50376 1990 215



### UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES-ARTOIS U.E.R. de BIOLOGIE

Année 1990

Thèse nº 515

SECTIO

THESE présentée à l'Université de Lille I pour l'obtention du grade de DOCTEUR EN BIOCHIMIE (Nouveau Régime)

par

**Claude RICHARD** 

# UTILISATION DES CARTES PEPTIDIQUES POUR L'ETUDE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES NEUROFILAMENTS

Présentée le 16 Juillet 1990

#### JURY

Président: Rapporteurs:

Examinateurs:



Professeur G. SPIK Professeur B. FOURNET Professeur P. ROUSSEL : Professeur M. DAUTREVAUX Docteur K.K. HAN Ce travail a fait l'objet des publications et communications suivantes :

HAN K.K., RICHARD C. & BISERTE G. (1983) Current developments in chemical cleavage of proteins. Int. J. Biochem. 15 : 875-884

HAN K.K., RICHARD C. & DELACOURTE A. (1984) Chemical cross-links of proteins by using bifunctional reagents. Int. J. Biochem. 16: 129-145

RICHARD C., MAHBOUB S., DELACOURTE A., HEMON B. & HAN K.K. (1985) Comparative studies of the neurofilament triplet protein peptide mapping by chemical cleavage. Comp. Biochem. Physiol. 83B : 707-712

HAN K.K., RICHARD C., MAHBOUB S. & DELACOURTE A. (1985) General applicability of chemical cleavage procedures to the SDS-PAGE systems : exemple of chemical cleavages of bovine neurofilament triplet proteins. 13<sup>th</sup> International Congress of Biochemistry. Amsterdam. Hollande. August, 24-31.

HAN K.K., RICHARD C., ZHANG G-Y & DELACOURTE A. (1986) Sequence homology analysis of proteins by chemical cleavages using a mono and two dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Int. J. Biochem. 18 : 1073-1082

MAHBOUB S., RICHARD C., DELACOURTE A. & HAN K.K. (1986) Applications of chemical cleavage procedures to the peptide mapping of neurofilament triplet protein bands in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 154 : 172-182

RICHARD C., HAN K.K., YANG H-L, ZHU D-X, BALDUICK M. & MIZON J. (1989) Evidence for the overestimate of molecular masses of proteins after chemical modification and chemical cross-links on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Biomedical Chromatography 3 : 131-135

1

## Abréviations utilisées :

\_

AI-B	: Arrowhead Inhibitor proteinase-B
	(Inhibiteur de la protéinase-B du fruit d'eau chinois)
BNPS-skatole	: 2-(2'-nitrophénylsulfényl)-3-méthyl-3-bromoindolénine
CBB	: Bleu Brillant de Coomassie
DMA	: Diméthyladipimidate
DMS	: Diméthyl suberimidate
DMSO	: Diméthylsulfoxide
DTT	: Dithiothréitol
EDTA	: Acide Ethylène Diamine Tétracétique
EGS	: Ethylène glycol bis succinyl succinate
EGTA	: Acide Ethylène Glycol Tétracétique
FI	: Filaments Intermédiaires
hfba	: Acide heptafluorobutyrique
HPLC	: Chromatographie Liquide à Haute Performance
IFAP	: Intermediate Filament-Associated Protein
	(Protéines Associées aux Filaments Intermédiaires)
kDa	: kilodalton
kpb	: kilo base pairs
MES	: 2-(N-morpholine)-éthane sulfonique
MetSO	: Méthionine sulfoxide
MF	: Microfilaments
MM	: Masse Moléculaire
MT	: Microtubules
NBS	: N-bromosuccinimide
NCS	: N-chlorosuccinimide
NF	: Neurofilaments
NF-H	: Neurofilament de haute (Heavy) masse moléculaire
NF-L	: Neurofilament de petite (Low) masse moléculaire
NF-M	: Neurofilament de moyenne (Medium) masse moléculaire
NFT	: Neurofibrillary Tangles
	(dégénéréscences Neurofibrillaires)
NTCB	: Acide 2-nitro-5-thiocyanobenzoique
O-1BA	: Acide ortho-1odosobenzoique
PAGE	: Polyacrylamide Gel Electrophonesis
224	(Electrophorese sur gel de polyacrylamide)
PBS	: Phosphate Buffer Saline (Tampon Phosphate Salin)
PIA	: Paire de Filaments en Hellce
PVDF	PolyvinyiDifluorure
RP HPLC	: Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography
	(Chromatographie Liquide à Haute Performance en Phase
ana.	Inverse) . Sodium Dodogul Sulfato
5US	: Sogium Dogecyi Sullate
TEMED	: N,N,N',N'-tetrametnylene dlamlne
TPA Train	: 12-U-tetradecanoy1-phorpol 13-acetate
TLIS	: TIB (nydroxymetnyl)-aminométhane

### -4-

## PARTIE I : REVUE GENERALE

-

	pages
	CHAPITRE I : CARTES PEPTIDIQUES EN ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE EN MILIEU SDS (PAGE/SDS)7
	INTRODUCTION9
1.	LA METHODE DE CLEVELAND et al. (1977) : CARTE DE DIGESTION ENZYMATIQUE LIMITEE D'UNE PROTEINE DANS UN PAGE-SDS A UNE DIMENSION
	1.1. avantages
	1.2. inconvénients14
2.	COUPURES CHIMIQUES ET CARTES PEPTIDIQUES
	2.1. introduction
	2.2. méthodologies employées17
	<pre>2.2.1. coupure chimique des liaisons méthionyl (Met-X) par le bromure de cyanogène</pre>
	2.2.2. coupure chimique des liaisons tryptophyl (Trp-X)
	2.2.3. coupure chimique des liaisons cystéine (X-Cys) par l'acide 2-nitro-5-thiocyanobenzoïque (NTCB)31
	2.2.4. coupure chimique des liaisons Aspartyl-Proline33
	2.2.5. coupure des liaisons Asparaginyl-Glycocolle par l'hydroxylamine
з.	CONCLUSION

.

-

	INTRODUCTION
1.	LES FILAMENTS INTERMEDIAIRES (FI)40
	1.1. Distribution des FI
2.	LES GENES DES FI
з.	EXPRESSION DES FI
	3.1. Régulation de l'expression des gènes FI
4.	FONCTIONS DES FI
5.	LES NEUROFILAMENTS

#### PARTIE II : RESULTATS PERSONNELS

I.	APPLICATION A L'ETUDE DES NEUROFILAMENTS
	Introduction
1.	Préparation des neurofilaments (NF)
2.	Composition en acides aminés des sous-unités L, M et H des NF de boeuf
3.	Clivage par le BNPS-skatole
4.	Clivage par le bromure de cyanogène92
5.	Clivage par l'acide nitrothiocyanobenzoïque (NTCB)
6.	Etude comparative des sous-unités L, M et H des NF de boeuf et de porc
	6.1. Comparaison biochimique1016.2. Comparaison immunologique105
II	. SURESTIMATION DE LA MASSE MOLECULAIRE APPARENTE DES

***	OOLIDO T TIRE				*** * *		
	PROTEINES	APRES	MODIFICATION	CHIMIQUE	SUR	<b>PAGESDS</b> 1	12

CONCLUSION
MATERIEL ET METHODES
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES135

