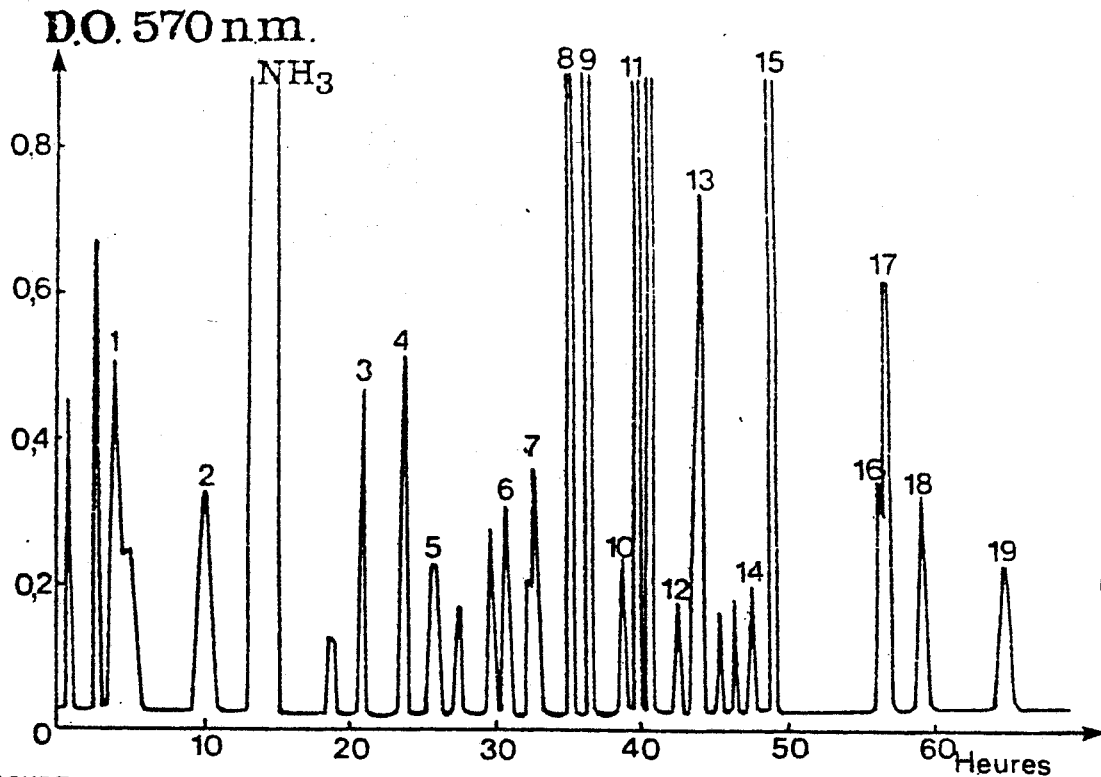


FIGURE 21 : PROFIL D'ELUTION DU FRACTIONNEMENT SUR COLONNE DE RESINE " CHROMOBEADS P " DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE DE L'ALC-L27

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Asx	3,0	1,7	2,2	1,2	1,0	1,0		1,0	1,1	1,1									
Thr		0,4	1,9	1,1	0,9						1,1					1,0			
Ser	1,9	1,5											1,1					1,1	1,1
Clx	3,3	5,2	2,3	3,1	4,8		1,3	0,9				0,8			1,2	1,2		1,2	
Pro		10,0		1,1	1,0			1,2			1,1				2,0		0,8		
Gly	2,2		2,0	1,0													1,2	0,9	
Ala	1,6	9,2		1,9			1,0	4,8	1,0			0,9	1,1				1,1		
Cys/2	0,5																		
Val	0,4		1,0	0,9						1,0							0,9	0,9	
Met	0,6						0,8					Traces	1,0						
Ile	0,7	1,8			0,6								1,0	1,0					0,9
Leu	1,0	0,8	1,2	1,8													1,9	0,8	1,0
Tyr	0,5		0,9																
Phe	0,6	1,6	1,2		2,4					0,8									
His													0,8			0,8		0,8	0,9
Lys	0,7	6,6		0,9	1,0	1,0	1,0	2,0	1,0	1,1	1,0	1,0		1,0	2,0		1,7	1,1	1,0
Arg			1,0										1,2						
TOTAL	19	36	13	13	12	2	4	10	5	4	3	4	5	2	5	9	6	6	4
N-ter	Leu	N.D	Asx	Ala	Asx	Asx	Ala	Ala	Asx	Val	Thr	Ala	His	Ile	Lys	His	Val-Leu	Leu	His
	T <sub>22</sub>	T <sub>1</sub>	T <sub>17</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>6</sub>	T <sub>16</sub>	T <sub>9</sub>	T <sub>14</sub>	T <sub>x</sub>	T <sub>18</sub>	T <sub>8</sub>	T <sub>9</sub>	T <sub>23</sub>	T <sub>5</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>20</sub>	T <sub>12</sub>	T <sub>15</sub>	T <sub>15</sub>

TABLEAU V : COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES ET EXTREMITES N-TERMINALES ( DNS-AA ) DES PEPTIDES TRYPSIQUES PURIFIES A PARTIR DES DIFFERENTES FRACTIONS 1 à 19.

α) Purification des peptides trypsiques :

L'homogénéité des fractions isolées est vérifiée par électrochromatographie sur papier ou encore sur couche mince de cellulose. Les fractions homogènes sont étudiées et caractérisées par leur composition en acides aminés et l'identification de l'acide aminé en position N-terminale ( Tableau V ). Certaines fractions chromatographiques ont nécessité une étape supplémentaire de purification par électrophorèse et/ou chromatographie préparative sur papier.

Le rendement de la séparation de l'hydrolysate trypsique de l'ALC-L<sub>27</sub> par chromatographie d'échange d'ions sur colonne de résine est très faible ( à partir de 1 μmole de chaîne légère, seulement 50 à 200 nmoles de peptides et ceci dans le meilleur des cas, ont pu être retrouvées ). A l'époque à laquelle nous avons effectué ce travail, des quantités relativement importantes ( 200 à 500 nmoles ) de peptide purifié étaient nécessaires pour mener à bien une étude séquence.

Néanmoins, l'accumulation de chromatographies préparatives répétées ont pu livrer cinq peptides trypsiques qui ont été soumis à une dégradation manuelle de Edman.

β) Définition et séquence des peptides trypsiques :

Parmi les trente fractions recueillies dix-huit peptides ont été purifiés quantitativement et étudiés pour leur composition en acides aminés. Connaissant la séquence en acides aminés de la chaîne légère ALC-L<sub>25</sub> de la myosine de muscle squelettique de Lapin, nous avons tenté de situer dans la molécule par analogie de séquence les peptides trypsiques de l'ALC-L<sub>27</sub> de myosine cardiaque de Porc. Nous l'avons fait avec prudence, ne possédant parfois à ce stade du travail que la composition en acides aminés et l'identité du résidu N-terminal déterminé après dansylation. Toutefois, on pourra retenir ( Fig. 22 ) que:

- trois peptides sont placés sans ambiguïté par analogie totale, il s'agit des peptides T<sub>17</sub>; T<sub>18</sub> et T<sub>22</sub>,

- trois l'ont été, compte tenu du principe des mutations ponctuelles et conservatives, T<sub>12</sub>; T<sub>16</sub> et T<sub>20</sub>,

- le peptide T<sub>23</sub> a été placé en position C-terminale étant donné qu'il ne contient pas de résidu basique et qu'il ne diffère de son homologue de l'ALC-L<sub>25</sub> de Lapin par l'existence d'alanine et de sérine. L'enchaînement Ala-Ser avait été identifié pour le peptide C-terminal de l'hydrolysate obtenu après action du BrCN.



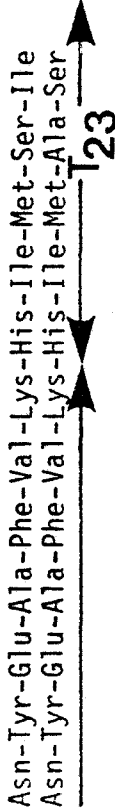
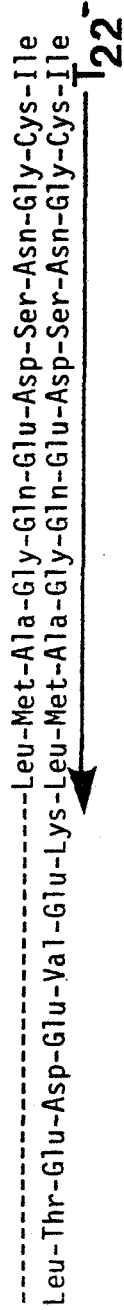
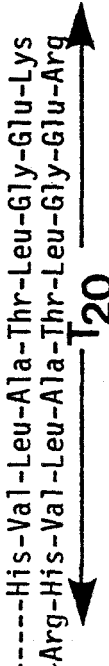
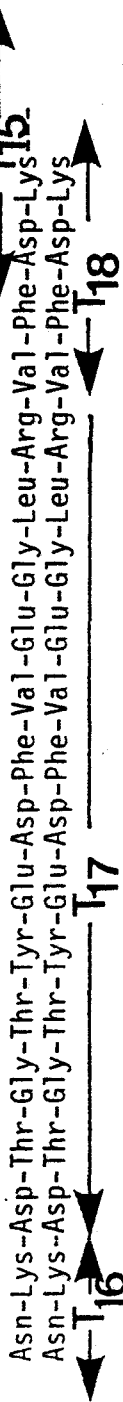
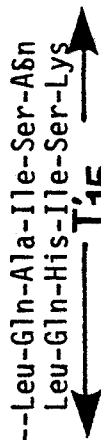
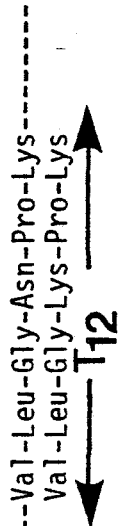
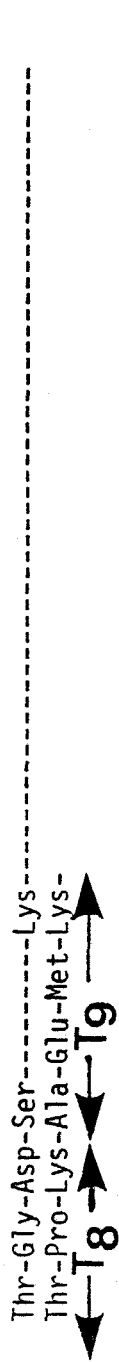


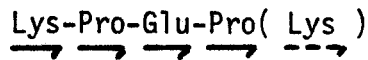
FIGURE 22 : POSITION DES PEPTIDES TRYPSIQUES DE L'ALC-L<sub>27</sub> ( T-PEPTIDES )

D'après leur composition en acides aminés, leur extrémité N-terminale et par rapport à la structure primaire de l'ALC-L<sub>25</sub> de la myosine de muscle squelettique de Lapin ( l'ALC-L<sub>25</sub> est placée à la ligne supérieure )

- en raison d'un taux élevé en résidus de proline, deux peptides avaient été désignés T<sub>1</sub> et T<sub>2</sub> et avaient été placés par erreur d'après leur seule composition en acides aminés dans la publication (PUBLICATION N° 8 )

\* "Partial amino acid sequence of pig heart left ventricular myosin light chain L<sub>27</sub>"  
Protides Biological Fluids Proceedings Colloquium 28 (1980) 75-78.

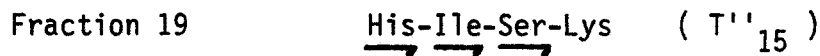
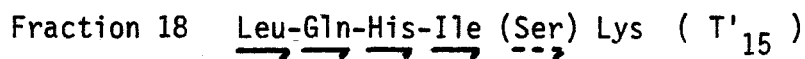
Ultérieurement, le peptide désigné T<sub>1</sub> a été isolé quantitativement pour être séquencé par dégradation manuelle de Edman. Nous obtenons la séquence



qui ne peut en aucun cas correspondre au peptide N-terminal N-bloqué. Il a donc été remplacé ici correctement et dénommé T<sub>2</sub> ( Fig. 22 ).

- un certain nombre de peptides ne peuvent être placés avec une complète certitude ( ceux des fractions 9; 12; 14 etc...).

Enfin, il est à souligner que des coupures trypsiques secondaires non spécifiques se produisent sur la chaîne légère ALC-L<sub>27</sub>. Ainsi, les fractions 18 et 19 sont obtenues avec d'excellents rendements. Elles ont pu être complètement caractérisées et séquencées par dégradation manuelle de Edman. Les séquences de ces peptides sont les suivantes :



S'agissant de fragments contenant un résidu d'histidine sur les trois que contient la molécule et dont deux font partie de peptides déjà positionnés. Ces peptides ne peuvent être placés qu'en position 113-118 pour T'<sub>15</sub> et 115-118 pour T''<sub>15</sub>. On peut alors constater que la trypsine aurait hydrolysé une liaison glutaminyl, sans doute du fait de la conformation toute particulière et aussi de l'hydrophobie importante qui caractérise cette région de la molécule, comme nous le verrons plus loin.

### 3°) FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT CHYMOTRYPSIQUE :

L'hydrolyse de l'ALC-L<sub>27</sub> par la chymotrypsine s'est révélée être la plus "totale". De plus, elle provoque l'apparition de très peu d'insoluble et, pour éviter au maximum "d'insoluble", l'hydrolysat chymotrypsique est citraconylé, puis fractionné sur colonne de Séphadex G50 en tampon propionate ( Fig. 23 ). Seulement trois fractions sont alors séparées et se révèlent hétérogènes après étude des extrémités N-terminales des peptides. Après dessalage, décitraconylation, chaque fraction est alors rechromatographiée sur colonne de résine Chromobeads P ( Fig. 23 ).

Malgré le préfractionnement par chromatographie de gel filtration, la bonne solubilité avant dépôt, le rendement de la séparation après chromatographie d'échange d'ions sur colonne de résine n'a pas été meilleur qu'après traitement trypsique. A partir de 1  $\mu$ mole d'ALC-L<sub>27</sub> sont obtenues de 20 à 200 nmoles de peptides. De nombreuses fractions se révèlent encore hétérogènes (  $\alpha$ -dansyl amino acides ), les rendant très difficile d'utilisation pour une identification de séquence.

### 4°) FRACTIONNEMENT DES AUTRES HYDROLYSATS :

Les hydrolysats obtenus après action des autres endopeptidases ( Collagénase ... ) et ceux obtenus après action des agents chimiques ( NTCBA, NBS ... ) ont été étudiés. Dans la plupart des cas, au maximum 20% du matériel de départ a pu être solubilisé et ceci quelque soit le tampon choisi pour le fractionnement, aussi ces préparations n'ont-elles été réellement utilisées qu'après avoir développé les techniques de séparation par HPLC.

## II - PAR CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE ( HPLC ) :

### 1°) FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT OBTENU APRES ACTION DU BrCN

#### $\alpha$ ) Introduction :

La séparation par les techniques "classiques" de chromatographie liquide des peptides obtenus après action du BrCN ( CB-peptides ), ne nous avait pas permis de les obtenir en nombre, en quantité et dans un état de pureté suffisant pour qu'ils puissent être étudiés en séquence et définir une grande partie de l'axe peptidique de l'ALC-L<sub>27</sub>.

Nous avons tenté de séparer les CB-peptides par HPLC, bien que leur taille puisse être importante et que leur solubilité soit parfois limite. Une étude systématique des phases stationnaires disponibles et

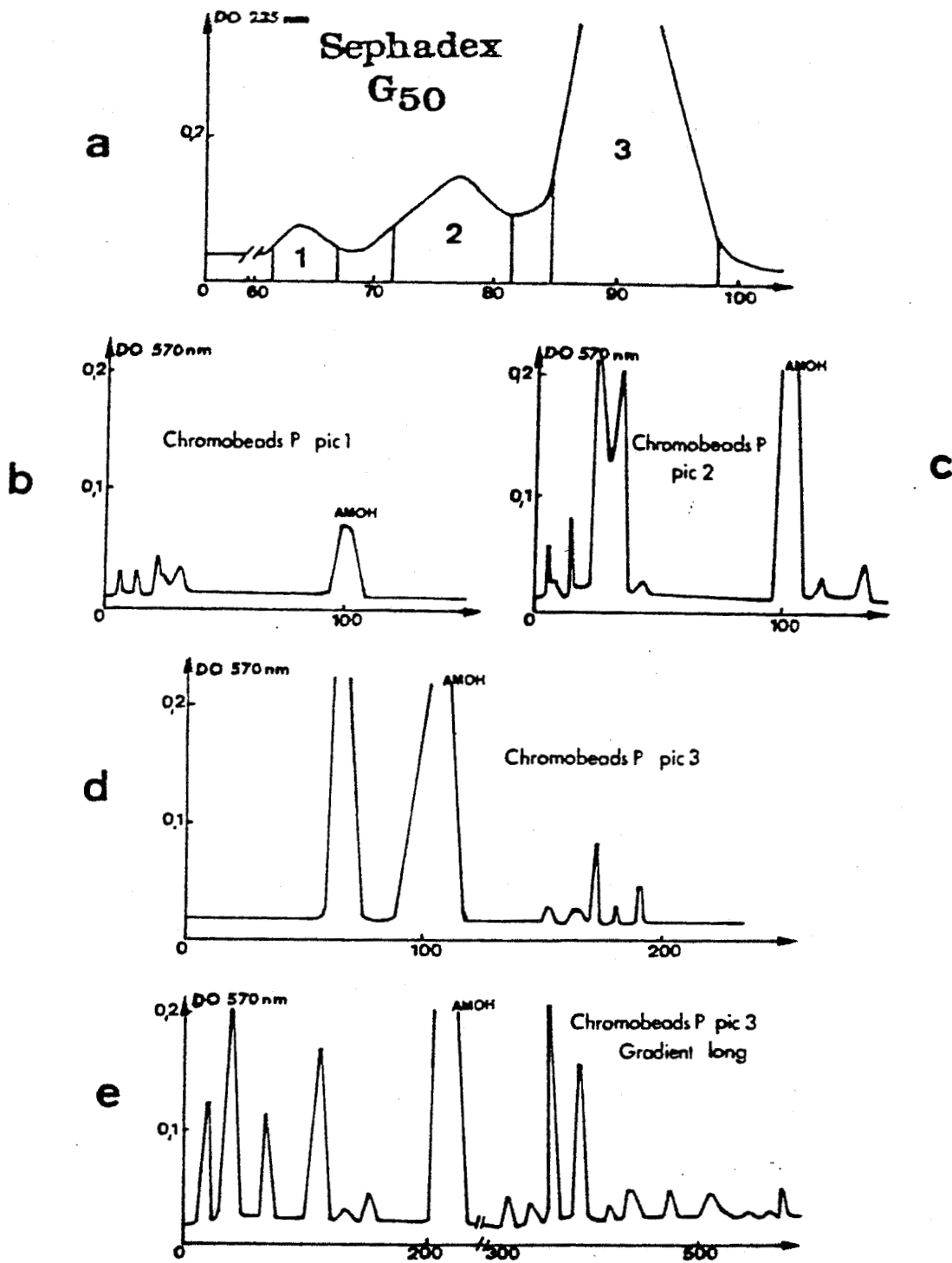


FIGURE 23 : FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT CHYMOTRYPSIQUE DE L'ALC-L<sub>27</sub>

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 & 3 obtenues du fractionnement préalable sur colonne de résine Chromobeads P avec un gradient de formiate et d'acétate de pyridine décrit par Han et al. ( 1972 ) [38]

e ) Fractionnement de la fraction 3 ( G 50 ) sur colonne de résine Chromobeads P avec un gradient d'élution différent ( passage d'acide formique 10% avant le gradient de formiate de pyridine de pH 2,9 ).

l'utilisation de conditions éluantes nombreuses a été entreprise :

\* Les phases stationnaires utilisées sont des colonnes de phase inversée, les colonnes analytiques C<sub>8</sub> (5 $\mu$ ) Merck; C<sub>8</sub> (10 $\mu$ ) à compression radiale Waters; C<sub>18</sub> (5 $\mu$ ) Whatman; C<sub>18</sub> (10 $\mu$ ) Waters; R-Phényl (R $\emptyset$ ) Waters; Synchropack RP-P Synchrom et la colonne semi-préparative C<sub>18</sub> Waters.

\* Les phases mobiles : le solvant A est constitué d'eau purifiée par passage sur un système Millipore ( Milli-Q ), contenant un contre-ion, le plus souvent l'acide trifluoroacétique ( TFA ) à 0,1%. Le solvant B permettant de réaliser le gradient et d'éluer les peptides de caractère de plus en plus hydrophobe est constitué de solvants organiques (acétonitrile, 2-propanol, 1-propanol) enrichis du même contre-ion.

Les conditions d'élution sont soit des gradients linéaires continus ( par exemple, de 0 à 75% de solvant B en 75 minutes ), soit de gradients linéaires discontinus ( par exemple, de 0 à 24%B en 20 min., puis de 24 à 60%B en 60 min.), soit une élution isocratique (30%B)

Une évaluation des performances des différentes colonnes de RP-HPLC a été réalisée dont les détails sont décrits dans la PUBLICATION N° 9 :

\* "Evaluation of commercial RP-HPLC columns for the separation of peptides from porcine cardiac myosin light chain L<sub>27</sub>"  
Protides Biological Fluids Proceedings Colloquium 30 (1982) 717-721.

De ces différents essais, nous avons retenu la colonne analytique R $\emptyset$ -Waters qui permet de préparer quantitativement les CB-peptides.

#### $\beta$ ) Fractionnement de l'hydrolysats total :

La colonne R $\emptyset$ -Waters nous ayant montré une capacité et un facteur de résolution supérieurs à toute les colonnes analytiques utilisées, 4  $\mu$ moles d'hydrolysats BrCN de l'ALC-L<sub>27</sub> ont été fractionnées. L'utilisation d'un gradient linéaire, en 70 minutes, de 0 à 70% de 1-propanol / TFA 0,1% avec un débit de 1 ml/min permet de séparer l'hydrolysats en plusieurs fractions dont six contiennent les CB-peptides ( Fig. 24 ). L'analyse des extrémités N-terminales par dansylation ou/et par identification des PTH-amino acides montre que les fractions sont hétérogènes.

**FIGURE 24 :** PURIFICATION PAR RP-HPLC DES PEPTIDES OBTENUS APRES ACTION DU BrCN ( CB-Peptides ).

- a ) Séparation de l'hydrolysate total sur colonne R $\emptyset$ -Waters ( 250 x 2,9 mm ) à un débit de 1 ml/min avec un gradient linéaire de 0 à 70% de n-propanol/TFA 0,1% en 70 min.
- b ) Purification du peptide CB<sub>3b</sub> sur colonne C<sub>18</sub> Merck en isocratique à 8% de 2-propanol/TFA 0,1% à un débit de 0,7 ml/min.
- c ) Purification du peptide CB<sub>2</sub> sur colonne C<sub>18</sub> à compression radiale Waters en isocratique à 34% de 2-propanol/TFA 0,1% à un débit de 2 ml/min.
- d ) Purification du peptide CB<sub>5</sub> sur colonne C<sub>18</sub> à compression radiale Waters en isocratique à 45% de 2-propanol/TFA 0,1% à un débit de 2 ml/min.

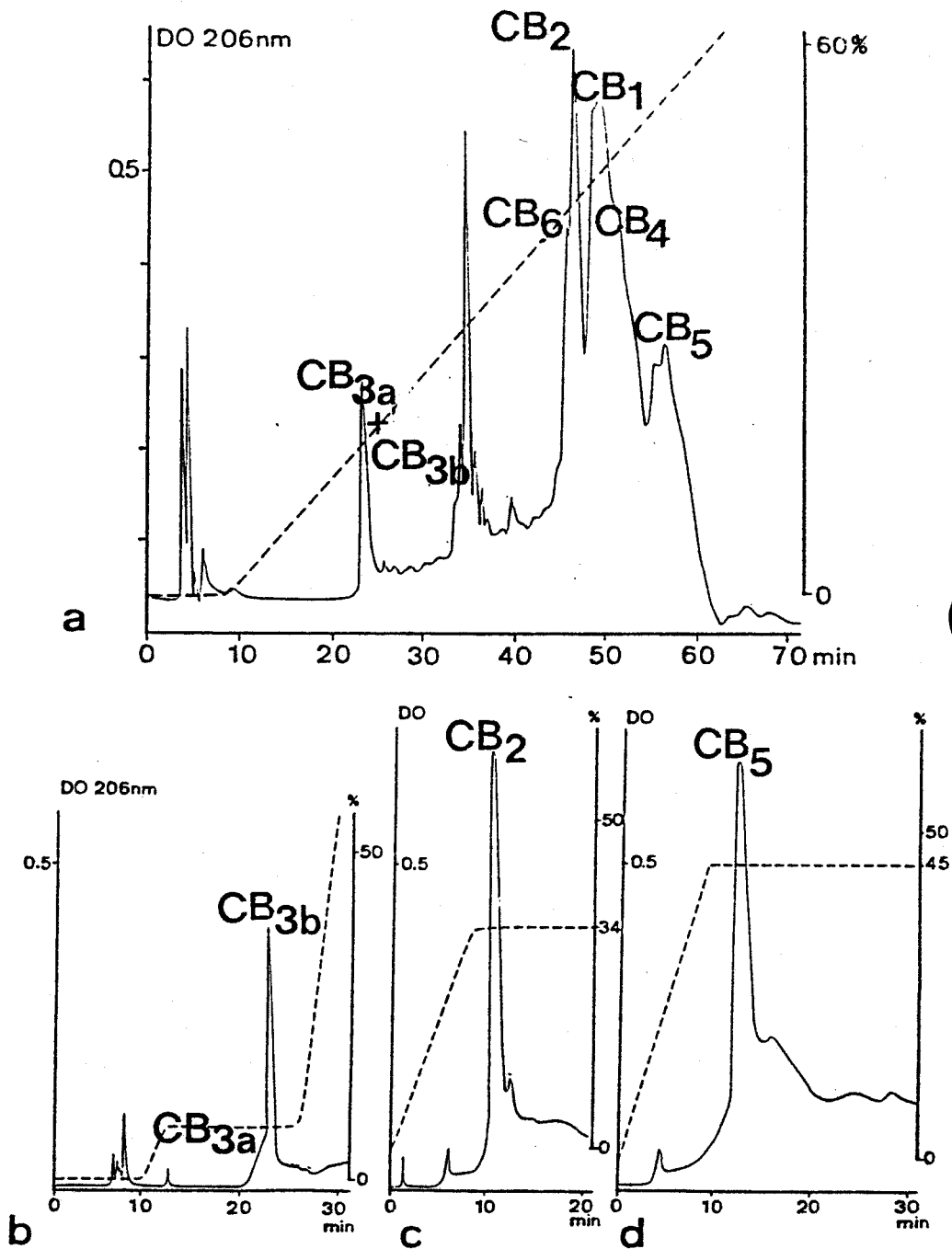


FIGURE 24

La rechromatographie des fractions, en modifiant les conditions d'élution et en changeant de colonne, est nécessaire pour purifier cinq des CB-peptides ( CB<sub>1</sub>; CB<sub>2</sub>; CB<sub>4</sub>; CB<sub>5</sub> et CB<sub>6</sub> ) ( Fig. 24 ). Par exemple, pour purifier 500 nmoles du peptide CB<sub>2</sub> une rechromatographie sur colonne C<sub>18</sub> (5μ) à compression radiale avec une élution en isocratique par 34% de 2-propanol/TFA à un débit de 2 ml/min en 20 minutes a été réalisée ( Fig. 24 ).

γ) Après préfractionnement de l'hydrolysats :

Puisque la capacité des colonnes analytiques est limitée, il est apparu parfois intéressant de préfractionner l'hydrolysats total par gel filtration ou RP-HPLC ( HPLC en phase inversée ) préparative, et, ne rechromatographier que la fraction à priori intéressante. Le préfractionnement permet aussi d'éliminer les agrégats facilitant l'utilisation de la HPLC et prolongeant la durée de vie des colonnes.

Ainsi, l'hydrolysats BrCN de l'ALC-L<sub>27</sub> a été fractionné sur colonne semi-préparative C<sub>18</sub> Waters ( Fig. 25 ). Les huit fractions majeures sont hétérogènes et doivent être rechromatographiées sur des colonnes analytiques, mais l'isolement des CB-peptides s'effectue avec de si faibles rendements que la méthode a dû être abandonnée.

Par contre, le préfractionnement de l'hydrolysats par chromatographie sur colonne de Séphadex G 50 en tampon bicarbonate d'ammonium 50 mM pH 8,8 contenant 10% de 1-propanol a été utilisé. La purification du peptide CB<sub>1</sub> a ainsi été conduite pour une étude de la structure de la partie N-terminale riche en proline et alanine de l'ALC-L<sub>27</sub>. De plus, la position du peptide CB<sub>1</sub> dans le chromatogramme de la HPLC ( environ pour l'élution à 50% de 1-propanol ) fait que ce peptide CB<sub>1</sub> a été intéressant pour une étude comparative plus générale de différentes colonnes de RP-HPLC ( C<sub>8</sub>; C<sub>18</sub> Waters; RP-P Synchron ... ) de l'élution de peptide hydrophobe de conformation particulière.

2°) FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE DE L'ALC-L<sub>27</sub>  
PREALABLEMENT CITRACONYLEE :

α) Introduction :

L'isolement de larges fragments peptidiques facilite beaucoup l'étude de la structure covalente de protéine aussi avons-nous recherché par citraconylation à limiter le nombre de coupures tryptiques, à améliorer la solubilité des fragments hydrolysés, à faciliter leur séparation chromatographique et à augmenter les rendements préparatifs.



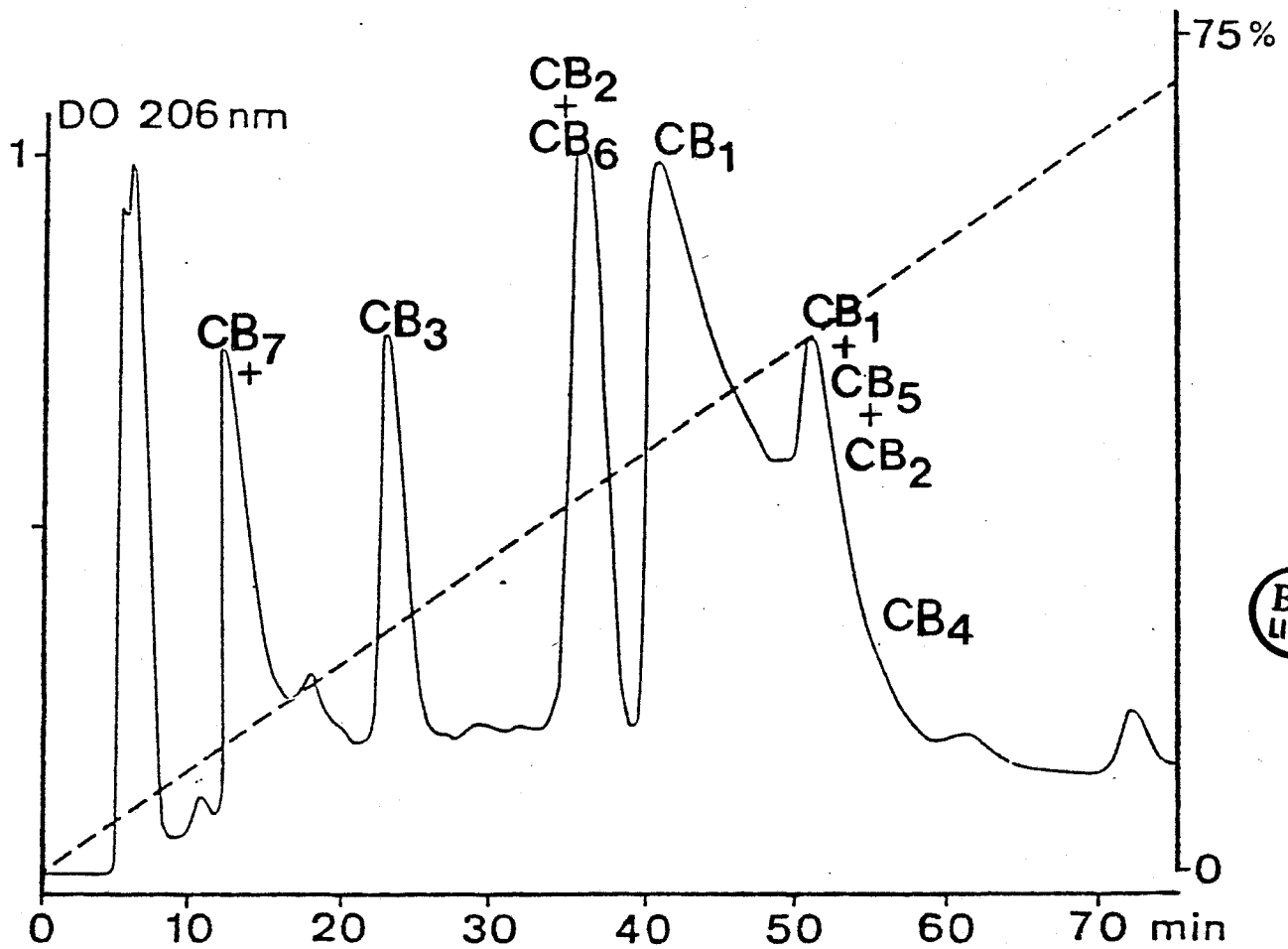


FIGURE 25 : PREFRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT BrCN DE L'ALC-L<sub>27</sub> SUR COLONNE SEMI-PREPARATIVE C<sub>18</sub> WATERS 2 X ( 600 x 7,8 mm ) AVEC UN GRADIENT LINEAIRE DE 0 à 75% DE 2-PROPANOL EN 80 min. A UN DEBIT DE 3ml/min. ( Le contre-ion est le TFA à 0,1% ).

Six résidus d'arginine ayant été dosés, ce protocole était à tester d'autant que la substitution des lysines est réversible.

Nous avons aussi comparé ces résultats à ceux qui sont obtenus par coupure enzymatique de l'ALC-L<sub>27</sub> par l'endopeptidase isolée de la glande sous-maxillaire de Souris ( GSMS ) dont se limite aux résidus d'arginine.

β) Fractionnement de l'hydrolysats tryptique de l'ALC-L<sub>27</sub> citraconylée :

Le fractionnement des peptides tryptiques de l'ALC-L<sub>27</sub> citraconylée ( Tc-peptides ) a été effectué après une étude systématique de différentes colonnes RP-HPLC, différents solvants et de gradients d'élution. La chromatographie sur colonne R<sub>0</sub>-Waters nous permet la séparation de plusieurs fractions (Fig. 26 ) qui se révèlent hétérogènes après l'analyse des extrémités N-terminales par dansylation. La purification ultime des peptides Tc a été alors réalisée par rechromatographies en modifiant les conditions de RP-HPLC ( Fig. 26 ). Tous les peptides Tc ( Tc<sub>1</sub> à Tc<sub>7</sub> ) ont été ainsi purifiés quantitativement.

γ) Fractionnement de l'hydrolysats de l'ALC-L<sub>27</sub> par la GSMS :

Par rapport à l'hydrolysats tryptique de l'ALC-L<sub>27</sub> citraconylée, l'hydrolysats obtenu par action de la GSMS est nettement moins soluble : un culot plus important est observé lors de la centrifugation qui précède le dépôt sur colonne de RP-HPLC. Pour cette raison le rendement global est moins bon. Le fractionnement de la partie soluble de l'hydrolysats "GSMS" de l'ALC-L<sub>27</sub> sur colonne R<sub>0</sub>-Waters montre un profil d'élution similaire à celui de l'hydrolysats tryptique de l'ALC citraconylée, mais les peptides sont purifiés en plus faible quantité.

3°) FRACTIONNEMENT DE L'HYDROLYSAT CHYMOTRYPTIQUE :

La chromatographie HPLC a été utilisée soit directement soit à la suite d'un premier fractionnement par échange ionique.

α) Fractionnement par RP-HPLC de l'hydrolysats total :

\*Introduction :

Pour éviter une multiplicité d'étapes chromatographiques, nous avons fractionné directement l'hydrolysats chymotryptique total par RP-HPLC. Un certain nombre de colonnes ont aussi été testé, afin d'en

FIGURE 26 : PURIFICATION PAR RP-HPLC DES PEPTIDES DE L'HYDROLYSAT OBTENU APRES HYDROLYSE PAR LA TRYPSINE LIMITEE AUX LIAISONS ARGINYLES PAR CITRACONYLATION DE L'ALC-L<sub>27</sub> .

- a ) Séparation de l'hydrolysat total sur colonne RØ-Waters à un débit de 1 ml/min avec un gradient linéaire de 0 à 70% de n-propanol/TFA 0,1% en 70 min.
- b ) Purification du peptide Tc<sub>7</sub> sur colonne C<sub>18</sub> Merck en isocratique à 38% de 2-propanol/TFA 0,1% à un débit de 0,7 ml/min.
- c ) Purification du peptide Tc<sub>4</sub> sur colonne RØ-Waters en isocratique à 26% de n-propanol/TFA 0,1% à un débit de 1 ml/min.

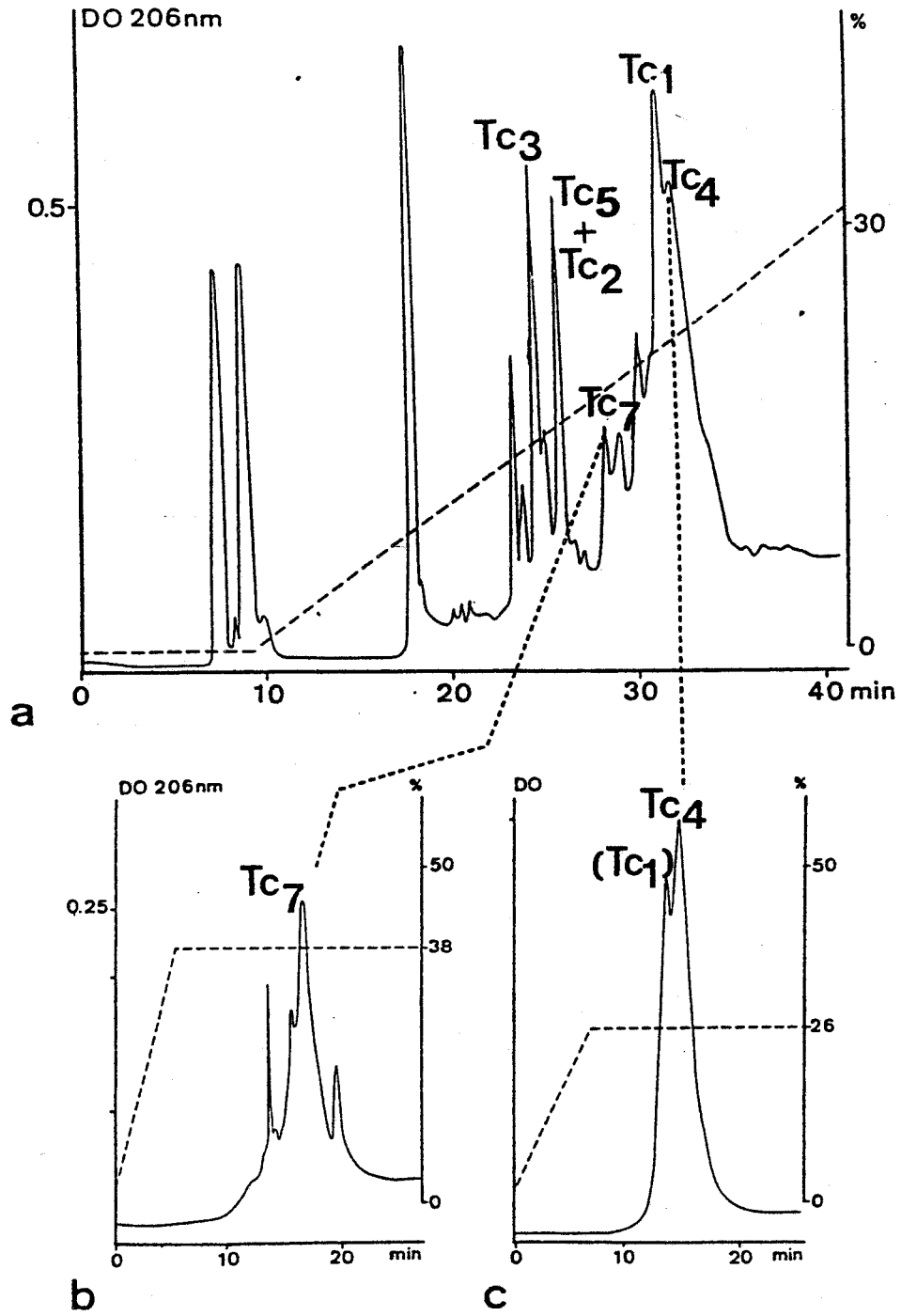


FIGURE 26

connaitre la capacité et le pouvoir de résolution. Il existe des colonnes de RP-HPLC très résolutive mais qui ne permettent pas d'obtenir quantitativement les peptides. Inversement, il existe des colonnes préparatives dont le pouvoir de résolution est relativement faible.