# REVUE GENERALE

ļ

-

# CHAPITRE I

CARTE PEPTIDIQUE EN ELECTROPHORESE SUR GEL

DE POLYACRYLAMIDE EN MILIEU SDS (PAGE/SDS)

~

-

#### INTRODUCTION

La diversité de la vie se reflète d'une certaine manière dans la multitude de protéines rencontrées chez les organismes vivants. La bactérie <u>E. coli</u>, par exemple, contient 3000 protéines différentes, alors que les organismes supérieurs peuvent en contenir plus d'un million. Parmi toutes ces protéines. certaines possèdent des homologies de séquence perleur classification au sein d'une même famille. Sur mettant le plan génétique, cela indique, qu'à l'origine, ces protéihomologues proviennent du même gène. L'un des movens nes d'identifier les homologies de séquence entre protéines consiste à déterminer leur structure primaire puis les comparer entre elles. Cette méthodologie demande non seulement des antravail, mais encore faut-il pouvoir disposer nées de de quantités importantes de matériel, ce qui n'est point le cas lorsque l'on travaille sur des protéines exprimées en très faible quantité dans un organisme. Dans la même optique, plusieurs auteurs ont préféré utiliser ces dernières années l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu SDS (PAGE-SDS). En effet, cette technique combinée à des méthodes de coupures (enzymatiques ou chimiques) des protéines permet d'établir rapidement et à un coût raisonnable la carte peptidique (ou "peptide mapping") d'une protéine. Le profil fragments peptidiques obtenus est caractéristique de des la protéine et de l'agent de coupure. Deux protéines homologues

-9-

possèderont des profils électrophorétiques similaires, alors que deux protéines non apparentées présenteront des cartes peptidiques différentes, après action du même agent de coupure. Cette "empreinte digitale" de la protéine ("fingerprint)" a été notamment appliquée à l'étude comparative des hémoglobines, en particulier l'hémoglobine S (INGRAM, 1956, 1957, 1958), par électrochromatographie des peptides trypsiques de la globine.

1. LA METHODE DE CLEVELAND <u>et al.</u> (1977) : CARTE DE DIGESTION ENZYMATIQUE LIMITEE D'UNE PROTEINE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE UNIDIMENSIONNEL EN MILIEU SDS

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide contenant du SDS (PAGE-SDS), (SHAPIRO et al., 1967), représente un outil efficace pour séparer des chaînes polypeptidiques à partir d'échantillons biologiques complexes. Toutefois, il arrive souvent que le seul critère de mobilité électrophorétique ne suffise pas à établir une corrélation entre deux ou plusieurs protéines. Cela est vrai, par exemple, si des protéines fortement apparentées diffèrent dans leur mobilité par suite légères modifications chimiques, si des peptides de de apparentés tailles lien différentes sont par un précurseur-produit ou si des protéines apparentées diffèrent dans leur mobilité par suite d'une protéolyse survenue pendant leur préparation. Dans de tels cas, il devient nécessaire de soumettre les bandes protéiques individualisées à des analyses biochimiques supplémentaires. Dans cette intendes méthodes ont été décrites pour tion. éluer (ou électroéluer) des protéines à partir de bandes de gel individualisées, permettant de cette façon leur utilisation dans études de renaturation et d'activité enzymatique (WEBER des et KUTER, 1971), d' analyses d'acides aminés (KYTE, 1971), de cartes peptidiques à deux dimensions, (WEBER et OSBORN, 1969), ou comme antigénes dans des études immunologiques (LAZARIDES et WEBER, 1974).

En 1977, CLEVELAND <u>et al.</u> développent une méthode rapide et facile pour établir des cartes peptidiques de protéines. Particulièrement applicable à l'analyse de protéines qui ont été isolées à partir de gels contenant du SDS, cette technique implique une protéolyse enzymatique partielle en présence de SDS et l'analyse des produits de digestion par électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Le profil des fragments peptidiques obtenu est reproductible et caractéristique du substrat protéique et de l'enzyme protéolytique.

#### 1.1. Avantages de la méthode de CLEVELANI)

Dans la carte peptidique électrophorétique conventionnelle, la résolution est obtenue par l'utilisation d'un sys-

-11-

tème à deux dimensions (WEBER et OSBORN, 1969). La méthode de CLEVELAND présente un pouvoir résolutif comparable, mais dans un système à une dimension, en utilisant plusieurs protéases de spécificités différentes. La résolution peut être améliorée, si nécessaire, par une protéolyse ultérieure des fragments peptidiques isolés grâce à un enzyme supplémentaire. Il est ainsi possible de comparer deux substrats différents au moyen de leurs cartes peptidiques.

De plus, les profils de digestion sont reproductibles et ne sont pas affectés par la manière dont est préparé le substrat protéique.

Depuis sa parution, la méthode de CLEVELAND est largement utilisée pour établir l'existence d'homologies structurales entre plusieurs protéines (BORDIER et CRETTOL-JÄRVIDEN, 1979 ; LAM et KASPER, 1979, 1980 a ; BARSH et BYERS, 1981 ; LOMPRE et al., 1984 ; SHAW et al., 1984). La grande flexibilité dans le choix de l'enzyme protéolytique élargit le champ d'application de la méthode. Plusieurs enzymes de spécificités différentes ont été testés par les auteurs de la méthode : la chymotrypsine, la papaïne, la subtilisine, les protéases de <u>S. aureus</u> et de <u>S. griseus</u>, la ficine et l'élastase.

Les échantillons à analyser peuvent être préparés par des techniques de purification classique (chromatographie d'échange d'ions, de gel filtration, d'affinité, etc...) oupar électroélution des bandes de protéines à partir de gels

-12-

d'acrylamide préparatifs (MENDEL-HARTVIG, 1982 ; STRÄLFORS et BELFRAGE, 1983). La manière la plus pratique reste quand même d'analyser la bande protéique directement dans le morceau de gel, sans élution préalable, par application directe du morceau de gel sur un gel de résolution que l'on recouvre ensuite avec l'enzyme protéolytique. Le profil de digestion des peptidiques générés est identique quelque soit fragments la méthode de préparation de l'échantillon . 5 à 10 µg seulement de protéine sont nécessaires pour générer un profil de digestion détectable par coloration au Bleu de Coomassie. Cette quantité peut être encore diminuée par l'utilisation de substrats protéigues radioactifs. Cela nécessite, d'une part, une activité spécifique suffisamment élevée pour permettre ultérieure des profils de digestion l'analyse par autoradiographie (FAIRBANKS et al., 1965) ou par fluorographie (BONNER et LASKEY, 1974) ; et d'autre part, que tous les fragments d'hydrolyse soient radioactifs, sous peine d'échapper à la détection.

La méthode de CLEVELAND est souple et simple à utiliser. Plusieurs profils peuvent être obtenus en quelques heures et réalisés sur le même gel , permettant ainsi facilement des comparaisons sans ambiguité. Aucun équipement sophistiqué n'est requis excepté un appareil d'électrophorèse sur gels en plaques. En outre, les protéases utilisées sont disponibles dans le commerce et à un moindre coût.

-13-

TAKEDA et CONE, 1984, ont amélioré la méthode de CLEVELAND en utilisant l'analyse en 2 dimensions, applicable à des quantités inférieures à 0,5 µg de protéine. Ces auteurs utilisent des protéines radioiodées qui sont digérées enzymatiquement en présence de 0,1% de SDS et d'un excès de sérum albumine bovine froide (0,2 mg/ml) de manière à obtenir une bonne reproductibilité en maintenant constante la concentration en substrat quelque soit l'échantillon.

#### 1.2. Inconvénients

Cependant, plusieurs problèmes liés à la méthode de CLEVELAND limitent son application :

1) pour obtenir un profil de digestion visible par le Bleu de Coomassie, les auteurs recommandent que chaque morceau de gel contienne au minimum 5 à 10  $\mu$ g de protéine purifiée. Il arrive souvent qu'une telle quantité de protéine soit difficile à obtenir , surtout si le morceau de gel est une pastille découpée à partir d'un profil complexe dans un gel à 2 dimensions. Pour éviter ce problème, les auteurs suggèrent de réaliser une autoradiographie ou une fluorographie de peptides, ce qui permettra de diminuer la quantité de matériel de départ. Mais obtenir des protéines radioactives n'est pas toujours aisé, particulièrement lorsque l'on travaille sur des biopsies humaines. Même si le marquage radioactif et l'autoradiographie ou la fluorographie ultérieure sont réalisables, le procédé consomme de l'argent et du temps.

2) De nombreuses techniques de coloration à l'argent des protéines sur les PAGE-SDS ont été publiées quelques années après la parution de la méthode de CLEVELAND (SWITZER et al., 1981 ; OAKLEY et al., 1979 ; MERRIL <u>et al.</u>, 1980, 1980 ; POEHLING et NEUHOFF, 1981 ; SAMMONS et al., 1981 ; WRAY et 1981). La plupart d'entre elles possèdent un seuil de al., détection inférieur à 0,5 ng de protéine/mm<sup>2</sup> de gel (OCHS et Mais la sensibilité de la coloration à l'argent 1981). al., difficultés d'interprétation provoque des des cartes peptidiques préparées selon le protocole de CLEVELAND : cela s'explique par la présence de protéines contaminantes dans les préparations enzymatiques obtenues dans le commerce.

3) Un autre problème rencontré pendant l'hydrolyse des protéines dans les morceaux de gel, et qui est lié à la méthode de CLEVELAND concerne le fait suivant : étant donné que la digestion enzymatique s'effectue dans le gel de concentration et que le courant est ensuite coupé pendant 30 minutes, les petits fragments peptidiques peuvent diffuser à travers les mailles du gel de concentration très poreux avant leur séparation. Ce phénomène est détecté par autoradiographie (LISCHWE et OCHS, 1982).

-15-

4) Enfin, déterminer les conditions appropriées de diges-(quantité d'enzyme utilisé et temps d'incubation) comtion, plique le protocole de CLEVELAND. Les résultats obtenus par ces auteurs montrent que la quantité d'enzyme nécessaire pour obtenir une carte peptidique interprétable peut varier d'un facteur 10 en fonction du substrat. Ainsi, des enzymes différents sont requis à des concentrations différentes, même si le substrat reste identique. Finalement, le profil de digestion n'est pas d'une stabilité absolue pour des périodes de temps aussi courtes que 20 minutes, si bien que certaines bandes seront perdues et d'autres générées. L'expérience pratique a montré qu'il est habituellement nécessaire de tester plusieurs concentrations pour chaque combinaison enzyme-protéine de manière à obtenir une carte peptidique satisfaisante. Mais encore faut-il disposer suffisamment de substrat protéique purifié de manière à pouvoir tester toutes ces variables !

Nous allons voir dans le chapitre suivant que l'emploi de réactifs chimiques qui clivent les liaisons peptidiques adjacentes à des résidus particuliers offrent une alternative aux inconvénients provoqués par l'utilisation des enzymes protéolytiques préconisés dans la méthode de CLEVELAND.

#### 2. COUPURES CHIMIQUES ET CARTES PEPTIDIQUES

#### 2.1. Introduction

Les liaisons méthionyl et tryptophyl sont peu fréquentes dans les protéines. Elles constituent par conséquent des sites de clivage intéressants. Pour la même raison, les liaisons peptidiques du type Asp-Pro, Asn-Gly et X-Cys font également l'objet d'un intérêt certain pour l'élaboration des cartes peptidiques.

#### 2.2. Méthodologies employées

#### 2.2.1. Coupure chimique des liaisons méthionyl (Met-X) par le bromure de cyanogène

#### \* mécanisme d'action

L'atome de soufre de la chaîne latérale de la méthionine, situé en position  $\delta$ , présente une très grande réactivité en raison de l'existence de 2 doublets électroniques libres.



-17-

En 1961, GROSS et WITKOP, mettent au point une technique de clivage spécifique des liaisons méthionyl par le bromure qu'ils expérimentent avec succès de cyanogène, sur la ribonucléase pancréatique de boeuf. Cette coupure hautement spécifique a depuis trouvé de nombreuses et importantes apl'étude structurale de toute une plications à variété d'autres protéines de masses moléculaires diverses, depuis un peptide de 2000 kDa comme la gastrine (GREGORY et al., 1964), jusqu'à une protéine de 660 000 kDa comme la thyroglobuline (NISSLEY <u>et al.</u>, 1969).

Les liaisons méthionyl des peptides ou des protéines sont clivées par le bromure de cyanogène, à température ambiante, dans l'acide chlorhydrique 0,1 N, dans l'acide formique en solution aqueuse à 70% ou dans l'acide trifluoroacétique en solution aqueuse à 70%. Le mécanisme réactionnel est représenté figure 1A. D'après GROSS et WITKOP (1962), il se forme initialement un bromure de cyanosulfonium qui, en milieu acide, se scinde en méthylthiocyanate et en bromhydrate d'iminolactone d'homosérine. Celui-ci se décompose spontanément en libérant d'un côté la lactone de l'homosérine et de l'autre un fragment peptidique ayant en position N-terminale l'acide aminé dont la fonction  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> était primitivement unie à la fonction  $\alpha$ -COOH de la méthionine.



Figure 1 : Mécanisme d'action du bromure de cyanogène. A : Coupure chimique des liaisons méthionyl par le bromure de cyanogène, selon GROSS et WLTKOP, 1962 B : Mécanisme de formation des liaisons intramoléculaires entre iminolactone et hydroxyle des résidus de thréonine (ou sérine) au cours de la coupure chimique des liaisons Met-Thr (ou Met-Ser) par le bromure de cyanogène (SCHROEDER <u>et al.</u>, 1969).

transformation de la méthionine en la La lactone de l'homosérine est quantitative (92 à 95%) (HOFMAN, 1964). Les résidus d'homosérine lactone sont interconvertibles en homosérine; l'homosérine peut être libérée par action de la carboxypeptidase A et dosée sur un analyseur d'acide aminé (AMBLER, 1965). L'intérêt du clivage par le bromure de cyanogène réside dans les points suivants:

(1) le bromure de cyanogène est volatil et peut être utilisé en excès.

(2) le milieu acide et le méthylthiocyanate, seul produit de réaction secondaire, sont facilement éliminés par lyophilisation ; les peptides obtenus après clivage par le BrCN sont solubles dans la plupart des cas et, après purification, peuvent être directement séquencés par la méthode de dégradation d'EDMAN (1950).

Le milieu acide permet :

(1) aux groupements E-NH2 et aux autres groupements
basiques d'être sous forme protonée et ainsi protégés d'une
réaction avec le BrCN;

(2) les protéines, ou éventuellement les peptides, qui ne réagissent pas avec le BrCN à pH 2-4, se "déroulent" en perdant leur structure secondaire dans l'acide formique à 70%, exposant ainsi complètement les résidus méthionyl à l'action du BrCN.