\* Le fractionnement :

Il nous a fallu rechercher des conditions optimales pour tenter d'améliorer les rendements des séparations de l'hydrolysate chymotrypsique de l'ALC-L<sub>27</sub> ainsi que la qualité de la chromatographie et nous avons essayé en particulier trois types de colonnes :

● La colonne semi-préparative C<sub>18</sub> Waters :

En utilisant un gradient linéaire de 0-60% de 2-propanol/TFA 0,1% en 80 min à un débit de 3ml/min, cette colonne sépare 500 nmoles d'hydrolysate chymotrypsique en quatorze fractions ( Fig. 27 ), dont la plupart sont hétérogènes, d'après l'étude de composition en acides aminés et d'extrémité N-terminale. D'autres conditions de gradient d'élution ne permettent pas de meilleures séparations.

● La colonne analytique C<sub>8</sub> ( 5μ ) Merck:

Comme le montre le profil d'élution ( Fig.27 ), cette colonne permet de séparer l'hydrolysate chymotrypsique en dix-huit fractions majeures. La plupart des fractions sont contaminées les unes par les autres ( asymétrie des pics ). De plus, un nombre limité de dépôts sur cette colonne est possible ( au maximum 30 dépôts ) et la quantité d'hydrolysate que nous pouvons y déposer pour obtenir un tel profil d'élution n'est que de 10 à 20 nmoles.

● La colonne analytique C<sub>18</sub> ( 10μ ) Waters:

Cette colonne permet la meilleure séparation de l'hydrolysate chymotrypsique, comme le montre le profil d'élution ( Fig. 27 ), puisque 24 fractions sont alors obtenues. Nous notons cependant la faible capacité de cette colonne ( 20 à 30 nmoles d'hydrolysate peuvent y être déposées ).

\* Conclusion :

Cette étude du fractionnement de l'hydrolysate chymotrypsique de la chaîne légère ALC-L<sub>27</sub> de la myosine ventriculaire gauche de coeur de Porc nous a permis de montrer qu'une séparation en une seule étape d'un mélange très hétérogène ( plus de 24 C-peptides ) est possible grâce à un choix judicieux de colonne RP-HPLC. Néanmoins, la purification finale des peptides par des rechromatographies est toujours nécessaire. Souvent, le rendement des rechromatographies est faible ce qui

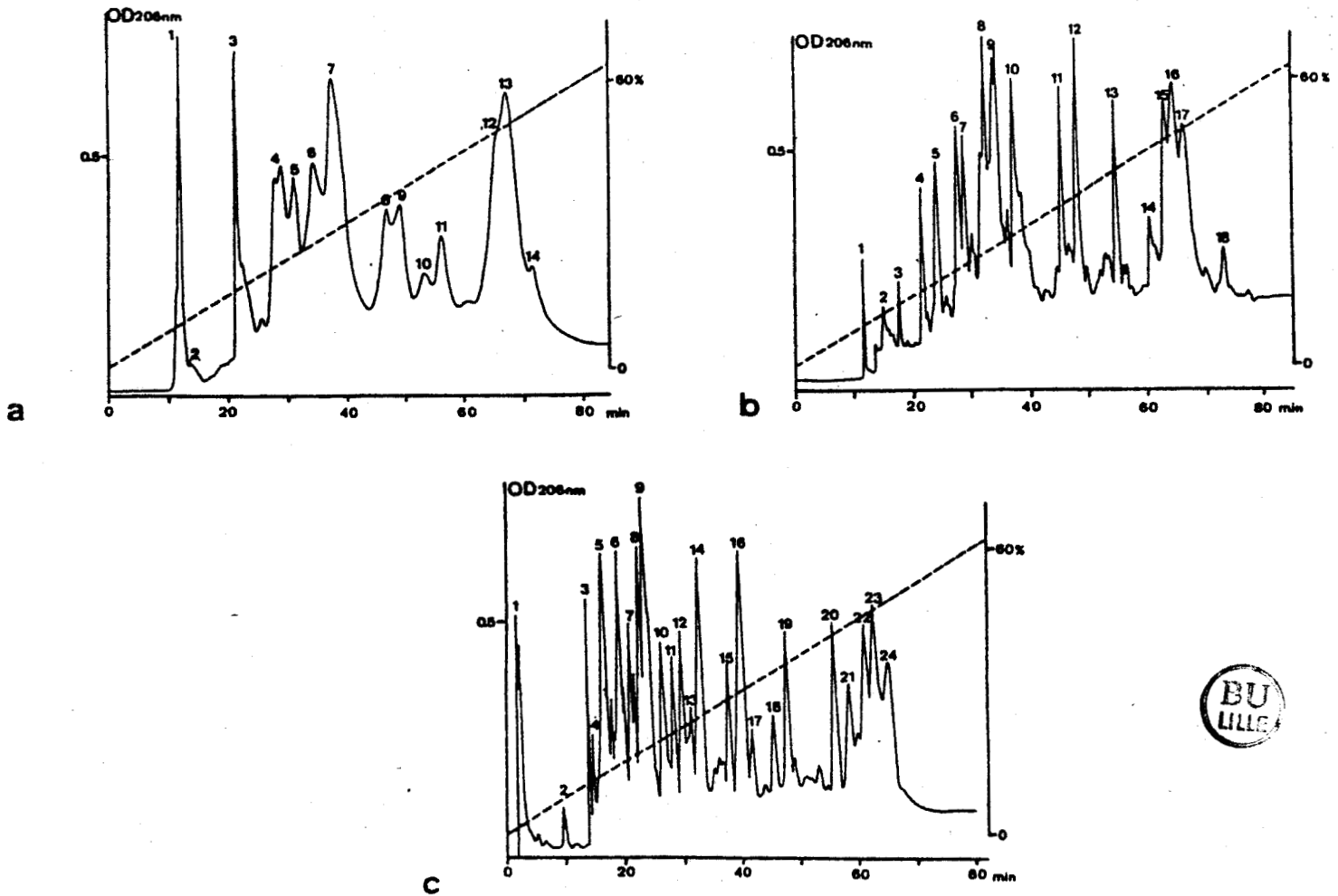


FIGURE 27 : FRACTIONNEMENT PAR RP-HPLC DE L'HYDROLYSAT CHYMOTRYPSIQUE DE L'ALC-L<sub>27</sub>.

- a ) Sur colonne semi-préparative C<sub>18</sub> Waters 2 X ( 600 x 7,8 mm ) avec un gradient linéaire de 0 à 60% de 2-propanol/TFA en 80 min. à un débit de 3 ml/min.
- b ) Sur colonne C<sub>18</sub> Waters ( 300 x 3,9 mm ) avec un gradient linéaire de 0 à 60% de 2-propanol/TFA 0,1% en 80 min. à un débit de 1 ml/min.
- c ) Sur une colonne C<sub>8</sub> Merck ( 250 x 4 mm ) avec un gradient linéaire de 0 à 60% de 2-propanol/TFA 0,1% en 80 min. à un débit de 0,5 ml/min.

représente un obstacle pour une purification préparative des C-peptides: par exemple, à partir de 4  $\mu$ moles d'hydrolysats chymotrypsique, trois rechromatographies sur différentes colonnes en modifiant les conditions d'élution sont nécessaires pour purifier 200 nmoles de C<sub>1</sub>-peptide.

$\beta$ ) Fractionnement sur colonne de DEAE-Trisacryl M suivi de RP-HPLC

Les essais de séparation par RP-HPLC de l'hydrolysats chymotrypsique total de l'ALC-L<sub>27</sub> montrent qu'un préfractionnement est préférable. A la gel filtration, nous avons préféré la DEAE-Trisacryl M, un échangeur d'ions qui est selon le fournisseur un support de grande capacité et sur lequel peu d'adsorptions non spécifiques se produisent. Bien que ce support n'ait jamais été utilisé pour un fractionnement peptidique, ses qualités nous ont amené à le tester pour séparer l'hydrolysats chymotrypsique de l'ALC-L<sub>27</sub>.

Nous avons mis au point un gradient de tampons volatils, de force ionique croissante et de pH décroissant permettant le repérage des fractions par réaction à la ninhydrine. Les détails techniques et les résultats sont décrits dans la PUBLICATION N° 10 :

\*"Methodology for purification of large hydrophobic peptides by high-performance liquid chromatography"

Journal of Chromatography 296 (1984) 301-308.

L'hydrolysats chymotrypsique de l'ALC-L<sub>27</sub> est ainsi séparé en vingt fractions dont sept réagissent fortement à la ninhydrine ( Fig. 28 ). Malgré la faible pente du gradient tant en pH qu'en force ionique, plusieurs fractions étudiées, par électrochromatographie sur couche mince de cellulose et par dansylation, par dégradation manuelle de Edman, ne sont pas homogènes. Cependant, en procédant au fractionnement sur colonne de DEAE-Trisacryl M préalablement, les C-peptides ne nécessitent en règle générale qu'une seule étape de rechromatographie. De plus, les rechromatographies peuvent être effectuées par RP-HPLC, tandis qu'en utilisant d'autres supports (DEAE-Cellulose, les résines de polystyrène ...) nous rencontrons des difficultés. Certaines fractions doivent toutefois être rechromatographiées plusieurs fois, ce qui abaisse d'autant les rendements. Nous avons pu caractériser un certain nombre de ces C-peptides et en déterminer la séquence ( par exemple, les peptides C<sub>1</sub>; C<sub>2</sub>; C<sub>4</sub> ... ) et surtout le tripeptide Glu-Asp-Phe, qui peut être placé en position 109-111. Cependant, d'après la séquence déjà

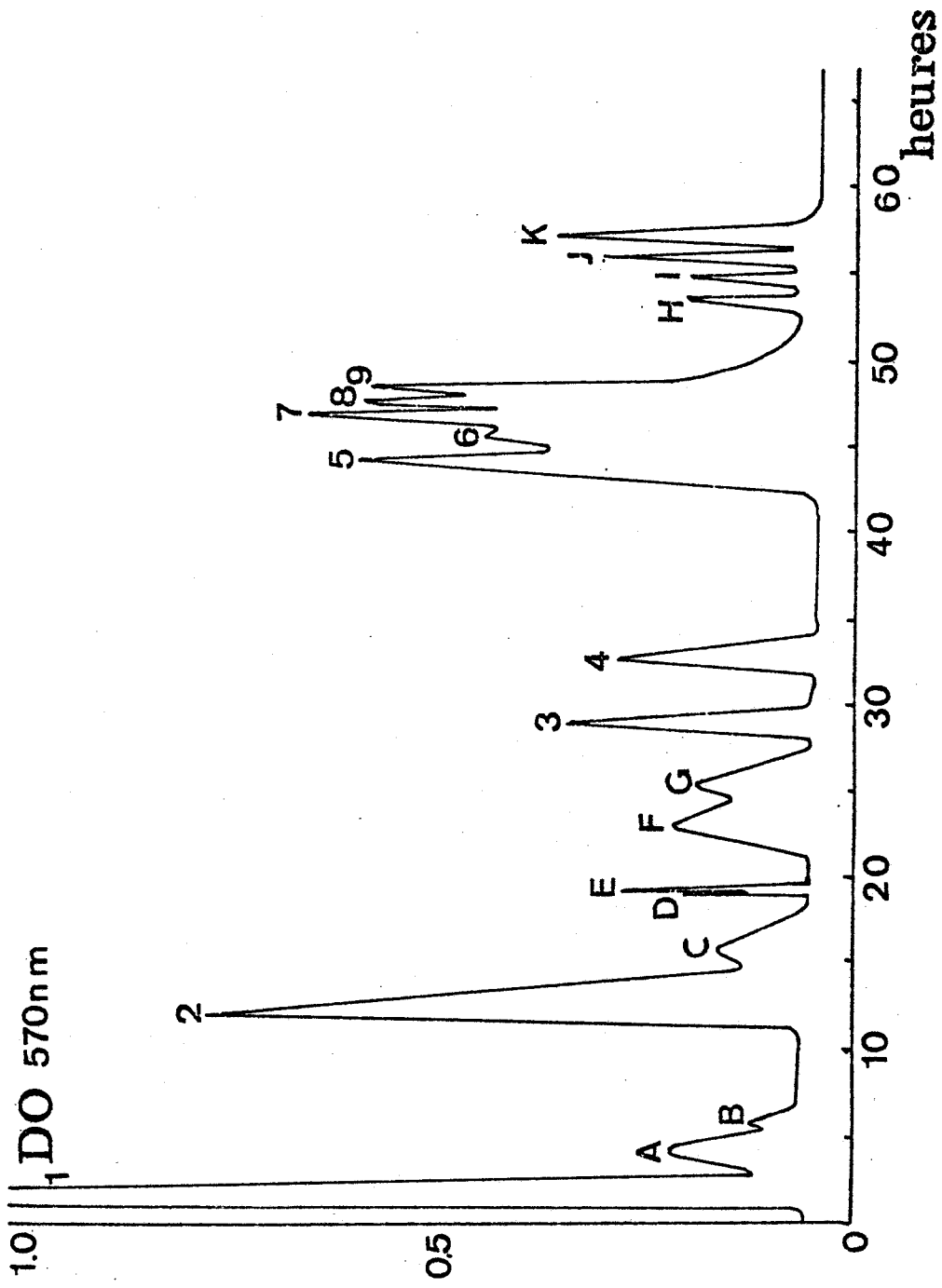


FIGURE 28 : Profil d'élution du fractionnement sur colonne de DEAE-Trisacryl M ( 25 x 2,5 cm ) de l'hydrolysate chymotrypsique de la chaîne légère L<sub>27</sub>.

Le fractionnement est réalisé avec un gradient discontinu de formiate de pyridine, croissant en force ionique 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.



déterminée, un peptide chymotrypsique C<sub>15</sub> Glu-Asp-Phe ( 128-130 ) peut également être libéré, ce qui pourrait expliquer que nous l'obtenons en si grande quantité.

#### 4°) FRACTIONNEMENT DES HYDROLYSATS OBTENUS APRES ACTION D'AUTRES TYPES D'ENDOPEPTIDASES :

Pour obtenir des peptides de taille importante donnant des recouvrements de séquence, d'autres endopeptidases ont été utilisées et les hydrolysats ont été fractionnés par RP-HPLC. Dans ce paragraphe, nous avons voulu sélectionner quelques-unes des expériences que nous avons réalisées.

##### α) L'hydrolysat de l'ALC-L<sub>27</sub> obtenu après action de l'endopeptidase de Staphylococcus aureus V<sub>8</sub> :

Tandis que par chromatographie sur colonne de résine "Chromobeads P", il ne nous avait pas été possible d'isoler quantitativement les peptides de ce type d'hydrolysat, la HPLC sur colonne RØ-Waters permet de fractionner les peptides obtenus après action de l'endopeptidase de Staphylococcus V<sub>8</sub> ( Sp-peptides ) ( Fig. 29 ). Leur isolement et leur purification nécessitent aussi des rechromatographies. L'étude sur le plan séquence n'a cependant présenté qu'un intérêt secondaire puisque les Sp-peptides que nous avons pu caractériser correspondaient toujours à une séquence déjà connue, ne permettant pas de recouvrement de séquence.

##### β) L'hydrolysat de l'ALC-L<sub>27</sub> obtenu après action de la Collagénase

La Collagénase n'a pas de spécificité d'action bien définie, mais les études cinétiques d'hydrolyse révèlent qu'après 50 minutes l'ALC-L<sub>27</sub> libère trois "larges" peptides de taille comprise entre 14.000 et 17.000 daltons. L'hydrolysat est fractionné par RP-HPLC sur colonne C<sub>18</sub> Waters ( Fig 29 ). Une fraction bien individualisée est éluée à 20% de 2-propanol tandis que la majorité des peptides sont hydrophobes ( élution entre 45 et 60% de 2-propanol ) ( Fig. 29 ).

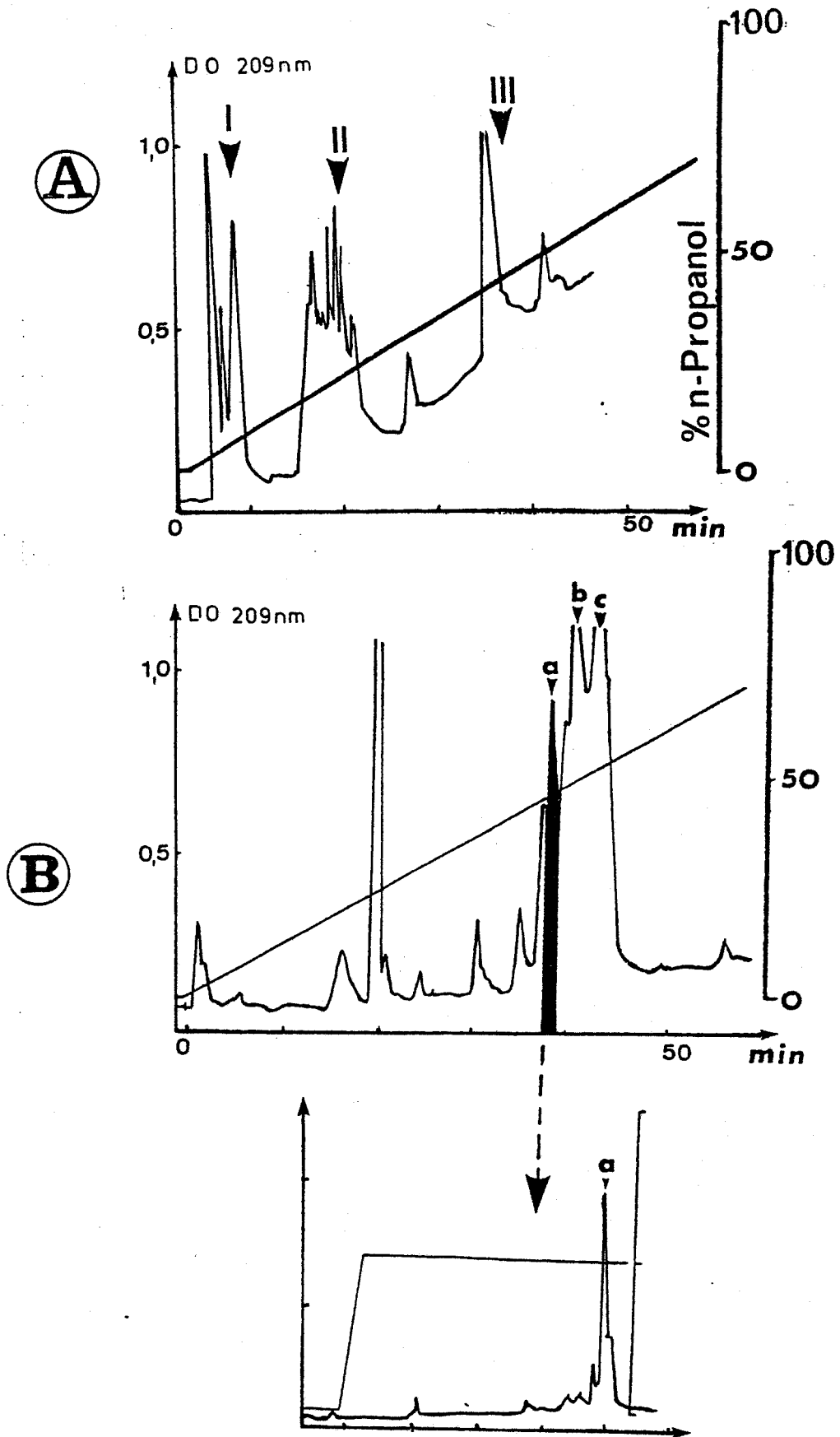
La purification des peptides est ensuite réalisée par des rechromatographies :

- par exemple, la fraction (a) est rechromatographiée sur la colonne C<sub>18</sub> Waters en isocratique par le solvant d'acétonitrile à 40% dans l'eau en présence de TFA 0,1%.

FIGURE 29 : FRACTIONNEMENTS PAR RP-HPLC DES HYDROLYSATS DE L'ALC-L<sub>27</sub> OBTENUS APRES ACTION DE L'ENDOPEPTIDASE SAV<sub>8</sub> ( A ) ET DE LA COLLAGENASE ( B ) SUR COLONNE RØ-WATERS ( 250 x 3,9 mm ) AVEC UN GRADIENT D'ELUTION DE 0-60% DE N-PROPANOL/TFA 0,1% EN 60 min.

A - Le profil montre que les Sp-peptides sont élués en trois groupes ( I à III ), difficiles à purifier ultérieurement.

B - Après hydrolyse par la collagénase de larges fragments sont libérés. Le peptide possédant une extrémité N-terminale identifiable ( DNS /PTH ) a été purifié par rechromatographie RP-HPLC en isocratique à un débit de 1 ml/min. ( 50% de n-propanol/TFA 0,1% )



BU  
LILLE

FIGURE 29

Dans ce cas également, la caractérisation des peptides ne représente qu'un intérêt secondaire car il s'agissait soit de séquences connues ou encore du peptide N-terminal N-bloqué.

#### 5°) CONCLUSION :

La chromatographie liquide haute pression se révèle la méthode la plus efficace pour purifier les peptides de la chaîne légère ALC-L<sub>27</sub> de la myosine ventriculaire gauche de coeur de Porc et, à l'inverse, les méthodes dites "classiques" ne permettent pas de les obtenir en quantité suffisante pour une étude de séquence. De plus, les peptides sont obtenus dans un tel état de pureté que le nombre de cycles de dégradation de Edman est alors plus important ( cf. le paragraphe suivant ). Au cours de cette étude, nous notons également que le choix de la colonne en phase inversée HPLC est important. Un préfractionnement par une méthode "conventionnelle" permet pourtant d'améliorer la qualité du fractionnement ultérieur par RP-HPLC et d'obtenir les peptides en plus grande quantité en diminuant le nombre de rechromatographies par RP-HPLC qui diminuent toujours les rendements.

### D - RESULTATS DE SEQUENCE

#### I - INTRODUCTION :

A partir des fractions séparées des différents hydrolysats par chromatographie liquide haute pression, un contrôle d'homogénéité des peptides est effectué par deux cycles de dégradation manuelle de Edman et détection avec quantification par HPLC des PTH-amino acides obtenus.

L'analyse de la composition en acides aminés des peptides homogènes est ensuite réalisée afin :

- \* de déterminer le nombre de résidus amino acides constituant le peptide.

- \* de caractériser ces peptides pour les placer si possible dans la séquence.

Les peptides purs sont enfin soumis à la dégradation de Edman pour leur caractérisation totale sur le plan séquence.

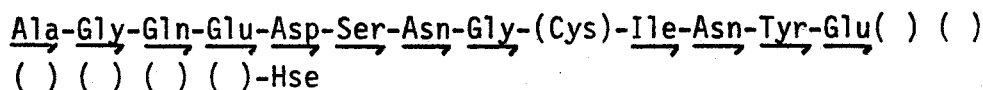
II - PEPTIDES OBTENUS APRES ACTION DU BrCN ( CB-PEPTIDES ) :

1°) PEPTIDES OBTENUS APRES PREFRACTIONNEMENT SUR COLONNE SEMI-PREPARATIVE DE L'HYDROLYSAT TOTAL :

Toutes les fractions, isolées après préfractionnement sur colonne semi-préparative et purifiées par chromatographie en RP-HPLC, ont été caractérisées par leur composition en acides aminés et leurs extrémités N-terminales ( Tableau VI ). Seuls, deux de ces CB-peptides, ont été isolés en quantité suffisante pour qu'une étude de séquence puisse être envisagée :

\* Le peptide CB<sub>1</sub> : après deux cycles de dégradation manuelle de Edman aucune extrémité N-terminale ne peut être identifiée. La composition en acides aminés est caractéristique et révèle un taux élevé en acide glutamique ( ou de glutamine ), en proline, en alanine et en lysine. Ce peptide correspond au peptide N-terminal N-bloqué de 66 résidus.

\* Le peptide CB<sub>6</sub> : après contrôle d'homogénéité de ce peptide de 20 résidus, la séquence des 12 premiers a pu être établie sans ambiguïté par dégradation récurrente de Edman :

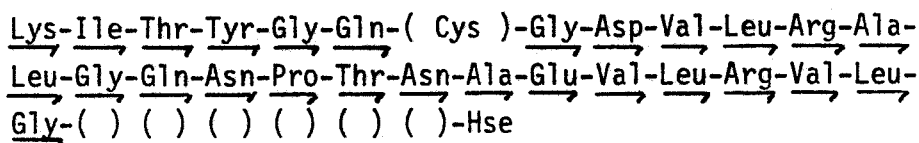


2°) PEPTIDES OBTENUS PAR FRACTIONNEMENT SUR COLONNE RP-WATERS

De l'hydrolysat total de l'ALC-L<sub>27</sub> après action du BrCN, cinq peptides ont été purifiés par rechromatographie en RP-HPLC en quantité suffisante pour leur caractérisation ( Tableau VI ) et leur étude sur le plan séquence :

\* Le peptide CB<sub>1</sub> : Ce peptide ne possède pas d'acide aminé pouvant réagir avec le PITC et sa composition en acides aminés est caractéristique ( taux élevé en Glx, Pro, Ala, Lys ). Il n'a pas pu être étudié par dégradation récurrente de Edman.

\* Le peptide CB<sub>2</sub> : Ce peptide de 35 résidus possède la lysine suivie de l'isoleucine en séquence N-terminale. 31 cycles de dégradation automatique de Edman ont été identifiés sans ambiguïté et la séquence obtenue est :



CARACTERISATION DES PEPTIDES CB

	CB <sub>1</sub>	CB <sub>2</sub>	CB <sub>4</sub>	CB <sub>5</sub>	CB <sub>6</sub>	CB <sub>1</sub>	CB <sub>2</sub>	CB <sub>4</sub>	CB <sub>5</sub>	CB <sub>6</sub>
	<b>a</b>					<b>b</b>				
Asx	3,4	3,8	3,9	1,6	3,2	4,3	3,7	4,2	1,2	3,1
Thr	1,3	2,1	3,7	2,1		1,8	2,1	3,5	2,1	
Ser	1,4	0,9	0,9		0,8	1,2	1,1	1,0		0,6
Glx	11,3	7,2	4,0	4,8	3,3	10,9	8,2	4,2	5,1	3,2
Pro	14,8	2,2	0,9			10,9	1,9			
Gly	0,7	3,8	3,0	2,1	2,2	1,3	4,2	3,7	2,1	2,9
Ala	13,6	1,9		2,0	2,2	11,6	2,1		1,3	3,8
Cys/2		0,6			0,7		0,8			0,7
Val	0,6	2,9	2,8	1,6	0,9	1,1	3,1	2,9	2,1	1,1
Met/Hse	1,2	0,8	0,8	0,7	0,8	0,7	0,8	0,7	0,6	0,7
Ile	3,1	0,9	0,7		1,7	2,6		0,7		2,4
Leu	1,4	4,5	2,2	4,2		1,4	5,2	1,5	4,9	
Tyr	0,5	1,0	0,8		1,0		0,8	0,7		0,9
Phe	4,2		1,9		1,2	4,1		2,7		1,3
His			0,8	0,7	0,9			0,9	1,1	0,8
Lys	9,9	4,9	2,3	1,3	1,2	8,2	3,8	3,8	0,9	1,2
Arg	1,2	2,0	1,0	1,7		1,1	2,1	1,1	1,9	
TOTAL	66	38	31	24	20	66	39	32	22	21

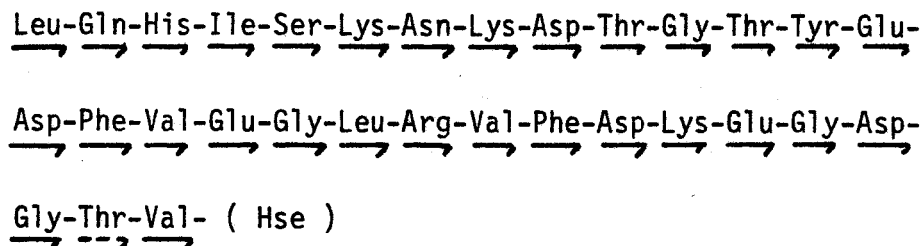
N-TERMINAL

N.D. Lys Leu Gly Ala N.D. Lys Leu Gly Ala

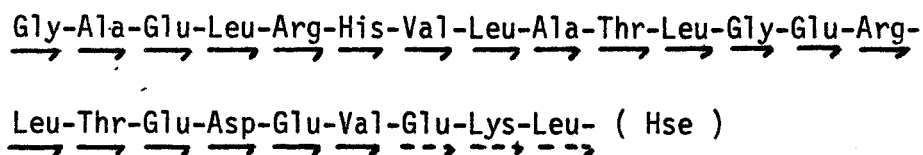
TABLEAU VI : COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES OBTENUS APRES ACTION DU BrCN ( CB-PEPTIDES ) PURIFIES PAR RP-HPLC.

(a) fractions isolées sur colonne semi-préparative.  
 (b) fractions purifiées sur colonnes analytiques.

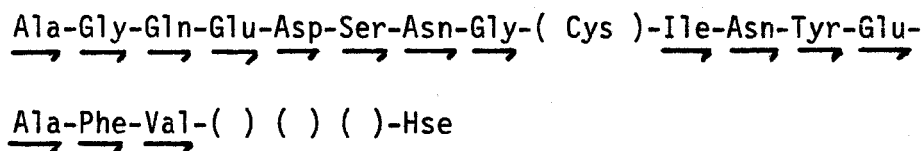
\* Le peptide CB<sub>4</sub> : est un peptide de 32 résidus dont la séquence a été totalement établie :



\* Le peptide CB<sub>5</sub> : la séquence de ce peptide de 24 résidus a été totalement établie et à titre d'exemple, les rendements de la dégradation de Edman sont exprimés dans le Tableau VII :



\* Le peptide CB<sub>6</sub> : Les quinze premiers résidus de ce peptide de 20 résidus ont été identifiés :



Un premier alignement de séquence a donc pu être proposé ( Fig. 30 ).

### III - LES PEPTIDES OBTENUS APRES ACTION DE LA TRYPSINE LIMITEE AUX LIAISONS ARGINYL ( Tc-PEPTIDES ):

Comme pour les CB-peptides, les peptides, obtenus après fractionnement sur colonne phényl HPLC ( R<sub>0</sub>-Waters ) du produit d'une hydrolyse trypsique limitée aux liaisons arginyl ( Tc-peptides ) et purifiés par rechromatographie en RP-HPLC, ont été caractérisés par deux cycles de dégradation manuelle de Edman et par leur composition en acides aminés ( Tableau VIII ). Les Tc-peptides purs ont été soumis ensuite à la dégradation automatique à l'exception du peptide Tc<sub>1</sub> qui correspond au peptide N-terminal N-bloqué.

DEGRADATION RECURRENTTE DE EDMAN DU PEPTIDE CB 5

( 150 nmoles )



1° Cycle	Gly	43,5	13° Cycle	Glu	6,2
2° Cycle	Ala	50,9	14° Cycle	Arg	9,5
3° Cycle	Glu	63,2	15° Cycle	Leu	8,0
4° Cycle	Leu	67,9	16° Cycle	Thr	6,2
5° Cycle	Arg	38,0	17° Cycle	Glu	3,9
6° Cycle	His	35,8	18° Cycle	Asp	4,2
7° Cycle	Val	46,7	19° Cycle	Glu	2,9
8° Cycle	Leu	44,6	20° Cycle	Val	3,8
9° Cycle	Ala	26,7	21° Cycle	Glu	n.q.
10° Cycle	Thr	18,5	22° Cycle	Lys	n.q.
11° Cycle	Leu	26,2	23° Cycle	Leu	n.q.
12° Cycle	Gly	12,4	24° Cycle	-	-

( n.q. = Non quantifié )

SEQUENCE PROPOSEE :

Gly-Ala-Glu-Leu-Arg-His-Val-Leu-Ala-Thr-Leu-Gly-Glu

Arg-Leu-Thr-Glu-Asp-Glu-Val-Glu-Val-Glu-Lys-Leu-Met

( Hse )

TABLEAU VII



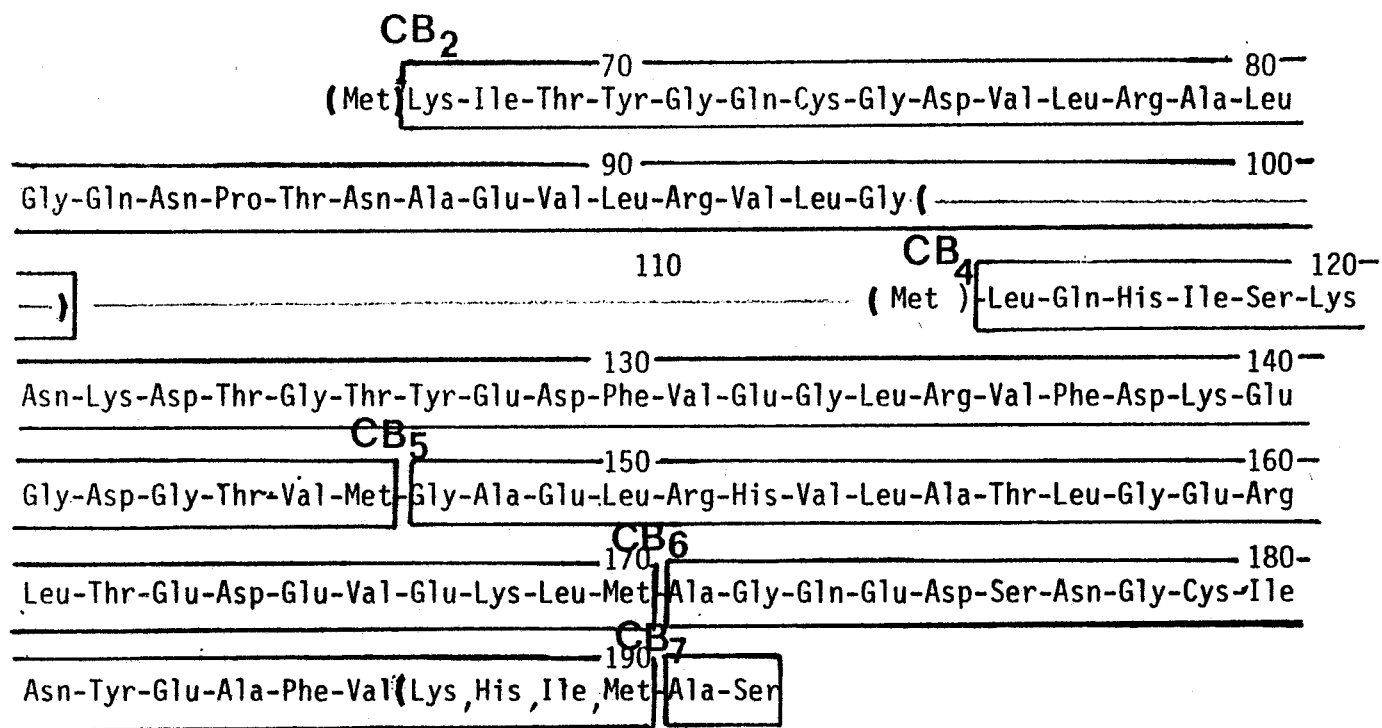


FIGURE 30 : ALIGNEMENT DES PEPTIDES CB OBTENUS APRES ACTION DU BrCN  
 DE LA CHAINE LEGERE ALC-L<sub>27</sub>



CARACTERISATION DES PEPTIDES Tc

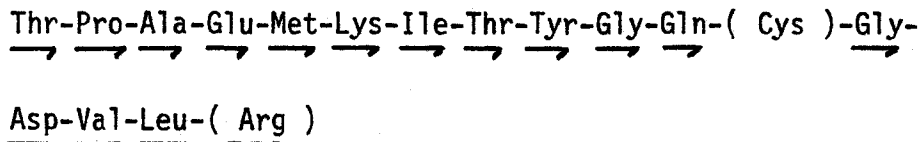
	TC <sub>1</sub>	TC <sub>2</sub>	TC <sub>3</sub>	TC <sub>4</sub>	TC <sub>5</sub>	TC <sub>6</sub>	TC <sub>7</sub>
Asx	4,2	1,2	1,4	5,0	1,9		4,3
Thr	1,3	2,1	1,1	2,4	1,1	1,2	0,9
Ser	1,2			2,1			1,8
Glx	10,4	2,2	2,8	7,4	2,3	1,4	6,2
Pro	13,8	1,2	0,8	2,6			
Gly	1,1	2,1	1,4	3,2	2,7	1,2	1,3
Ala	11,9	0,9	2,1	1,9	1,0	1,2	2,8
Cys/2		1,2					0,6
Val	1,2	1,2	0,9	2,3	2,1	1,4	2,1
Met		0,7		2,4	0,9		1,5
Ile	2,8	0,8		1,5			1,8
Leu	0,9	1,2	2,2	4,3	1,3	1,9	2,2
Tyr		1,1		0,6			0,7
Phe	3,3			3,3	1,1		1,2
His				0,6		0,9	0,8
Lys	7,7	1,8		3,3	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-TERMINAL

N.D.      Thr      Ala      Val      Val      His      Leu

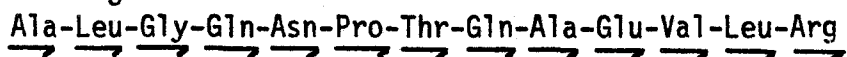
TABEAU VIII : COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES TRYPSIQUES  
OBTENUS SUR L'ALC-L<sub>27</sub> CITRACONYLEE ( Tc-PEPTIDES )  
ET LEUR EXTREMITE N-TERMINALE ( PTH ).

\* Le peptide Tc<sub>2</sub> : sur 18 résidus, 17 ont été identifiés sans ambiguïté :

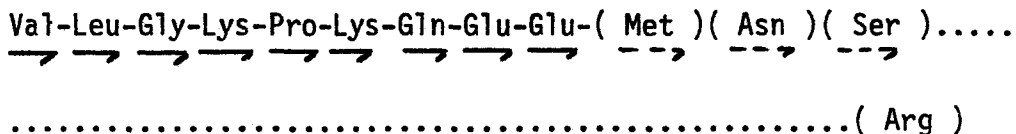


Le " blanc " obtenu en position 13 correspond à un résidu de cystéine. En effet, le PTH-Cys n'est pas détecté dans notre système HPLC mais le résidu de cystéine a été déterminé dans la composition en acides aminés.

\* Le peptide Tc<sub>3</sub> : les 13 résidus ont été identifiés sans ambiguïté

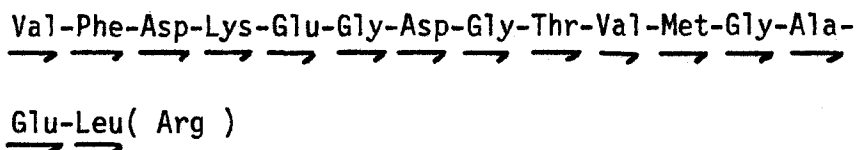


\* Le peptide Tc<sub>4</sub> : sur les 44 résidus, 9 seulement ont été identifiés avec certitude, la séquence est :



La présence et la proximité d'un résidu de proline et de glutamine ont abaissé considérablement le rendement répétitif de la dégradation automatique de Edman.