#### - Cas particulier des liaisons Met-Ser et Met-Thr

Dans le cas où la liaison méthionyl est suivie d'un résidu séryl ou thréonyl, la coupure est incomplète et le rendement très faible (NARITA et TITANI, 1968 ; CUNNIGHAM <u>et</u> <u>al.</u>, 1968 ; TANIUCHI et ANFINSEN, 1966). SCHROEDER <u>et al.</u> (1969) ont suggéré que les fonctions hydroxyles en  $\beta$  de la sérine et de la thréonine interviennent dans la réaction (Figure 1B).

Dans ce cas particulier, l'iminolactone intermédiaire est attaquée par le groupement hydroxyle voisin du résidu thréonyl (ou séryl) et produit un peptide homoséryl-O-thréonyl. La neutralisation du mélange réactionnel aboutit à une migration O ---> N créant une situation où tous les résidus méthionyl sont convertis en résidus homoséryl sans rupture de la liaison peptidique.

SCHROEDER <u>et al.</u>, 1969, ont amélioré le faible rendement de clivage des liaisons Met-Thr de la catalasse en modifiant les conditions de la réaction. Un clivage plus complet se produit avec l'acide trifluoroacétique dilué à 70 % plutôt qu'avec l'acide formique dilué à 70 % (le taux plus lent de réaction avec l'acide trifluoroacétique étant compensé par une augmentation de la concentration en réactifs). Selon ces auteurs, l'utilisation de l'acide trifluoroacétique comme solvant est probablement avantageuse, seulement si une liaison Met-Thr ou Met-Ser doit être coupée. La réaction

-21-

intramoléculaire potentielle du groupe hydroxyle (du résidu Ser ou Thr) avec l'iminolactone peut être évitée en augmentant la protonation du groupe hydroxyle et de l'iminolactone. L'acidité plus importante de l'acide trifluoroacétique peut provoquer cet effet.

Par ailleurs, HAN <u>et al.</u>, 1972, ont mis au point un protocole en milieu acide formique dilué à 70 % qui permet le clivage par le bromure de cyanogène des liaisons Met-Thr et Met-Ser. Suite à une modification des conditions normales de clivage (solvant - température - concentration en BrCN par rapport au nombre de résidus Met de la protéine), ils ont réussi à couper la liaison Met-Ser (131-132) de la myoglobine du coeur de mouton avec un rendement de 80 %.

Toutefois, BLUMENTHAL et KEM, 1983, constatent après clivage par le bromure de cyanogène de la cytolysine III (<u>Stoichactis helianthus</u>) en milieu acide formique à 70 % à température ambiante, l'absence de coupure de la liaison Met-Ser (70-71), alors que la liaison Met-Thr (139-140) n'est que partiellement rompue (11 % de rendement).

#### \* Protocoles expérimentaux

La réaction de fragmentation des protéines par le bromure de cyanogène dans le but d'établir des cartes peptidiques électrophorétiques a d'abord été appliquée par NIKODEM et FRESCO, 1979, puis par d'autres auteurs, tels que BORDIER et

-22-

CRETTOL-JÄRVINEN, 1979 ; LAM et KASPER, 1979, 1980 ; LONSDALE-ECCLES <u>et al.</u>, 1981 ; BARSH et BYERS, 1981 ; ZINGDE <u>et al.</u>, 1986 ; SCOTT <u>et al.</u>, 1988.

Nous détaillerons ci-dessous deux protocoles de clivage qui offrent l'avantage d'éviter certains problèmes rencontrés dans la méthodologie classique.

#### a) clivage "indirect" par des vapeurs acides de bromure de cyanogène, selon ZINGDE <u>et al.</u>, 1986

Cette méthodologie, où le contact direct entre le BrCN et la protéine contenue dans les morceaux de gel est éliminé, possède plusieurs avantages par rapport à la technique classique de coupure chimique, où la protéine "baigne" dans le réactif en solution :

 après réaction, les morceaux de gel sont rapidement débarrassés du réactif et du solvant

 2) les protéines acido-labiles ne subissent pas de clivages acides non spécifiques

3) contrairement à la méthode de coupure classique, ici, l'étape d'équilibration des morceaux de gel avant coupure est supprimée. Cela évite toute perte de matériel par diffusion, notamment lorsque l'on désire obtenir des cartes électrophorétiques de petites protéines (< 50 kDa)</p>

4) les conditions douces de cette méthode donnent généralement des peptides de taille importante. Ainsi, les risques

-23-

de perte de petits peptides par diffusion pendant les étapes électrophorétiques sont-ils réduits.

5) enfin, cette technique, combinée à la technique de SWANK et MUNKRES (1971) connue pour son bon pouvoir séparateur sur les petits peptides, peut donner des cartes peptidiques intéressantes sur ces derniers.

#### b) clivage in situ selon SCOTT et al., 1988

Ces auteurs développent une méthodologie permettant le clivage au bromure de cyanogène in situ de quantités de protéines de l'ordre du microgramme. Dans ce but, ces protéines sont soumises à un PAGE-SDS puis "électrotransférées" sur un hydrophile de polyvinyldifluorure (PVDF) support (MATSUIDARA, 1987). En effet, contrai.rement à la nitrocellulose, la membrane de PVDF résiste aux conditions drastiques utilisées à la fois pendant la coupure par le bromure de cyanogène et la dégradation d'EDMAN (1950). Après coloration au Rouge Ponceau, la membrane est incubée en présence de BrCN dissous dans une solution aqueuse d'acide formique à 70 % (v/v) pendant une nuit à 20°C, à l'obscurité. Les fragments produits sont élués de la membrane (SZEWCZYK et SUMMERS, 1988), séparés ensuite par PAGE-SDS et enfin transférés à nouveau sur PVDF pour leur microséquencage automatique en phase gazeuse.

-24-

Cette approche pourrait en outre être appliquée à d'autres méthodes de coupure chimique spécifiques, telle que la coupure chimique des liaisons Tryptophyl.

#### 2.2.2. Coupure chimique des liaisons tryptophyl (Trp-X)

Les nombreux réactifs proposés pour rompre les chaînes polypeptidiques au niveau des liaisons tryptophyl impliquent la bromation, la chloration ou l'iodation oxydatives du noyau indole du Tryptophane.

BNPS-skatole et la N-chlorosuccinimide représentent Le les seuls réactifs spécifiques des liaisons Trp-X utilisés jusqu'à présent pour obtenir des cartes de digestions partielles de protéines. Nous nous limiterons donc à leur seule description , bien qu'il existe d'autres réactifs spécifiques des liaisons Trp-X produisant également des rendements de coupures élevés : l'acide ortho-iodosobenzoïque (O-IBA) (MAHONEY et HERMODSON, 1979 ; MAHONEY et al., 1981), de fortes concentrations de bromure de cyanogène en milieu acide heptafluorobutyrique anhydre (BrCN/HFBA) (OZOLS et GERARD, 1977), et le mélange diméthylsulfoxide/acide bromhydrique (DMSO/HBr) (SAVIGE et FONTANA, 1977)

#### A. Clivage des liaisons Trp-X par le BNPS-skatole

Le NPS-skatole ou 2-(2'-nitrophénylsulfényl) -3-méthyl-indole, par traitement avec un équivalent de NBS (N-bromosuccinimide) dans l'acide acétique en solution aqueuse à 80 % donne un composé cristallisé bromant : le BNPS-skatole ou 2-(2'-nitrophénylsulfényl)-3-méthyl-3'-bromo indolénine dont la structure est présentée ci-dessous :



Le BNPS-skatole est un agent oxydant et bromant plus doux que la N-bromosuccinimide (NBS) et donc plus spécifique pour le clivage des résidus tryptophyl (FONTANA, 1972). L'analogie de structure qu'il présente avec le Tryptophane oriente préférentiellement la coupure vers cet acide aminé. Un excès de BNPS-skatole en milieu aqueux aboutit au clivage de la liaison Trp-X. Le mécanisme réactionnel de clivage est similaire à celui proposé par PATCHORNIK <u>et al.</u> (1960) pour la NBS (Figure 2).





Figure 2 : Mécanisme d'action du BNPS-skatole sur les liaisons tryptophyl (KAMP, 1986)

Quelques précautions sont à prendre lorsque l'on effectue cette coupure chimique : les groupements thiols doivent être protégés (de manière réversible) comme pour les autres modifications et coupures oxydatives. La Méthionine est convertie en Méthionine sulfoxide (MetSO) ; il suffit de l'incuber en présence d'une solution aqueuse de 2-mercaptoéthanol à 15% pendant 72 heures à 30°C pour la reconvertir en Méthionine.La protéine pourra ultérieurement être coupée par le bromure de cyanogène.

Les réactions des chaînes latérales telle que l'oxydation des résidus tyrosyl et histidyl peuvent être évitées par l'addition d'un compétiteur tels que la L-Tyrosine exogène (FONTANA, 1972 ; EYLAR <u>et al.</u>, 1974) ou le phénol aqueux (p/v) (FONTANA <u>et al.</u>, 1973 ; HUNZIKER <u>et al.</u>, 1980).

Les rendements de coupure peuvent atteindre 95 % (EYLAR <u>et al.</u>, 1974 ; DEBUIRE <u>et al.</u>, 1977 ; HUNZIKER <u>et al.</u>, 1980)

# B. Clivage des liaisons Trp-X par le réactif: N-chlorosuccinimide/urée (NCS/urée)



La N-chlorosuccinimide (NCS), dont la structure est représentée ci-dessus, a été utilisée pour couper sélectivement les liaisons tryptophyl dans les protéines (LISCHWE et SUNG, 1977). Son mécanisme d'action est similaire à celui proposé pour la NBS (Figure 3) par PATCHORNIK <u>et al.</u>, 1960. LISCHWE et SUNG (1977) obtiennent ainsi des cartes peptidiques partielles de protéines en solution. En 1982, LISCHWE et OCHS appliquent cette technique au "peptide mapping" partiel en utilisant le réactif NCS/urée et la coloration à l'argent dans un système PAGE-SDS.

La réaction avec la NCS est si spécifique (SHECHTER <u>et</u> <u>al.</u>, 1976 ; LISCHWE et SUNG, 1977) et si stable que de bons résultats peuvent être obtenus en une seule digestion dans la plupart des cas.

L'avantage de ce protocole sur celui proposé par DETKE et KELLER, 1982, réside dans sa rapidité puisque seulement 30 minutes de réaction suffisent à digérer la protéine au lieu des 48 heures requises pour la coupure par le BNPS-skatole.





#### 2.2.3. Coupure chimique des liaisons cystéine (X-Cys) par l'acide 2-nitro-5-thiocyanobenzoïque (NTCB)

En 1974, DEGANI et PATCHORNIK rapportent que les résidus cystéinyl sont convertis en résidus S-cyanocystéinyl (ou  $\beta$ -thiocyanoalanine) par  $\epsilon$  réaction avec l'acide 2-nitro-5-cyanobenzoïque à pH 8,0. La S-cyanocystéinyl protéine est incubée à pH 9,0 pour permettre le clivage de la liaison peptidique. La figure 4 illustre le mécanisme réactionnel. Il y a libération du groupe  $\alpha$ -carboxylique du résidu précédent et formation d'un résidu amino-terminal 2-iminothiazolidine-4-carboxyl cyclisé à partir du résidu S-cyanocystéine.

Le composé cyclisé peut être éliminé par un excès de Nickel de Raney (STARK, 1977), et permettre ainsi au peptide libéré de subir la méthode de dégradation d'EDMAN (1950). Néanmoins, les conditions proposées par STARK provoquent des coupures secondaires. Des fragmentations ultérieures, protéasiques ou chimiques, seront nécessaires pour déterminer la séquence de ces peptides bloqués.

GEISLER et WEBER, 1981 ; GEISLER <u>et al.</u>, 1982, ont ainsi clivé successivement, par le NTCB (d'après JACOBSON <u>et al.</u>, 1973) puis le BNPS-skatole, plusieurs protéines des Filaments Intermédiaires. Ils ont établi des parentés chimiques entre ces protéines en établissant des cartes électrophorétiques sur gel de polyacrylamide en milieu SDS.

-31-



Figure 4 : Mécanisme d'action du NTCB sur les liaisons Cystéine (DEGANI & PATCHORNIK, 1974).



Figure 5 : Hydrolyse des liaisons Aspartyl-Proline en milieu acide, selon PISZKIEWICZ et al., 1970.

2.2.4. Coupure chimique des liaisons Aspartyl-Proline

liaisons peptidiques Asp-Pro s'hydrolysent dans Les des conditions de pH acide (2-2,5), conditions pour lesquelles autres liaisons du type Asp-X (X différent de Pro) resles tent stables. PISZKIEWICZ et al., 1970, ont proposé un mécanisme d'hydrolyse préférentielle (figure 5 page 32) : il se une imide cyclique intermédiaire de formerait l'acide par suite de la catalyse intramoléculaire du déaspartique placement de l'anion carboxylate par l'azote protoné de la liaison peptidique.

D'autre part, la basicité élevée de l'azote  $\alpha$ -aminé secondaire de la proline (pKb = 10,6) confère à la liaison Asp-Pro une labilité nettement supérieure à la labilité des autres liaisons aspartyl (les pKb des fonctions  $\alpha$ -aminées primaires des autres acides aminés s'échelonnent entre 9,1 et 9,7 (MIYAMOTO et SCHMIDT, 1931).

L'imide cyclique formée entre le résidu aspartyl et le résidu prolyl serait plus fortement ionisée et susceptible de libérer à l'hydrolyse une fonction aminée de la Proline plus ionisable.

La fréquence des liaisons Asp-Pro a été estimée à partir du taux moyen de résidus Asp et Pro contenus dans une protéine et à partir de l'étude structurale de 50 protéines non homologues choisies au hasard. Les deux procédés donnent

-33-

le même taux de fréquence moyen : 1 liaison Asp-Pro pour 400 résidus d'acides aminés. A cause de leur rareté, leur hydrolyse sélective produira généralement de grands peptides applicables à une étude en PAGE/SDS.