\* Le peptide Tc<sub>5</sub> : seule l'arginine en position C-terminale de ce peptide de 16 résidus n'a pas été identifiée et la séquence est la suivante :



\* Le peptide Tc<sub>6</sub> : ce peptide de 9 résidus, d'après sa composition en acides aminés et la séquence His-Val N-terminale, confirme l'existence de l'enchaînement



que nous trouvons dans le peptide CB<sub>5</sub> déjà séquencé ( Fig. 31 ).

60  
(Arg)

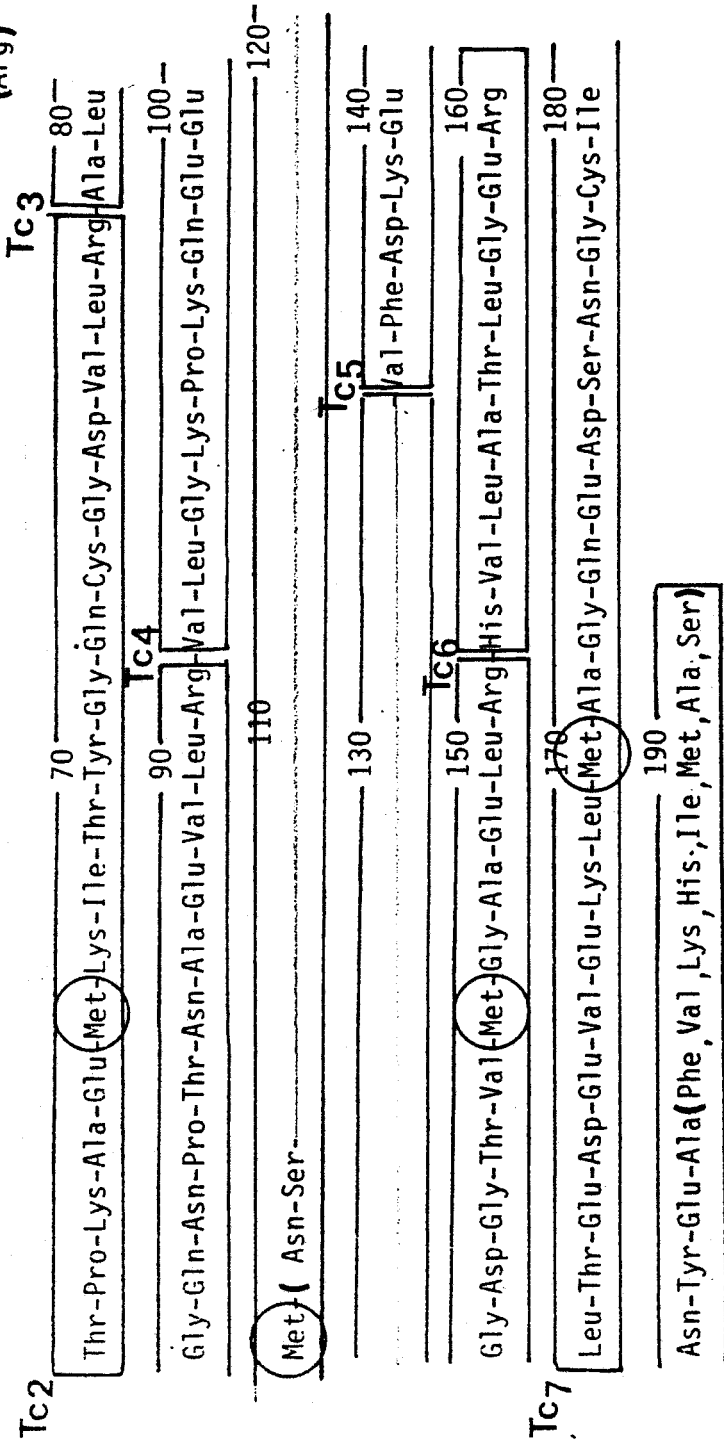
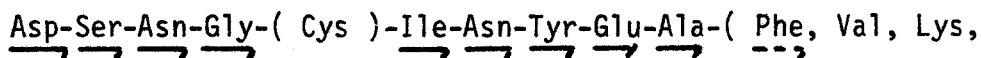
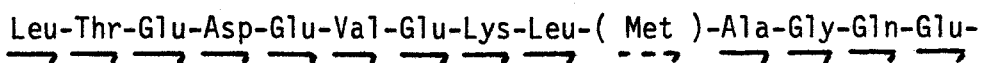


FIGURE 31 : ALIGNEMENT DES PEPTIDES Tc OBTENUS APRES HYDROLYSE TRYPSIQUE DE L'ALC-L<sub>27</sub> CITRACONYLEE

Les peptides Tc ont été placés par rapport aux séquences connues des peptides CB. Les recouvrements de séquences au niveau des résidus de méthionine ( résidus encadrés ) ont ainsi pu être effectués.



\* Le peptide Tc<sub>7</sub> : les 24 premiers résidus de ce peptide de 32 résidus C-terminal ( absence d'arginine dans la composition en acides aminés ) ont été identifiés :



His, Ile, Met, Ala, Ser )

L'enchaînement en acides aminés de l'ALC-L<sub>27</sub> avec les recouvrements de séquence ( CB- et Tc-peptides ) a pu être ainsi proposé ( Fig. 31 ).

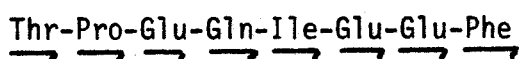
#### IV - PEPTIDES CHYMOTRYSIQUES ( C-PEPTIDES ) :

##### 1°) LES PEPTIDES OBTENUS A PARTIR DE L'HYDROLYSAT TOTAL :

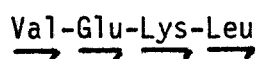
Les fractions homogènes ( symétrie de pics dans le profil d'éluion après RP-HPLC sur la colonne C<sub>18</sub> Waters ) ont été étudiées. Les acides aminés en position N-terminale ainsi que la composition en acides aminés des différents C-peptides sont donnés dans le Tableau IX.

Deux des peptides ont été isolés en quantité suffisante pour que la séquence puisse être établie par dégradation automatique de Edman

\* Le peptide C<sub>4</sub> :



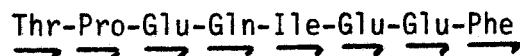
\* Le peptide C<sub>19</sub> :



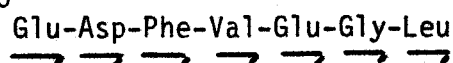
##### 2°) LES PEPTIDES CHYMOTRYSIQUES OBTENUS APRES PREFRACTIONNEMENT SUR COLONNE DE DEAE-TRISACRYL M :

Plusieurs peptides sont obtenus en quantité suffisante pour leur caractérisation ( composition en acides aminés et extrémités N-terminales [ Tableau IX ] ) et leur étude sur le plan de la séquence

\* Le peptide C<sub>4</sub> : la séquence des 8 résidus de ce peptide a été à nouveau déterminée par dégradation automatique de Edman



\* Le peptide C<sub>15</sub> :



CARACTERISATION DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES ( C-PEPTIDES )

	<b>a</b>							<b>b</b>							
	C'1	C3	C4	C7	C8	C'15	C'21	C1b	C2	C4	C8	C12	C15a	C'15	C19
Asx		2,6		1,1	1,8	1,3					1,4	1,0	1,2	1,0	1,1
Thr		1,2	1,5	1,4						0,6					2,1
Ser				0,9			1,6								
Glx	2,1	1,2	4,6	3,1	2,4	2,6	1,0	3,2	3,2	5,1	1,0	1,0	0,9	2,1	4,2
Pro	5,8		1,5	1,1				6,1	3,1	0,6					
Gly					2,4	2,6					2,5			1,1	1,2
Ala	5,8	0,9					2,4	5,7	5,0						1,1
Cys/2					0,3						0,4				
Val					1,8	1,3	0,7				1,1			1,0	1,1
Met				1,1			0,4								
Ile		0,6	1,4				0,7		1,0	1,2					
Leu					1,0	1,1					1,0			1,0	1,1
Tyr				0,6											
Phe	1,0	1,0	1,0			1,0	1,0	1,0	1,0	1,0		1,0	1,0	1,0	
His							0,9								
Lys	3,3	1,7		1,1			0,8	1,8	2,0						1,1
Arg				1,2											
TOTAL	18	10	11	11	10	10	10	-	-	8	7	3	3	7	15
N-TERMINAL	Lys	Asp	Thr	N.D.	Gly	Glu	Glu	N.D.	Ala	Thr	Gly	Glu	Glu	Glu	Ala

TABLEAU IX : COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES OBTENUS APRES PURIFICATION PAR RP-HPLC

( a ) Obtenus à partir de l'hydrolysat total.

( b ) Obtenus à partir du préfractionnement par chromatographie sur colonne de Trisacryl M.



Nous notons que la liaison Phe-Val n'a pas été hydrolysée bien que la chymotrypsine coupe préférentiellement au niveau des résidus à chaîne latérale aromatique ( Tyr et Phe ).

\* Le peptide C<sub>19</sub> : ce peptide est une nouvelle fois isolé en quantité importante pour être séquencé.

Tous les C-peptides ont été placés dans la séquence ( Fig. 32 ).

#### V - LES PEPTIDES OBTENUS APRES ACTION DE LA COLLAGENASE :

Les quatre fractions majeures ont été purifiées par RP-HPLC sur colonne C<sub>18</sub> Waters et leur étude montre que l'ALC-L<sub>27</sub> est hydrolysée en deux larges polypeptides ( Fig. 32 ) :

\* Le peptide N-terminal N-bloqué

\* Le peptide C-terminal de 56 résidus dont la séquence est

Val-Phe-Asp-Lys-Glu-( .....)-Ser

Ces peptides ne présentent qu'un intérêt secondaire : la région qui pourrait être séquencée est déjà bien connue. Nous avons seulement la confirmation que la collagénase coupe sélectivement l'ALC-L<sub>27</sub> au niveau de la liaison arginyl en position 135.

#### VI - ETABLISSEMENT DE LA SEQUENCE PARTIELLE ET CONCLUSION :

Dans ce paragraphe, nous avons rassemblé tous les résultats de séquence qui nous permettent d'établir la structure primaire partielle de l'ALC-L<sub>27</sub> de la myosine ventriculaire de coeur de Porc ( Fig. 33 ). En particulier, l'étude des CB- et Tc-peptides montre que les recouvrements de séquence indispensables ont été effectués. Au total, 2/3 de la séquence de l'axe peptidique sont déterminés mais des ambiguïtés subsistent en ce qui concerne la région N-terminale ( 1-60 ), la région 101-114 et la région C-terminale 186-192.

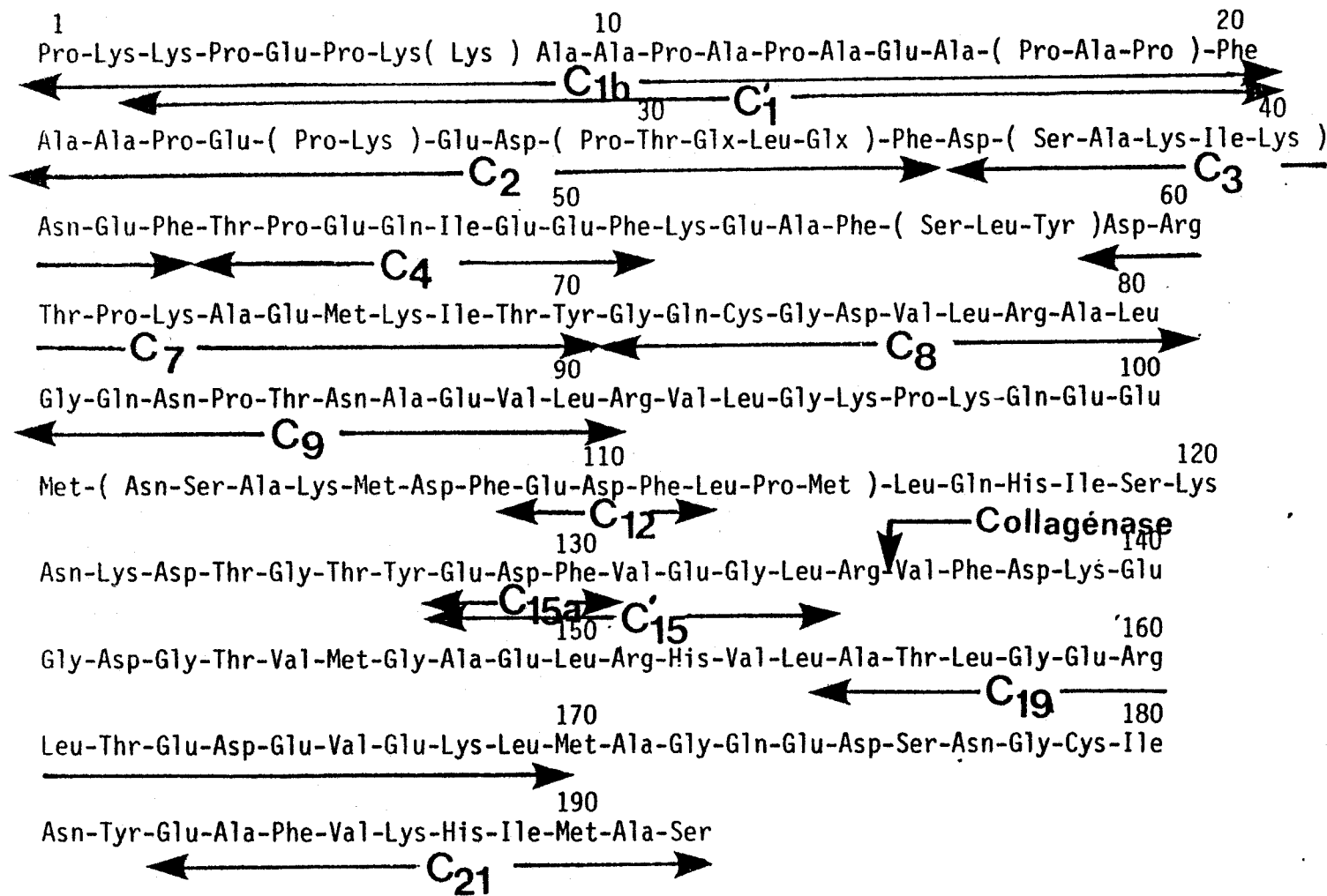


FIGURE 32 : POSITION DES PEPTIDES CHYMATRYPSIQUES DE L'ALC-L<sub>27</sub> ( C-PEPTIDES )  
 D'après leur composition en acides aminés, leur acide aminé N-terminal et de différents résultats de séquence déjà acquis.

indique le point de clivage par la collagénase.







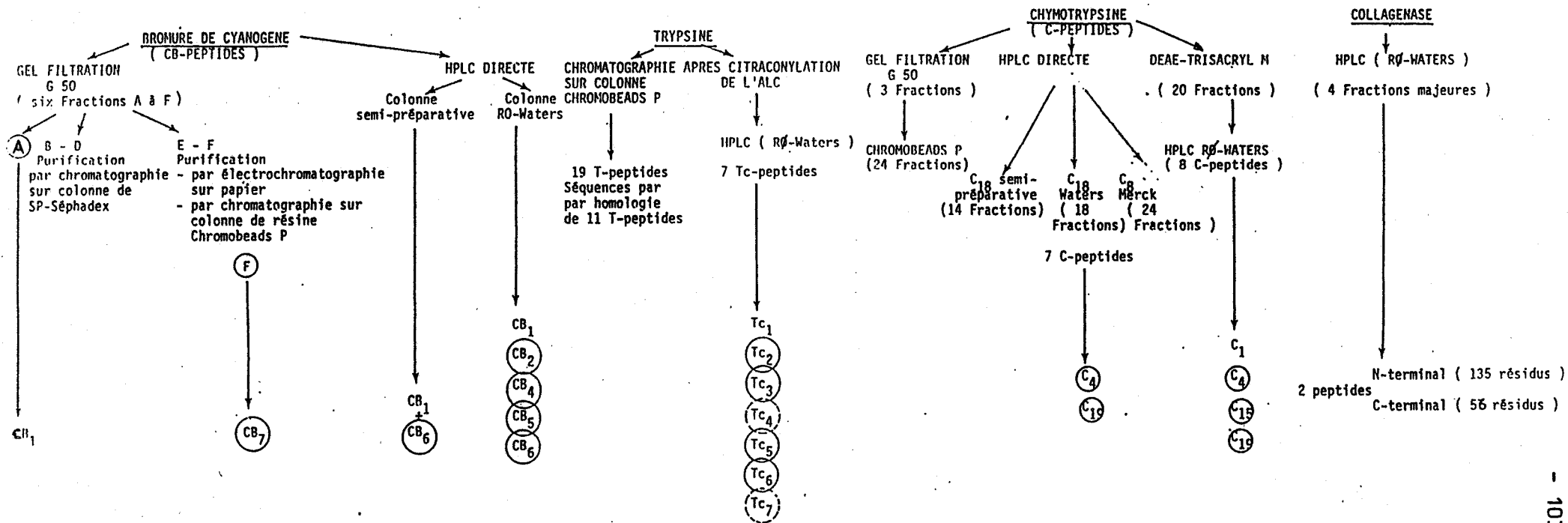


FIGURE 34 : PURIFICATION DES DIFFERENTS PEPTIDES DE L'ALC-L<sub>27</sub>

La détermination de la séquence des peptides encadrés a été réalisée totalement ( en trait plein ) ; partiellement ( en pointillé )





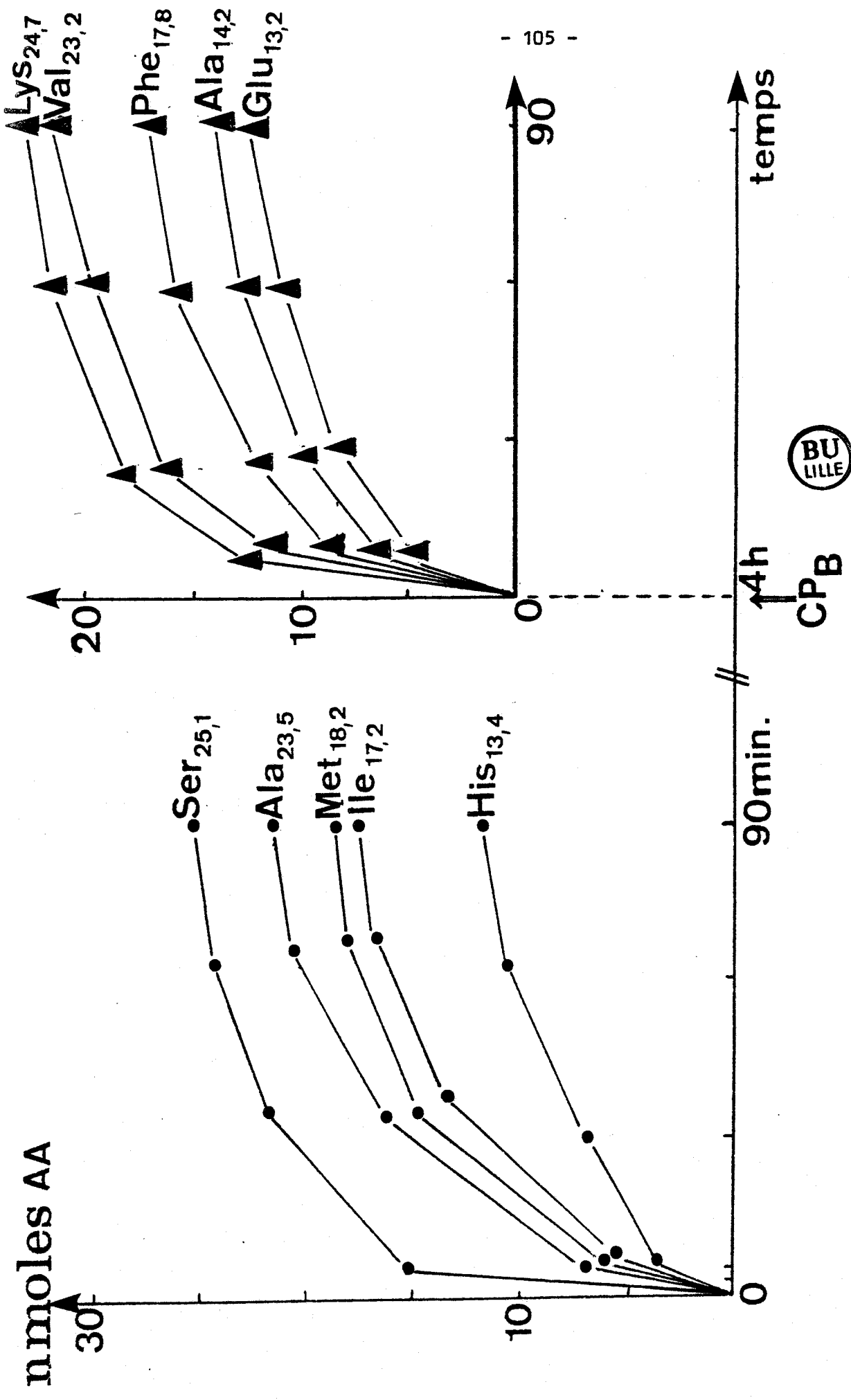


FIGURE 35 : CINETIQUE D'HYDROLYSE DE L'ALC-L<sub>27</sub> PAR LES CARBOXYPEPTIDASES A & B

30 nanomoles d'ALC-L<sub>27</sub> sont soumis à l'action de la Carboxypeptidase A. Les résultats sont exprimés en nanomoles d'acides aminés libérés ( n moles AA ) en fonction du temps. Après 4 heures, la carboxypeptidase B ( CP<sub>B</sub> ) est ajoutée. Les résultats sont alors exprimés en soustrayant les nmoles d'acides aminés libérés par la carboxypeptidase A.



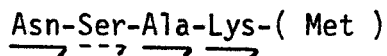
\* le rendement répétitif de la dégradation automatique de Edman de cette région ( le peptide Tc<sub>4</sub> par exemple ) soit considérablement diminué, si on le compare à celui d'un peptide de même taille ( CB<sub>5</sub> );

\* lors de l'étude du fractionnement de l'hydrolysate trypsique, nous avons remarqué des coupures non spécifiques par la trypsine ( hydrolyse de liaison glutaminyl et méthionyl );

\* l'ensemble des CB-peptides ne soient pas retrouvés lors des fractionnements.

Une recherche systématique des peptides répondant à cette séquence très hydrophobe a été entreprise dans les différents fractionnement de gel filtration et de RP-HPLC. Ainsi, dans le fractionnement de l'hydrolysate sur colonne de Séphadex G 50, un peptide CB<sub>3a</sub> a été localisé dans le pic des sels tandis qu'un autre peptide CB<sub>3b</sub> était retrouvé dans la partie descendante du pic des sels. Après dessalage de ces peptides par RP-HPLC, nous avons obtenu :

\* Le peptide CB<sub>3a</sub> : en quantité juste suffisante pour une composition en acides aminés et la détermination de sa séquence par dégradation manuelle de Edman

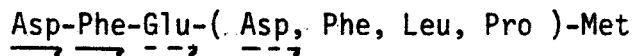


\* Le peptide CB<sub>3b</sub> : la composition en acides aminés montre que le peptide CB<sub>3b</sub> est constitué de 8 résidus

Asx ( 2,4 ); Glx ( 1,0 ); Hse ( 0,6 ); Pro ( 1,2 ); Leu ( 1,2 )

Phe ( 1,8 ).

La dégradation manuelle de Edman du peptide permet d'obtenir seulement deux cycles sans ambiguïté



D'autres fractionnements d'hydrolysats de l'ALC-L<sub>27</sub> obtenus après action de la chymotrypsine, la collagénase, l'élastase etc... ont été analysés, mais aucun ne nous a permis d'identifier de peptides susceptibles d'effectuer le recouvrement de séquence désiré. Le peptide Tc<sub>4</sub> a même été préparé à nouveau, mais une nouvelle fois après le résidu de méthionine ( position 101 ) les résultats après la dégradation Asn-Ser...ne sont pas interprétables.

La structure primaire de la partie C-terminale de la chaîne légère ALC-L<sub>27</sub> de la myosine ventriculaire de coeur de Porc a ainsi été complètement établie. Ainsi, il persiste juste une incertitude en ce qui concerne le recouvrement de la séquence de la région 101-114, mais :

- La composition en acides aminés du peptide CB<sub>3b</sub>,
- et le caractère très conservatif de l'enchaînement

111            114  
Phe-Leu-Pro-Met

pour toutes les chaînes légères de type alcaline connues. Ceci nous permet de supposer que notre chaîne légère de myocarde de Porc ne fait pas exception.

### III - ETUDE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DE LA REGION N-TERMINALE ( POSITION 1-60 ) DE L'ALC-L<sub>27</sub> :

#### 1°) LA STRATEGIE UTILISEE :

L'étude des nombreux fractionnements des hydrolysats de l'ALC-L<sub>27</sub> nous a apporté un certain nombre d'indications concernant la structure primaire N-terminale N-bloquée de la molécule :

- . l'existence de plusieurs peptides de configuration particulière, riches en résidus de proline;
- . une séquence Lys-Pro-Glu-Pro-Lys proche de l'extrémité N-terminale N-bloquée ( peptide T<sub>2</sub> );
- . une séquence Thr-Pro-Glu-Gln-Ile-Glu-Glu-Phe ( étude du peptide C<sub>4</sub> de l'hydrolysat chymotrypsique de l'ALC-L<sub>27</sub> );
- . la présence d'un résidu de phénylalanine en position 20 ( étude des peptides tryptiques et chymotrypsiques de l'ALC-L<sub>27</sub> );
- . la résistance de la région N-terminale, quelque soit l'enzyme protéolytique : trypsine, collagénase....

Après traitement chimique par le bromure de cyanogène, un fragment de 66 résidus est également libéré ( peptide CB<sub>1</sub> ). Ce peptide CB<sub>1</sub> est caractéristique : extrémité N-terminale N-bloquée et composition en acides aminés dont la teneur en résidus d'acide glutamique ( ou de glutamine ), proline, alanine et de lysine est élevée. De plus, ce peptide CB<sub>1</sub> est facilement isolé et purifié, soit par RP-HPLC, soit par chromatographie sur colonne de gel filtration de Séphadex G 50 ( la fraction A exclue : cf. paragraphe III C ).

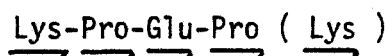
La stratégie, que nous avons alors adoptée, a été de traiter ce peptide CB<sub>1</sub> par deux endopeptidases parmi les plus spécifiques : trypsine et chymotrypsine. La séparation des hydrolysats a ensuite été réalisée par RP-HPLC.

2°) ETUDE DU FRACTIONNEMENT PAR RP-HPLC DE L'HYDROLYSAT TRYPSIQUE :

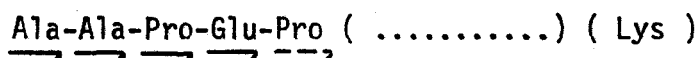
Le peptide CB<sub>1</sub> ( 2 µmoles ) est hydrolysé par la trypsine traitée par le TPCK. L'hydrolysate est fractionné par RP-HPLC sur colonne R<sub>0</sub>-Waters et huit fractions sont obtenues ( Fig.36 ). Des problèmes de solubilisation des échantillons sont à nouveau rencontrés et les différents peptides ne sont isolés qu'avec de faibles rendements. De fortes interactions entre peptides et phase stationnaire de la colonne de RP-HPLC provoquent une augmentation de la pression après chaque dépôt, quelque soit le pouvoir éluant du solvant. La quantité de peptides tryptiques retrouvée est d'autant plus faible que la purification finale est effectuée par rechromatographie par RP-HPLC.

Les contrôles d'homogénéité des peptides et leur caractérisation sont réalisés selon le protocole habituel : étude des compositions en acides aminés et identification de deux cycles de dégradation de Edman ( Tableau X ). La dégradation automatique de Edman n'a pu être conduite que sur trois des peptides tryptiques du fragment CB<sub>1</sub> ( peptide BT ) :

\* Le peptide BT<sub>2</sub> qui donne la séquence

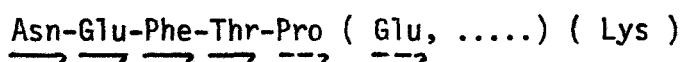


\* Le peptide BT<sub>3</sub> de 18 résidus possédant un enchaînement Ala-Ala en position N-terminal, contenant de la phénylalanine. Ce peptide n'a pas été identifié totalement et donne la séquence :



Seulement 5 résidus sont donc identifiés sans ambiguïté. La proximité de deux résidus de proline ayant abaissé considérablement le rendement répétitif de la dégradation automatique de Edman.

\* Le peptide BT<sub>6</sub> de 12 résidus qui contient deux résidus de phénylalanine donne la séquence :



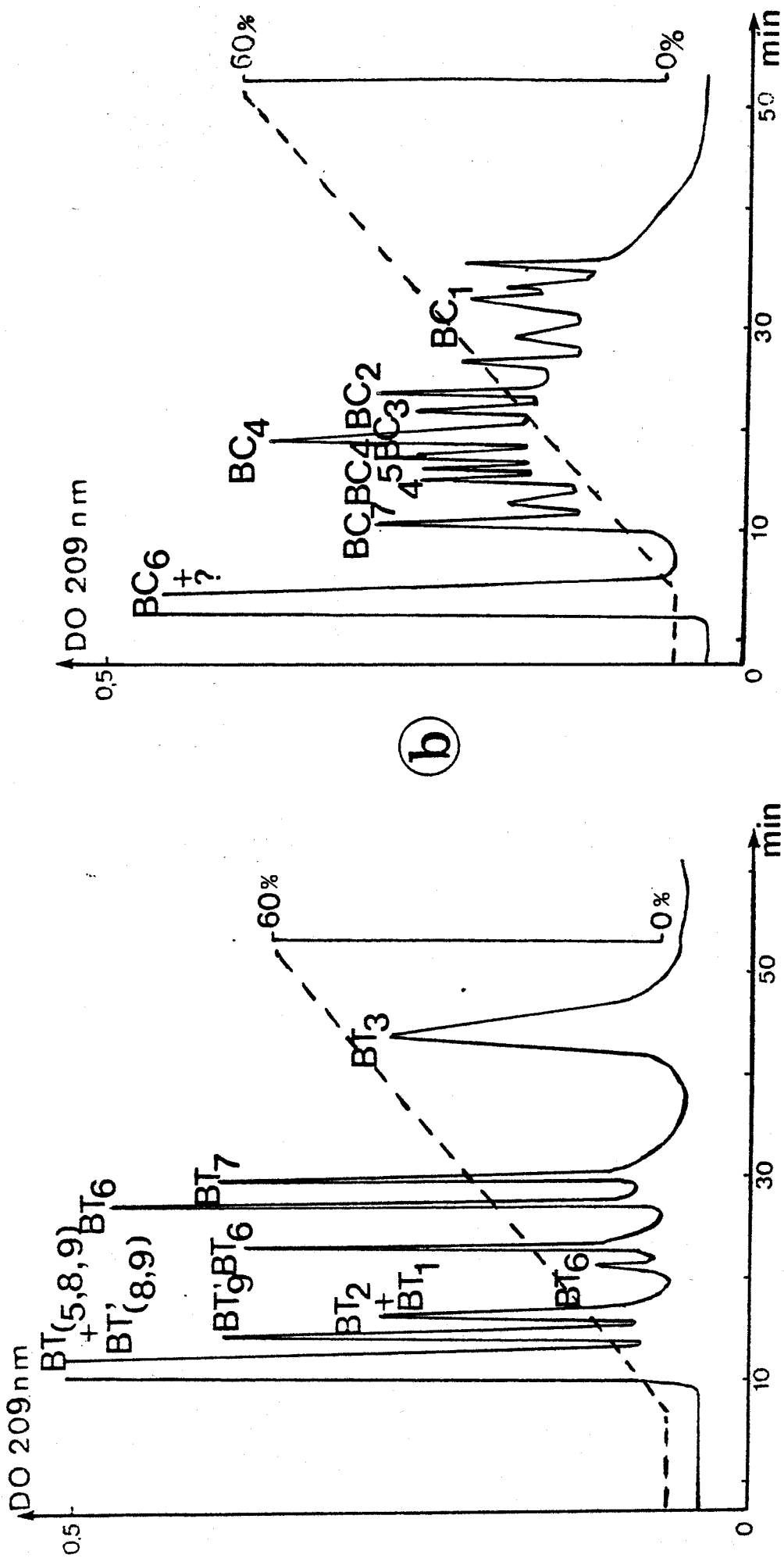


FIGURE 36 : Séparation par RP-HPLC sur colonne Beckman Altex C<sub>8</sub> ( 250 x 4 mm ) à un débit de 0,7 ml/min avec un gradient de 0 à 60% de 1-propanol/ TFA 0,1% :

- (a) de l'hydrolysate tryptique de CB<sub>1</sub>
- (b) de l'hydrolysate chymotrypsique de CB<sub>1</sub>





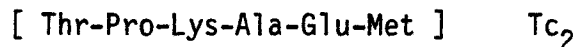
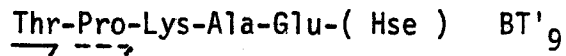
CARACTERISATION DES BT-PEPTIDES

	BT <sub>2</sub>	BT <sub>3</sub>	BT <sub>4</sub>	BT <sub>5</sub>	BT <sub>6</sub>	BT <sub>7</sub>	BT <sub>8</sub>	BT' <sub>8</sub>	BT <sub>9</sub>	BT' <sub>9</sub>
Asx			1,9		1,8	1,5				1,5
Thr			0,8		1,5		0,6	0,7		0,7
Ser			0,8			1,6				0,7
Glx	1,0	3,4	3,1		3,9	1,6		1,2	1,3	2,3
Pro	1,7	6,8	1,2		1,1		0,8	0,9		1,0
Gly										
Ala		7,6	1,1			1,2		1,1	0,7	1,3
Cys/2										
Val										
Met								Hse	Hse	Hse
Ile				0,7	0,9					
Leu			1,0			1,0				1,0
Tyr						0,6				0,5
Phe		0,9	1,2		1,5	1,0				0,7
His										
Lys	1,6	1,0	1,0	1,0	1,0		1,0	1,0		1,0
Arg						1,0				0,7
TOTAL	5	18	12	2	12	8	3	6	3	14
N-TERMINAL	Lys	Ala	Ala	Ile	Asn	N.D.	Thr	Thr	Ala	Ala



TABLEAU X : COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES TRYPSIQUES OBTENUS APRES HYDROLYSE DU PEPTIDE CB<sub>1</sub> DE L'ALC-L<sub>27</sub> ( BT-PEPTIDES ) ET LEUR EXTREMITE N-TERMINALE ( PTH ).

Quant aux autres peptides trypsiques, ils sont tous élués dans la première fraction dans le profil de RP-HPLC. Il est alors très difficile de les purifier même en changeant de colonne et de gradient d'élu-tion. Toutefois, un seul des peptides dont la composition révèle la présence de lysine, d'alanine, de proline, d'homosérine et d'acide glutamique ( ou glutamine ) et l'enchaînement Thr-Pro a néanmoins été établi et placé en position C-terminale du peptide CB<sub>1</sub> ( position 61-66 ). Il s'agit d'un produit d'hydrolyse trypsique incomplète dont une partie de la séquence a été préalablement déterminée lors de l'étude du peptide Tc<sub>2</sub>. La séquence que nous pouvons donc proposer est :



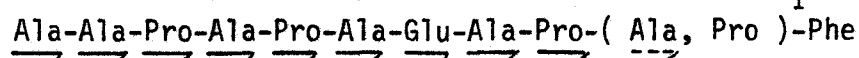
### 3°) ETUDE DU FRACTIONNEMENT PAR RP-HPLC DE L'HYDROLYSAT CHYMOTRYPSIQUE :

Après action de la chymotrypsine sur le peptide CB<sub>1</sub>, l'hydrolysat est fractionné par RP-HPLC sur colonne RO-Waters ( Fig. 36 ). Comme dans le cas de l'hydrolysat trypsique, les peptides chymotrypsiques ( BC-peptides ) ont été caractérisés par leur composition en acides aminés et leurs acides aminés en position N-terminale ( Tableau XI ).

Nous avons pu isoler des quantités suffisantes pour déterminer la structure primaire de plusieurs d'entre eux :

\* Un peptide BC<sub>1</sub> de 20 résidus dont l'extrémité N-terminale est bloquée. Ce peptide est soumis à l'hydrolyse par la trypsine et deux sous-fragments sont alors obtenus. L'un d'entre eux a son extrémité N-bloquée tandis que l'autre possède un résidu d'alanine en position N-terminale. Dans ces conditions, la trypsine n'a pas hydrolysé la liaison Lys-Lys ( résidu en position 3 et 4 ) du peptide CB<sub>1</sub> alors que pour la chaîne légère totale l'hydrolyse avait effectivement eu lieu ( cf. paragraphe B ).

Le mélange des deux peptides ( le peptide N-terminal N-bloqué et celui libéré par action de la trypsine ) a pu être étudié directement en séquence automatique. La présence de trois résidus de proline ayant à chaque fois fait chuter considérablement le rendement répétitif de la dégradation de Edman, nous n'avons pu identifier que 9 cycles. D'après la composition en acides aminés du peptide repurifié en RP-HPLC une séquence hautement probable peut être proposée pour BC<sub>1</sub>T :



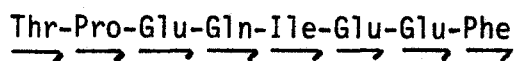
CARACTERISATION DES BC-PEPTIDES

	BC <sub>1</sub>	BC <sub>2</sub>	BC <sub>3</sub>	BC <sub>4</sub>	BC <sub>5</sub>	BC <sub>7</sub>
Asx		1,4	2,1			1,2
Thr		1,2		1,3		0,7
Ser						
Glx	2,3	4,3	1,8	3,7	1,5	1,5
Pro	6,8	2,1		1,4		0,7
Gly						
Ala	6,2	1,8	0,9		1,3	0,7
Cys/2						
Val						
Met						Hse
Ile			0,6	0,6		
Leu		1,2				
Tyr						
Phe	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	
His						
Lys	2,4	1,2	1,5		0,8	1,3
Arg						0,7
TOTAL	20	14	9	8	4	8



TABLEAU XI : N-TERMINAL N.D. Ala Asp Thr Lys Asp  
 COMPOSITIONS EN ACIDES AMINES DES PEPTIDES CHYMO TRYPSIQUES  
 OBTENUS APRES HYDROLYSE DU PEPTIDE CB<sub>1</sub> ( BC-PEPTIDES ) ET  
 LEUR EXTREMITE N-TERMINALE ( PTH ).

\* Un peptide BC<sub>4</sub> de sept résidus dont la séquence est :



que nous situons en position 45-51. Ce peptide BC<sub>4</sub> est retrouvé dans trois fractions HPLC différentes ( Fig. 36 ) sans doute en raison de la présence d'un résidu de glutamine ( ce peptide est plus ou moins désamidé ).

Les résultats de la séquence probable de la région N-terminale, c'est à dire des peptides BC et TC, en tenant compte des compositions en acides aminés, peuvent alors être présentés ( Fig. 37 ).

#### 4°) CONCLUSION : STRUCTURE PRIMAIRE PROBABLE DE L'ALC-L<sub>27</sub> :

En fonction des données accumulées, nous pensons pouvoir proposer la structure primaire de l'ALC-L<sub>27</sub> de la myosine ventriculaire gauche de coeur de Porc ( Fig. 38 ). La séquence elle-même explique les difficultés que nous avons rencontrées et qui proviennent pour l'essentiel de l'existence de nombreux résidus de proline dans la partie N-terminale. L'hydrolyse enzymatique génère souvent des peptides hydrophobes difficiles à préparer, à purifier et à séquencer mais aussi des peptides riches en résidus chargés de caractère physico-chimique fort différent et donc difficiles à fractionner. La nécessité de recourir à toute une série de clivage ou de plans de purification, chacun amenant un à deux peptides utiles, a rendu aussi l'intégration et la présentation difficile.