# 2.2.5. Coupure chimique des liaisons Asparaginyl-Glycocolle par l'hydroxylamine

Les travaux simultanés de BUTLER et de BORNSTEIN en 1969, sur les chaînes de collagène ont montré la grande sensibilité des liaisons Asparaginyl-Glycocolle (Asn-Gly) à l'action de l'hydroxylamine. Le mécanisme réactionnel proposé par BORNSTEIN, 1970, et BORNSTEIN et BALIAN, 1977, est représenté Figure 6. Il se forme initialement une imide cyclique (anhydro-aspartyl-glycyl) à partir des séquences Asn-Gly, puis l'imide est clivée par l'hydroxylamine pour libérer un nouveau fragment à Glycocolle N-terminal. BORNSTEIN et BALIAN, 1977, ont montré que les groupements  $\alpha$ - et  $\beta$ -carboxyl de l'acide Aspartique étaient tous les deux impliqués dans la formation de la liaison Aspartyl-hydroxamate. Le rendement de clivage des liaisons Asn-Gly avoisine 70% .

Son application à l'étude des protéines par carte électrophorétique sur gel de polyacrylamide en milieu SDS a d'abord été rapportée par LAM et KASPER (1980) puis par SARIS <u>et al.</u> (1983). Le protocole proposé par ces derniers auteurs possède l'avantage de procéder à partir de la protéine

-34-



Figure 6 : Mécanisme d'action de l'hydroxylamine sur les liaisons asparaginyl-glycocolle (BORNSTEIN, 1970).

enfouie dans un morceau de gel préparatif et d'éviter ainsi toute perte de fragments peptidiques après la coupure chimique, aboutissant ainsi à l'obtention d'un fort rendement de clivage.

#### 3. CONCLUSION

les méthodologies présentées dans ce Parmi chapître, celle préconisée par SCOTT et al. (1988) semble la plus intéla coupure chimique in situ de protéines ressante : électrotransférées sur membrane de PVDF. En effet, elle permet non seulement d'établir des cartes peptidiques mais aussi la séparation de fragments destinés directement au séquençage, par une approche relativement simple et peu coûle PAGE-SDS et l'électrotransfert. Elle fournit un teuse : moyen simple pour déterminer la structure primaire interne de très grandes protéines, disponibles en très faibles quantités. L'avantage sur l'hydrolyse enzymatique est la production d'une quantité réduite de fragments et la capacité à prévoir séquence intéressante lorsque les résidus méthionyl la (ou tryptophyl) sont conservés au sein d'une famille de protéines homologues. La détermination de la séquence en acides aminés interne d'une protéine est nécessaire lorsque celle-ci possède un résidu d'acide aminé N-terminal bloqué ou lorsque les informations sur la région N-terminale fournissent peu de

-36-
discrimination entre les membres d'une famille de protéines possédant une forte homologie dans la région N-terminale.

En modifiant la méthode décrite par CLEVELAND <u>et al.</u> (1977), et en la combinant avec des méthodes de coupures chimiques des protéines, on obtient alors des outils très précieux pour l'analyse d'homologies de séquence entre protéines.

L'application à l'échelle préparative de la coupure chimique d'une protéine, suivie par l'établissement de sa carte peptidique électrophorétique permet de produire des polypeptides, dont l'utilisation en tant qu'antigènes permettra d'obtenir des anticorps dirigés spécifiquement contre des séquences bien précises de la protéine.

Une partie de nos travaux a porté sur l'étude structurale des neurofilaments de Mammifères. Ceux-ci sont constitués de trois protéines plus ou moins apparentées. La production d'anticorps contre des régions précises de ces protéines peut fournir des outils intéressants dans le but de mieux comprendre le rôle de ces dernières dans les différents aspects de la physiologie du neurofilament.

C'est dans cet objectif que nous avons préparé des anticorps contre 2 polypeptides au BrCN isolés des cartes peptidiques de ces protéines.

-37-

neurofilaments (NF), spécifiques des neurones, Les appartiennent à la famille des Filaments Intermédiaires (FI). Ceux-ci suscitent un intérêt de plus en plus vif de la part des Biologistes Cellulaires et Moléculaires depuis une dizaine d'années. Les Biochimistes et les Biophysiciens cherchent à résoudre la structure de cette classe complexe et unique de protéines fibreuses. Les Biologistes Moléculaires s'intéressent à la manière dont les différents gènes des protéines FI sont régulés pendant le développement et la différenciation. Quant aux Biologistes Cellulaires, ils essayent de comprendre la relation existant entre l'expression des gènes FI dans les cellules spécialisées et l'organisation dynamique et les fonctions des FI dans les cellules.

C'est pourquoi nous avons préféré axé la revue générale sur les FI plutôt que la limiter aux NF. -

CHAPITRE II

# LES FILAMENTS INTERMEDIAIRES

Les propriétés de forme, d'organisation interne et de mouvement que possède une cellule eucaryote, reposent sur des réseaux complexes de filaments protéiques situés dans le cytoplasme, appelés cytosquelette cellulaire (SCHLIWA, 1986).

Les deux principaux types de filaments composant le cytosquelette sont les Microtubules (MT) et les Microfilaments (MF), tous deux constitués de protéines polymérisées et dont les sous-unités (tubuline et actine respectivement) peuvent s'associer et se dissocier rapidement.

La troisième classe de filaments, les Filaments Intermédiaires (FI), est composée de sous-unités formant des structures beaucoup plus stables.

Contrairement aux MF et aux MT, les FI sont exprimés avec une **spécificité tissulaire** et semblent jouer un rôle structurant et mécanique dans l'organisation des tissus différenciés.

#### 1. LES FILAMENTS INTERMEDIAIRES

### 1.1. DISTRIBUTION DES FI

Le terme "Filaments Intermédiaires" (ou Filaments de 10 nm) a été donné de manière à les distinguer des MF et des MT, lesquels possèdent respectivement un diamètre plus petit (5 nm) ou plus grand (25 nm) lorsqu'on les observe au microscope électronique.

Les FI ont été divisés pendant longtemps en 5 sous-classes, en fonction de leur localisation tissulaire dans les cellules différenciées de Vertébrés (LAZARIDES, 1980, 1982) (Tableau I). Mais des études récentes, basées sur les analyses de séquences, indiquent que ces sous-classes doivent être définies plutôt en fonction du type de séquence: les types I à IV (STEINERT <u>et al.</u>, 1985 ; STEINERT et PARRY, 1985 ; PARRY et FRASER, 1985 ; OSBORN et WEBER, 1986 ; FRASER <u>et al.</u>, 1987 ; STEINERT et ROOP, 1988) (Tableau I) :

- 15 **kératines acides** différentes exprimées dans les épithélia (44-60 kDa) sont du **type I** 

 - 15 kératines basiques-neutres exprimées dans les épithélia (50-70 kDa) sont du type II

- la vimentine (54 kDa) exprimée dans les cellules mésenchymateuses et les cellules en culture, la desmine (53 kDa) exprimée dans les cellules musculaires et la GFAP (Glial Fibrillar Acid Protein) (51 kDa) exprimée dans les cellules gliales et les astrocytes sont du type III

- les 3 protéines des Neurofilaments (NF) exprimées dans les neurones, NF-L (68 kDa), NF-M (145 kDa), NF-H (200 kDa), sont du type IV

La **périphérine** (58 kDa), localisée dans les neurones périphériques (PORTIER <u>et al.</u>, 1984 ; PARYSEK et GOLDMAN, 1987), appartiendrait au **type IV** d'après STEINERT et ROOP

-41-

### TABLEAU I LES DIFFERENTES SOUS-UNITES PROTEIQUES DES FILAMENTS INTERMEDIAIRES CHEZ LES VERTEBRES ET LEUR ORIGINE CELLULAIRE (STEINERT et ROOP, 1988 ; BLOEMENDAL et PIEPER, 1989)