Mais on sait que lors de la détermination de la structure primaire des chaînes légères alcalines de la myosine cardiaque pour d'autres espèces de Mammifères supérieurs ( Boeuf : Weeds 1975 [130] ; Homme : Léger et al 1981 [62] ), il avait été impossible de proposer une structure même approximative de la région N-terminale, partie la plus difficile à traiter.

Sans doute, cette région N-terminale par sa séquence exemplaire confère-t-elle un rôle biologique important à ce type de chaîne légère ALC et, peut être, comme le propose Wagner et Weeds 1977 [123], lui confère-t-elle la possibilité d'influencer l'activité ATPasique dépendante de l'actine.

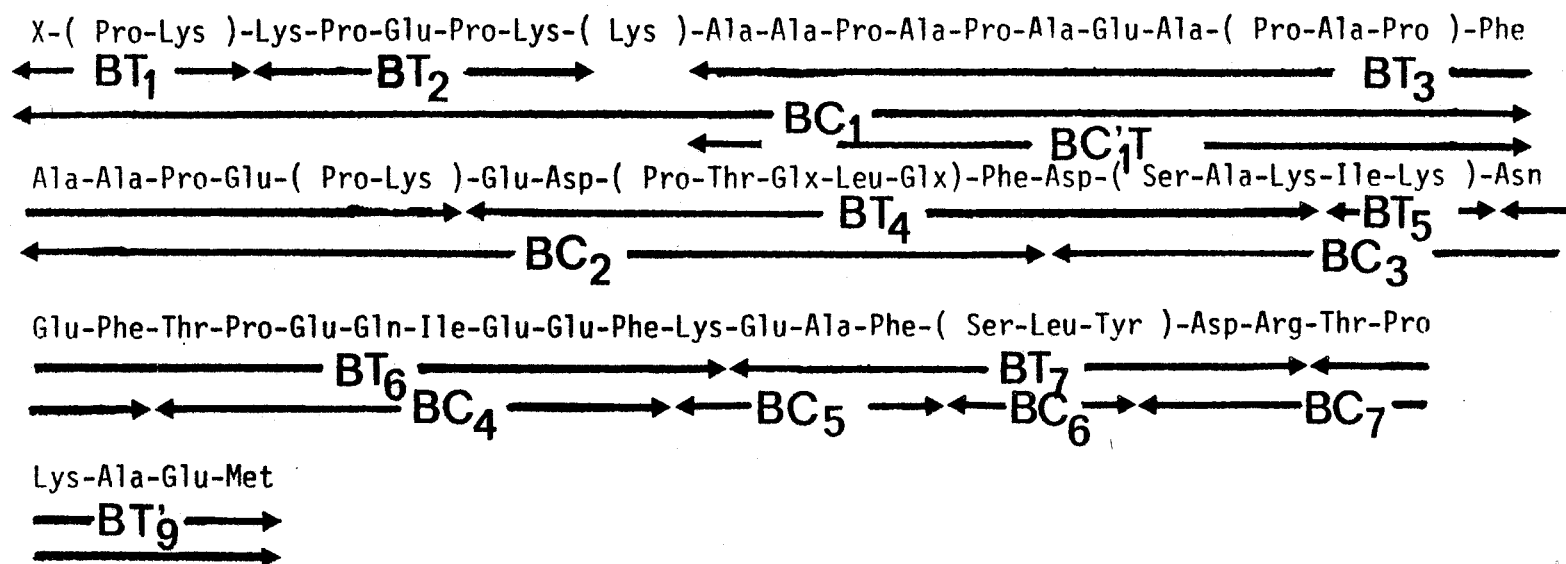
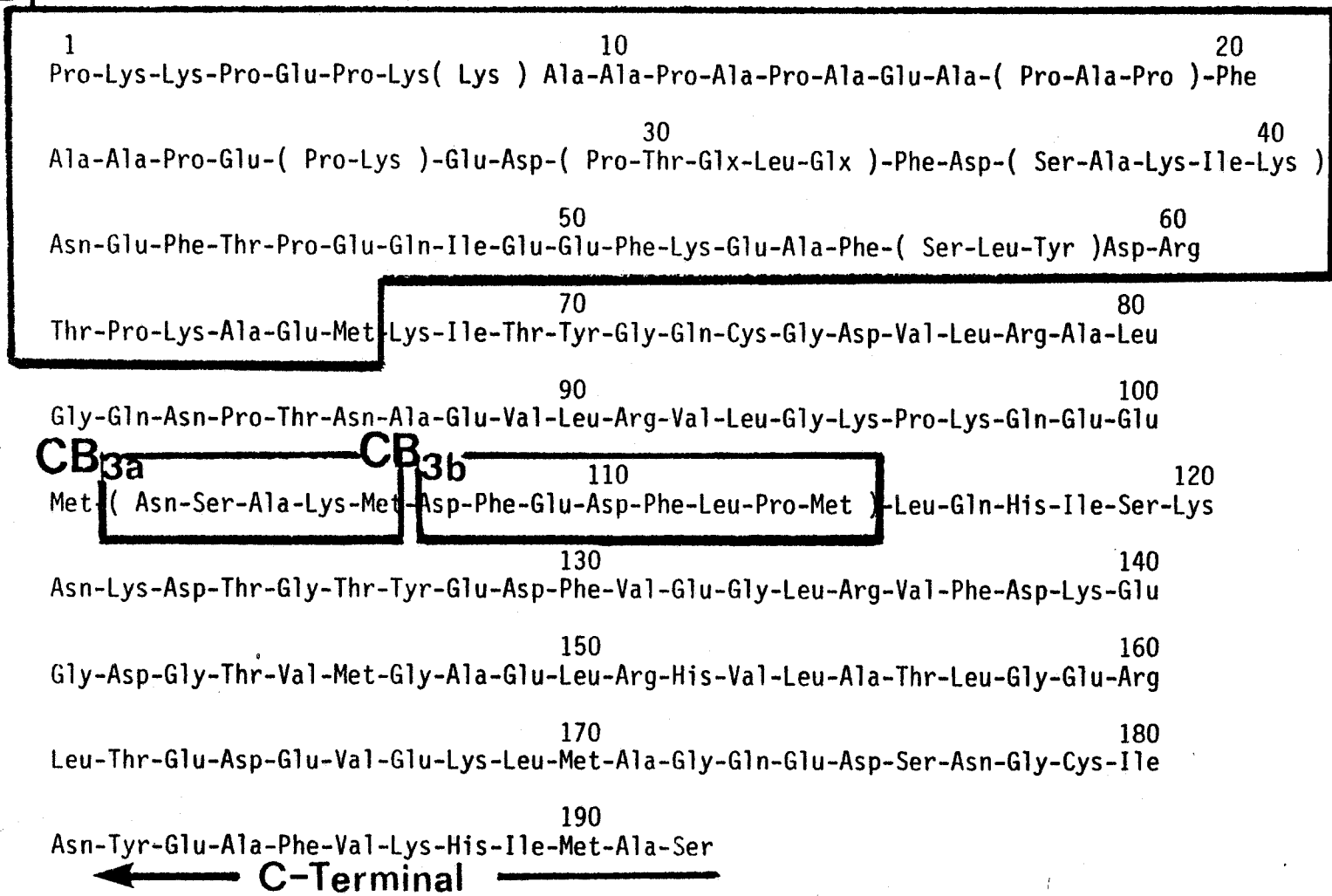


FIGURE 37 : SEQUENCE EN ACIDES AMINES DE LA REGION N-TERMINALE DE L'ALC-L<sub>27</sub> ( position 1 - 66 )

Cette séquence a été établie en tenant compte des compositions en acides aminés et des éléments de séquence des BT- et BC-peptides obtenus à partir des hydrolysats tryptiques et chymotryptiques du peptide CB<sub>1</sub> ( fragment N-terminal de l'ALC-L<sub>27</sub> obtenu par RP-HPLC après action du BrCN )



CB<sub>1</sub>



- 115 -

FIGURE 38 : SEQUENCE EN ACIDES AMINES PROPOSEE POUR L'ALC-L<sub>27</sub> DE LA MYOSINE VENTRICULAIRE GAUCHE DE COEUR DE PORC

Les acides aminés entre parenthèses ( ) ont été placés en tenant compte des compositions en acides aminés de différents peptides . La séquence des régions encadrées , soulignées a été traitée dans le paragraphe III-E



## PARTIAL AMINO ACID SEQUENCE OF PIG HEART LEFT VENTRICULAR MYOSIN LIGHT CHAIN L<sub>27</sub>

X. GRANDIER-VAZEILLE,\* D. TETAERT,\* B. HEMON,\*  
K. K. HAN\* and G. BISERTE\*\*

\*Unité I.N.S.E.R.M. No 16 place de Verdun, F 59045 Lille Cédex, France  
\*\*Unité I.N.S.E.R.M. No 124 & Institut de Recherches sur le Cancer de Lille, B.P.,  
311 F 59045 Lille Cédex, France

### ABSTRACT

In order to determine the role of Ca<sup>2+</sup>-binding sites conformation in the control of ATPase activity, the partial amino acid sequence of the pig heart left ventricular myosin light chain L<sub>27</sub> has been compared with the sequence of rabbit skeletal muscle myosin light chain L<sub>25</sub> and the partial sequence of beef cardiac myosin light chain L<sub>27</sub>.

### KEYWORDS

Pig heart - Myosin - Cardiac left ventricular myosin light chain L<sub>27</sub> - Amino acid sequence.

### INTRODUCTION

Myosin is the protein responsible for the transduction of chemical energy (ATP) to force generation in muscle contraction. The rod-shaped myosin molecule is composed of two heavy-chains (200,000 daltons) divided at one end into two globular regions on which light chains are associated. In the case of pig cardiac myosin, two different types of light chains (27,000 and 18,000 daltons) are found and are referred to as L<sub>27</sub> and L<sub>18</sub> (Grandier-Vazeille, 1978). It has been shown that there is extensive homology of amino acid sequence between rabbit skeletal muscle myosin light chain L<sub>25</sub>, beef cardiac myosin light chain L<sub>27</sub>, rabbit troponin C and a calcium-binding parvalbumin from carp (Collins, 1974 ; Weeds, 1974 ; Tufty, 1975 ; Weeds, 1975), which indicates that these proteins may have evolved from a common precursor having characteristic Ca<sup>2+</sup>-binding sites. Moreover, it has been suggested by several authors (Dreizen, 1970 ; Wagner, 1976) that myosin light chain is involved in the control of the ATPase activity. The ATPase activity and the light chain composition of myosins differ in the same muscle of various animal species and for different muscles of the same species. The present study on primary structure of pig cardiac left ventricular myosin light chain L<sub>27</sub> has been carried out to obtain informations on possible differences in the Ca<sup>2+</sup>-binding sites conformation and on the evolutionary role of additional peptides between L<sub>25</sub> and L<sub>27</sub>.

### MATERIAL AND METHODS

Preparation of the left ventricle free wall myosin, isolation of the light chains

and homogeneity tests of  $L_{27}$  were already described elsewhere (Grandier-Vazeille, 1978). Tryptic digestion, tryptic peptides fractionation, tryptic peptides isolation and subfractions purity criteria were performed as described previously (Han, 1970). N-terminal residue was identified by dansylation according to Gray and Hartley (1963). Amino acid composition was established after complete acidic hydrolysis (24 and 72 hrs). Quantitative analysis was carried out on JEOLCO 5 AH amino acid analyzer.

### RESULTS

Each of the pig cardiac myosin light chains isolated by preparative polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) was obtained with a good yield (40 to 50 mg per g of myosin) and in a high degree of purity as shown by their homogeneity in SDS-PAGE (Fig. 1).

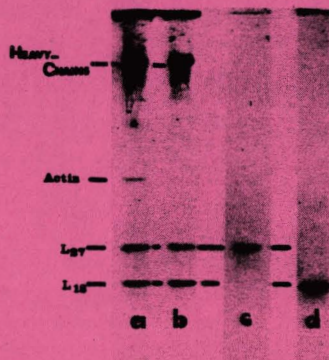


Fig. 1 : SDS-polyacrylamide gels (5 - 30 %) of pig cardiac actomyosin (a), pig cardiac myosin (b), light chain  $L_{27}$  (c), light chain  $L_{18}$  (d).

Another purity criteria used was the analysis of the largest cyanogen bromide fragments. The largest fragments of  $L_{27}$  ( $A_{27}$ ) and  $L_{18}$  ( $A_{18}$ ) shown on the Sephadex G-50 chromatography pattern (Fig. 2), were isolated pure.

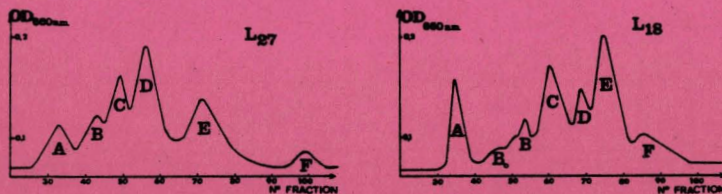


Fig. 2 : Fractionation on Sephadex G-50 of pig cardiac myosin light chain CNBr fragments of  $L_{27}$  and  $L_{18}$ .

The determination of the N-terminal residues gave phenylalanine for the  $A_{18}$  peptide, whereas the corresponding one  $A_{27}$  has a blocked Nterminal residue. Moreover, the amino acid composition of these fragments (Table I) were characteristic. The peptide  $A_{27}$  was rich in alanine, proline and lysine and contained no leucine whereas the peptide  $A_{18}$  was rich in leucine and contained no proline.



	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Gly	Ala	Cys	Val	Met	Ile	Leu	Tyr	Phe	His	Lys	Arg	Trp	N-Ter
A <sub>27</sub>	3	1	1	9	12	1	11	0	1	(1)	3	0	0	0	0	8	0	0	N-Blo
A <sub>18</sub>	6	2	3	14	0	1	7	1	2	(1)	2	6	1	1	0	5	2	0	Phe

Table 1 : Amino Acid Composition and Nterminal Residue Determination of Sephadex G-50 Fraction A of L<sub>27</sub> and L<sub>18</sub> CNBr Fragments.

These results indicated that the peptide A<sub>27</sub> correspond to the proline-rich, N-terminal, N-blocked fragment of L<sub>27</sub>.

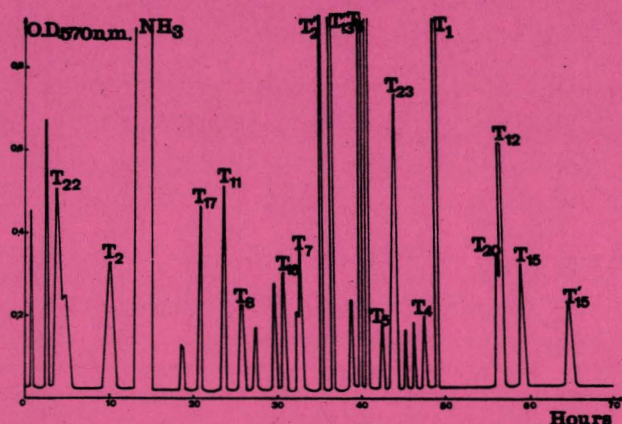


Fig. 3 : Elution pattern on Chromobeads P of pig cardiac myosin light chain L<sub>27</sub> tryptic digest.

After tryptic digestion of L<sub>27</sub> and fractionation of the resulting peptides on Chromobeads P (Fig. 3), the different fractions were pooled and subjected to amino acid analysis and to N-terminal determination. As shown in Fig. 4, peptides were positioned by comparison with two previously published sequences as models (the complete sequence of rabbit skeletal L<sub>25</sub> and the partial sequence of beef cardiac myosin L<sub>27</sub>).

#### CONCLUSION

The data presented here show that using a five-step isolation procedure, the myosin light chains L<sub>27</sub> and L<sub>18</sub>, were obtained with a good yield and in a high degree of purity. The sequence determination of L<sub>27</sub> allowed us to position 19 tryptic peptides, 9 of which without ambiguity. Among these 19 peptides, 7 others were placed according to the homology and the principle of conservative mutations (e.g., Lys 158 vs Arg 158). 10 peptides could not yet be placed within the sequence and need therefore to be sequenced for unambiguous localization.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We are indebted to Professor P. Boulanger for the critical review of the manuscript. We thank Mrs Garet for her expert photographic work. Parts of this work were supported by the grant of D.G.R.S.T. (N°80-7-...)

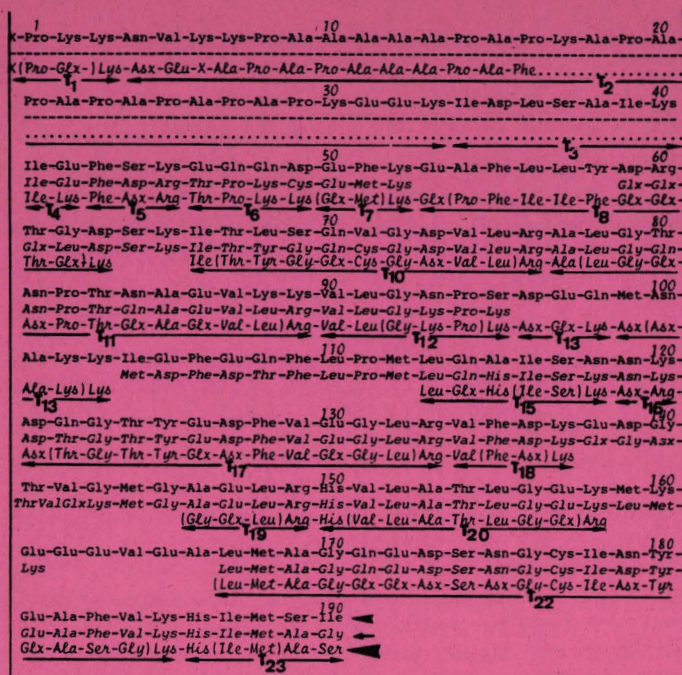


Fig. 4 : Partial amino acid sequence of pig cardiac myosin light chain L<sub>27</sub> (◀). Tryptic peptides order is based on sequence homology with complete rabbit skeletal myosin light chain sequence L<sub>25</sub> (◀) and partial beef cardiac myosin one L<sub>27</sub> (◀).

## REFERENCES

- Collins J.H. (1974). Homology of myosin light chains, troponin C and parvalbumin deduced of their amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **58**, 301-308.
- Dreizen P. and L.C. Gershman (1970). Relationship of structure to function in myosin. Salt denaturation and recombinaison experiments. *Biochemistry*, **9**, 1688-1694.
- Grandier-Vazeille X., D. Tetaert (1978). Isolement des chaînes légères de la myosine cardiaque de Porc par électrophorèse préparative et étude des polypeptides après action du bromure de cyanogène. *Biochimie*, **60**, 409-415.
- Gray W.R. and B.S. Hartley (1963). A fluorescent end-group reagent for proteins and peptides. *Biochem. J.*, **89**, 59 p.
- Han K.K., M. Dautrevaux, X. Chaila and G. Biserte (1970). The covalent structure of beef heart myoglobin. *Eur. J. Biochem.*, **16**, 465-471.
- Tufty R.M. and R.H. Kretsinger (1975). Troponin and parvalbumin calcium-binding regions predicted in myosin light chain and T4 lysozyme. *Science*, **187**, 167-169.
- Wagner P.D. and R.G. Yount (1976). Modification of the alkali light chains of skeletal myosin inhibits actin binding and adenosine cleavage. *J. Biol. Chem.*, **251**, 5424-5426.
- Weeds A.G. and McLachlan (1974). Structural homology of myosin alkali light chains, troponin and carp calcium-binding protein. *Nature*, **252**, 646-649.
- Weeds A.G. (1975). Cyanogen bromide fragments of the cardiac I light chain from bovine myosin : evidence for sequence homology with rabbit skeletal myosin alkali light chain. *FEBS Letters*, **59**, 203-208.

## EVALUATION OF COMMERCIAL RP-HPLC COLUMNS FOR THE SEPARATION OF PEPTIDES FROM PORCINE CARDIAC MYOSIN LIGHT CHAIN L<sub>27</sub>

XAVIER GRANDIER-VAZEILLE, DANIEL TETAERT, BRIGITTE HEMON  
and GÉRARD BISERTE

*Unité INSERM, N° 16 Place de Verdun, F-59045 Lille Cédex, France*

### ABSTRACT

For the separation of large hydrophobic and acidic peptides from pig cardiac left ventricular myosin light chain L<sub>27</sub>, different commercial RP-HPLC (half-preparative and several analytical ones) were tested. To obtain the best separation, different solvent systems has been also investigated. Cyanogen bromide cleavage and limited tryptic digestion produced large peptides (CB and Tc respectively) having uncommon physico-chemical properties. They were powerful probes to evaluate the different commercial RP-HPLC columns. In particular, a good separation with a high yield has been obtained on an R-phenyl column (WATERS). Thus, it has been possible to establish the C-terminal amino acid sequence of L<sub>27</sub>.

### KEYWORDS

Pig cardiac left ventricular myosin light chain L<sub>27</sub> - Reverse phase high pressure liquid chromatography (HPLC) - amino acid sequence.

### INTRODUCTION

To determine rapidly the primary structure of pig cardiac left ventricular myosin light chain L<sub>27</sub>, isolation of large peptides obtained after BrCN cleavage is the main priority. Purification of a small number of large fragments (20 to 66 residues in length) is suitable for automated sequencing. However, the highly hydrophobic and acidic nature of the large peptides from L<sub>27</sub> digest made difficult and, often unsuccessful their separation by conventional methods (Grandier-Vazeille et al., 1980).

We have developed reverse-phase HPLC technique for quantitative isolation of large peptides obtained after cyanogen bromide cleavage and limited tryptic hydrolysis. We have found that several columns from many manufacturers produce different separation and with dramatically different capacity. This paper reports the approach to column evaluation for separation of peptides from the light chain L<sub>27</sub> of pig cardiac left ventricular myosin.

### MATERIALS and METHODS

Methods described by Grandier-Vazeille and Tetaert 1978, were used to purify pig cardiac left ventricular myosin light chain L<sub>27</sub> and to prepare BrCN fragments from carboxymethylated L<sub>27</sub>. Citraconylation of L<sub>27</sub> was performed according to Dixon and Perham 1968, and using TPCK trypsin from Sigma Chemical

Company, limited tryptic hydrolysis was carried out.

The peptides were purified with an high performance liquid chromatography VARIAN 5000 system. The columns (WATERS micro-Bondapak  $C_{18}$  (10  $\mu$ ), MERCK Lichrosorb  $C_{18}$  (5 $\mu$ ) and  $C_{18}$  (7 $\mu$ ), VARIAN Micropak MCH<sub>5</sub> and MCH<sub>10</sub>, SYNCRHOM Inc. Synchronpak RP-P) were equilibrated with 0.0013 M TFA (PIERCE) and eluted at different flow rate with an isocratic or programmed gradient of n-propanol or 2-propanol (CARLO ERBA and MERCK). The elution conditions to test the columns was a linear gradient (0 to 75% 2-propanol/0.0013 M TFA as counter-ion) in 75 min at a flow rate depending of the maximum pressure (less than 3,500 PSI). The peptides were detected by measuring the absorbance at 206 nm with a LKB Uvicord S.

The methods for amino acid analysis, PTH amino acid determination of N-terminal residues and sequence determination of the peptides with a Beckman model 890C sequencer have been described (Sautière et al., 1981).

## RESULTS

The digests obtained after BrCN cleavage and after limited tryptic hydrolysis from pig heart left ventricular myosin light chain "L<sub>27</sub>" have been fractionated by RP-HPLC. Experimental procedures were investigated to find separation conditions of large hydrophobic peptides with good yield on various RP-HPLC columns.

The BrCN digest was first fractionated on RP-HPLC columns such as half-preparative and several analytical. On half-preparative WATERS column, 0.5  $\mu$ moles were applied and eight peaks were obtained (Fig. 1). After amino acid composition and PTH amino-acid determination, only five fractions were identified as polypeptide fractions. However, these fractions (3, 5, 6, 7 and 8) had to be further purified. The fractions (1, 2 and 4) would perhaps correspond to salts or others contaminants.

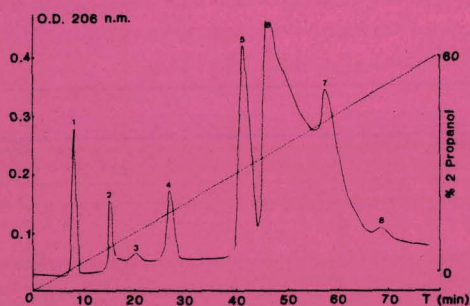


Fig. 1 : Elution profile of BrCN digest of L<sub>27</sub> on half-preparative WATERS HPLC column 2 x (600 x 7.8 mm) with a linear gradient (0 to 75% 2-propanol/TFA 0.0013 M) in 75 min at a flow rate of 3 ml/min.

Several analytical columns were tested with the same condition of elution gradient. For example, on  $C_{18}$  WHATMAN column (Fig. 2a) 40 to 80 nanomoles of BrCN digest were separated in eight heterogeneous fractions. On  $C_{18}$   $\mu$ -Bondapak WATERS column, then fractions were obtained (Fig. 2b) from the same amount of digest. These fractions were not pure according to the PTH-amino acid analysis.

Chromatography on  $C_{18}$  (5 $\mu$ ) MERCK was also performed. If the separation was similar as described above, the capacity of this (7  $\mu$ )MERCK and  $C_{18}$  (5 and 10  $\mu$ ) VARIAN : the capacity of these column was very low. In addition, non-specific adsorption always occurred. For example, if the same amount of digests (40 nanomoles) was applied on the  $C_{18}$  (7 $\mu$ ) MERCK column, the pressure was greatly increased during the fractionation and no peptide was eluted : the column was destroyed after only one injection.

The use of SYNCHROM Inc. Synchron RP-P column led us to separate a larger amount of digest (180 nmoles) with low resolution power of this type of column (Fig. 2c). In order to increase the resolution power of the SYNCHROM Inc. Synchron RP-P column, the conditions of gradient, solvent and flow rate were investigated. The best results were obtained using n-propanol/TFA, with discontinuous gradient and a flow rate of 0.7 ml/min (Fig. 3). Ten peaks were quantitatively but roughly

separated. They have to be further purified by rechromatography.

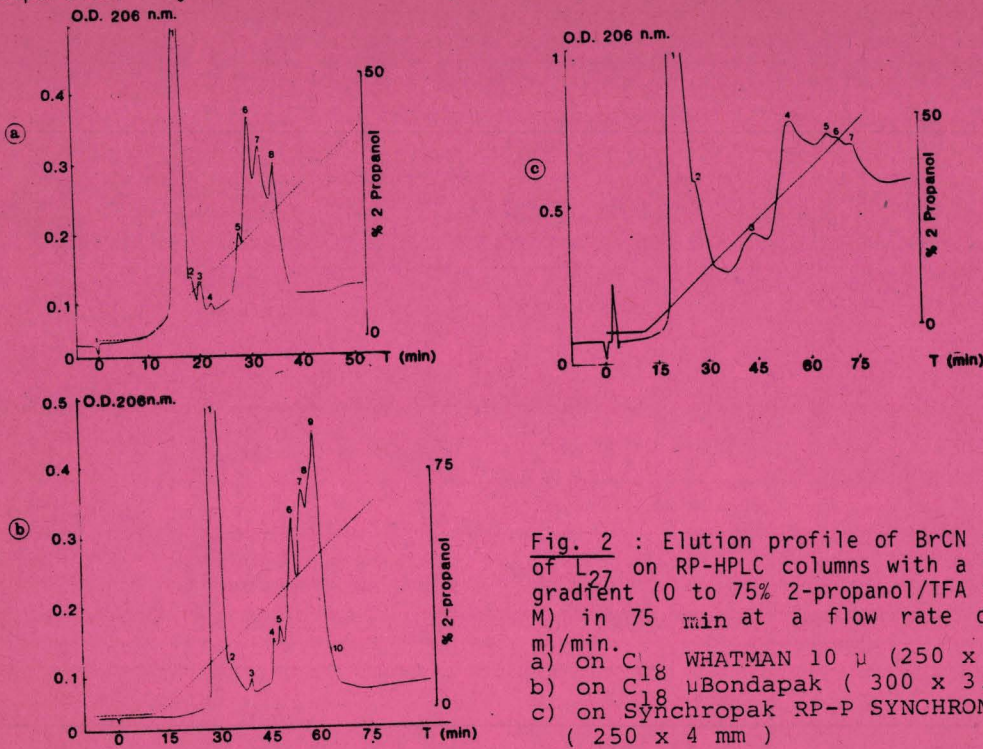


Fig. 2 : Elution profile of BrCN digest of  $L_{27}$  on RP-HPLC columns with a linear gradient (0 to 75% 2-propanol/TFA 0.0013 M) in 75 min at a flow rate of 0.5 ml/min.  
 a) on  $C_{18}$  WHATMAN 10  $\mu$  (250 x 4.6mm)  
 b) on  $C_{18}$   $\mu$ Bondapak ( 300 x 3.9 mm)  
 c) on Synchronapak RP-P SYNCHROM Inc. ( 250 x 4 mm )

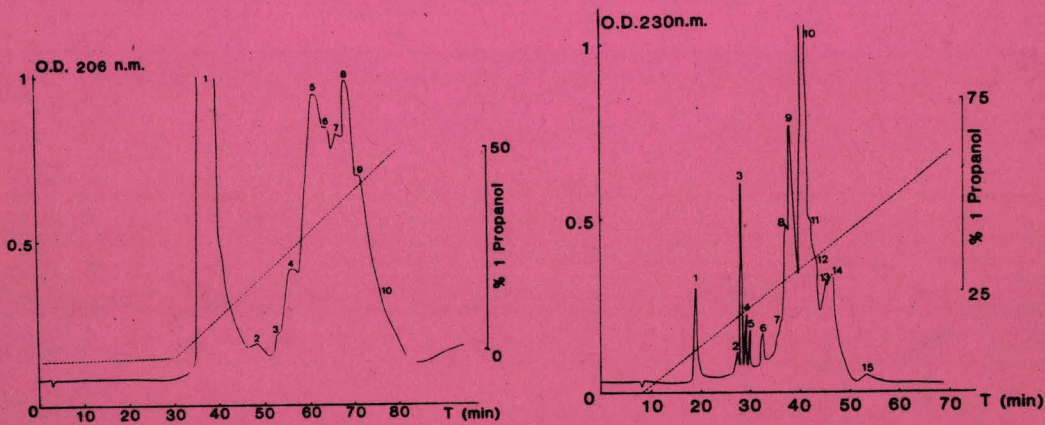


Fig. 3 : Elution profile of BrCN digest of  $L_{27}$  on Synchronapak RP-P SYNCHROM Inc. (250 x 4 mm) with a linear gradient (0 to 70% n-propanol/TFA 0.0013 M) in 70 min at a flow rate of 0.7 ml/min.

Fig. 4 : Elution profile of BrCN digest of  $L_{27}$  on RQ WATERS (300 x 3.9 mm) with a linear gradient 0 to 70% n-propanol/TFA 0.0013 M) in 70 min at a flow rate of 1 ml/min.

The R-phenyl WATERS column, which is scarcely used by others authors, was very powerful for the separation of the BrCN digest from pig heart left ventricular myosin light chain L<sub>27</sub>. If the capacity of this column was slightly lower (100 nmoles), the resolution power was greatly increased (Fig. 4) : fifteen peaks were thus resolved and seven were sharp. After only one rechromatography all the CB-peptides except CB-3 and CB-7 the smaller ones, were purified according our criteria (Table 1) and their amino acid sequence has been established.

	11	10	12	14	8
ASP	4,3	3,7	4,2	1,2	3,1
THR	1,8	4,1	3,5	2,1	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	4,1	1,1
MET (Hsc)	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	1,7	2,1	1,1	1,9	
TOTAL	76,2	7,9	7,32	7,22	7,1
peptide BrCN of respondent	CB <sub>1</sub>	CB <sub>2</sub>	CB <sub>4</sub>	CB <sub>5</sub>	CB <sub>6</sub>

Table 1 : Amino acid composition of BrCN peptides of L<sub>27</sub> purified RQ-HPLC WATERS column.

Identical studies have been performed in order to purify large peptides from limited tryptic digest of L<sub>27</sub> pig cardiac left ventricular light chain. The best conditions of separation and the best yield were those described for the fractionation of BrCN digest : elution of the digest on RQ-WATERS column with a linear gradient of n-propanol/TFA 0.0013 M (Fig. 5). Among the fifteen fractions, nine were major and three (4, 6 and 8) were homogeneous according to our criteria (Table 2). Other fractions were purified by only one step of rechromatography. The pure Tc-peptides were submitted to the automatic EDMAN degradation and their sequence has been established (Fig. 6).

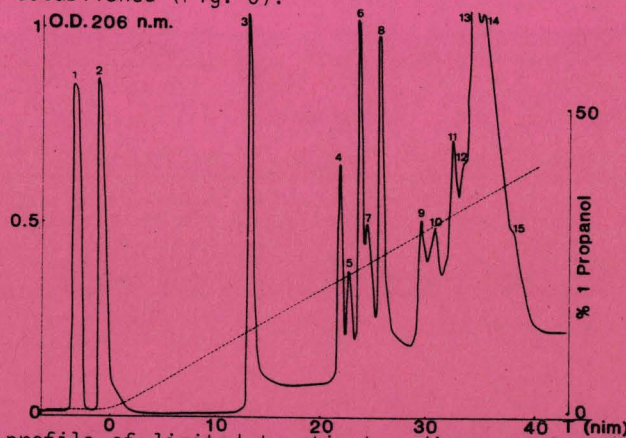


Fig. 5 : Elution profile of limited tryptic L<sub>27</sub> digest on R-phenyl column WATERS (300 x 3.9 mm) with a linear gradient (0 to 70% n-propanol/TFA 0.0013 M) in 70 min at a flow rate of 1 ml/min.



	13	8	6	14	5	4	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	4,2
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		1,5
ARG	0,8	0,9	1,1	1,0	1,1	1,2	
TOTAL	60	18	13	44	15	9	31
TYR	N.D.	Thr	Ala	Val	Val	His	Leu
Peptide							
Tryptique	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							

Table 2 : Amino acid composition of limited tryptic peptides of L<sub>27</sub> on RQ-WATERS column.

DISCUSSION

The present work demonstrate that commercial HPLC columns differ significantly in their abilities to separate with a good yield the large peptides obtained from pig heart left ventricular myosin light chain L<sub>27</sub>. For optimization of RP-HPLC separation of peptide digests, two ways might be undertaken : the analytical separation or the preparative one. For an analytical resolution, comparable separation could be performed with almost all the column tested (C<sub>8</sub> and C<sub>18</sub>) under different solvent and flow rate conditions.

For a preparative purpose, the problem is completely different. For example, half-preparative columns have very high capacity but the resolution power is very low compared to analytical column (C<sub>18</sub> μ-Bondapak WATERS). Evaluation of analytical columns showed that the differences were above all in the capacity and the non-specific adsorption on the matrix. For example though the amount applied on C<sub>8</sub> or C<sub>18</sub> columns MERCK was twice less than on Synchronak RP-P (SYNCHROM Inc.) no peptide has been eluted from the MERCK columns i.e. the MERCK column was "end-use" after one injection.

Before a quantitative given separation, the choice of stationary and mobile phases is an important determinant. Octadecyl silane columns eluted at low flow rate with weak solvent led us to obtain better separation of hydrophilic peptides. On the other hand, better separation of hydrophobic peptides was obtain with octyl silane or R-phenyl silane columns at high flow rate with strong solvent. We found the R-phenyl column to be superior to the other column tested for the resolution and the capacity for pig cardiac left ventricular myosin light chain L<sub>27</sub> digests.

The RP-HPLC technique is very efficient for purification of large hydrophobic and acidic peptides compared to conventional methods. For example, by ion-exchange chromatography or paper electrophoresis, adsorption may occur more strongly on the matrix and often the peptides were not purified quantitatively.

REFERENCES

Dixon H.B.F. and R.N. Perham (1960) *Biochem. J.* 109 312-314  
 Grandier-Vazeille X. and D. Tétaert (1978) *Biochimie* 60 409-415  
 Grandier-Vazeille X., D. Tétaert, B. Hémon, K.K. Han and G. Biserte (1980) *Protides Biol. Fluids Proc. Colloq.* 28 75-78  
 Sautière P., G. Briand, M. Gusse and P. Chevallier (1981) *Eur. J. Biochem.* 119 251-255

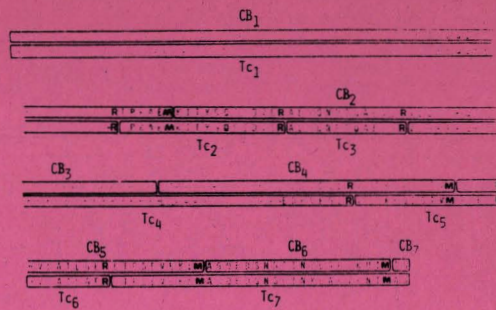


Fig. 6 : Aligment of the L<sub>27</sub> myosin light chain sequence using the sequences of CB and Tc peptides.



## METHODOLOGY FOR PURIFICATION OF LARGE HYDROPHOBIC PEPTIDES BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

XAVIER GRANDIER-VAZELLE and DANIEL TETAERT\*

*Unité INSERM No. 16 and L.A. CNRS 268, Place de Verdun, 59045 Lille Cédex (France)*

### SUMMARY

To aid in structural studies of pig cardiac myosin light chains ( $L_{27}$  and  $L_{28}$ ), a procedure of ion-exchange chromatography (IEC) on Trisacryl M (noted for its high capacity) in combination with reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) and volatile buffers has been developed. In contrast with other IEC methods (resins or HPIC), the use of Trisacryl M facilitates subsequent peptide purifications by RP-HPLC. The advantage of the present combination of techniques is also that it enables the isolation of hydrophobic peptides in high yield, e.g., the N-terminal chymotryptic peptide from  $L_{27}$  was thus purified and, after sub-digestion with trypsin, its sequence has been established.

### INTRODUCTION

Myosin is the principal contractile and structural protein comprising thick filaments in various muscle cells. It consists of two heavy chains ( $\approx 200,000$  daltons) and two pairs of light chains ( $\approx 20,000$  daltons), referred to as the essential (or alkali) pair and the regulatory pair, and denoted respectively as  $L_{27}$  and  $L_{18}$  for pig ventricular myosin<sup>1,2</sup>. The function of the light chains is not clearly understood, but there is a considerable body of evidence to suggest that they in some way determine the enzymatic characteristics of the actomyosin. More information about the role of the light chains could also be obtained by determining their amino acid sequence. However, chemical or enzymatic cleavages of  $L_{27}$  release large hydrophobic peptides, rich in proline and alanine residues: for instance, the N-terminal BrCN peptide ( $C_{B1}$ -peptide: residues 1-66) and the chymotryptic one ( $C_1$ -peptide: residues 1-20). These larger peptides from  $L_{27}$  often behave poorly in conventional chromatographic systems, because of insolubility, aggregation or irreversible adsorption to column materials, although high concentrations of glycerol, detergent or salt have been used<sup>2,3</sup>. In addition, the presence of proline residues in the N-terminal sequence causes significant decreases in the repetitive yields of the Edman degradation.

With the introduction of mobile phases capable of dissolving large denatured peptides, reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) has been developed to optimize both resolution and yield<sup>4</sup>. However, not all peptide mixtures can be resolved by using only one RP-HPLC step<sup>4,5</sup>. A combination of a



preparative technique and RP-HPLC has proved to be a more powerful separation method<sup>5</sup>.

To facilitate the recovery of the hydrophobic CB<sub>1</sub> and C<sub>1</sub> peptides from L<sub>27</sub> (excellent probes for testing purification procedures), we report here the combination of ion-exchange chromatography (IEC) on DEAE-Trisacryl M columns and RP-HPLC, using volatile buffers. Hence, the isolation and characterization of the hydrophobic C<sub>1</sub>-peptide from pig ventricular myosin L<sub>27</sub> light chain could be performed and we were then in a position to establish the N-terminal sequence of cardiac myosin alkali light chain, which has not previously been described for higher vertebrates.

## EXPERIMENTAL

### Chemicals

Bovine trypsin, treated with L-(1-tosylamido-2-phenylethyl) chloromethyl ketone (TPCK) and bovine  $\alpha$ -chymotrypsin, treated with L-(1-tosylamido-2-lysylethyl) chloromethyl ketone (TLCK), were from Sigma. Sequanal grade trifluoroacetic acid (TFA) and reagents for sequence analysis were from Pierce. Ninhydrin and cyanogen bromide were obtained from Merck. Glass-distilled chromatography grade 1-propanol, 2-propanol, ammonia, acetic acid and formic acid were purchased from Carlo Erba. Pyridine was obtained from Merck and purified by refluxing for several hours with ninhydrin and then distilled: only the constant-boiling fraction (b.p. 115.2°C) was collected.

### Sample preparations

Pig cardiac left ventricular myosin light chains (L<sub>27</sub> and L<sub>18</sub>) were purified as described earlier<sup>2</sup>. Following reduction and S-alkylation, the light chain L<sub>27</sub> was dissolved in 70% formic acid and cleaved with cyanogen bromide<sup>2</sup>. Tryptic digestion was performed in 50 mM ammonium bicarbonate buffer pH 8.75 at 37°C for 4 h with an enzyme: substrate ratio of 2:100 (w/v). Chymotryptic digestion was performed in 50 mM ammonium bicarbonate buffer pH 8.0 (adjusted with formic acid) at 37°C for 2 h with an enzyme: substrate ratio of 1:100 (w/w).

### High-performance liquid chromatography

The HPLC method was developed using a Varian Model 5000 system. Peptides were detected with an UV absorbance detector LKB 2238 Uvicord S<sub>II</sub> and were collected with a 202 Gilson collector. The following RP-HPLC columns were used: from Waters Associates, semi-preparative  $\mu$ Bondapak (two 60  $\times$  7.8 mm), C<sub>18</sub>  $\mu$ Bondapak, phenyl (R $\emptyset$ )  $\mu$ Bondapak (30 cm  $\times$  3.9 mm with 10- $\mu$ m packing); from Beckman, 5- $\mu$ m Ultrasphere ODS, Ultrasphere-Octyl (25 cm  $\times$  4.6 mm); from Varian, Micropak MCH<sub>10</sub> and MCH<sub>5</sub> (25 cm  $\times$  4.6 mm); from Merck, LiChrosorb C<sub>8</sub> (25 cm  $\times$  4 mm with 5- and 7- $\mu$ m packings).

L<sub>27</sub> digests were introduced into C<sub>8</sub> and R $\emptyset$ -HPLC columns and eluted at a flow-rate of 1 ml/min. Measurements were made at 226 or 206 nm, in the sensitivity range of 0.5–2.0 absorption units full scale. The following gradient systems were employed: (a) 0.0013 M TFA in water to 60% 1-propanol–0.0013 M TFA or 2-propanol–TFA; 1b) ammonium formate pH 7.8 (1.6 ml of 25% ammonia + 0.25 of

TABLE I

DISCONTINUOUS PYRIDINE-FORMATE GRADIENT USED FOR IEC ON DEAE-TRISACRYL M

Time (h)	Pyridine (M)	pH
0 - 8	0.2	8.4
8 -18.5	0.2	8.4 -6.6
18.5-29.5	0.2-0.6	6.6
29.5-37.5	0.6-1.0	6.6
37.5-41.5	1.0	6.6 -5.25
41.5-55	1.0	5.25-4.0
55 -58.5	1.0	4.0 -3.5
58.5-60.5	1.0	3.5 -3.0
60.5-69	1.0-2.0	3.0

98% formic acid per 2 l water) to 60% 1-propanol. The buffers were filtered through a 0.22- $\mu$ m Millipore membrane before use.

#### *Ion-exchange chromatography*

Separation of peptides by IEC was carried out on DEAE-Trisacryl M (from LKB) columns (25  $\times$  2.5 cm) at a flow-rate of 150 ml/h. The column was preequilibrated with 0.2 M pyridine pH 8.4 and then developed in a discontinuous gradient of pyridine-formate buffer as shown in Table I. The column eluates were automatically monitored (Technicon Autoanalyzer) by a ninhydrin colorimetric assay.

#### *Amino acid analysis*

Amino acid compositions were determined using a Beckman 119 C amino acid analyzer after hydrolysis of the dried peptides with constant-boiling 6 M HCl at 110°C in evacuated sealed tubes for 24 and 72 h. Automated Edman sequence analyses were performed on a Beckman 890 C sequencer. The sequanator program and PTH amino acid determinations have been described<sup>6</sup>.

## RESULTS

#### *Analyses and purity of pig ventricular myosin light chain L<sub>27</sub>*

The myosin light chains were isolated from pig heart left ventricle by preparative polyacrylamide gel electrophoresis as previously described<sup>2</sup>. The purity of L<sub>27</sub> light chain was tested by one-dimensional gel electrophoresis and also by identification of the higher-molecular-weight BrCN peptide CB<sub>1</sub><sup>2</sup>. Because CB<sub>1</sub> failed to release any PTH amino acid in an Edman experiment, it contained the blocked NH<sub>2</sub> terminus of L<sub>27</sub>. (The N-blocked amino acid residue is probably trimethylalanine.) In addition, the high content of proline and alanine residues essentially characterized the N-terminal sequence of L<sub>27</sub> and the CB<sub>1</sub>-peptide<sup>2</sup>.

#### *Separation of L<sub>27</sub> chymotryptic and BrCN digests by direct RP-HPLC*

The peptide mixtures obtained after chymotryptic digestion and cyanogen bromide cleavage from pig heart left ventricular myosin light chain L<sub>27</sub> have been

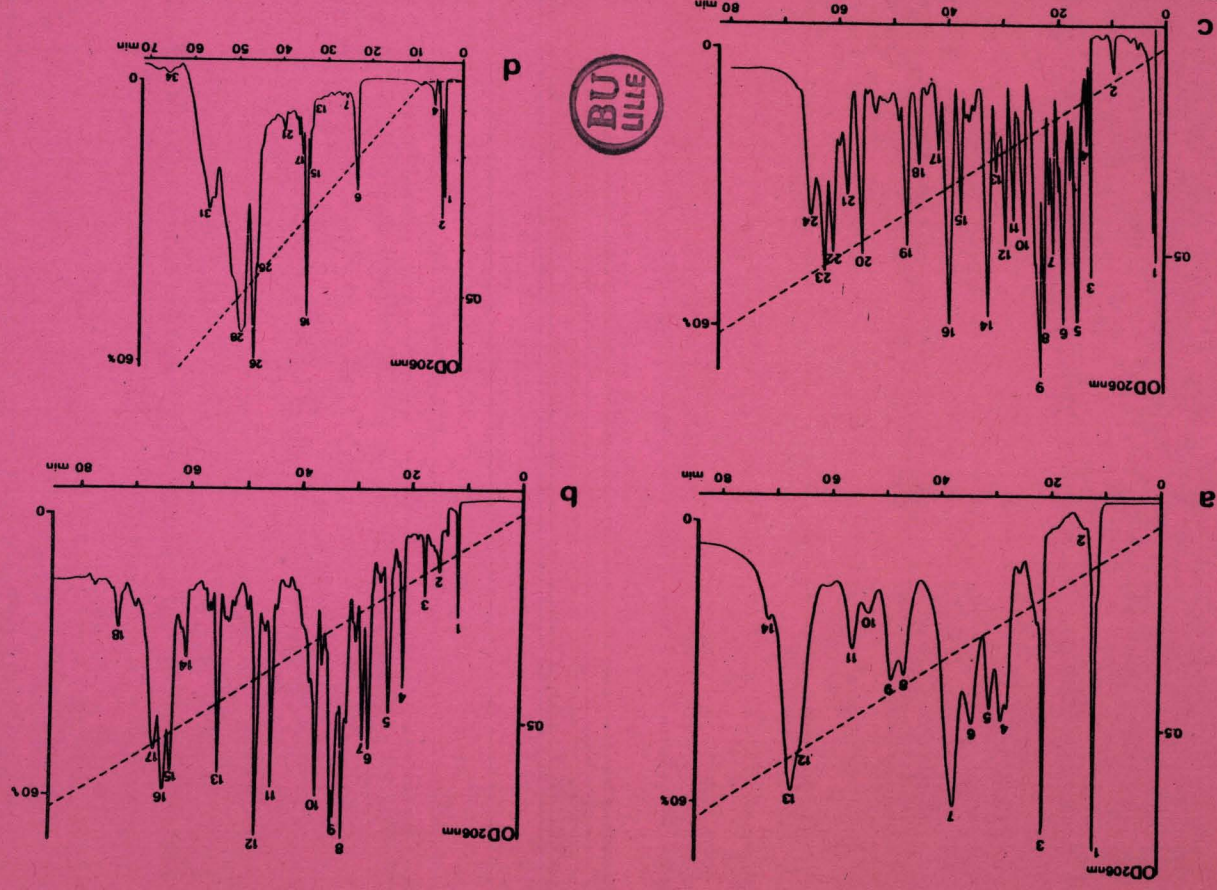


Fig. 1. Separation of chymotryptic peptides from pig left ventricular myosin light chain L<sub>27</sub> by RP-HPLC. a, L<sub>27</sub> chymotryptic digest (0.5  $\mu$ mol) was applied to a Waters  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> semi-preparative column (two 60 cm  $\times$  7.8 mm) and eluted with a 80-min linear gradient from 0 to 60% of 2-propanol in 0.0013 M TFA. Temperature: ambient. Flow-rate: 3 ml/min. b, L<sub>27</sub> chymotryptic digest (80 nmol) was applied to a Waters  $\mu$ Bondapak C<sub>18</sub> column (30 cm  $\times$  3.9 mm with 10- $\mu$ m packing) and eluted with a 80-min linear gradient from 0 to 60% of 2-propanol in 0.0013 M TFA. Temperature: ambient. Flow-rate: 1 ml/min. c, as in b but with a Merck (5- $\mu$ m packing) C<sub>18</sub> column (25 cm  $\times$  4 mm) and at a flow-rate of 0.5 ml/min. d, L<sub>27</sub> cyanogen bromide fragments (100 nmol) was applied to a Waters  $\mu$ Bondapak phenyl column (30 cm  $\times$  3.9 mm with 10- $\mu$ m packing) and eluted with a 70-min linear gradient from 0 to 60% of 1-propanol in 0.0013 M TFA. Temperature: ambient. Flow-rate: 1 ml/min.

separated by RP-HPLC. Different experimental procedures were investigated to find optimal separation conditions for large hydrophobic peptides ( $C_1$  and  $CB_1$ ) on various RP-HPLC columns. Peptide elution was recorded at 206 and 226 nm and the peaks obtained were analyzed for amino acid composition and N-terminal residue.

The chymotryptic digest was first fractionated on the semi-preparative Waters columns; 0.5  $\mu\text{mol}$  were applied and only fourteen peaks were obtained (Fig. 1a). The yield of the isolated fractions, based on the amount of  $L_{27}$  digested, was very low (5–10%). On the other hand, on analytical columns (Waters  $\mu\text{Bonpak}$ , Merck  $C_8$ ) about 30 peaks and shoulders were detected (Fig. 1b,c). The capacity of these analytical columns was low (40–80 nmol of digest) and the hydrophobic peptide  $C_1$  was eluted as a well defined peak at the same gradient position (55% 1-propanol) whatever the analytical column used. However, recoveries of  $L_{27}$  chymotryptic peptides from the analytical columns were similar with about 1/10 of the injected sample. In addition, all the isolated fractions were not pure enough for direct sequence analysis, according to the amino acid compositions and PTH amino acid determinations. It should also be noted that, with other supports tested, one or more of the peptides were not eluted (not shown).

Comparable results were also found for the RP-HPLC fractionation of BrCN peptides from  $L_{27}$  (CB-peptides). Only eight CB-peptides were released from  $L_{27}$ , but their separation was not complete even under optimal conditions (Fig. 1d). Moreover, drastic losses of the hydrophobic peptide  $CB_1$  were observed.

Nevertheless, pure hydrophobic peptides  $CB_1$  and  $C_1$  were isolated by repeated RP-HPLC. Depending on the chromatographic behaviour of the peptide mixture, the elution gradient was optimized for each hydrolysate or rechromatography (not shown). The amount of peptide was not sufficient for subsequent amino acid analyses of the N-blocked sequences. In addition, the peptides were obtained at several retention times due to desamidation and/or the presence of homoserine lactone.

#### *Isolation of the $C_1$ -peptide*

In performing IEC on DEAE-Trisacryl M, our objective was to purify quantitatively the N-blocked  $C_1$ -peptide generated by chymotrypsin digestion of  $L_{27}$ . The chymotryptic digest (5  $\mu\text{mol}$ ) was applied to the DEAE-Trisacryl M column and, using volatile buffers (pyridine-formate), the elution pattern obtained after ninhydrin reaction revealed nine major fractions (1–9) and nine minor fractions (A–K) (Fig. 2). These fractions were analyzed for amino acid composition and PTH amino acid determination. Fraction 3, well separated from the others, contained mainly the  $C_1$ -peptide. Because of the large amount (4  $\mu\text{mol}$ ) of fraction 3 isolated by IEC on DEAE-Trisacryl M, the  $C_1$ -peptide could be further purified by RP-HPLC. Despite the greater eluting power of 1-propanol relative to other solvents, the  $C_1$ -peptide was eluted at high concentration (55% 1-propanol) and emerged as a broad peak (Fig. 2B). Nevertheless, RP-HPLC was the most efficient procedure for the final purification step of the  $C_1$ -peptide. The amount of sample isolated (1  $\mu\text{mol}$ ) was sufficient for subsequent amino acid analyses, different subdigestions and sequence analyses.

#### *Determination of $C_1$ -peptide amino acid sequence*

To confirm the probable N-blocked covalent structure of  $L_{27}$  reported earlier using sequence homology<sup>3</sup>, the  $C_1$ -peptide was subdigested with trypsin. Although

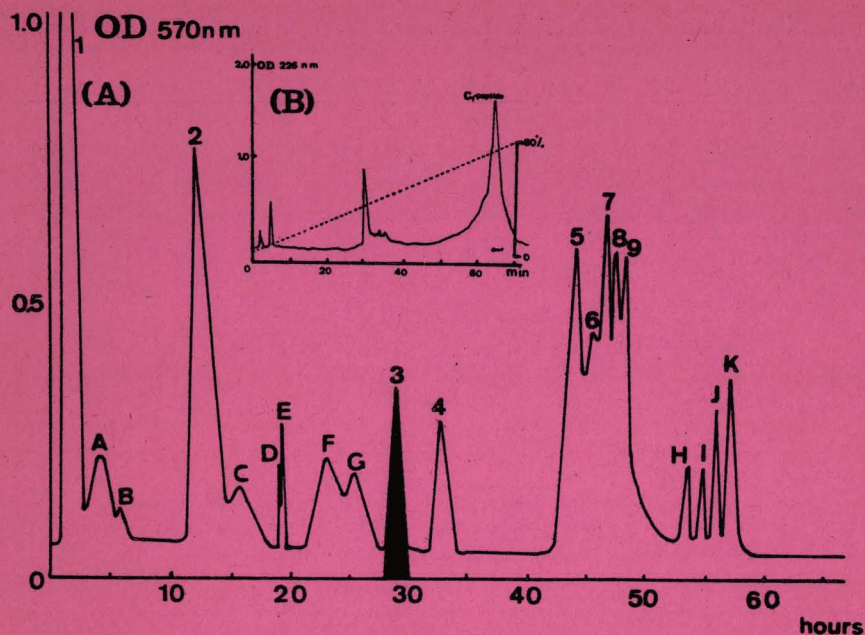
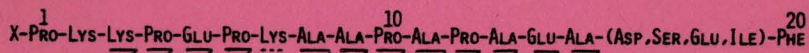


Fig. 2. Separation of the chymotryptic digest from pig left ventricular myosin light chain  $L_{27}$  on DEAE-trisacryl M and purification of the  $C_1$ -peptide by RP-HPLC. A,  $L_{27}$  chymotryptic digest ( $5 \mu\text{mol}$ ) was applied to a DEAE-Trisacryl M ion-exchange (column  $25 \times 2.5 \text{ cm}$ ) and eluted with the discontinuous pyridine-formate gradient described in Table I at room temperature and with a flow-rate of  $150 \text{ ml/h}$ . The elution profile was obtained after ninhydrin reaction. B (inset), Fraction 3 from the IEC on DEAE-Trisacryl M was lyophilized, then dissolved in  $0.2 \text{ ml}$  water containing  $0.0013 \text{ M}$  TFA and applied to a Waters  $\mu\text{Bondapak}$  phenyl column ( $30 \text{ cm} \times 3.9 \text{ mm}$ ). It was eluted with a 70-min linear gradient of 0 to 60% 1-propanol in  $0.0013 \text{ M}$  TFA at a flow-rate of  $1 \text{ ml/min}$ .

#### $C_1$ -PEPTIDE



#### AMINO ACID COMPOSITION OF THE $C_1$ -PEPTIDE

ASP	1.3	( 1 )
SER	0.9	( 1 )
GLU	3.3	( 3 )
PRO	4.9	( 5 )
ALA	4.7	( 5 )
ILE	1.4	( 1 )
PHE	1.2	( 1 )
LYS	2.5	( 3 )

Fig. 3. Amino acid composition of the  $C_1$ -peptide from pig ventricular light chain  $L_{27}$ . The residues underlined with an arrow were determined by automatic Edman degradation. The composition was established after hydrolysis for 24 and 72 h with  $6 \text{ M}$  HCl. Amino acid residues are numbered according to Frank and Weeds<sup>13</sup>. X represents the N-blocked residue (trimethylalanine).

the Lys-Lys (residues 2 and 3) and the Lys-Ala (residues 7 and 8) sequences have been characterized, the C<sub>1</sub>-peptide was only cleaved by trypsin at Lys-7 (Fig. 3): preliminary RP-HPLC fractionations led us to obtain two tryptic peptides and the uncleaved C<sub>1</sub>-peptide. The tryptic digest from the C<sub>1</sub>-peptide was thus submitted to automatic Edman degradation. Despite the presence of proline residues (positions 10 and 12), eight residues were identified. According to the amino acid composition and sequence determination, the N-terminal sequence of the alkali light chain L<sub>27</sub> from pig ventricular myosin was identified with high accuracy (Fig. 3).

#### DISCUSSION

As a part of our interest in the structure of contractile proteins, we have reported on the primary structure of ventricular myosin light chains from higher vertebrates<sup>2,7</sup>. Attempts to determine the complete amino acid sequence of cardiac myosin light chain from higher vertebrates (human and beef<sup>8,9</sup>) were unsuccessful because of the hydrophobic and acidic character of L<sub>27</sub>, particularly of its N-blocked terminal part.

Since the development of HPLC, new possibilities exist for purifying hydrophobic peptides<sup>4,10</sup>. Although RP-HPLC has proven to be a fast and efficient method, separations of large hydrophobic peptides can pose special problems. For example, the recovery of our pig L<sub>27</sub> hydrophobic peptides from RP-HPLC was not great<sup>11</sup>. In addition, a mixture of about 30 chymotryptic peptides from L<sub>27</sub> was not completely resolved in one RP-HPLC step. After repeated RP-HPLC the yields decreased and the elution of the same peptide often gave more than one HPLC peak (due to chemical changes).

We have developed a combination of IEC on Trisacryl M (a new support noted for its high capacity) with RP-HPLC and volatile buffers. Elution of the Trisacryl M column by pyridine and formic acid allowed the use of gradients with easily adjustable pH and/or ionic strength over a very wide range. The application of this chromatographic procedure had several advantages compared with other IEC methods of peptide purification: easy recovery of sample (without desalting steps) by evaporation or lyophilization, high yields, speed (using a high flow-rate at moderate pressure), flexibility, resolution, sensitivity (reactions with fluorescamine and *O*-phthalaldehyde were also commonly performed) and chemical stability of the column material.

It should be noted that with other ion exchangers, *e.g.*, polystyrene resin, the particles of resin and peptides interacted and they were eluted in the same fractions<sup>3</sup>. This non-specific adsorption prevented any subsequent RP-HPLC fractionation. In contrast, combination of IEC on Trisacryl M and RP-HPLC has been used with excellent results for separation of hydrophobic and/or neutral peptides, for example, those generated from the pig cardiac myosin light chain L<sub>18</sub> and using SP-Trisacryl M support (not shown).

In this novel combination of methods, HPLC remained the most suitable step in the purification procedure. It allowed us to isolate homogeneous peptide samples of unexpectedly high quality for sequence analysis. However, we have found our IEC procedure to be a useful and complementary addition to the limited set of methods currently available to purify large peptides. For example, the Trisacryl M chromato-

graphy enabled us to isolate the L<sub>27</sub> N-terminal chymotryptic C<sub>1</sub>-peptide in high yield. Despite the presence of charged amino acids (three Lys, three Glu and one Asp), this C<sub>1</sub>-peptide had similar chromatographic behaviour to the very hydrophobic peptides (elution with 55% of 1-propanol). A special conformation and/or the core formed by the proline and alanine residues (8-13) in the C<sub>1</sub>-peptide certainly must contribute to this unusual elution behaviour. Nevertheless, quantitative isolation of the C<sub>1</sub>-peptide enabled us to establish its sequence. The determination of this N-terminal sequence of pig alkali light chain L<sub>27</sub>, not previously reported for any higher vertebrate cardiac myosin light chain, was the most difficult part of the L<sub>27</sub> structure. Moreover, this work now in progress has led us to compute, from the L<sub>27</sub> primary structure, the secondary structure of the molecule as well as of its N-terminal part. Additional circular dichroism studies<sup>12</sup> confirmed the calculated secondary structure and explained the contribution of calcium ions to the conformation of the myosin alkali light chain.

## REFERENCES

- 1 S. Sarkar, F. A. Sreter and J. Gergely, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 68 (1971) 946.
- 2 X. Grandier-Vazeille and D. Tetaert, *Biochimie*, 60 (1978) 409.
- 3 X. Grandier-Vazeille, D. Tetaert, B. Hémon, K. K. Han and G. Biserte, *Protides Biol. Fluids Proc. Colloq.*, 28 (1980) 75.
- 4 W. C. Mahoney and M. A. Hermodson, *J. Biol. Chem.*, 255 (1980) 11199.
- 5 D. Tetaert, N. Takahashi and F. W. Putnam, *Anal. Biochem.*, 123 (1982) 430.
- 6 P. Sautière, G. Briand, M. Gusse and P. Chevallier, *Eur. J. Biochem.*, 119 (1981) 251.
- 7 D. Tetaert, X. Grandier-Vazeille, B. Hémon and G. Biserte, *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 3 (1982) 474.
- 8 A. G. Weeds, *FEBS Lett.*, 59 (1975) 203.
- 9 C. Klotz, J. J. Leger and M. Elzinga, *Circ. Res.*, 50 (1982) 201.
- 10 G. E. Tarr and J. W. Crabb, *Anal. Biochem.*, 131 (1983) 99.
- 11 X. Grandier-Vazeille, D. Tetaert, B. Hémon and G. Biserte, *Protides Biol. Fluids Proc. Colloq.*, 30 (1982) 717.
- 12 D. Tetaert, X. Grandier-Vazeille, B. Grandier-Vazeille Hémon, J. P. Aubert and G. Biserte, *Proceedings of 15th FEBS Meeting, Brussels, July 24-29, 1983*, p. 202.
- 13 G. Frank and A. G. Weeds, *Eur. J. Biochem.*, 44 (1974) 317.

# CHAPITRE IV

ETUDE

DE LA STRUCTURE SECONDAIRE

DE LA CHAÎNE LÉGÈRE L<sub>27</sub>

DE LA MYOSINE VENTRICULAIRE

DE COEUR DE PORC



## A - INTRODUCTION

A mesure que paraissaient dans la littérature les résultats d'études de structures primaires et de structures tertiaires des protéines, de nombreux auteurs ont tenté d'établir une corrélation entre structure primaire et configuration des protéines. Parmi toutes les méthodes, celle décrite par Chou et Fasman ( 1974 ) [9] est la méthode de prédiction de conformation actuellement la plus utilisée. Elle s'avère être parmi les plus précises et les techniques physico-chimiques utilisées en contrôle ont d'ailleurs très souvent confirmé les prédictions de conformation établies par cette technique.

Cette approche mathématique a précisé dans un premier temps l'aptitude de chacun des vingt résidus d'acides aminés à adopter ou à favoriser telle ou telle structure conformationnelle selon leur fréquence d'apparition dans un peptide. Cette relation chiffrée fréquence-effet conformationnel a été obtenu de compilations faites sur un grand nombre de protéines de structure tertiaire établie. L'influence réelle dans une conformation donnée a pu être affinée progressivement ( Chou et Fasman 1978 [10] ) et cette méthode autorise aujourd'hui la prédiction de la structure secondaire de peptides mais aussi de protéines en sachant qu'à chaque acide aminé est attribué un coefficient bien précis représentatif de son effet vis à vis de l'une des rubriques suivantes :

hélices  $\alpha$ , feuillets  $\beta$ , coude  $\beta$  ( ou  $\beta$ -turn ), structures inorganisées. Il est tenu compte aussi de l'environnement de chaque acide aminé. Ainsi,

\* pour la recherche des régions hélicoïdales, la chaîne peptidique est " découpée " en groupes de six résidus et il faut que sur ces six résidus, quatre au moins soient initiateurs d'hélice  $\alpha$ , c'est à dire qu'ils aient un coefficient suffisant de probabilité favorisant la formation d'hélice  $\alpha$ . A titre d'exemples, les résidus de proline, d'acide glutamique et d'acide aspartique en position N-terminale du groupe des six résidus ou encore des résidus d'histidine, de lysine ou d'arginine en position C-terminale du peptide de six résidus favorisent la formation d'hélice  $\alpha$ . Par contre, la présence de résidu de proline au milieu ou à l'extrémité C-terminale du groupe de six résidus empêche la formation d'hélice  $\alpha$ .

\* Pour la recherche des feuillets plissés  $\beta$ , la chaîne peptidique est découpée en groupe de cinq résidus et il faut qu'il y ait dans le groupe au moins trois acides aminés possédant un coefficient de probabilité initiateur de structure en feuillets plissés  $\beta$ .

\* Enfin, tout polypeptide de 4 résidus dont la valeur de probabilité conformationnelle est supérieure à celle nécessaire pour affirmer une hélice  $\alpha$  ( généralement supérieure à  $10^{-4}$  ) ou à celle exigée pour un feuillet plissé  $\beta$ , est retenu en catégorie coude  $\beta$ .

Toutes ces données statistiques ont été réunies dans un programme informatique et pour une structure primaire donnée l'ordinateur calcule le coefficient de probabilité pour telle ou telle structure secondaire en tenant compte de la qualité, de la fréquence et de l'effet de voisinage de tous les acides aminés les uns par rapport aux autres.

En considérant la structure primaire proposée pour la chaîne légère ALC-L<sub>27</sub>, nous avons par étude prédictive et par étude expérimentale tenté de préciser sa structure secondaire pour en déduire éventuellement des informations susceptibles de mieux comprendre son rôle biologique.

#### B - PREDICTION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DE LA CHAÎNE LÈGÈRE ALC-L<sub>27</sub> PAR LA MÉTHODE CHOU ET FASMAN

En retenant la structure primaire proposée, en fonction de résultats expérimentaux et des données apportées par la littérature, nous avons pu envisager à l'aide de la méthode de Chou et Fasman l'étude prédictive de la structure secondaire de la chaîne légère ALC-L<sub>27</sub>.

A titre d'exemples, les valeurs obtenues par ordinateur d'une séquence caractéristique de la région toute C-terminale sont données dans le Tableau XII. Dans cette région, la structure secondaire la plus probable est l'existence de 2 hélices  $\alpha$  ( séquence 159-174 et séquence 180-192 ; coefficient de 1,2 à 1,3 ) séparées par une zone coude  $\beta$  ( coefficient de 3,2 en position 175 ).

De la même façon, par approches successives, toute la structure secondaire de l'ALC-L<sub>27</sub> a été étudiée et nous avons pu représenter graphiquement l'ALC-L<sub>27</sub> dans son ensemble ( Fig. 39 ).

L'ALC-L<sub>27</sub> apparaît alors être une molécule très organisée où nous ne trouvons que 1 à 2% de structure inorganisée dite en pelote statistique. Elle semble constituée de deux régions bien individualisées

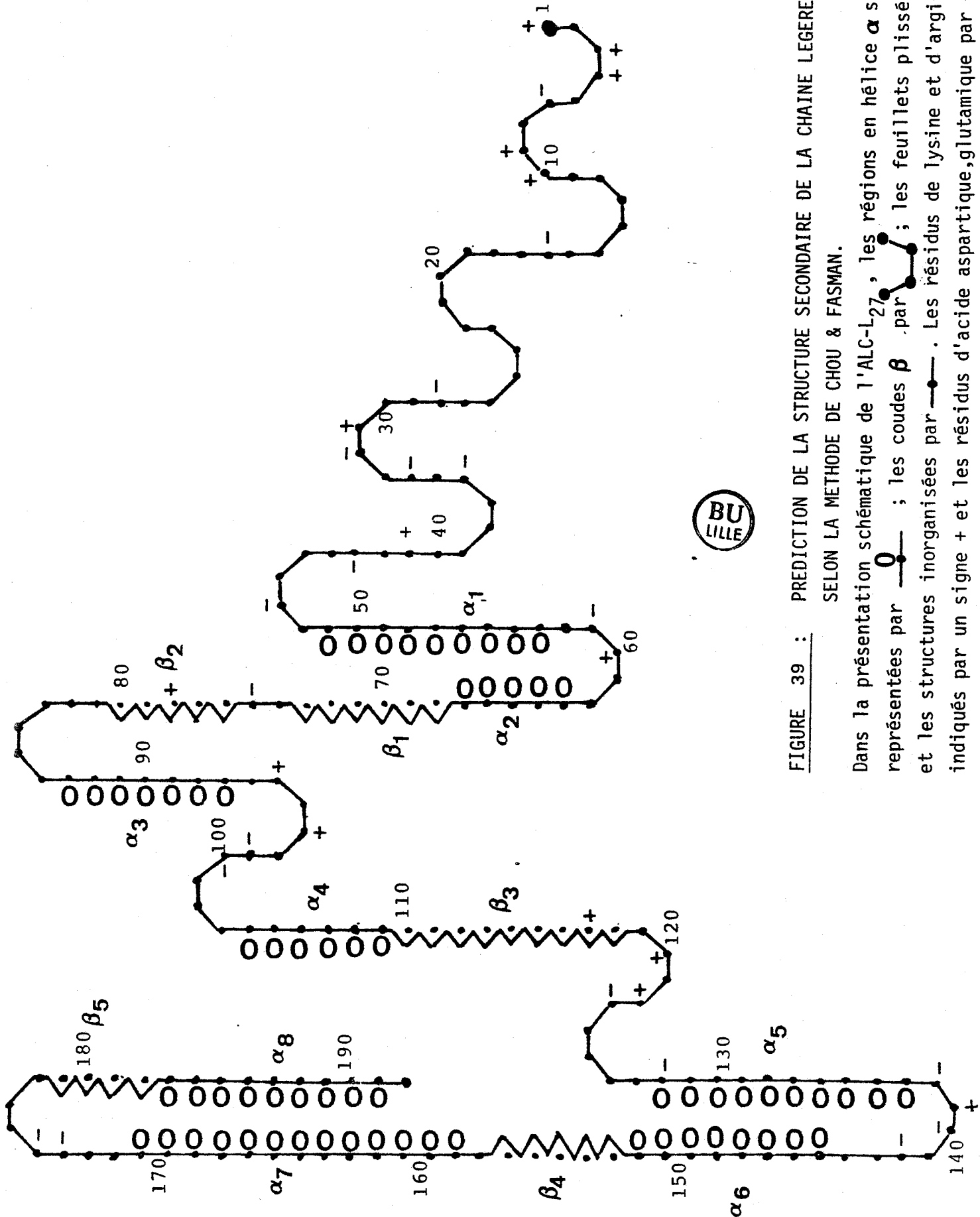


FIGURE 39 : PREDICTION DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DE LA CHAINE LEGERE ALC-L27  
 SELON LA METHODE DE CHOU & FASMAN.

Dans la présentation schématique de l'ALC-L27, les régions en hélice  $\alpha$  sont représentées par  $\bigcirc$  ; les coudes  $\beta$  par  $\bigtriangledown$  ; les feuillets pliés  $\beta$  par  $\nabla$  et les structures inorganisées par  $\text{---}$ . Les résidus de lysine et d'arginine sont indiqués par un signe + et les résidus d'acide aspartique, glutamique par -

POSITION DANS LA SEQUENCE	ACIDE AMINE		PROBALITE EN 10 <sup>-4</sup>			CONCLUSION
			α-Hélice	Feuillets-β	β-Turn	
159	Glu	E	1,12	0,89	0,03	H
160	Arg	R	1,12	0,89	0,01	i
161	Leu	L	1,17	0,87	0,11	H
162	Thr	T	1,22	0,63	0,03	i
163	Glu	E	1,30	0,74	0,02	H
164	Asp	D	1,30	0,74	0,01	i
165	Glu	E	1,32	0,72	0,01	H
166	Val	V	1,27	0,96	0,03	h
167	Glu	E	1,29	0,97	0,02	H
168	Lys	K	1,27	1,15	0,01	I
169	Leu	L	1,13	1,16	0,10	H
170	Met	M	1,09	1,17	0,48	h
171	Ala	A	1,17	0,81	0,03	H
172	Gly	G	1,05	0,77	0,29	<b>BU</b>
173	Gln	Q	1,12	0,75	0,12	<b>MLLE</b>
174	Glu	E	1,01	0,60	0,06	H
175	Asp	D	0,76	0,74	3,18	Turn
176	Ser	S	0,71	0,87	1,21	i
177	Asn	N	0,76	1,09	0,52	Turn
178	Gly	G	0,76	1,09	0,67	B
179	Cys	C	0,78	1,21	0,67	Turn
180	Ile	I	0,97	0,95	0,14	I
181	Asn	N	1,08	0,79	0,04	b
182	Tyr	Y	1,18	0,79	0,04	b
183	Glu	E	1,31	1,04	0,01	H
184	Ala	A	1,20	1,16	0,02	H
185	Phe	F	1,14	1,09	0,02	h
186	Val	V	1,11	1,17	0,03	h
187	Lys	K	1,13	1,18	0,04	I
188	His	H	1,22	1,23	0,03	h
189	Ile	I	1,11	1,24	0,17	I
190	Met	M	-	-	-	-
191	Ala	A	-	-	-	-
192	Ser	S	-	-	-	-

Tableau XII : ETUDE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE PAR LA METHODE DE CHOU ET FASMAN DE LA REGION C-TERMINALE DE L' ALC-L<sub>27</sub>

La partie encadrée ( 175-179 ) correspond à un coude-β  
 ( H et h = Hélice α ; B et b = structure β ; Turn = Coude β,  
 I et i = Indifférent ).

- Une région C-terminale ( séquence 50 à 192 ) où nous trouvons plus de 35% hélices  $\alpha$  (  $\alpha_1$  à  $\alpha_8$  ) et 15% de feuillets  $\beta$  (  $\beta_1$  à  $\beta_5$  ).
- Une région N-terminale ( séquence 1 à 50 ) à très forte probabilité pour n'adopter uniquement qu'une structure en coude  $\beta$ , ce qui est tout à fait exemplaire sur une séquence d'une telle amplitude.

Ces éléments ont été soumis à l'épreuve de l'étude physique par dichroïsme circulaire de l'ALC-L<sub>27</sub>.

## C - ETUDE PAR DICHROISME CIRCULAIRE

### I - INTRODUCTION :

En plus de la détermination de la structure secondaire d'un polypeptide ou d'une protéine, le dichroïsme circulaire permet de réaliser un certain nombre d'études physico-chimiques comme par exemple la mise en évidence des interactions protéine-protéine ou protéine-ligand. En effet, les effets Cotton mesurables en dichroïsme circulaire dans le domaine de l'Ultra-Violet lointain ( 150 à 240 nm ) sont ceux du chromophore CO-NH ( effets Cotton dits " intrinsèques " ) dont l'activité optique est directement reliée à la structure secondaire d'un polypeptide. A chaque structure secondaire correspond alors à une ou plusieurs bandes dichroïques particulières qui lors d'interactions peuvent être modifiées.

### II - ETUDES DES SPECTRES DICHROIQUES DE L'ALC-L<sub>27</sub>:

#### 1°) LE SPECTRE DICHROIQUE DE L'ALC-L<sub>27</sub>:

L'échantillon d'ALC-L<sub>27</sub> est dissous dans de l'eau déminéralisée. Seul est retenu pour l'étude physico-chimique, un échantillon parfaitement solubilisé et recueilli après centrifugation. La concentration en protéines de la préparation est déterminée par la méthode de Lowry. Le dichrographe Jobin-Yvon Mark II a été utilisé pour nos études. Le spectre de l'ALC-L<sub>27</sub> ( Fig. 40a ) montre principalement entre 190 et 250 nm, les bandes dichroïques des hélices  $\alpha$  et leur pourcentage atteint une valeur de 35%. La comparaison de notre spectre à ceux obtenus par Holt et Lowey ( 1975 ) [46] et par Wu et Yang ( 1976 ) [134] révèle que les spectres dichroïques pour d'autres chaînes légères : de la myosine de muscle squelettique Blanc de Lapin sont tout à fait identique apparemment à celui de l'ALC-L<sub>27</sub> de la myosine cardiaque de Porc ( Fig. 40b ).

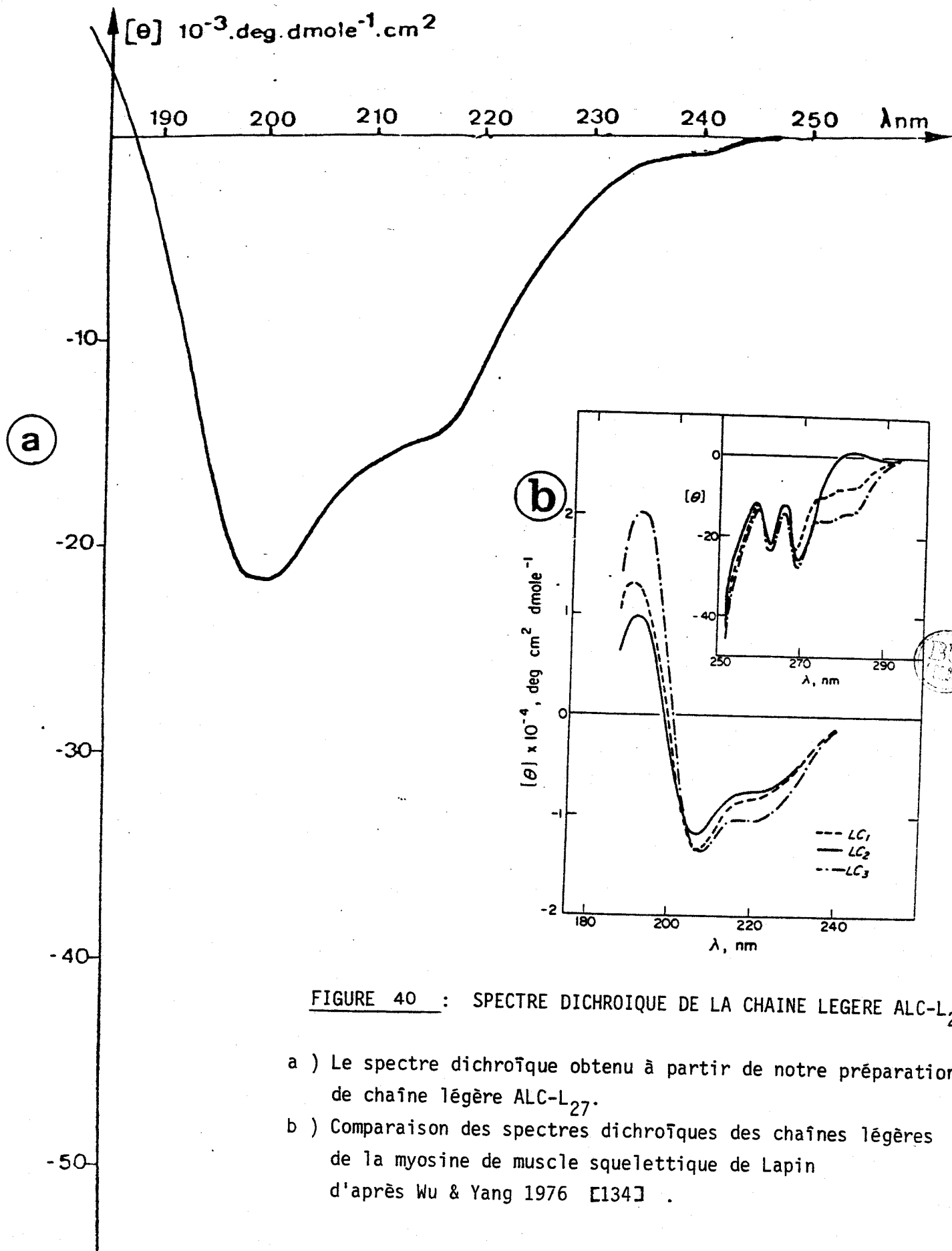


FIGURE 40 : SPECTRE DICHROIQUE DE LA CHAINE LEGERE ALC-L<sub>27</sub>

- a ) Le spectre dichroïque obtenu à partir de notre préparation de chaîne légère ALC-L<sub>27</sub>.
- b ) Comparaison des spectres dichroïques des chaînes légères de la myosine de muscle squelettique de Lapin d'après Wu & Yang 1976 [134] .