Type cellulaire	Protéine FI	Nombre de chaines	Туре	MM (kDa)
CYTOPLASME				
épithélia	kératines acides kératines basiques	<u>≈1</u> 5 ≈15	I II	44-60 50-70
cellules en culture et cellules mésen- chymateuses	vimentine	1	III	54
cellules musculaires	desmine	1	III	53
cellules gliales et astrocytes	GFAP (Glial Fibrillar Acidic Protein)	1	III	51
neurones*	Neurofilaments : NF-L NF-M NF-H	3	IV	60-70 105-110 135-150
NOYAU				
cellules nuclées	lamines : lamine A lamine B lamine C	3	v	60 67 70

a : les axones de certains Arthropodes ne contiennent pas de NF (LASEK <u>et al.</u>, 1985). (1988) mais LEONARD <u>et al.</u> (1988) et ALETTA <u>et al.</u> (1989) préfèrent la classer dans le **type III**.

types de séquence forment des Ces 4 structures cytoplasmiques de diamètre filamenteuses 10 - 15nm, classiquement connues sous le nom de Filaments de Taille Intermédiaire (FI) et dont l'apparence est identique en microscopie électronique.

Sont venues récemment s'ajouter à cette famille, des protéines cette fois-ci à localisation nucléaire, les lamines. le complexe de la lamine nucléaire qui forment ou caryosquelette à la surface interne de la membrane nucléaire des cellules eucaryotes (GERACE, 1986 ; AEBI et al., 1986 ; FRANKE, 1987). Les lamines ne forment pas des structures cytoplasmiques de 10 nm, mais plutôt un treillis de mailles tétragonal composé de fibres d'environ 10 nm de diamètre dans les cellules en interphase in vivo (AEBI et al., 1986 ) et en ordre paracristallin in vitro (ZACKROFF et al., 1984 ; AEBI et al., 1986 ; GOLDMAN et al., 1986 ; PARRY et al., 1987).

Les lamines sont constituées de 3 protéines (lamines A, B et C) chez les cellules de Vertébrés (SHELTON <u>et al.</u>, 1982; FRANKE, 1987 ; GOLDMAN <u>et al.</u>, 1986 ) et d'au moins une protéine chez les Invertébrés (KROHNE et BENAVENTE, 1986 ; KROHNE <u>et al.</u>, 1981). Leurs masses moléculaires sont comprises entre 60 et 70 kDa. L'analyse de leur séquence les classe

-43-

dans un type distinct, le type V (Mc KEON <u>et al.</u>, 1986 ; FISCHER <u>et al.</u>, 1986 ; PARRY <u>et al.</u>, 1986).

Les classes et les types de séquence des FI sont tous présents chez les Vertébrés primitifs. On en rencontre également dans beaucoup de cellules différenciées d'Invertébrés et de Métazoaires simples (TRAUB, 1985 ; BARTNIK <u>et al.</u>, 1986).

De plus, les FI seraient présents dans les cellules de plantes en culture (DAWSON et al., 1985), chez la levure (SOLL et MITCHELL, 1983) et chez certains champignons (KOURY et ECKERT, 1984). Les tektines (3 protéines de 47 à 55 kDa), localisées dans l'axonème des flagelles d'eucaryotes, seraient assimilées à des protéines "IF-like" (LINCK et LANGEVIN, 1982 ; LINCK et al., 1985 ; LINCK et STEPHENS, 1987 ; CHANG et PIPERNO, 1987). Ces hypothèses reposent uniquement la reconnaissance immunochimique de ces protéines sur par l'anticorps "universel" anti FI développé par le groupe de PRUSS (1981), qui reconnaitrait vraisemblablement un épitope commun dans le domaine médian. Une étude plus détaillée, impliquant l'isolement et le séquençage de ces protéines serait nécessaire pour confirmer cette apparentée (homologie de séquences).

-44-

#### 1.2. Structure des FI

Les séquences en acides aminés partielles ou complètes d'un certain nombre de protéines des FI de Vertébrés sont actuellement connues (Revues : PARRY et FRASER, 1985 ; CONWAY et PARRY, 1988).

Le trait caractéristique qui distingue une chaine protéique de FI est son domaine central "rod" en baguette de 310-315 résidus (types I-IV) ou de 356 résidus (type V). Celui-ci est remarquablement conservé dans sa taille, sa structure secondaire et, selon un degré plus ou moins grand, dans sa séquence. Les chaines des protéines FI diffèrent essentiellement par la taille et la séquence de leurs domaines N- et C-terminaux.

### 1.2.1. Le domaine médian

Le domaine médian a été défini à l'origine comme une longue séquence  $\alpha$ -hélicoïdale de la desmine, résistante à la chymotrypsine et dont l'analyse de sa séquence a établi l'existence de deux segments capables de former des liaisons interpeptidiques (GEISLER <u>et al.</u>, 1982a).

La Figure 7 présente les traits caractéristiques de ce domaine. Il est formé de 4 zones hélicoïdales qui possèdent une séquence heptapeptidique de la forme  $(a-b-c-d-e-f-g)_n$  où

-45-



Figure 7 : Organisation en domaines des Filaments Intermédiaires chaque type de chaine FI (I à V) contient un domaine médian entouré par des domaines N- et C-terminaux. Dans les types I à IV, le domaine médian est constitué de 4 séquences peptidiques α-hélicoïdales (1A, 1B, 2A, 2B) de taille invariante, que séparent 3 jonctions (L1, L12, L2) à structure non-hélicoïdale, contrairement aux lamines du type V. Les domaines Net C-terminaux peuvent être divisés en sous-domaines d'après la présence de séquences homologues (H), variables (V) et terminales (E), communes aux types I à IV. plus de 75 % des positions a et d sont occupées par des résidus apolaires, alors que les positions b, c, e, f et g sont souvent des résidus polaires ou chargés. Cette séquence heptapeptidique qu'adopte facilement une structure en super-hélice ("coiled-coil") (Mc LACHLAN, 1978 ; DOOLITTLE <u>et</u> <u>al.</u>, 1978) a été mise en évidence pour la première fois, dans le cas des FI, dans les kératines de la laine (CREWTHER <u>et</u> <u>al.</u>, 1978). Les 4 zones en  $\alpha$ -hélice appelées 1A, 1B, 2A et 2B sont interrompues par 3 courtes jonctions :

- L1 joint 1A et 1B pour former le segment 1

- L2 joint 2A et 2B pour former le segment: 2

- L12 joint les segments 1 et 2

Les tailles et les séquences de ces zones  $\alpha$ -hélicoïdales et de leurs jonctions définissent les types I à V mentionnés plus haut.

A l'intérieur d'un même type de séquence, les chaines protéiques présentent 70 à 95 % d'homologie, alors que les chaines appartenant à des types différents montrent une homologie nettement plus faible (30 % ou moins) (PARRY et FRASER, 1985 ; CONWAY et PARRY, 1988).

Les zones  $\alpha$ -hélicoïdales des chaines des type I à IV possèdent une taille invariante. L1, dont la longueur et la séquence varient, est non-hélicoïdal ; L12 forme probablement une structure  $\beta$  ; L2 est en  $\alpha$ -hélice mais ne comporte pas de séquence heptapeptidique. La zone 1B et le segment 2 possèdent respectivement des périodicités de 9,55 et 9,85 résidus dans la distribution des résidus chargés qui seraient impliqués dans la détermination des super-ordres de la structure des FI. Les segments 1 et 2 mesurent chacun 22 nm de long et le domaine médian entier atteint 47 nm.