Il est intéressant de retrouver le pourcentage avancé par la méthode de prédiction de Chou et Fasman , LE MEME POURCENTAGE D'HELICITE  $\alpha$  DE 35% étant obtenu par les deux approches mathématique et expérimentale.

2°) ETUDE DES INTERACTIONS DE L'ALC-L<sub>27</sub> PAR DICHROISME CIRCULAIRE :

Dans la mesure où les effets Cotton de deux molécules s'additionnent, à partir du spectre dichroïque d'un mélange de deux molécules, il est possible par soustraction du spectre théorique d'une des molécules de montrer que, si le résultat est nul, les molécules sont indépendantes mais qu'au contraire l'obtention d'une différence de spectre implique l'existence d'une interaction entre ces deux molécules.

Les travaux de Sutoh ( 1982 ) [112] ont démontré que l'ALC-L<sub>25</sub> de la myosine de muscle squelettique de Lapin interagit avec l'actine. Il nous est apparu de grand intérêt d'étudier les spectres dichroïques de mélange d'ALC-L<sub>27</sub> et d'actine à différentes concentrations relatives.

Le spectre dichroïque de l'actine de muscle cardiaque de Porc a été déterminé et est illustré ( Fig. 41a ). Ce spectre est semblable à celui de l'actine de muscle squelettique de Lapin décrit par Wu et Yang ( 1976 ) [140] .

Lorsque nous ajoutons à l'actine en rapport équimolaire l'ALC-L<sub>27</sub>, nous obtenons un spectre intermédiaire ( Fig. 41b ). Ce résultat est peu significatif et aucune conclusion n'a pu en être tirée concernant une interaction possible actine-ALC-L<sub>27</sub> .

D'autre part, les études de dichroïsme circulaire menées en présence de facteurs intervenant lors de la contraction musculaire : ions divalents, calcium, magnésium, l'ATP, complexe Mg-ATP, sous-fragment HMM-S<sub>1</sub> n'ont pas non plus provoqué de modification significative du spectre de l'ALC-L<sub>27</sub>.

Au total, il semblerait que la liaison actine-myosine ignore les chaînes légères ALC et que ces chaînes légères sont globalement peu influencées dans leur conformation par les " co-facteurs " de la contraction musculaire.

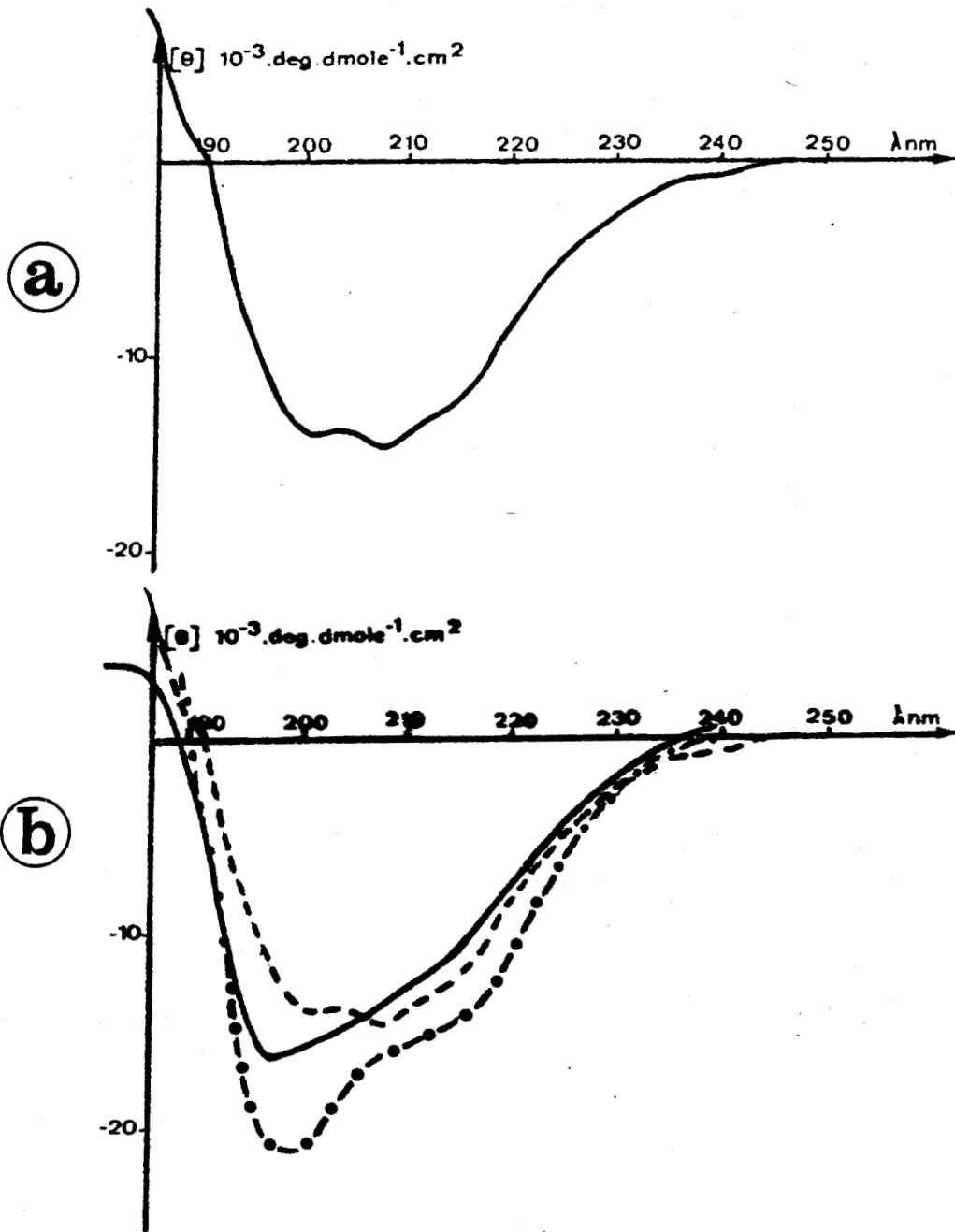


FIGURE 41 : ETUDE DES INTERACTIONS DE LA CHAÎNE LÉGÈRE ALC-L<sub>27</sub> AVEC L'ACTINE PAR DICHROISME CIRCULAIRE.

a ) L'actine seule.

b ) L'actine (-----) ; La chaîne légère ALC-L<sub>27</sub> (—●—●—●—) ; Un échantillon constitué d'une mole d'actine et d'une mole de chaîne légère.(————)



### III - ETUDES DES SPECTRES DICHROIQUES DU FRAGMENT N-TERMINAL DE L'ALC-L<sub>27</sub> :

#### 1°) INTRODUCTION :

Dans la mesure où la région N-terminale pourrait conférer un rôle particulier à l'ALC-L<sub>27</sub>, il nous a paru important d'isoler le peptide contenant les 50 premiers résidus d'acides aminés et d'établir le spectre dichroïque. Pour ce faire le modèle ALC-L<sub>27</sub> de Porc est des plus intéressants puisque les 66 premiers résidus peuvent être obtenus par coupure par le bromure de cyanogène ( cf. Chapitre III-C ). Ce peptide [ CB<sub>1</sub> de 66 résidus ], si l'on se réfère à l'illustration présentée Fig. 38, possède la particularité de ne contenir que très peu d'acides aminés ayant la probabilité de former une hélice  $\alpha$  et donc de perturber le spectre dichroïque de la région N-terminale.

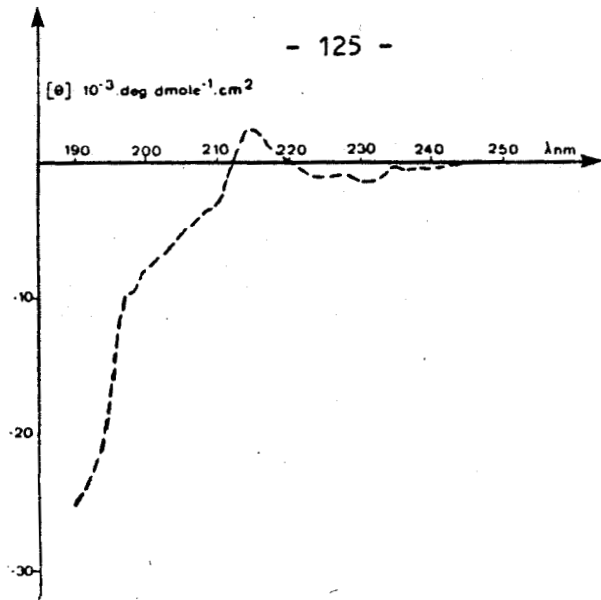
Notre modèle pour ce point particulier présente un avantage indubitable sur le classique exemple référence d'ALC-L<sub>25</sub> de Lapin qui dans les mêmes conditions de clivage BrCN ne peut libérer qu'un peptide plus long ( 101 résidus ) du fait de la position plus interne de la première méthionine.

#### 2°) ETUDE DU SPECTRE DICHROIQUE DU FRAGMENT N-TERMINAL :

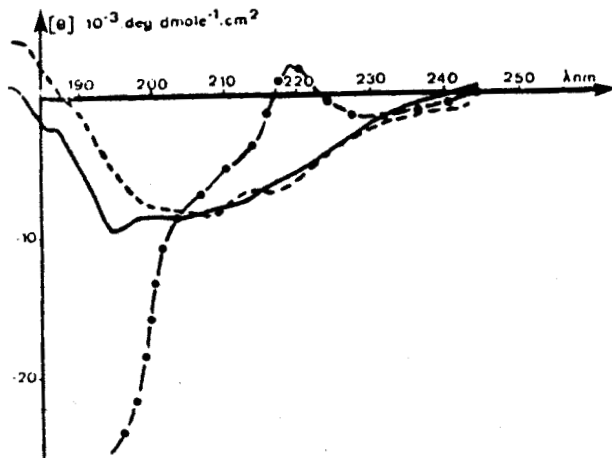
L'étude de dichroïsme circulaire a été effectuée sur un peptide BrCN CB<sub>1</sub> obtenu après action du BrCN et purifié par RP-HPLC. L'échantillon est dissous dans l'eau et le spectre dichroïque est analysé entre 190 et 250 nm.

Le profil obtenu est totalement différent de celui de l'ALC-L<sub>27</sub> intacte ( Fig.42a ) : le spectre révèle l'absence de bandes dichroïques négatives caractéristiques d'hélices  $\alpha$ , mais par contre il existe une faible bande positive à 212 nm évoquant une structure en coude  $\beta$ . Ces structures en coude  $\beta$  donnent toujours un signal relativement faible, mais cette hypothèse de région en coude  $\beta$  était largement avancée nous l'avons vu plus haut par l'étude prédictionnelle de Chou et Fasman. Il y a donc encore confirmation expérimentale de l'étude prévisionnelle statistique. De plus, pour le peptide CB<sub>1</sub>, la probabilité de turn [ P(t) ] est généralement de l'ordre de  $10^{-5}$  et peu de résidus d'acides aminés dépasse la valeur moyenne symbolisée par la ligne continue ( Fig.43 ).

a



b



c

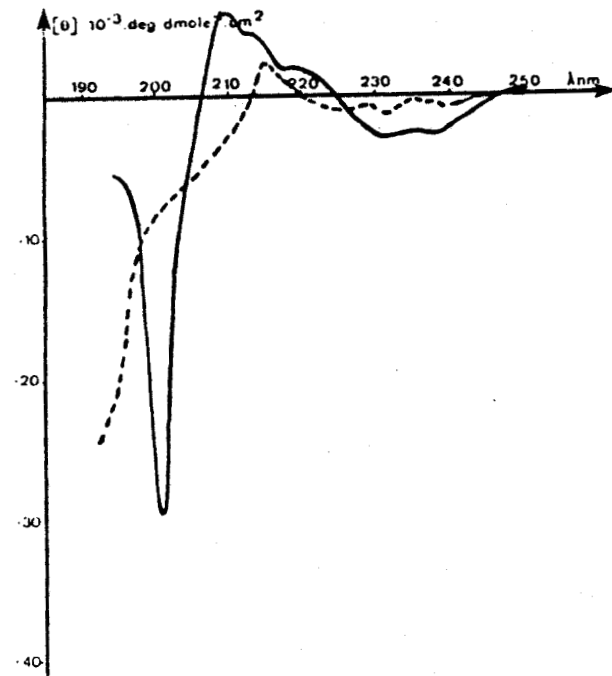


FIGURE 42 : ETUDE PAR DICHROISME CIRCULAIRE DU FRAGMENT N-TERMINAL DE LA CHAÎNE LÉGÈRE ALC-L<sub>27</sub> ( PEPTIDE CB<sub>1</sub> ) ET SES INTERACTIONS.

- a ) Spectre dichroïque du peptide CB<sub>1</sub> dans l'eau ( peptide purifié par RP-HPLC ).
- b ) Interaction du peptide CB<sub>1</sub> avec l'actine : l'actine ( - - - - ) ; le peptide CB<sub>1</sub> ( ●●●● ) ; mélange d'une mole d'actine + une mole de CB<sub>1</sub> ( ——— )
- c ) Interaction du peptide CB<sub>1</sub> avec les ions calcium ( ——— ) à une concentration de 1,2 M en CaCl<sub>2</sub>

\*10<sup>-3</sup>

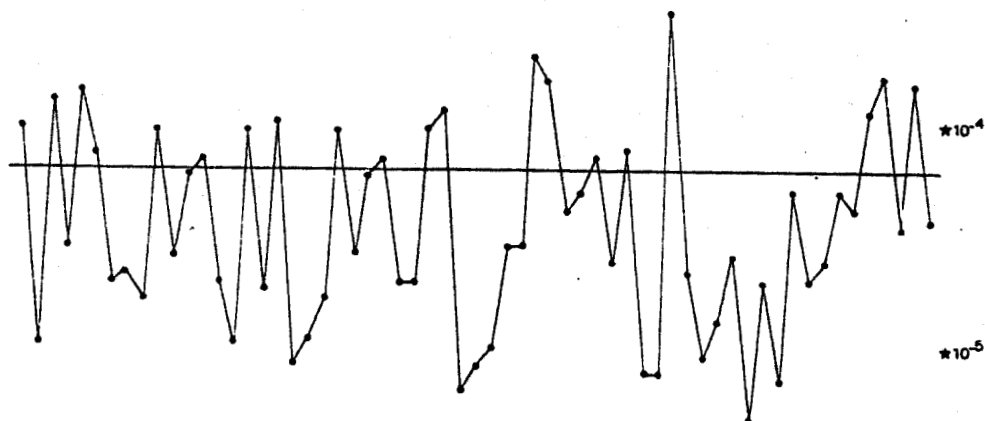


FIGURE 43 : CALCUL DE PROBABILITE DE LA STRUCTURE SECONDAIRE DE LA REGION N-TERMINALE ( position 1-66 ) DE L'ALC-L<sub>27</sub>.

(  $P_{Turn} = P_{A1} \times P_{A2} \times P_{A3}$  ) : les valeurs apparaissant sous la ligne continue révèle une forte probabilité pour adopter la conformation en  $\beta$ -Turn.

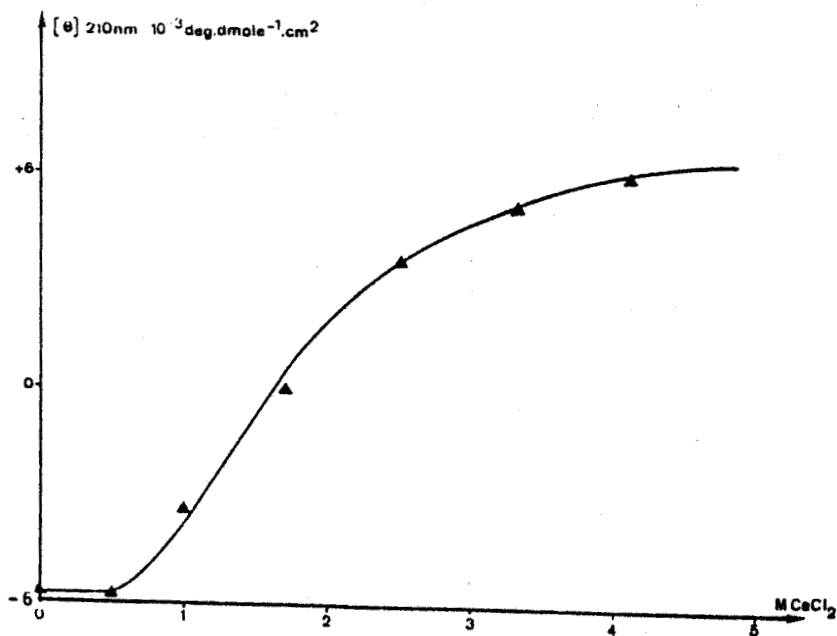


FIGURE 44 : AUGMENTATION DE LA VALEUR DU  $\theta$  A 210 nm EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN  $CaCl_2$ .

### 3°) ETUDE PAR DICHROISME CIRCULAIRE DES INTERACTIONS

#### PEPTIDE CB<sub>1</sub> -ACTINE, PEPTIDE CB<sub>1</sub> -IONS DIVALENTS :

##### α) Interaction peptide CB<sub>1</sub> -actine :

Comme pour l'ALC-L<sub>27</sub> intacte, une étude de la possible interaction peptide CB<sub>1</sub>-actine a été réalisée par dichroïsme circulaire. Le spectre du mélange peptide CB<sub>1</sub>-actine ne s'est pas avéré significatif pour avancer la notion d'une possible interaction et ceci quelque soit le rapport actine/peptide CB<sub>1</sub> ( Fig.42b ).

##### β) Interaction peptide CB<sub>1</sub> - ions divalents :

L'influence des ions calcium sur la conformation du peptide CB<sub>1</sub> a été étudiée par dichroïsme circulaire pour des concentrations croissantes en CaCl<sub>2</sub> de 0 à 4 M. Cette étude révèle que la structure secondaire de CB<sub>1</sub> est modifiée avec une augmentation de l'intensité de la bande positive à 212 nm. Lorsque la concentration en CaCl<sub>2</sub> est de 1,2 M, le spectre est alors nettement modifié ( Fig.42c ) bien qu'un changement de spectre est déjà observé pour une concentration de 0,6 M CaCl<sub>2</sub>. Ce résultat signifie que le nombre de coudes β augmente avec l'élévation de la concentration en CaCl<sub>2</sub> se traduisant par une valeur de θ croissante ( Fig.44 ).

Cette modification de structure aurait pu être due à l'action de n'importe quel ion divalent et non spécifique du calcium. Pour lever cette ambiguïté, une étude identique a été effectuée par dichroïsme circulaire en remplaçant les ions calcium par les ions magnésium. Nous n'observons alors aucune modification du spectre, même pour des concentrations en MgCl<sub>2</sub> de 5 M. Ce résultats permet de penser que le rôle des ions calcium sur la modification de structure secondaire du fragment N-terminal de l'ALC-L<sub>27</sub> est très important et très spécifique.

#### IV - CONCLUSION :

Cette étude de la structure secondaire de l'ALC-L<sub>27</sub> de la myosine ventriculaire de coeur de Porc nous a permis de montrer que la chaîne légère est constituée de deux régions distinctes avec une région N-terminale de structure secondaire tout à fait particulière. La structure secondaire prédite selon la méthode de Chou et Fasman a été confirmée par notre étude de dichroïsme circulaire. Cette analyse en dichroïsme circulaire montre aussi que le protocole de préparation utilisé permet d'isoler l'ALC-L<sub>27</sub> dans un état de pureté élevé.

L'étude des interactions de l'ALC-L<sub>27</sub> avec différents ligands par dichroïsme circulaire ne nous a pas donné de résultats déterminants. Le plus souvent, les bandes dichroïques caractéristiques du ligand masquent celles de l'ALC-L<sub>27</sub> : par exemple, il est admis que la chaîne légère de type ALC interagit avec l'actine ( Sutoh 1982 [112] ; Kassab 1982 [54]), mais aucune modification de spectre ne peut être effectivement détectée par dichroïsme circulaire pour les mélanges actine-ALC-L<sub>27</sub>.

Par contre, des résultats très intéressants ont été obtenus avec le fragment N-terminal ( CB<sub>1</sub> ) de la chaîne légère. Son spectre dichroïque est caractéristique d'une structure en coude  $\beta$  et sélectivement les ions calcium modifie le spectre ( augmentation du signal de la bande dichroïque à 212 nm ). La concentration en CaCl<sub>2</sub> de 1,2 M peut paraître très élevée au regard de conditions physiologiques. Cependant, pour une expérimentation in vitro et pour des études physico-chimiques des conditions exemplaires sont nécessaires. Dans le cas particulier, il faut que tous les sites sensibles aux ions calcium soient occupés pour observer le changement du spectre ( Aubert et al 1981 ). De plus, il est possible qu'in vivo les transporteurs d'ions ou les protéines régulatrices du flux calcique interviennent pour atteindre des cibles privilégiées, si bien que localement la concentration en ions Ca<sup>2+</sup> peut être plus élevée même que celle utilisée pour nos expérimentations in vitro. Ceci pourrait également expliquer que Ueno et al ( 1985 [120]) ont aussi utilisé une concentration en CaCl<sub>2</sub> de 0,3 M , c'est à dire une dimension non physiologique pour visualiser un très faible changement du spectre dichroïque de l'ALC-L<sub>25</sub> de muscle squelettique de Lapin.

Une modification de conformation due aux ions Ca<sup>2+</sup> n'est pas observée lors de l'étude du spectre dichroïque de l'ALC-L<sub>27</sub> intacte. Ce résultat peut s'expliquer :

- par la faible contribution du signal dichroïque positif des coudes  $\beta$  à 212 nm par rapport au signal négatif élevé des hélices  $\alpha$ .
- par le fait que le peptide N-terminal CB<sub>1</sub> ne représente que 20% de la molécule.

Cette étude de l'interaction ALC-L<sub>27</sub> intacte-ions divalents suggère également que les ions divalents n'auraient aucune influence sur la structure secondaire de la région C-terminale de l'ALC-L<sub>27</sub>.

# CHAPITRE V

PARTICULARITES DE L'ALC-L<sub>27</sub>

&



PRESENTATION

D'UN MODELE MOLECULAIRE

A - COMPARAISON DES SEQUENCES EN ACIDES AMINES DES CHAINES LEGERES

I - COMPARAISON DES STRUCTURES DES DIFFERENTES ALC :

Partant de nos études et pour mettre en évidence d'autres particularités structurales pouvant conférer aux chaînes légères de type " alcaline " ( ALC ) un rôle biologique spécifique, nous avons envisager de comparer la séquence en acides aminés de l'ALC-L<sub>27</sub> de la myosine ventriculaire de coeur de Porc ( donc de Mammifère supérieur ) avec les séquences déjà connues d'ALC pour d'autres myosines.

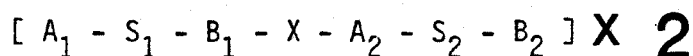
\* La recherche d'homologie de séquence en acides aminés des ALC de myosine de différents muscles et pour différentes espèces révèle une très grande constance de structure primaire ( Fig. 45A ). Pour aligner les parties homologues, il ne nous a fallu utiliser que cinq réalignements pouvant d'ailleurs correspondre à des délétions et ainsi le pourcentage global d'homologie atteint 70 à 80%. Les parties N-terminales présentent des pourcentages d'homologie faibles ( 30 à 50% ) ( Fig. 45B ), la structure C-terminale ( position 53 - 192 ) est la mieux conservée ( 90% d'homologie ) : à titre d'exemples, entre les chaînes légères ALC de myosine cardiaque du Poulet et du Porc seulement 15 mutations ont été mises en évidence dans la partie C-terminale de ces ALC. Ces mutations sont le plus souvent le fait d'un simple remplacement d'un acide aminé hydrophobe par un autre acide aminé hydrophobe ( Ile en Leu ou Val ), d'acide glutamique par l'acide aspartique, de lysine par l'arginine ....

\* Les études comparatives de structure primaire des calcioprotéines du système contractile ( Troponine C [ TN C ] et Parvalbumine de Carpe [ CPB ] ) avec la chaîne légère de type ALC de la myosine de muscle squelettique de Lapin ont montré que la conformation de ces protéines étaient voisines sinon semblables ( Collins 1974 [11] ; Weeds et McLachlan 1974 [133] ) ( Chapitre 1; paragraphe III-3 ).

En effectuant une étude similaire pour notre ALC-L<sub>27</sub>, nous avons voulu savoir si l'ALC de myosine cardiaque de Mammifères supérieurs possède

1°) les mêmes caractéristiques structurales que la TN C, la CPB et l'ALC-L<sub>25</sub> à savoir :

une structure secondaire du type général



**A**

<1> ZPKK - NVKKPAAAAAPAPKAPAPAPAPAPAPKKEEKIDLSA I K I E F S K E Q Q D E  
 <2> ZPKK - DVKKPAAAAAPAPAPAPAPAPAPAKPKKEPAIDLKS I K I E F S K E Q Q D D  
 <3> ZPKK - DVKKPAAAAAPAPAPAPAPAPAPAKPKKEPAIDLKS I K I E F S P D Q I D D  
 <4> ZPKK - DVKKPAAAAAPAPAPAPAPAPAPAKPKKEPAIDLKS I K I C D F S E E Q T A E  
 <5> ZPKK PEPKKAPEPKKEEPKPAKPAEPEPK - KEVEFNPA S I K V E F T P D Q I E E  
 <6> ZPKK PEPKKAAPAPAEAPAPFAAPEPKEDP - T E L E F D S A K I K N E F T P E Q I E E

FKEAFL LYDRTGDS - - KITLSQVGDVLRALG TNPTNAEVK KVLGNP SDEQMN  
 FKEAFL LFDRTGDA - - KITLSQVGDIVRALG TNPTNAE I NK I LGNP SK EEMN  
 FKEAFL LFDRTGDA - - KITLSQVGDIVRALG TNPTNAE I NK I LGNP SK EEMN  
 FKEAFQ LFDRTGDG - - K I L Y S Q C G D V M R A L G T N P T N A E V M K I L G N P K S D E M N  
 FKEAFS LFDRTPKSEMKITIYAQC G D V L R A L G T N P T Q A E V M K V L G R P K Q E E M N  
 FKEAFS LYDRTPKAEMKITIYGQC G D V L R A L G T N P I Q A E V L R V L G K P K Q E E M N

AKKIEFENFLPMLQAISSNK D Q G T Y E D F V E G L R V F D K E  
 AKKITFEFLPMLQAAANNK D Q G T F E D F V E G L R V F D K E  
 AKKITFEFLPMLQAAANNK D Q G T F E D F V E G L R V F D K E  
 LKTLNFEQFLPMMQTI AKNK D Q G T F E D Y V E G L R V F D K E  
 SKMIDFETFLPMLQHISKTK D Q G T Y E D F V E G L R V F D K E  
 SAKMDFEDFLPMLQHISKNK D Q G I Y E D F V E G L R V F D K E

- D G T V G M G A E L R H V L A T L G E K M K E E E V E A L M A G Q E D S N G C I N Y E A F V K H I M S I  
 G N G T V - M G A E L R H V L A T L G E K M T E E E V E E L M K G A E D S N G C I N Y E A F V K H I M S V  
 G N G T V - M G A E L R H V L A T L G E K M T E E E V E E L M K G A E D S N G C I N Y E A F V K H I M S V  
 G - - T V - M G A E I R H V L V T L G E K M T E E E V E Q L V A G H E D S N G C I N Y E E L V R M V L S G  
 G D G T V - M G A E L R H V L A T L G E R L T E E E V D K L M A G Q E D A N G C I N Y E A F V K H I M A N  
 G D G T V - M G A E L R H V L A T L G E R L T E D E V E K L M A G Q E D S N G C I N Y E A F V K H I M A S

**B**

	RbSM-L25	CSM-L25	CSM-L16	CGM-L17	CCM-L27	PCM-L27
RbSM-L25	<b>a*</b> <b>b</b>	80%	83%	71%	68%	70%
CSM-L25	56%		97%	73%	63%	68%
CSM-L16	-	-		73%	73%	74%
CGM-L17	-	-	-		68%	68%
CCM-L27	28%	38%	-	-		82%
PCM-L27	38%	51%	-	-	56%	

BU  
LILLE

FIGURE 45 : COMPARAISON DES STRUCTURES PRIMAIRES DES CHAINES LEGERES ALCALINES (A) ET POURCENTAGE D'HOMOLOGIE ENTRE CES STRUCTURES PRIMAIRES (B)

\* ( a ) Entre les chaînes légères ( b ) Entre leur région N-terminale.

( 1 ) Myosine de muscle squelettique de Lapin RbSM-L<sub>25</sub> ; ( 2 ) Myosine de muscle squelettique de Poulet CSM-L<sub>25</sub> ; ( 3 ) Myosine de muscle squelettique de Poulet CSM-L<sub>16</sub> ; ( 4 ) Myosine de muscle lisse de gésier de Poulet CGM-L<sub>17</sub> ; ( 5 ) Myosine de muscle cardiaque de Poulet CCM-L<sub>27</sub> ; ( 6 ) Myosine ventriculaire de Porc PCM-L<sub>27</sub>

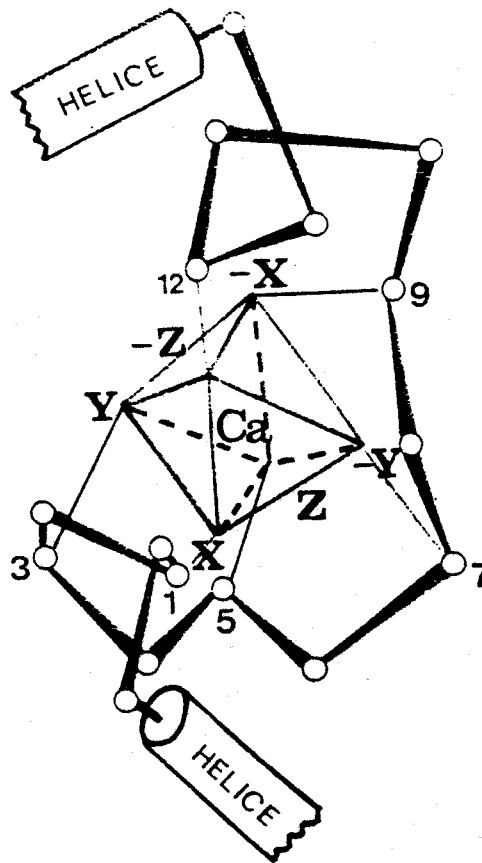


A, B, X, S figurant des régions d'une dizaine de résidus d'acides aminés  
A, B les régions hélicoïdales hydrophobes  
X la région de liaison entre domaines fonctionnels  
S les régions très hydrophiles ( pour les calciprotéines correspondant aux sites de fixation des ions calcium et magnésium ).

Si est retenu ce mode d'agencement moléculaire pour l'ALC-L<sub>27</sub>, le maintien en situation conformationnelle et fonctionnelle des régions caractéristiques impose la notion d'interactions amino acides de type Van der Waals ( le maintien de la structure tridimensionnelle étant assuré, en effet, par interactions entre différents acides aminés hydrophobes situés de façon précise dans les différentes régions hélicoïdales ( Kretsinger 1972 [64] ).

2°) Dans la partie C-terminale des structures permettant la possible fixation des ions calcium.

D'après Kretsinger et Nockolds 1973 [65], un site de fixation du calcium ( S ) est constitué de 12 résidus pour lesquels les positions 1, 3, 5, 7, 9 et 12 correspondent aux axes des verticales d'un octaèdre ( X, Y, Z, -X, -Y et -Z ) permettant la liaison avec le calcium, comme nous l'avons représenté ci-dessous :



Le cristal de calcium est inséré dans une boucle, formée de 12 résidus d'acides aminés adoptant une conformation bien particulière. Une condition indispensable pour que le site fixe effectivement le calcium, est qu'au moins 4 acides aminés occupant les différentes positions 1 à 12 ( en face des axes X ...-Z ) soient chargés négativement ( acide glutamique ou acide aspartique ).

► Pour le premier point, la comparaison des structures primaires des régions C-terminales des ALC :

\* ALC-L<sub>25</sub> de la myosine de muscle squelettique de Lapin ( RbSM-L<sub>25</sub> )

\* ALC-L<sub>25</sub> et -L<sub>16</sub> de la myosine de muscle squelettique de Poulet ( CSM-L<sub>25</sub> et CSM-L<sub>16</sub> )

\* ALC-L<sub>17</sub> de la myosine de muscle lisse de gésier de Poulet ( CGM-L<sub>17</sub> )

\* ALC-L<sub>27</sub> de la myosine cardiaque de Poulet ( CCM-L<sub>27</sub> )

\* ALC-L<sub>27</sub> de la myosine ventriculaire de coeur de Porc ( PCM-L<sub>27</sub> )

montre que les positions " clefs " sont toutes occupées par des acides aminés de nature hydrophobe ( Fig. 46 ). Rappelons ici que les sites amino acides d'interactions hydrophobes sont considérés par analogie avec les résultats d'étude cristallographique d'une parvalbumine de Carpe ( étudiée par Kretzinger et reprise par Weeds et McLachlan ). Si des mutations interviennent, elles restent conservatives, comme par exemple en position 106 où une isoleucine est remplacée par une leucine ou une méthionine. En accord avec Weeds et McLachlan 1974 [133], ce résultat suggère que le maintien de la conformation de la région C-terminale des ALC peut être du type [ A-S-B-X-A-S-B ], comme pour les calciprotéines et est le fait d'interactions hydrophobes.

En partant de cette hypothèse, nous avons voulu savoir qu'elles étaient les régions possibles d'interagir par liaison de type Van der Waals. Ainsi, nous avons schématisé le modèle proposé par Weeds et McLachlan et nous avons replacé ( Fig. 47 ) les différentes structures organisées ( hélices  $\alpha$  et feuilletts  $\beta$  ) trouvées par la prédictionnel. Les résidus qui, d'après Weeds et McLachlan ( 1974 ) [133], sont engagés dans des interactions hydrophobes ont été placés et le schéma laisse alors envisager des interactions possibles entre les hélices  $\alpha_1 - \alpha_6$  ;  $\alpha_2 - \alpha_7$ ;  $\alpha_5 - \alpha_7$  ;  $\alpha_3 - \alpha_4$  et les feuilletts  $\beta$  :  $\beta_3 - \beta_4$  .

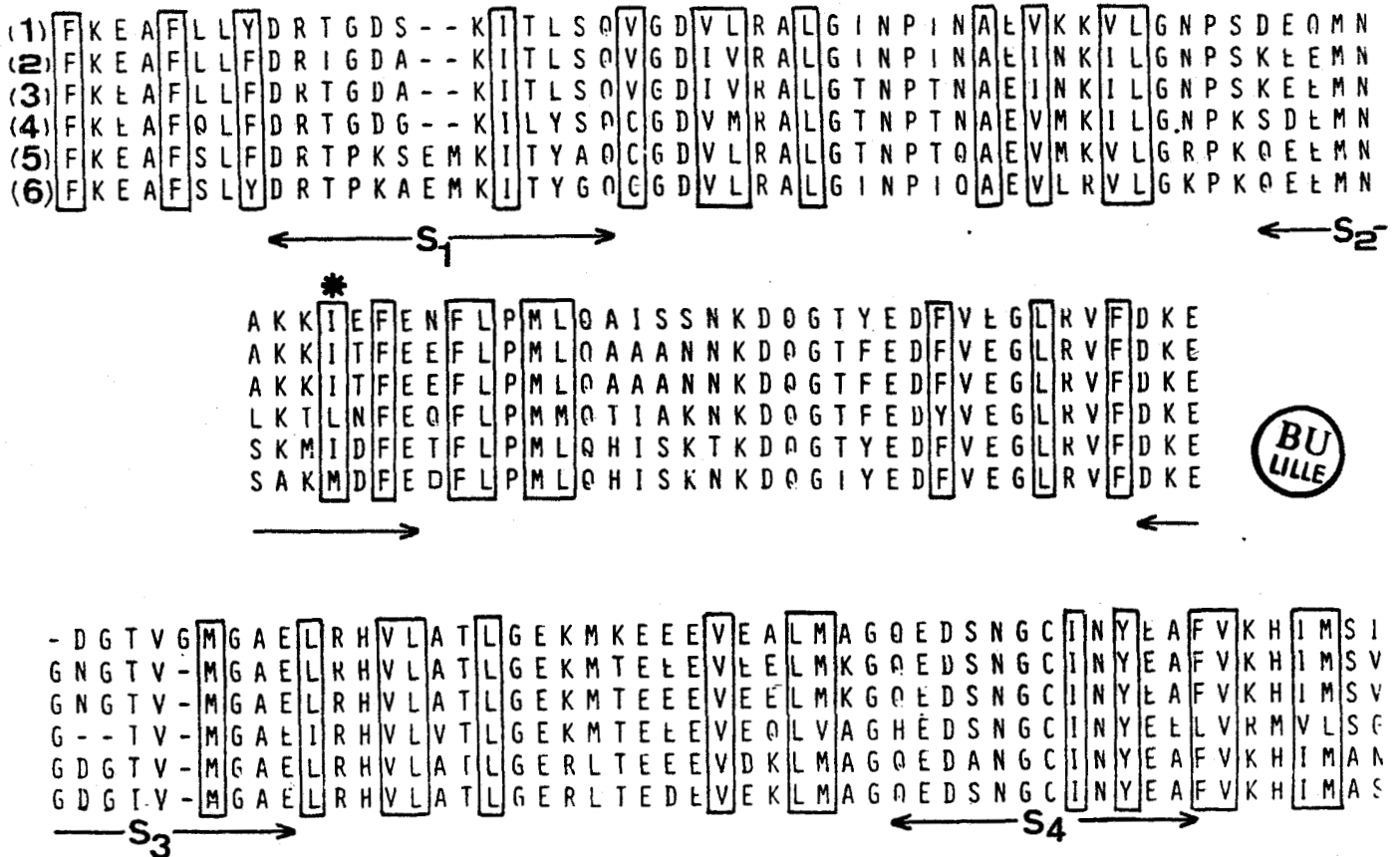


FIGURE 46 : Comparaison des structures primaires des parties C-terminales des ALC des myosines

Les acides aminés encadrés correspondent aux positions d'acides aminés hydrophobes responsables du maintien d'une certaine conformation ( D'APRES WEEDS & McLACHLAN 1974[133] , les sites S correspondent aux sites présumés de fixation des ions calcium.

- (1) RbSM-L<sub>25</sub> (2) CSM-L<sub>25</sub> (3) CSM-L<sub>16</sub> (4) CGM-L<sub>17</sub> (5) CCM-L<sub>27</sub>  
 (6) PCM-L<sub>27</sub>

\* Correspond à la position 106

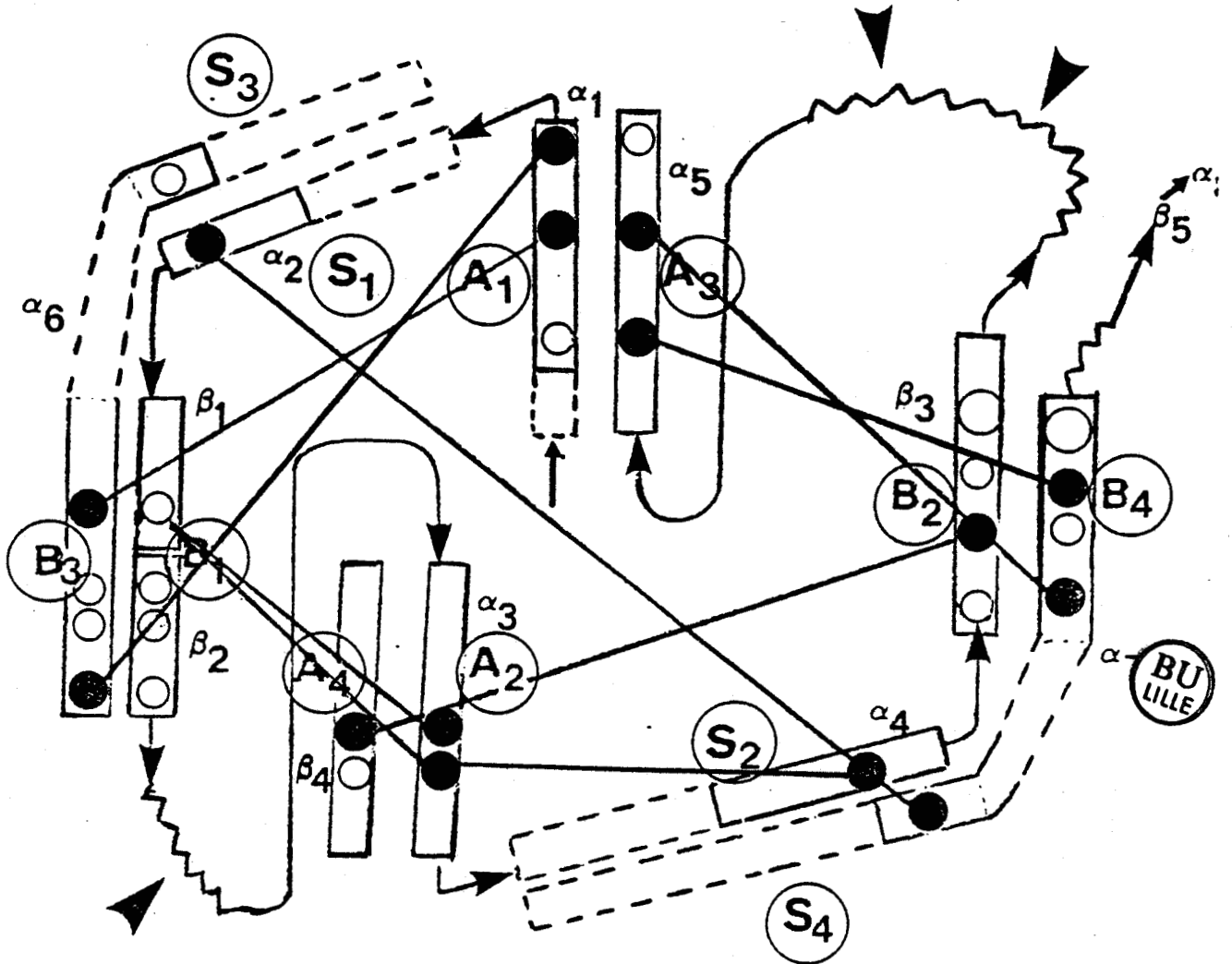


FIGURE 47 : INTERACTIONS HYDROPHOBES ENTRE LES STRUCTURES ORGANISEES DE L'ALC-L<sub>27</sub>.

Sur le schéma proposé par Weeds & McLachlan 1974 [133] qui est du type ( ABSXABS ) X 2 ( en pointillé ), nous avons fait figurer les structures  $\alpha$  et  $\beta$  trouvé par le prédictif. ( ○ ) correspondent aux acides aminés hydrophobes importants pour le maintien de la conformation. ( ● ) correspondent aux acides aminés hydrophobes engagés dans des interactions du type Van der Waals.

▶ sont les coudes  $\beta$

► Pour le deuxième point, l'agencement moléculaire [ ASBXASB ] étant acquis, nous avons considéré les positions de coordination au niveau des sites  $S_1 - S_4$  ( Fig.46 ). Dans le cas de la troponine C qui fixe effectivement les ions divalents nous trouvons 4 points de coordination occupés par des acides aminés chargés négativement pour tous les sites ( S ), mais pour l'ALC-L<sub>27</sub>, au contraire, seul le site  $S_3$  possède le nombre d'acides aminés suffisants pour potentiellement fixer les ions divalents ou la capacité de lier le calcium ( Tableau XIII ).

En conclusion, cette étude comparative révèle que la partie N-terminale de l'ALC-L<sub>27</sub> possède une structure caractéristique ( il y a peu d'homologie de séquence dans cette région ). La portion C-terminale par contre est très bien conservée ( approximativement 90% d'homologie ). Si les acides aminés indispensables pour le maintien d'une structure tridimensionnelle comparable à celle de calciprotéine sont présents pour l'ALC-L<sub>27</sub>, sa région C-terminale ne semble pas fixer de manière spécifique les ions divalents.

## II - COMPARAISON DES STRUCTURES PRIMAIRES D'ALC et DE RLC :

La comparaison des structures primaires de l'ALC-L<sub>27</sub> de la myosine ventriculaire de coeur de Porc et de Poulet avec celle de la RLC-L<sub>18</sub> de myosine cardiaque de Poulet révèle que les ALC ont une structure primaire très différente de celle des RLC ( Fig.48 A ). Le pourcentage d'homologie n'atteint le score que de 19 à 30% et ceci en introduisant un nombre important " d'intervalles " ( une trentaine environ ), principalement dans la région N-terminale. La région charnière séparant les régions N- et C-terminales ( EFKEAF ) reste bien conservée. Nous pouvons aussi remarquer que les positions qui d'après Weeds et McLachlan ( 1974 ) [133] sont indispensables pour conditionner une structure tridimensionnelle voisine de celle de la TN C , sont également occupées par des résidus d'acides aminés hydrophobes ( Fig.48 B ).

De toute cette étude de comparaison des structures primaires des chaînes légères et au vu des grandes analogies de structure, nous pouvons conclure que les chaînes légères ( aussi bien RLC que ALC ) et les calciprotéines du système contractile ont probablement dû évoluer à partir d'un gène ancestral commun.

Position de coordination	TNC				ALC								RLC			
	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	(1) S <sub>1</sub>	(1) S <sub>2</sub>	(1) S <sub>3</sub>	(1) S <sub>4</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>	S <sub>1</sub>	S <sub>2</sub>	S <sub>3</sub>	S <sub>4</sub>
X	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Asp	Gln	Asp	Asp	Gln	Gln	Asp	Pro	Asp	Asp
Y	Asp	Asp	Asn	Asn	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Glu	Asp	Asp	Asn	Pro	Glu	Ser
Z	Gly	Ser	Asp	Asp	Asp	Glu	Asn	Asn	Asp	Asp	Asn	Asn	Asp	Asn	Lys	Asn
-Y	Asp	Thr	Tyr	Arg	Lys	Lys	Lys	Ala	Thr	Thr	Cys	Cys	Phe	Thr	His	Asp
-X	Ser	Asp	Asp	Asp	Thr	Thr	Glu	Asp	Gly	Gly	Asn	Asn	Asp	Thr	Lys	Asn
-Z	Glu	Glu	Glu	Glu	Gln	Gln	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Asp	Glu	Asp	Cys
Charges négatives	4	4	4	4	2	2	3	3	4	4	2	2	4	1	3	2

TABLEAU XIII : Groupes de coordination du calcium dans la troponine-C et positions équivalentes pour les chaînes légères alcalines et régulatrice de s myosines .

X , Y & Z correspondent aux verticales de l'octaèdre des positions liant le calcium avec les positions de séquence indiquées dans les différents sites de la TNC , les ALC (1) RbSM-L<sub>25</sub> et l'ALC-L<sub>27</sub> de la myosine ventriculaire de coeur de Porc et la RLC de la myosine cardiaque de Poulet.

**A**

(1) Z P K K P E P K K A A P A P A E A P A P F A A P E P K E D P T E L E F D S A K I K N E F T P E Q I E E  
 (2) Z P K K P E P K K A P E P K K E E P K P A P K P A E P E P K K E V E F N P A S I K I E F T P D Q I E E  
 (3) Z P K K - - - A K K - - - R I E - G A N S - - - - - N V - - - - - F - S M - - - - - F E Q A Q I Q E

F K E A F S L Y D R T P K A E M K I T Y G Q C G D V L R A L G I - N P I Q A E V L R V L G K P K Q E E  
 F K E A F S L F D R T P K S E M K I T Y A Q C G D V L R A L G T - N P T Q A E V M K V L G R P K Q E E  
 F K E A F T I M D Q N - R D G F - I D K A D L R D T F A A L G R L N V K N E E I D E M I - K E A P G P

M N S A K M D F E D F L P M L Q H I S K N K D Q G T Y E D F V E G L R V F D K E G D G T V - - M G A E  
 M N S K M I D F E T F L P M L Q H I S K T K D Q G T Y E D F V E G L R V F D K E G D G T V - - M G A E  
 I N - - - - - F T V F L T M F G E - - K L K G A D P E E T I L N A F K V F D P E G K D L K S A Y I K E

L R H V L A T L G E R L T E D E V E K L M - A G Q - E D - S - N G C I - N Y E - A F V K H I M A - S  
 L R H V L A T L G E R L T E E E V D K L M - A G Q - E D - A - N G C I - N Y E - A F V K H I M A - N  
 M - - - L M T Q E G R F S Q E E I D Q - M F A A F P P D V S G N L D Y K N L V H V I - I H G E E K D



**B**

(1) Z P K K P E P K K A A P A P A E A P A P F A A P E P K E D P T E L E F D S A K I K N E F T P E Q I E E  
 (2) Z P K K P E P K K A P E P K K E E P K P A P K P A E P E P K K E V E F N P A S I K I E F T P D Q I E E  
 (3) Z P K K - - - A K K - - - R I E - G A N S - - - - - N V - - - - - F - S M - - - - - F E Q A Q I Q E

F K E A F S L Y D R T P K A E M K I T Y G Q C G D V L R A L G T - N P T Q A E V L R V L G K P K Q E E  
 F K E A F S L F D R T P K S E M K I T Y A Q C G D V L R A L G T - N P T Q A E V M K V L G R P K Q E E  
 F K E A F T I M D Q N - R D G F - I D K A D L R D T F A A L G R L N V K N E E I D E M I - K E A P G P

M N S A K M D F E D F L P M L Q H I S K N K D Q G T Y E D F V E G L R V F D K E G D G T V - - M G A E  
 M N S K M I D F E T F L P M L Q H I S K T K D Q G T Y E D F V E G L R V F D K E G D G T V - - M G A E  
 I N - - - - - F T V F L T M F G E - - K L K G A D P E E T I L N A F K V F D P E G K D L K S A Y I K E

L R H V L A T L G E R L T E D E V E K L M - A G Q - E D - S - N G C I - N Y E - A F V K H I M A - S  
 L R H V L A T L G E R L T E E E V D K L M - A G Q - E D - A - N G C I - N Y E - A F V K H I M A - N  
 M - - - L M T Q E G R F S Q E E I D Q - M F A A F P P D V S G N L D Y K N L V H V I - I H G E E K D

**FIGURE 48** : Comparaison des structures primaires des ALC de myosines cardiaques ( Poulet & Porc ) et de la RLC de myosine cardiaque.

A - Comparaison des structures primaires des chaînes légères permettant la mise en évidence des régions homologues.

B - Comparaison permettant de mettre en évidence les positions des acides aminés hydrophobes qui maintiennent la conformation des chaînes légères.

(1) structure primaire de l'ALC-L<sub>27</sub> de Porc ; (2) ALC-L<sub>27</sub> de Poulet  
 (3) RLC-L<sub>18</sub> de Poulet.

## B - HYDROPHOBIE ET HYDROPHILIE DE LA MOLECULE

La méthode de Chou et Fasman nous a permis de prédire la position des hélices  $\alpha$  le long de l'axe peptidique de l'ALC-L<sub>27</sub>. En utilisant les travaux de Eisenberg et al ( 1982 ) [18] , Kaiser et Kezdy ( 1983 ) [53] Eisenberg et al ( 1984 ) [19] , différents programmes informatiques d'analyses permettent d'apprécier la nature hydrophobe ou hydrophile des différentes structures ( hélices  $\alpha$  ; feuillet  $\beta$  ), de donner même des indications sur la structure tertiaire d'une molécule ( par exemple, le caractère amphiphile des  $\alpha$ -hélices ).

L'étude de calcul "d'hydrophilicité" a pu être menée à partir de la structure primaire proposée pour l'ALC-L<sub>27</sub> qui se révèle être une molécule relativement peu hydrophile puisque la valeur moyenne d'hydrophilicité n'est que de 0,37.

Trois régions se révèlent néanmoins un peu plus hydrophile et donc plus extériorisées " à priori " :

- \* la région CB<sub>1</sub> N-terminale ( séquence 1-66 )
- \* dans la portion C-terminale,
  - les régions correspondant aux sites S<sub>1</sub> ( en structure coude  $\beta$  ) et S<sub>2</sub> en structure feuillet plissé ( la région occupée par le feuillet  $\beta_3$  ).
  - à un moindre titre , certaines régions des zones hélicoïdales  $\alpha_4$ ,  $\alpha_6$  et  $\alpha_7$ .

Ainsi, à titre d'illustration la région sub-N-terminale, montre des valeurs d'hydrophilicité très élevées :

Résidu en position N°2	Pro	1,5
3	Lys	2,0
4	Lys	2,0
5	Pro	1,4
6	Glu	1,3
7	Pro	0,8

D'ailleurs malgré la présence de 3 résidus de proline, la valeur moyenne d'hydrophilicité atteint 1,5, valeur élevée qui ne tient pas compte de l'hypothèse de l'existence en position 1 de la triméthyl N<sup>+</sup>-alanine qui pourrait caractériser l'ALC-L<sub>27</sub> de la myosine cardiaque de Porc, comme il a été décrit pour plusieurs ALC de myosines d'autres muscles et pour d'autres espèces ( Henry et al 1985 [40] ). Ainsi, ce



caractère très hydrophile très prononcé de cette partie de la molécule est à rapprocher du fait de l'interaction à son niveau avec l'actine ( Kassab 1982 [54] ; Sutoh 1982 [112] ).

Le caractère hydrophile-hydrophobe de toute l'ALC-L<sub>27</sub> a aussi pu être calculé ( Fig.49 ). Le tracé obtenu par rapport à l'hydrophilicité moyenne confirme les résultats précédemment obtenus et montre la présence de sites hydrophiles, pouvant correspondre à des sites de fixation des ions calcium, qu'entourent des hélices de nature hydrophobe.

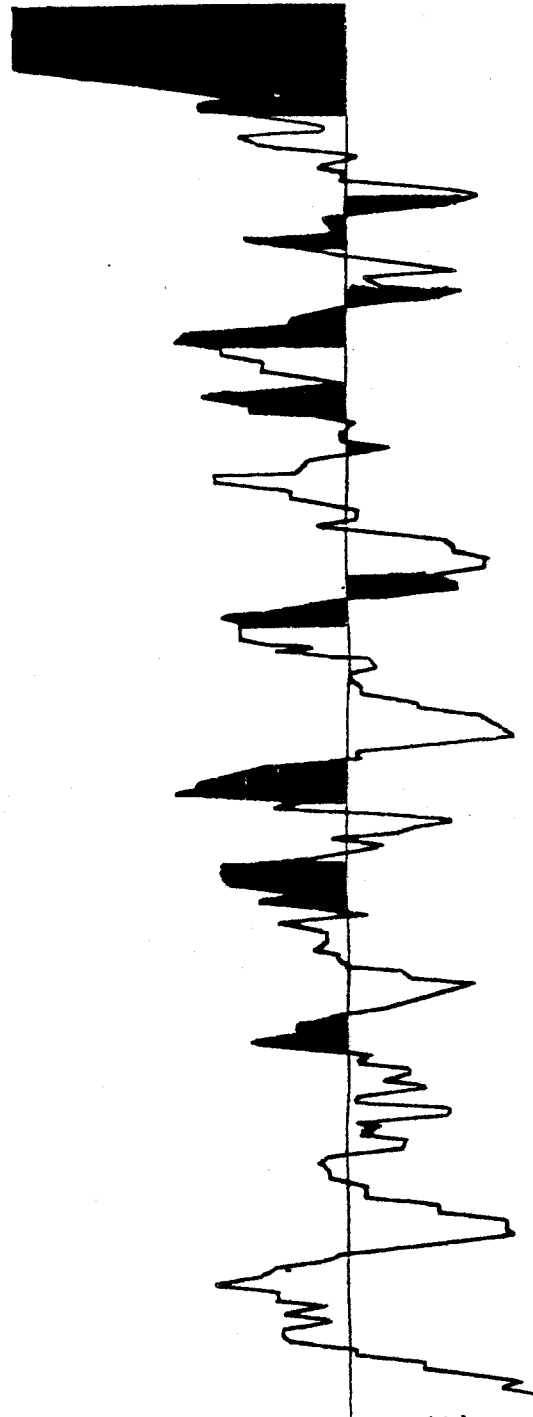
Nous avons également étudié en détail le caractère hydrophobe des différentes zones hélicoïdales (  $\alpha_1$  à  $\alpha_8$  ). Grâce au programme HELICE, nous obtenons une représentation graphique où l'hélice est vue selon son axe central à partir duquel les chaînes latérales des différents résidus d'acides aminés sont figurées. La longueur de la projection (le vecteur) est un signal numérique d'hydrophobicité associé directement à la nature de la chaîne latérale de l'acide aminé et la direction du vecteur est déterminée par la place de la chaîne latérale sur le pas de l'hélice ( Eisenberg et al 1982 [18] ).

Par exemple, pour l'hélice  $\alpha_1$ , nous distinguons nettement deux parties approximativement d'égale importance ( Fig.49 ) : la partie supérieure très hydrophobe peut interagir avec une partie hydrophobe d'une autre hélice par liaisons du type Van der Waals ; la partie inférieure plus hydrophile est celle plus exposée au milieu extérieur, aux solvants.

En règle générale, les autres hélices  $\alpha$  de l'ALC-L<sub>27</sub> possèdent cette double caractéristique d'une portion hydrophile et d'une autre hydrophobe ( Fig.50 ). Ces résultats confirment la possibilité de stabilisation de la structure tridimensionnelle de l'ALC par interaction hydrophobe hélice-hélice, comme l'avait suggéré Weeds et McLachlan ( 1974 ) [133] .

Nous avons aussi voulu vérifier le caractère amphiphile des différentes hélices : le moment hydrophobe est calculé pas à pas sur l'hélice et il faut que la valeur maximale du moment hydrophobe soit atteinte pour un angle de 100° pour considérer l'hélice amphiphile. S'il s'agit d'une structure en feuillet  $\beta$ , la valeur maximale du moment hydrophobe doit être atteinte pour un angle de 180° ( Eisenberg et al 1984 [19] ). L'amphiphilicité est un facteur de repliement de la molécule permettant d'exposer ses surfaces hydrophobes. Le calcul réalisé en partant des structures de l'ALC-L<sub>27</sub> révèle que seules les

1 50 100 150 192 N° résidus



HYDROPHILIE

← CB1 →

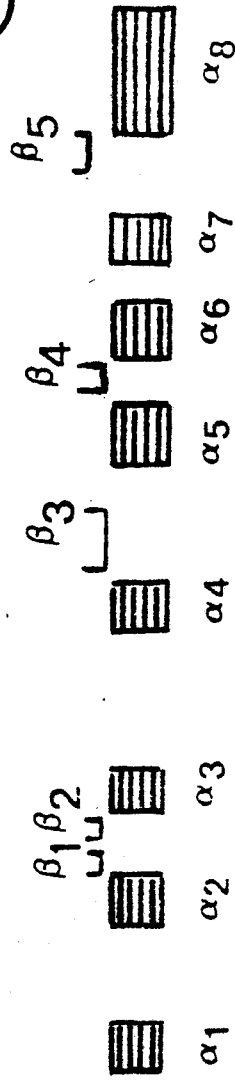


FIGURE 49 : HYDROPHOBICITE ET HYDROPHILICITE DE LA CHAINE LEGERE ALC-L<sub>27</sub> DE LA MYOSINE VENTRICULAIRE DE COEUR PORC.

La valeur pour chaque acide aminé est calculée par ordinateur pour un environnement de 7 acides aminés. Les valeurs sont portées par rapport à l'hydrophilicité moyenne de la molécule ( trait continu ). Les zones ombrées correspondent aux hélices .

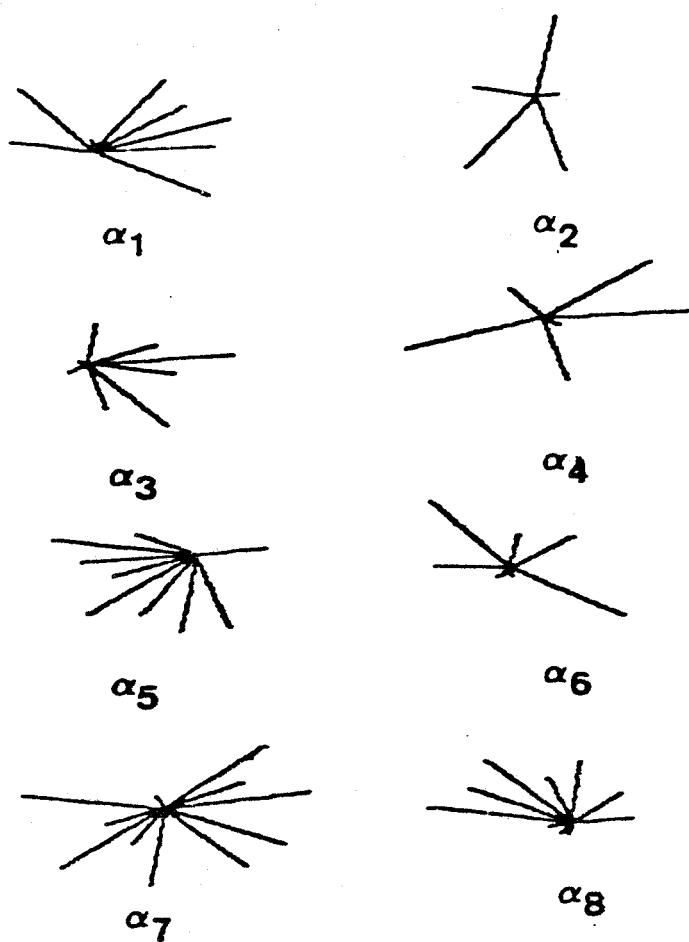


FIGURE 50 : REPRESENTATION GRAPHIQUE DU CARACTERE HYDROPHOBE DES DIFFERENTES HELICES DE L'ALC-L<sub>27</sub>.

hélices  $\alpha_1$  et  $\alpha_5$  ont probablement le caractère amphiphile ( Fig.51 ). Ces hélices auraient donc la propriété d'interagir avec d'autres structures tandis que les autres hélices  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_4$ ,  $\alpha_6$ ,  $\alpha_7$  et  $\alpha_8$  ne seraient quant à elles qu'enfouies au sein de la molécule.

Pour le feuillet plissé  $\beta_5$ , il s'agit bien d'une structure  $\beta$  dont le rôle doit être très important car la valeur maximale du moment hydrophobe est atteinte à  $180^\circ$ , cela reflète bien la tendance du  $\beta$ -sheet à se " vriller " pour mieux interagir avec d'autres structures ( Eisenberg et al 1984 [19] ).

### C - CONSTRUCTION DU MODELE MOLECULAIRE DE L'ALC-L<sub>27</sub> DE LA MYOSINE VENTRICULAIRE DE COEUR DE PORC

A partir de la structure secondaire avancée selon la méthode de Chou et Fasman, en fonction des résultats obtenus par les estimations d'amphiphilicité, d'hydrophobicité et d'hydrophilicité etc..., nous avons tenté de reconstituer la structure tridimensionnelle de la chaîne légère ALC-L<sub>27</sub> de la myosine ventriculaire de coeur de Porc. L'échelle utilisée est de 1,5 cm par acide aminé ou plutôt par liaison peptidique CO-CH-NH. Nous avons tenu compte des zones hélicoïdales ( 3,6 résidus par tour de spire ), des feuillets plissés  $\beta$  et des coudes  $\beta$ . Nous avons tenu compte du fait que certaines hélices interagissent entre elles par liaison hydrophobe ce qui nous a amené à placer à proximité les hélices  $\alpha_1$  et  $\alpha_6$ ;  $\alpha_2$  et  $\alpha_7$ ;  $\alpha_3$  et  $\alpha_4$ ; les feuillets plissés  $\beta_3$  et  $\beta_4$  ( cf. paragraphe A ). Les autres régions structurées se placent alors automatiquement :  $\alpha_3$  se rapproche d' $\alpha_4$ ; l'hélice  $\alpha_5$  et le feuillet plissé  $\beta_5$  se retrouve rejetter à la périphérie; l'hélice  $\alpha_8$  se rapproche de la région N-terminale ( Fig.52 ).

L'axe peptidique de la région N-terminale se retrouve complètement à l'écart de la région compacte formée d'hélices et de feuillets qui elle est assimilable à une ellipse. Alexis et Gratzer 1978 [1] avaient déjà considéré cette notion d'asymétrie des chaînes légères ALC et sa forme ellipsoïdale en fonction de la valeur du rayon apparent de Stokes.

Valeur  
du Moment  
Hydrophobe

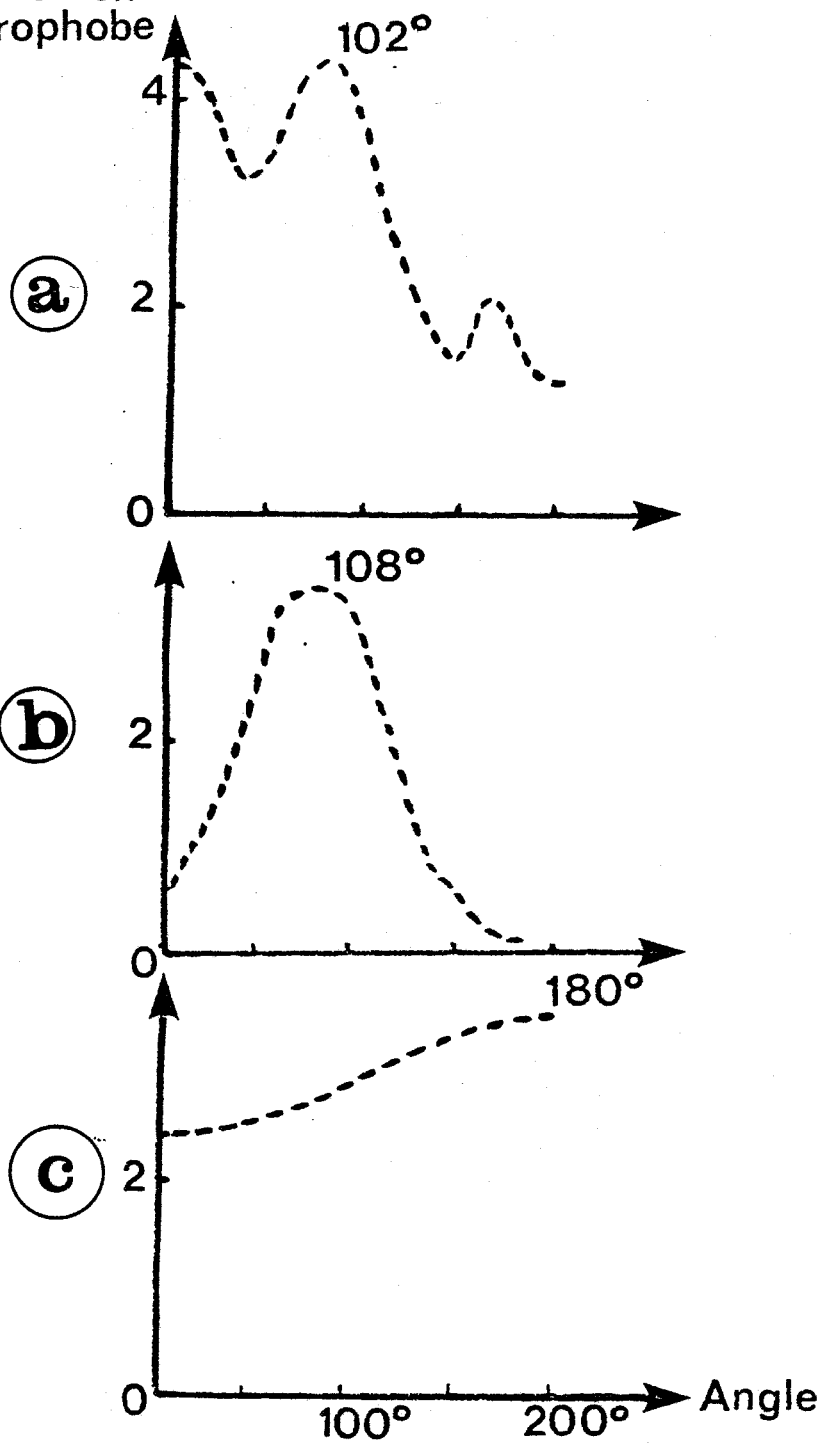


FIGURE 51 : CALCUL DU MOMENT HYDROPHOBE POUR DIFFERENTS ANGLES DU PAS DE L'HELICE  $\alpha$  OU DU FEUILLET PLISSE CONSIDERE.

( a ) Hélice  $\alpha_1$  ; ( b ) Hélice  $\alpha_5$  ; ( c ) Feuillet plissé  $\beta_5$

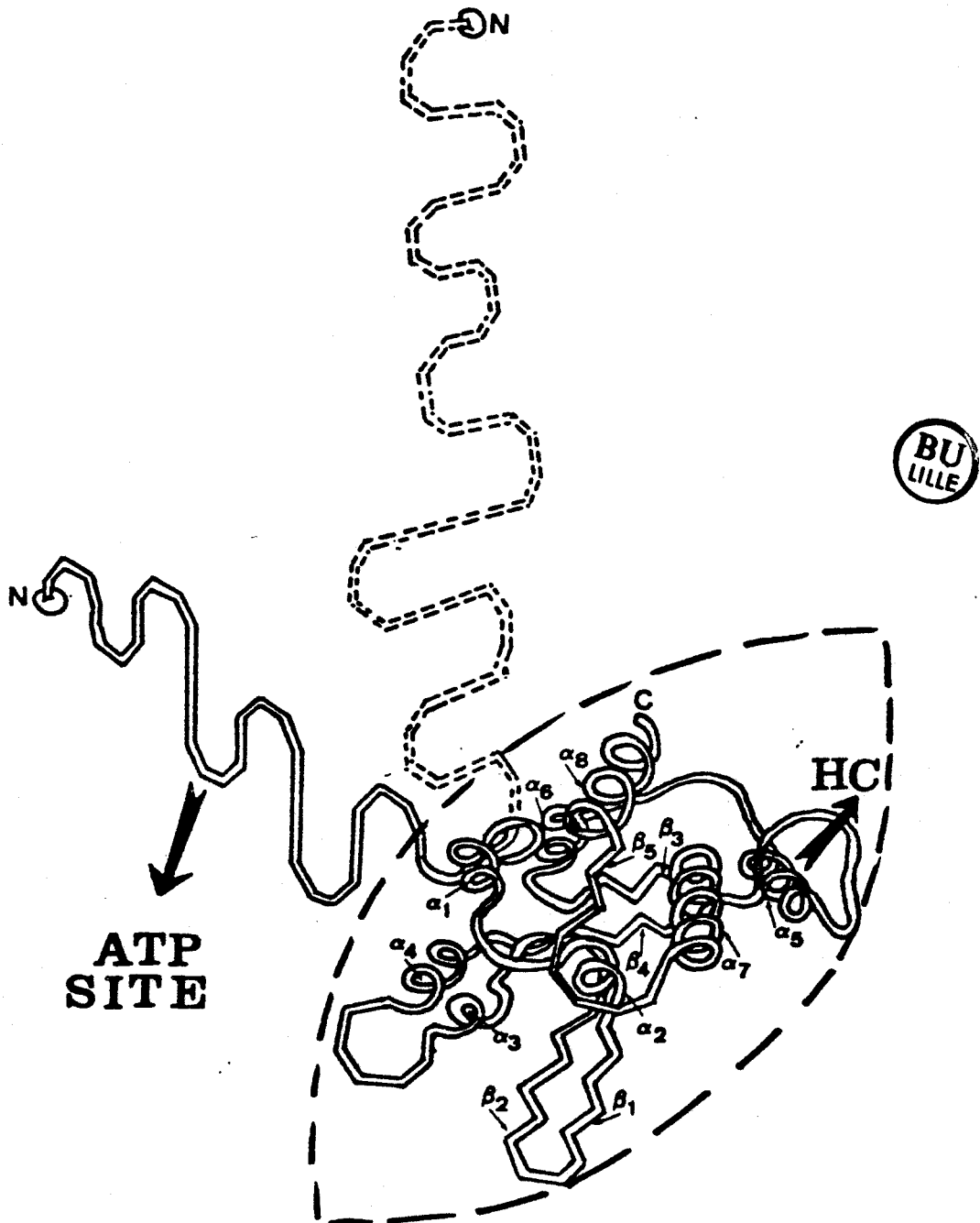


FIGURE 52 : MODELE MOLECULAIRE D'ALC

Représentation schématique de la structure tridimensionnelle de l'ALC-L<sub>27</sub> de la myosine ventriculaire de coeur de Porc. Les différentes hélices et feuillets plissés sont placés dans l'ordre établi selon la structure secondaire prédite par la méthode Chou & Fasman. La structure figurant en pointillé représente le fragment N-terminal (CB<sub>1</sub>) après action des ions calcium.

HC : chaines lourdes de la myosine.

Des données bibliographiques apportent des arguments supplémentaires en faveur de la structure tridimensionnelle du modèle moléculaire que nous proposons ( Fig.52 ) :

1°) En utilisant des composés fluorescents, Burke et Wang 1982 [6] ont montré que pour l'ALC-L<sub>25</sub> de la myosine de muscle squelettique de Lapin :

- La région Glu-Asp-Phe-Val-Glu-Gly-Leu-Arg-Val est une structure très conservée pour toutes les ALC ( Elle correspond à l'hélice  $\alpha_5$  dans notre modèle ) . Cette région par ses acides aminés hydrophobes ( soulignés dans la structure ) interagit avec les chaînes lourdes de la myosine. Ceci est en rapport avec le fait l'hélice  $\alpha_5$  dans notre modèle soit rejetée à la périphérie et possède un caractère amphiphile prononcé qui expose donc vers l'extérieur les chaînes latérales d'acides aminés hydrophobes sites d'interaction avec les chaînes lourdes.

- La partie N-terminale de l'ALC intervient au niveau du site ATPasique des chaînes lourdes.

- et enfin que cette région N-terminale interagit aussi avec la zone hélicoïdale  $\alpha_8$  de notre modèle, zone C-terminale qui est d'ailleurs proche dans l'espace de la région N-terminale de la molécule.

2°) Cardinaud 1982 [8] ; Kassab 1982 [54] ont mis en évidence que l'interaction actine-ALC s'effectue grâce à l'existence de la région très basique N-terminale ( pour les ALC de myosine de muscle squelettique comme pour celle de myosine cardiaque )

Triméthyl N<sup>+</sup>-Ala-Pro-Lys-Lys

dans le cas de l'ALC-L<sub>25</sub> de la myosine de muscle squelettique de Lapin La chaîne légère ALC-L<sub>27</sub> de Porc, comme de nombreuses ALC possède ce même enchaînement en acides aminés N-terminal ( Pro-Lys-Lys ).

3°) par ultracentrifugation analytique, Ueno et al ( 1985 ) [120] ont montré qu'un peptide de 14 résidus autour de la tyrosine en position 182 est impliqué dans l'interaction du fragment 20K de l'HMM-S<sub>1</sub> de la tête globulaire de la myosine et que l'interaction ne peut avoir lieu qu'en présence d'actine. La région  $\beta_5$  contenant le résidu de tyrosine 182, du fait de sa structure en feuillet plissé, de sa position dans l'architecture générale, de son caractère hydrophobe, enfin de son moment hydrophobe si caractéristique est certainement dans notre modèle moléculaire un site privilégié de l'interaction HMM-S<sub>1</sub>-ALC.

Ainsi, si nous retenons notre modèle moléculaire, nous distinguons pour l'ALC-L<sub>27</sub> deux régions bien différentes à fonction différenciée : la région C-terminale compacte, organisée et ellipsoïdale; la région N-terminale en structure coude  $\beta$  complètement à l'écart de l'ellipse. Les études de dichroïsme circulaire avaient montré que les ions calcium modifient la conformation de la partie N-terminale ( peptide CB<sub>1</sub> ) de l'ALC-L<sub>27</sub>, avec une augmentation du nombre des coudes  $\beta$ . Nous avons voulu savoir qu'elle pouvait être l'incidence de cette modification de structure sur notre modèle moléculaire. Il est connu qu'une structure en coude  $\beta$  est une structure très rigide et avec l'augmentation du nombre des coudes  $\beta$  nous voyons que l'axe peptidique de la région N-terminale pivote d'un angle d'environ 90° ( Fig. 52 ). Or si le fragment N-terminal interagit avec le site ATPasique des chaînes lourdes ( Burke et Wang 1982 [6] ), cela pourrait alors signifier que l'arrivée des ions calcium provoque la libération du site ATPasique par pivotement de l'axe peptidique de la partie N-terminale de L'ALC.

Nos résultats sont tout à fait en accord avec ceux obtenus récemment par Bhandari et al (1984) [4c] qui, en utilisant la résonance magnétique nucléaire, montrent que la région N-terminale de l'ALC possède une structure particulière, que nous décrivons également, d'une grande flexibilité, qui joue un rôle important lors de l'interaction actine-myosine.

Cette notion de dynamique moléculaire, comme elle se confirme, pourrait à elle seule valider ce travail physico-chimique.



# **CONCLUSION**

Le système protéique actine-myosine est universel. Mais si l'actine présente des caractéristiques assez constantes, il est maintenant bien établi que c'est au niveau de la myosine que s'effectue la différenciation des cellules motiles. La structure de la myosine diffère d'un type de muscle à l'autre et dans des muscles homogènes, comme le muscle cardiaque, la myosine semble spécifique d'une espèce animale donnée.

Pourquoi la nature a-t-elle imaginé cette diversité de structure, ce polymorphisme, de la molécule de myosine ? Il est encore bien difficile de répondre à ce jour à cette question.

\* Peut être ces myosines polymorphes ne représentent que des stades différents de l'évolution de cette protéine, la myosine de muscle strié étant vraisemblablement la forme la plus évoluée. Les variations phylogéniques sont aussi à rapprocher de ce qui est observé en pathologie en particulier tumorale

\* Peut être, aussi pour avoir une meilleure adaptabilité du système contractile aux exigences fonctionnelles : exemple du muscle antérieur rétracteur du byssus de la Moule ( ABRM ) où le système contractile permet une tension prolongée du muscle.

Notre étude de la chaîne légère ALC-L<sub>27</sub> de la myosine ventriculaire gauche de coeur de Porc a été entreprise afin

- de déterminer les caractéristiques structurales d'une chaîne légère de type " alcaline " chez un Mammifère supérieur.

- de tenter d'établir une relation structure-fonction qui pourrait être en rapport avec cette notion d'adaptabilité des systèmes contractiles et d'explorer plus directement, au niveau moléculaire, les interactions ALC-chaînes lourdes de la myosine.

Nous avons, ainsi dans un premier temps, 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 ALC-L<sub>27</sub> correspondant à la chaîne légère de type " alcaline ".

\* L'étude d'une structure primaire exigeant l'isolement d'une quantité relativement importante de protéine, nous avons donc mis au point un protocole simple et original de préparation et de purification de l'ALC-L<sub>27</sub> qui permet de séparer chaînes légères et chaînes lourdes de myosine cardiaque en une seule étape. L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence d'urée 8 M a permis en outre d'isoler pure chacune des chaînes légères, en individualisant même la forme phosphorylée RLC-L<sub>18p</sub>, et cela avec de très bons rendements.

\* Deux critères de pureté ont été retenus pour vérifier l'homogénéité de nos préparations : le gel de polyacrylamide en présence de SDS et l'identification des peptides de plus haut poids moléculaire obtenus après action du BrCN de l'ALC-L<sub>27</sub> et de la RLC-L<sub>18</sub>.

\* Différentes hydrolyses enzymatiques et coupures chimiques ont été conduites. Au cours de ces démarches il est apparu que quelque soit, le clivage de l'ALC-L<sub>27</sub> choisi des phénomènes d'agrégation se produisaient au cours, même, des réactions. Il apparaissaient très vite que les peptides de l'ALC-L<sub>27</sub> ont tendance à se réassocier spontanément et ceci seulement une fois libérés.

La formation d'insoluble a alors considérablement gêné les tentatives de fractionnement des différents hydrolysats d'ALC-L<sub>27</sub>. L'utilisation de méthodes dites " conventionnelles " de séparation ne nous a pas permis d'obtenir tous les peptides purs en quantité suffisante pour une étude de structure.

Aussi après de nombreux essais infructueux dans la mesure où les mêmes peptides étaient purifiés et les autres peu ou pas retrouvés ( quelque soit le clivage ou les supports chromatographiques ), nous avons eu recours à la chromatographie liquide haute performance en utilisant des colonnes de phase inversée ( RP-HPLC ), la séparation s'effectuant alors selon le caractère hydrophobe des peptides.

Cette technique s'avère sans conteste la plus efficace pour purifier en quantité les peptides de l'ALC-L<sub>27</sub>. Toutefois, cette méthodologie a été de mise en oeuvre relativement délicate, les phases mobiles et les phases stationnaires devant être minutieusement choisies selon le type d'hydrolysat à fractionner ( nombre et taille des peptides ; adsorption irréversible de certains peptides sur les phases stationnaires ). Nous avons également constaté qu'un préfractionnement par une technique " conventionnelle " améliore la capacité et la qualité de la séparation ultérieure des hydrolysats de l'ALC-L<sub>27</sub> par RP-HPLC.

Pour l'étude des peptides de l'ALC-L<sub>27</sub>, nous avons en fait effectué une évaluation systématique de différentes colonnes RP-HPLC commercialisées et bien que peu d'auteurs utilisent la colonne R-Phényl, nous avons finalement obtenu pour l'ALC-L<sub>27</sub> les meilleurs résultats avec ce type de colonne : les peptides de l'ALC-L<sub>27</sub> ainsi isolés en quantité, et surtout dans un état de pureté élevé, permettant l'alignement à l'aide de différents recouvrements, de 114 résidus d'acides aminés dans la séquence de 134 résidus qui constitue la partie C-terminale de notre chaîne légère.

Au total, nous avons établi une grande partie de la séquence couvrant : la région N-terminale ( 1-66 ) contigue à la région C-terminale ( 66-192 ) totalement déterminée.

Nous retiendrons que ce travail de détermination structurale fût délicat et même difficile

- difficile pour obtenir une stratégie efficace de coupure de l'axe peptidique;

- difficile pour définir les protocoles de fractionnement des fragments.

- délicat de mise au point pour minimiser les formations d'agrégats.

- enfin, difficile sur le plan de la détermination de la séquence du fait de la richesse en certains acides aminés connus pour gêner la séquence et faire chuter les rendements de cycle de dégradation de Edman.

Notre modèle sur ce plan représente un exemple de choix dans l'avenir pour combiner des approches physiques et chimiques lors de détermination de structure de protéines.

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés à la structure secondaire de l'ALC-L<sub>27</sub>, en axant notre intérêt sur le fragment N-terminal. Cette étude nous a fourni des résultats nombreux qui apportent réellement à la connaissance des chaînes légères en établissant que

(i) la structure secondaire du fragment N-terminal en structure coude  $\beta$  est tout à fait exemplaire et totalement différente de la structure organisée en hélice  $\alpha$  et en feuillets  $\beta$  de la région C-terminale.

(ii) la structure secondaire est modifiée de façon spécifique par les ions calcium.

Cette modification de structure de la région N-terminale en présence d'ions calcium pourrait signifier que l'ALC-L<sub>27</sub> joue un rôle dans l'interaction calcium-dépendante actine-myosine d'un muscle strié de vertébré : la région N-terminale riche en proline, alanine, acide glutamique masquant le site ATPasique des chaînes lourdes de la myosine qui est libéré avec l'arrivée du calcium.

Avec l'aide de notre modèle moléculaire, nous pouvons, nous le pensons, évoquer en toute hypothèse rendre compte de différents événements se produisant à l'échelle moléculaire lors de l'arrivée du calcium qui vient se fixer sur les résidus d'acide glutamique de la région N-terminale, avant l'interaction actine-myosine. Ce mécanisme pourrait ainsi être retenu pour les ALC possédant ce fragment N-terminal si caractéristique.

Enfin, notre étude comparative des structures primaires des ALC, la très forte analogie de structure entre les ALC et les calcioprotéines du système contractile nous permet de penser que ces différentes protéines dérivent d'un même gène ancestral commun. Il aurait été surprenant que les muscles striés de vertébrés ne possèdent qu'un seul système de régulation par le calcium ( la TN C ) alors que chez les invertébrés deux systèmes ( TN C et chaîne légère ) coexistent. Ainsi, au cours de l'évolution des espèces des systèmes biologiques de plus en plus complexes se sont individualisés pour mieux contrôler et affiner la contraction musculaire dans son rendement et dans ses modalités d'expression fonctionnelle.

Le développement de cette approche structure-fonction devient actuellement une préoccupation de la Biologie Moléculaire. Le contrôle de l'adaptation du muscle passe par des associatifs moléculaires où les éléments fonctionnels sont régulés dès leur expression génique pour satisfaire à une fonction. Certainement, dans un avenir proche, certaines situations pathologiques bénéficieront aussi de ces recherches. Notre satisfaction sera par une biochimie traditionnelle, délicate de mise en oeuvre, d'avoir participé à cette évolution fonctionnaliste des éléments constitutifs de la myosine.

# **BIBLIOGRAPHIE**

1 - Alexis , M.N. et Gratzer , W.B. ( 1978 )

Biochemistry 17 2319-2325.

Interaction of skeletal myosin light chains with calcium ions.

2 - Aubert , J.P. , Porchet , N. , Boersma , A. , Loucheux-Lefebvre ,  
M.H. et Degand , P. ( 1982 )

Biochim.Biophys.Acta 704 361-365.

Circular dichroism studies on the proline-rich glycoprotein of human parotid saliva.

3 - Barany , M. , Gaetjens , E. , Barany , K.J. et Karp , E.D. ( 1964 )

Arch.Biochem.Biophys. 106 280-293.

Comparative studies of rabbit cardiac and skeletal myosins.

4 - Barany , M. , Bailin , G. et Barany , K.J. ( 1969 )

J. Biol. Chem. 244 648-657.

Reaction of myosin with 1-fluoro-2,4 dinitrobenzene at low ionic strength.

4b - Barton , P.J.R. , Cohen , A. , Robert , B. , Fiszman , M.Y. ,  
Bonhomme , F. , Guénet , J.L. , Leader , D.P. et Buckingham , M.E.  
( 1985 )

J.Biol.Chem. 260 8578-8584.

The myosin alkali light chains of mouse ventricular and slow skeletal muscle are indisguishable and are encoded by the same gene.

4c - Bhandari , D.G. , Levine , B.A. , Trayer , I.P. et Yeadon , M.E.  
( 1986 )

Eur.J.Biochem. 160 349-356.

<sup>3</sup>H-NMR study of mobility and conformational constraints within the proline-rich N-terminal of LC<sub>1</sub> alkali light chain of skeletal myosin.

5 - Biro , E.N.A. , Szilagyi , L. et Balint , M. ( 1972 )

Cold-Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37 55-63.

Studies on the helical segment of the myosin molecule.

6 - Burke , M. et Wang , H.L. ( 1982 )

Arch.Biochem.Biophys. 213 363-371.

A comparison of the alkali light chain subunits of the vertebrate skeletal muscle myosin in free and heavy chain associated states.

7 - Burke , M. , Sivaramakrisnan , M. et Kamalakannan , V. ( 1983 )  
Biochemistry 22 3046-3053.

On the mode of the alkali light chain association to the heavy chain of myosin subfragment-1 : Evidence for the involvement of the carboxyl-terminal region of the heavy chain.

8 - Cardinaud , R. ( 1982 )  
Eur.J.Biochem. 122 527-533.

" Artificial " myosin isoenzymes ; preparation and characteristics.

9 - Chou , P.Y. et Fasman , G.D. ( 1974 )  
Biochemistry 13 211-245.

Conformational parameters for amino acids in helical,  $\beta$ -sheet and random coil regions calculated from proteins.

10 - Chou , P.Y. et Fasman , G.D. ( 1978 )  
Ann.Rev.Biochem. 47 251-276.

Empirical predictions of protein conformation.

11 - Collins , J.H. , Jakes , R. , Kendrick-Jones , J. , Leszyk , J. Barouch , W. , Theibert , J.L. , Spiegel , J. et Szent-Gyorgyi , A.G. ( 1986 )

Biochemistry 25 7651-7656.

Amino-acid sequence of myosin essential light chain from scallop Aquiptecten irradians.

12 - Craig , R. , Szent-Györgyi , A.G. , Beese , L. , Flicker , P. , Vibert , P. et Cohen , C. ( 1980 )  
J.Mol.Biol. 140 35-55.

Electron microscopy of thin filaments decorated with a  $\text{Ca}^{2+}$ -regulated myosin.

13 - Cummins , P. et Perry , S.V. ( 1973 )  
Biochem.J. 133 765-777.

The subunits and biological activity of polymorphic forms of tropomyosin.

14 - D'Albis , A. , Pantaloni , C. et Béchet , J.J. ( 1979 )  
Eur.J.Biochem. 99 261-272.

An electrophoretic study of native isozymes and their subunit content.



15 - D'Albis , A. ( 1983 )

Pathol.Biol. 31 5-7.

Le polymorphisme de la myosine musculaire.

16 - Dhoot , G.K. , Gell , P.G.H. et Perry , S.V. ( 1978 )

Exp.Cell Res. 117 357-370.

The localization of the different forms of troponin I in skeletal and cardiac muscle cells.

17 - Eaton , B.L. et Pepe , F.A. ( 1972 )

J.Mol.Biol. 82 421-423.

Myosin filaments showing a 430 A axial repeat periodicity.

18 - Eisenberg , D. , Weiss , R.M. et Terwilliger , T.C. ( 1982 )

Nature 299 371-374.

The helical hydrophobic moment : a measure of the amphiphilicity of a helix.

19 - Eisenberg , D. , Weiss , R.M. et Terwilliger , T.C. ( 1984 )

Proc.Natl.Acad.Sci. ( USA ) 81 140-144.

The hydrophobic moment detects periodicity in protein hydrophobicity.

20 - Elzinga , M. ( 1970 )

Biochemistry 9 1365-1374.

Amino acid sequence studies on rabbit skeletal muscle actin : cyanogen bromide cleavage of the protein and determination the sequences of seven of the resulting peptides.

21 - Elzinga , M. ( 1983 )

Communication Personnelle

Tentative amino acid sequence ( up to 800 residues ) of HMM-S<sub>1</sub> and HMM-S<sub>2</sub> of rabbit skeletal muscle myosin.

22 - Elzinga , M. , Collins , J.H. , Kuehl , W.M. et Adelstein , R.S.

( 1973 ) Proc.Natl.Acad.Sci. ( USA ) 70 2687-2691.

Complete amino acid sequence of actin of rabbit skeletal muscle.

23 - Elzinga , M. et Collins , J.H. ( 1977 )

Proc.Natl.Acad.Sci. ( USA ) 74 4281-4284.

Amino acid sequence of a myosin fragment that contains SH 1, SH 2 and N<sup>t</sup>-methylhistidine.

- 24 - Etlinger , J.D. et Fishman , D.A. ( 1972 )  
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 37 511-522.  
M and Z band components and the assembly of myofibrils.
- 25 - Fabian , F. et Szilagyí , L. ( 1978 )  
Acta Biochim. et Biophys.Acad.Sci. ( Hung. ) 13 1-5.  
Isolation of the C-terminal peptides of rabbit skeletal myosin.
- 26 - Frank , G. et Weeds , A.G. ( 1974 )  
Eur.J.Biochem. 144 317-334.  
The amino acid sequence of the alkali light chains of rabbit skeletal-muscle myosin.
- 27 - Frearson , N. et Perry , S.V. ( 1975 )  
Biochem.J. 151 99-107.  
Phosphorylation of the light-chain components of myosin from cardiac and red skeletal muscles.
- 28 - Gauthier , G.F. , Lowey , S. , Benfield , P.A. et Hobbs , A.W.  
( 1982 ) J.Cell Biol. 92 471-484.  
Distribution and properties of myosin isoenzymes in developing avian and mammalian skeletal muscle fibers.
- 29 - Gershman , L.C. , Stracher , A. et Dreizen , P. ( 1969 )  
J.Biol.Chem. 244 2726-2732.  
Subunit structure of myosin. III : A proposed model for rabbit skeletal myosin.
- 30 - Gillis , J.M. ( 1975 )  
La Recherche 6 840-849.  
Le controle intracellulaire de la contraction musculaire.
- 31 - Grandier-Vazeille , X. ( 1982 )  
Thèse de Doctorat d'Etat es-Sciences Naturelles ( LILLE ).  
Etude 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 coeur de Porc.

32 - Grandier-Vazeille , X. et Tetaert , D. ( 1978 )

Biochimie 60 409-415.

Isolement des chaines légères de la myosine cardiaque de Porc par électrophorèse préparative et étude des polypeptides obtenus après action du bromure de cyanogène.

33 - Grandier-Vazeille , X. , Tetaert , D., Hildebrand , H.F. et Biserte , G. ( 1979 )

Proc.VIII<sup>th</sup> European Conference on Muscle and Cell Motility

Heidelberg ( R.F.A. ) 8 110.

New evidences of pig cardiac myosin isoenzymes.

34 - Grandier-Vazeille , X. , Tetaert , D., Hildebrand , H.F. et Biserte , G. ( 1980 )

Eur.J.Cell Biol. 21 116-121.

Pig cardiac myosin isoenzymes.

35 - Grandier-Vazeille , X. , Tetaert , D., Hémon , B. et Biserte , G. ( 1982 ) Protides Biol.Fluids Proc.Colloq. 30 717-721.

Evaluation of commercial RP-HPLC columns for the separation of peptides from porcine cardiac myosin light chain L<sub>27</sub>.

36 - Grandier-Vazeille , X. , Tetaert , D., Hémon , B. et Biserte , G. ( 1983 ) Comp.Biochem.Physiol. 76B 263-270.

Phylogenetic studies of cardiac myosins from amphibia to mammals.

37 - Greaser , M.L. et Gergely , J. ( 1971 )

J.Biol.Chem. 246 4226-4233.

Reconstitution of troponin activity from three protein components.

38 - Han , K.K. , Tetaert , D. , Moschetto , Y. , Dautrevaux , M. et Kopeyan , C. ( 1972 )

Eur.J.Biochem. 27 585-592.

The covalent structure of sheep heart myoglobin.

39 - Hardwicke , P.M.D. , Wallimann , T. et Szent-Györgyi A.G. ( 1982 )

J.Mol.Biol. 156 141-152.

Regulatory and essential light chain interactions in Scallop myosin.

I : Protection of essential light chain thiol groups by regulatory light chains.

- 39b - Hardwicke , P.M.D. et Szent-Gyorgyi , A.G. ( 1985 )  
J.Mol.Biol. 183 203-211.  
Proximity of regulatory light chains in scallop myosin.
- 40 - Henry , G.D. , Trayer , I.P. , Brewer , S. et Levine , B.A.  
( 1985 ) Eur.J.Biochem. 148 75-82.  
The widespread distribution of  $\alpha$ -N-trimethylalanine as the N-terminal amino acid of light chains from vertebrate striated muscle myosins.
- 41 - Herzberg , O. et James , M.N.G. ( 1985 )  
Biochemistry 24 5298-5302.  
Common structural framework of the two  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  binding loops of troponin C and other  $\text{Ca}^{2+}$  binding proteins.
- 42 - Hildebrand , H.F. , Tetaert , D. et Gilloteaux , J. ( 1979 )  
C.R.Acad.Sci. ( PARIS ) 288D 109-112.  
Etude des filaments de paramyosine de muscle lisse de Mytilus edulis L :  
Ultrastructure, purification et interaction paramyosine-myosine.
- 43 - Hiratsuka , T. ( 1980 )  
Biochim.Biophys.Acta 625 369-373.  
A simple method for the separation of cardiac myosin light chains.
- 44 - Hitchcock , S.E. , Huxley , H.E. et Szent-Györgyi , A.G. ( 1974 )  
J.Mol.Biol. 80 825-835.  
Calcium sensitive binding of troponin to actin-tropomyosin : a two-site model for troponin action.
- 45 - Hoh , J.F.Y. , McGrath , P.A. et Hale , P.T. ( 1978 )  
J.Mol.Cell Cardiol. 10 1053-1076.  
Electrophoretic analysis of multiple forms of myosin in fast-twitch and slow-twitch muscles of the chick.
- 46 - Holt , J.C. et Lowey , S. ( 1975 )  
Biochemistry 14 4609-4620.  
An immunological approach to the role of the low molecular weight subunits in myosin. I : Physical-chemical and immunological characterization of the light chains.

47 - Huszar , G. et Elzinga , M. ( 1972 )

J.Biol.Chem. 247 745-753.

Homologous methylated and monomethylated histidine peptides in skeletal and cardiac myosins.

48 - Huxley , H.E. ( 1963 )

J.Mol.Biol. 7 281-308.

Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filament from striated muscle.

49 - Huxley , H.E. ( 1969 )

Science 164 1356-1366.

The mechanism of muscular contraction : Recent structural studies suggest a revealing model for cross-bridge action at variable filament spacing.

50 - Huxley , H.E. ( 1973 )

Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 37 361-376.

Structural changes in the actin- and myosin-containing filaments during contraction.

51 - Huxley , H.E. et Brown , W. ( 1967 )

J.Mol.Biol. 27 203-225.

The low-angle X ray diagram of vertebrate striated muscle and its behaviour during contraction and rigor.

52 - Jacobson , G.R. , Schaffer , M.H. , Stark , G.R. et Vanaman , T.C.

( 1973 ) J.Mol.Biol. 218 6583-6591.

Specific chemical cleavage in high yield at the aminopeptide bonds of cysteine and cystine residues.

53 - Kaiser , E.T. et Kezdy , F.J. ( 1983 )

Proc.Natl.Acad.Sci. ( USA ) 80 1137-1143.

Secondary structures of protein and peptides in amphiphilic environments.

54 - Kassab , R. ( 1982 )

Communication à la Table Ronde " Chaines légères de la myosine "  
CEA ( PARIS ).

- 55 - Katoh , N. et Kubo , S. ( 1978 )  
Biochim.Biophys.Acta 535 401-411.  
Light chains of chicken embryonic gizzard myosin.
- 56 - Kendrick-Jones , J. et Jakes ( 1976 )  
TIBS ( Dec. ) 281-284.  
The regulatory function of the myosin light chains.
- 57 - Kendrick-Jones , J. , Szentkiralyi , E.M. et Szent-Györgyi , A.G.  
( 1979 ) J.Mol.Biol. 104 747-775.  
Regulatory light chains in myosins.
- 58 - Kerckaert , J.P. ( 1978 )  
Anal.Biochem. 84 354-360.  
Highly simplified analytical or preparative slab gel electrophoresis.
- 59 - Kessler , D. , Eisenlohr , L.C. , Lathwell , M. , Huang , J. ,  
Taylor , H.C. , Godfrey , G.D. et Spady , M.L. ( 1980 )  
J.Muscle Res.Cell Motility 1 63-71.  
Physarum myosin light chain binds calcium.
- 60 - Klotz , C. , Aumont , M.C. , Léger , J.J. et Swynghedauw , B.  
( 1975 ) Biochim.Biophys.Acta 386 461-469.  
Human cardiac myosin ATPase and light subunits : a comparative study.
- 61 - Klotz , C. , Léger , J.J. , Marotte , F. et Mendes , H. ( 1978 )  
Biochim.Biophys.Acta 532 369-372.  
The separation of the myosin light chains on agarose beads.
- 62 - Klotz , C. , Léger , J.J. et Elzinga , M. ( 1982 )  
Cir.Res. 50 201-209.  
Comparative sequence of myosin light chains from normal and hypertrophied human hearts.
- 63 - Knappeis , G.G. et Carlsen , F. ( 1968 )  
J.Cell Biol. 38 202-211.  
The ultrastructure of the M-line in skeletal muscle.
- 64 - Kretsinger , R.H. ( 1972 )  
Nature ( New Biol. ) 240 85-88.  
Gene duplication in carp muscle calcium binding protein.

65 - Kretsinger , R.H. et Nockolds , C.E.( 1973 )  
J.Biol.Chem. 248 3313-3326.

66 - Kretsinger , R.H. et Barry , C.D. ( 1975 )  
Biochim.Biophys.Acta 405 40-52.

The predicted structure of the calcium-binding component of troponin.

67 - Labbé , J.P. , Mornet , D. , Vandest , P. et Kassab , R. ( 1981 )  
Biochim.Biophys.Res.Comm. 102 466-475.

Proximity of alkali light chains to 27K domain of the heavy chain in myosin subfragment-1.

67b - Labbé , J.P. , Audemard , E. , Berthrand , R. et Kassab , R.  
( 1986 )

Biochemistry 25 8325-8330.

Specific interactions of the alkali light chain 1 in skeletal myosin heads probed by chemical cross-linking.

68 - Laemmli , U.K. ( 1970 )  
Nature 227 680-685.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>.

69 - Landon , F. et Oriol , C. ( 1978 )  
Biochem.Biophys.Res.Comm. 62 241-245.

Native conformation of M-protein.

70 - Leavis , P.C. et Kraft , E.L. ( 1978 )  
Arch.Biochem.Biophys. 186 411-415.

71 - Léger , J.J. et Focant , B. ( 1973 )  
Biochim.Biophys.Acta 328 166-172.

Low molecular weight components of cow smooth muscle myosin : characterization and comparison with those of striated muscles.

72 - Léger , J.J. et Elzinga , M. ( 1977 )  
Biochem.Biophys.Res.Comm. 74 1390-1396.

Studies on cardiac myosin light chains : comparison of the sequences of cardiac and skeletal myosin LC 2.

73 - Lewis , W.G. et Smillie , L.B. ( 1980 )

J.Biol.Chem. 255 6854-6859.

The amino acid sequence of rabbit cardiac tropomyosin.

74 - Lompré , A.M. , Schwartz , K. , D'Albis , A. , Lacombe , G. ,

Van Thiem , N.S. et Swynghedauw , B. ( 1979 )

Nature 282 105-107.

Myosin isoenzyme redistribution in chronic heart overload.

75 - McLachlan A.D. ( 1984 )

Ann.Rev.Biophys.Bioeng. 13 167-189.

Structural implications of the myosin amino acid sequence.

76 - Mahoney , W.C. et Hermodson , M.A. ( 1980 )

J.Biol.Chem. 255 11199-11202.

Separation of large denatured peptides by reverse phase high performance liquid chromatography. Trifluoroacetic acid as a peptide solvent.

77 - Maita , T. , Umegane , T. , Kato , Y. et Matsuda , G. ( 1980 )

Eur.J.Biochem. 107 565-575.

Amino acid sequence of the L-1 light chain of chicken cardiac-muscle myosin.

78 - Maita , T. , Chen , I.J. et Matsuda , G. ( 1981a )

Eur.J.Biochem. 117 417-424.

Amino acid sequence of the 20000-molecular-weight light chain of chicken gizzard-muscle myosin.

79 - Maita , T. , Umegane , T. et Matsuda , G. ( 1981b )

Eur.J.Biochem. 114 45-49.

Amino acid sequence of the L-4 light chain of chicken skeletal-muscle myosin.

80 - Maita , T. , Konno , K. , Osima , T. et Matsuda , G. ( 1984 )

J.Biochem. 95 167-177.

Amino acid sequences of the regulatory light chains of striated adductor muscle myosins from ego-giant scallop and akazara scallop.

81 - Mani , R.S et Kay , K.M. ( 1978 )

Biochim.Biophys.Acta 536 134-141.

Interaction studies of the 165000 daltons protein component of the M-line with the S<sub>2</sub> subfragment of myosin.



- 82 - Mannherz , H.G. , Barrington-Leich , J. , Holmes , K.C. et Rosenbaum , G. ( 1973 )  
Nature ( New Biol. ) 241 226-229.  
Identification of the transitory complex myosin-ATP by the use of  $\alpha,\beta$ -methylene-ATP.
- 83 - Masaki , T. ( 1974 )  
J.Biochem. 76 441-449.  
Immunochemical comparison of myosins from chicken cardiac, fast white, slow red and smooth muscles.
- 84 - Matsuda , G., Maita , T. , Suzuyama, Y. , Setoguchi , M. et Umegane , T. ( 1977a )  
J.Biochem. 81 809-811.  
Amino acid sequence of the L-2 light chain of rabbit skeletal muscle myosin.
- 85 - Matsuda , G., Suzuyama , Y., Maita , T. et Umegane , T. ( 1977b )  
Febs Letters 84 53-56.  
The L-2 light chain of chicken skeletal muscle myosin.
- 86 - Matsuda , G. Maita , T. , Kato , Y. , Chen , I.J. et Umegane , G. ( 1981 ) Febs Letters 135 232-235.  
Amino acid sequences of the cardiac 1-2A,L-2B and gizzard 17000-Mr light chains of chicken muscle myosin.
- 87 - Morel , J.E. ( 1984 ) Progress in Biophysics and Molecular Biology 44 44-73.  
A theoretical and semi-empirical approach of muscle mechanics and energetics, independent of the mechanical role of the cross-bridges :  
I : Mechanics of a single fibre ; II : Energetics of the whole muscle.
- 88 - Morel , J.E. et Pinset-Härström , I. ( 1975 )  
Biomédecine 22 88-96.  
Ultrastructure of the contractile system of striated skeletal muscle and processes of muscular contraction I : Ultrastructure of the myofibril and source of energy.
- 89 - Mornet , D. , Berthrand , R. , Pantel , P. , Audemard , E. et Kassab , R. ( 1981 )  
Biochemistry 20 2110-2120.  
Proteolytic approach to structure and function of actin recognition site in myosin heads.

90 - Nabeshima , Y. , Fuji-Kuriyama , Y. , Muramatsu , M. et Ogata , K.  
( 1984 ) Nature 308 333-338.

Alternative transcription and two modes of splicing result in two myosin light chains from one gene.

91 - Offer , G.W. ( 1965 )  
Biochim.Biophys.Acta 111 191-207.

The N-terminus on N-acetyl peptides from a pronase digest of myosin.

92 - Offer , G.W. ( 1973 )  
Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol. 37 87-93.

C-protein and the periodicity in the thick filaments of vertebrate skeletal muscle.

93 - Offer , G.W. et Elliot , A. ( 1978 )  
Nature 271 325-329.

Can a myosin molecule bind to two actin filaments ?

93b - Okamoto , Y. , Sekine , T. , Grommer , J. et Yount , R.G. ( 1986 )  
Nature 324 78-80.

The essential light chains constitute part of the active site of smooth muscle myosin.

94 - Pearlstone , J.R. , Carpentier , M.R. , Johnson , P. et  
Smillie , L.B. ( 1976 )  
Proc.Natl.Acad.Sci. ( USA ) 73 1902-1906.

Amino-acid sequence of tropomyosin-binding component of rabbit skeletal muscle troponin.

95 - Pepe , F.A. et Drucker , B. ( 1979 )  
J.Mol.Biol. 130 379-393.

The myosin filament VI : Myosin content

96 - Pinset-Härström , I. et Truffly , J. ( 1979 )  
J.Mol.Biol. 134 173-188.

Effect of adenosine triphosphate, inorganic phosphate and divalent cations on the size and structure of synthetic myosin filaments : an electron microscope study.

97 - Pliszka , B. , Strzelecka-Golaszewska , H. , Pantaloni , C. et D'Albis , A. ( 1981 )

Eur.J.Cell Biol. 25 144-149.

Comparison of myosin isoenzymes from slow-tonic and fast-twitch fibers of frog muscle.

98 - Pope , B. , Hoh , J.F.Y. et Weeds , A.G. ( 1980 )

Febs Letters 118 205-208.

The ATPase activities of rat cardiac myosin isoenzymes.

99 - Pollard , T.D. ( 1975 )

J.Cell Biol. 67 93-104.

Electron microscopy of synthetic myosin filaments : evidence for cross-bridge, flexibility and copolymer formation.

100 - Porzio , M.A. et Pearson , A.M. ( 1977 )

Biochim.Biophys.Acta 490 27-34.

Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.

101 - Ramirez , F. , Shulka , K.K. et Levy , H.M. ( 1979 )

J.theor.Biol. 76 351-357.

A model for the active site of skeletal muscle myosin.

102 - Richards , E.G. , Chung , C.S. , Menzel , D.B. et Olcott , M.S.

( 1967 ) Biochemistry 6 528-533.

Chromatography of myosin on diethylaminoethyl-Sephadex A 50.

102b - Robert , B. , Daubas , P. , Akimenko , M.A. , Cohen , A. , Garner , I. , Guénet , J.L. et Buckingham , M. ( 1984 )

Cell 39 129-140.

A single locus in the mouse encodes both myosin light chains 1 and 3, a second locus corresponds to a related pseudogene.

103 - Sarkar , S. , Srèter , F.A. et Gergely , J. ( 1971 )

Proc.Natl.Acad.Sci. ( USA ) 68 946-950.

Light chains of myosins from white, red and cardiac muscles.

104 - Scholey , J.M. , Taylor , K.A. et Kendrick-Jones , J. ( 1980 )

Biochimie 63 255-271.

The role of myosin light chains in regulatory actin-myosin interaction.

105 - Schlossler ,W. , Pelouch , V. , Mielke , F. et Porstman , B.  
( 1982 ) Acta Biol.Med.Germ., Band 41 K33-K37.

A simple and fast method for the preparation of the human cardiac myosin light chains.

106 - Schwartz , K. ( 1978 )  
La Recherche 91 683-685.

La myosine : une famille de protéines polymorphes.

107 - Shulka , K.K. , Ramirez , F. , Marecek , J.F. et Levy , H.M.  
( 1979 ) J.theor.Biol. 76 359-367.

A mechanism for the hydrolysis of Mg-ATP by actomyosin of skeletal muscle.

108 - Sivaramakrishnan , M. et Burke , M. ( 1981 )  
J.Biol.Chem. 257 1102-1105.

The free heavy chain of vertebrate skeletal myosin subfragment 1 shows full enzymatic activity.

109 - Sobieszek , A. et Bremel , R.D. ( 1975 )  
Eur.J.Biochem. 55 49-50.

Preparation and properties of vertebrate smooth-muscle myofibrils and actomyosin.

110 - Starr , R. et Offer , G.W. ( 1971 )  
Febs Letters 15 40-43.

Polypeptide chains of intermediate molecular weight in myosin preparations.

111 - Sutoh , K. ( 1981 )  
Biochemistry 20 3281-3285.

Location of SH1 and SH2 along a heavy chain of myosin subfragment 1.

112 - Sutoh , K. ( 1982 )  
Biochemistry 21 4800-4804.

Identification of myosin-binding sites on the actin sequence.

113 - Suzuki , A. , Goll , D.E. , Singh , I., Allen , R.E. ,  
Robson , R.M. et Stromer , M. ( 1976 )  
J.Biol.Chem. 251 6860-6870.

Some properties of purified skeletal muscle  $\alpha$ -actinin.

- 114 - Szent-Györgyi , A.G. , Cohen , C. et Kendrick-Jones , J. ( 1971 )  
J.Mol.Biol. 56 239-252.  
Paramyosin and the filaments of molluscan " catch " muscles. II : Native filaments : isolation and characterization.
- 115 - Taylor , E.W. ( 1972 )  
Ann.Rev.Biochem. - 41 577-616.  
Chemistry of muscle contraction.
- 116 - Tetaert , D. ( 1980 )  
Encyclopeadia Universialis 19 15.  
L'actine
- 117 - Tetaert , D., Grandier-Vazeille , X., Hémon , B. et Biserte , G.  
( 1982 ) J.Muscle Res.Cell Motility 3 474-475.  
Partial amino acid sequence of 27000 daltons light chain of pig left ventricular cardiac myosin : comparison with the primary structures of some high molecular weight myosin light chains.
- 118 - Tong , S.W. et Elzinga , M. ( 1983 )  
J.Biol.Chem. 258 13100-13110.  
The sequence of the NH<sub>2</sub>- terminal 204-residue fragment of the heavy chain of rabbit skeletal muscle myosin.
- 119 - Turner , D.C. , Walliman , T. et Eppenberger , H.M. ( 1973 )  
Proc.Natl.Acad.Sci. ( USA ) 70 702-705.  
A protein that binds specifically to the M-line of skeletal muscle is identified as the muscle form of creatine kinase.
- 120 - Ueno , H. , Katoh , T. et Morita , F. ( 1985 )  
J.Biochem. 97 1785-1793.  
Involvement of C-terminal 14 residues of alkali light chain in binding to the heavy chain of myosin.
- 121 - Umegane , T. , Maita , T. et Matsuda , G. ( 1982 )  
Hoppe-Seylers Z.Physiol.Chem. 363 1321-1330.  
Amino acid sequence of the L-1 light chain of chicken fast skeletal muscle myosin.
- 122 - Wachberger , P.R. et Pepe , F.A. ( 1974 )  
J.Mol.Biol. 88 385-391.  
Purification of uterine myosin and synthetic filament formation.

123 - Wagner , P.D. et Weeds , A.G. ( 1977 )

J.Mol.Biol. 109 455-473.

Studies on the role of myosin alkali light chains : recombination and hybridization of light chains and heavy chains in subfragment 1 preparations.

124 - Wagner , P.D. et Giniger , E. ( 1981 )

Nature 292 560-562.

Hydrolysis of ATP and reversible binding to F-actin by myosin heavy chains free of all light chains.

125 - Wahlen , R.G. , Butler-Browne , G.S. et Gros , F. ( 1978 )

Proc.Natl.Acad.Sci. ( USA ) 73 2018-2022.

Identification of a novel form of myosin light chain present in embryonic muscle tissue and cultured cells.

125b - Waller , G.S. et Lowey , S. ( 1985 )

J.Biol.Chem. 260 14368-14373.

Myosin subunit interactions : localization of the alkali light chains.

126 - Walliman , T. , Turner , D.C. et Eppenberger , H.M. ( 1977 )

J.Cell Biol. 75 318-325.

Localization of creatine-kinase isoenzymes in myofibrils II : Chicken heart muscle.

127 - Wang , K. , Ash , J.F. et Singer , J.J. ( 1975 )

Proc.Natl.Acad.Sci. ( USA ) 72 4483-4486.

Filamin : a new high molecular-weight protein found in smooth muscle and non-muscle cells.

128 - Wang , K. , McClures , J. et Tu , A. ( 1979 )

Proc.Natl.Acad.Sci. ( USA ) 76 3698-3702.

Titin : major myofibrillar components of striated muscle.

129 - Weber , A.M. et Murray , J.M. ( 1973 )

Physiol.Rev. 53 612-625.

Molecular control mechanisms in muscle contraction.

130 - Weeds , A.G. ( 1975 )

Febs Letters 59 203-208.

Cyanogen bromide fragments of the cardiac I light chain from bovine myosin : evidence for sequence homology with rabbit skeletal myosin alkali light chains.

131 - Weeds , A.G. ( 1978 )

Nature 274 417-418.

Myosin : polymorphism and promiscuity.

132 - Weeds , A.G. et Lowey , S. ( 1971 )

J.Mol.Biol. 61 701-725.

Substructure of the myosin molecule II : The light chains.

133 - Weeds , A.G. et McLachlan , A.D. ( 1974 )

Nature 252 646-649.

Structural homology of myosin alkali light chains, troponin C and carp calcium binding protein.

134 - Weeds , A.G. et Taylor , R.S. ( 1975 )

Nature 257 54-56.

Separation of subfragment-1 isoenzymes from rabbit skeletal muscle myosin.

135 - Wilkinson , J.M. et Grand , A. ( 1978a )

Eur.J.Biochem. 82 493-501.

The amino acid sequence of chicken fast-skeletal muscle Troponin I.



TETAERT Daniel

**STRUCTURE PRIMAIRE ET ROLE DE  
LA CHAINE LEGERE DITE "ALCALINE"  
DE LA MYOSINE VENTRICULAIRE  
DE COEUR DE PORC**

Thèse de Doctorat d'état Sciences Naturelles, LILLE 1988

feuilles illustrations réf.

---

**RESUME DE LA THESE :**

Bien que les chaînes légères dites alcalines (ALC) ne semblent pas avoir d'influence sur les activités ATPasiques de la myosine, de telles sous-unités sont toujours associées à la tête globulaire de la myosine quelque soit le muscle étudié. Leur rôle biologique pendant la transduction d'énergie par le complexe d'actomyosine lors de la contraction musculaire reste néanmoins à élucider.

Une étude de préparation de myosines de différents types de muscle a été réalisée pour différentes espèces, à l'état adulte et lorsque le muscle se trouve à d'autres stades de différenciation. Pour l'essentiel, c'est le comportement des ALC en électrophorèse sur gel de polyacrylamide qui différencie les myosines, confirmant ainsi l'existence de plusieurs "isomyosines".

Nous nous sommes alors orientés vers l'étude de la structure d'une ALC, celle de la myosine ventriculaire de cœur de Porc. Pour la détermination de la structure primaire, nous avons eu recours à toute une série de clivages spécifiques et de plans de purification par des méthodes classiques et en utilisant la chromatographie liquide haute performance (HPLC). L'enchaînement en acides aminés d'ALC de la myosine cardiaque chez un mammifère supérieur (le porc) a pu être proposé avec quasi-certitude. L'étude de la région N-terminale a été la plus difficile à traiter, en raison de sa séquence exemplaire (richesse en résidus de proline et d'alanine).

Les études prévisionnelles de conformation et d'hydrophobie, le dichroïsme circulaire, les données bibliographiques..., en axant notre intérêt sur la région N-terminale ont permis de compléter nos connaissances de la structure secondaire d'ALC et de nous apporter les informations nécessaires pour construire un modèle moléculaire d'ALC.

Au total, à partir de la structure primaire de l'ALC de la myosine ventriculaire de Porc, une étude comparative des structures primaires des ALC a été entreprise et grâce au dichroïsme circulaire et à l'aide du modèle moléculaire proposé, il apparaît de ce travail que la région N-terminale des chaînes légères alcalines de haut poids moléculaire de la myosine jouerait un rôle important à l'échelle moléculaire lors de l'arrivée des ions calcium avant l'interaction actine-myosine lors de la contraction musculaire.

---

**Jury :**

*Président :* Professeur J. MONTREUIL

*Rapporteurs :* Professeur G. BISERTE  
Professeur R. KASSAB  
Professeur S. BOUQUELET

*Examineurs :* Professeur P. DEGAND  
Professeur B. FOURNET