Le domaine médian des lamines du type V diffère légèrement (PARRY et al., 1986 ; CONWAY et PARRY, 1988). Le premier segment comprend 42 acides aminés supplémentaires, suite à l'insertion de 6 heptades dans la zone 1B (WEBER, 1986 ; PARRY et al., 1986), si bien que ce segment mesure 28 nm de long et le domaine entier 53 nm. Des séquences comparables jonctions sont présentes mais L1 possède une séquence aux heptapeptidique et L12 et L2 sont en  $\alpha$ -hélice. Le domaine mélamines possède ainsi une structure entièrement dian des  $\alpha$ -hélicoïdale qui le rapproche plus, de ce fait, de la tropomyosine (PARRY et al., 1986). Les segments 1 et 2, ainsi plus fortement chargés que dans les chaines des types I à V, contiennent une périodicité significativement différente dans la distribution des résidus chargés.

Néanmoins, tous les types de chaines des FI, y compris les lamines, possèdent certains traits communs :

- ils contiennent tous des séquences fortement conservées
de 2 à 3 heptapeptides dans le début de la zone 1A et de 4 à
5 heptapeptides à la fin du segment 2

- ils possédent tous une "cassure" exactement conservée

-48-

au milieu de la zone 2B (Figure 7).

Pour qu'une chaine protéique soit désormais assimilée aux FI, STEINERT et ROOP (1988) proposent que celle-ci possède un domaine médian en baguette "rod" dont la structure secondaire et les propriétés soient identiques à celles mentionnées ci-dessus.

### 1.2.2. Les domaines N- et C-terminaux

Les analyses des séquences N- et C-terminales (STEINERT <u>et al.</u>, 1985 ; STEINERT et PARRY, 1985 ; CONWAY et PARRY, 1988) ont permis leur classification en sous-domaines. Celle-ci est basée sur l'existence :

- de séquences de forte homologie (sous-domaines H)

- de séquences variables ou basées sur le taux de répétition exacte ou inexacte de séquences peptidiques (sous-domaines V)

- des séquences terminales fortement chargées (sous-domaines El et E2) (Figure 7).

En dépit de ces divisions en sous-domaines, les structures secondaires et en super-ordre de ces domaines N- et C-terminaux restent mal comprises. La clarification des fonctions des FI mériterait une étude structurale détaillée des domaines N- et C-terminaux.

### 1.3. Assemblage des FI

Les FI sont formés par l'assemblage de sous-unités protéiques monomériques. L'association débute par la formation de "coiled-coiled" à partir de 2 monomères par des interactions latérales des domaines en baguette. Les forces impliquées dans cette réaction sont principalement de nature hydrophobe.

Par opposition avec la plupart des autres FI, les filaments de **kératine** sont obligatoirement composés d'hétérodimères (STEINERT <u>et al.</u>, 1976 ; HATZFELD et FRANKE, 1985), composés d'une sous-unité de kératine du type I et d'une autre du type II (Tableau I). Des homodimères peuvent toutefois être obtenus <u>in vitro</u> (QUINLAN <u>et al.</u>, 1986).

La seconde étape dans l'assemblage du FI consisterait en une interaction entre 2 dimères conduisant à un tétramère puis un octamère comprenant 2 complexes à 4 chaînes orientées antiparallèlement (STEINERT et ROOP, 1988), si bien que dans la structure finale, les domaines terminaux non-hélicoïdaux débordent de la colonne du filament. Un modèle représentant un filament de kératine est schématisé sur la Figure 8A.

Les **lamines** peuvent former des dimères <u>in vitro</u>, capables de s'associer ultérieurement pour former des filaments de 10 nm similaires aux FI (AEBI <u>et al.</u>, 1986). Toutefois et

-50-



Figure 8 : Modèle structural d'un filament de kératine de 8 nm Deux sous-unités différentes, une kératine du type I et une kératine du type II s'assemblent pour former un protofilament de 2 nm. Les domaines terminaux non-hélicoïdaux débordent de la colonne du filament. L'interaction entre deux protofilaments donne une protofibrille de 4,5 nm. L'assemblage de quatre protofibrilles aboutit à la formation du FI. Le diamètre des différents types de FI varie de 8 à 12 nm (STEINERT et ROOP, 1988 ; BLOEMENDAL et PIEPER, 1989). contrairement aux types I à IV, les lamines peuvent former des entités polymorphiques en solution de faible force ionique (ZACKROFF <u>et al.</u>, 1984 ; GOLDMAN <u>et al.</u>, 1986 ; PARRY <u>et</u> <u>al.</u>, 1987). La dimérisation de la lamine a aussi été obtenue <u>in vivo</u> (LOEWINGER et Mc KEON, 1988). La formation du filament peut être achevée après transfection ou microinjection de gènes de FI, normaux ou modifiés, ou d'ADNc en culture cellulaire.

Des expériences de transfections ont montré que les altérations dans le domaine C-terminal n'influencent pas le potentiel de formation du filament des protéines codées (VAN DEN HEUVEL <u>et al.</u>, 1987 ; ALBERS et FUCHS, 1987), résultat non surprenant, puisque la plus petite sous-unité FI connue, K19, est encore capable de s'assembler en filaments , malgré l'absence de la fin du domaine C-terminal (BADER <u>et al.</u>, 1986).

Il a été démontré cependant que des délétions dans le premier exon de la **desmine** (VAN DEN HEUVEL <u>et al.</u>, 1987), ou la libération par protéolyse des acides aminés du côté N-terminal affaiblissent la capacité de la **desmine** ou de la **vimentine** à former des filaments ( TRAUB et VORGIAS, 1983 ; KAUFMAN <u>et al.</u>, 1985). Cela prouve aussi que sont impliqués, non seulement le domaine médian, mais aussi le domaine N-terminal.

-52-

Les observations en microscopie électronique suggèrent fortement une interaction entre les FI et la membrane plasmique (RAMAEKERS <u>et al.</u>, 1982).

GEORGATOS <u>et al.</u>, 1985, 1987, ont montré que les filaments de desmine et de vimentine sont en contact avec l'enveloppe nucléaire par l'intermédiaire du domaine C-terminal, alors que le domaine de tête s'associe avec la membrane plasmique.

1.4. Contrôle post-traductionnel de l'assemblage des FI

Les domaines variables N- et C-terminaux de toutes les chaines de FI, y compris les lamines, représentent les sites majeurs des modifications post-synthétiques (TRAUB, 1985 ; FRASER <u>et al.</u>, 1987).

Deux types de modifications, la phosphorylation et la protéolyse limitée, semblent jouer un rôle majeur dans l'assemblage et le "turn-over" des FI.

Le phosphate possède un "turn-over" plus rapide que la protéine FI (FEY <u>et al.</u>, 1983 ; Mc TAVISCH <u>et al.</u>, 1983). La réorganisation du FI dans les cellules mitotiques s'accompagnée d'un accroissement de la phosphorylation (EVANS et FINK, 1982 ; FEY <u>et al.</u>, 1983 ; CELIS <u>et al.</u>, 1983 ; WESTWOOD <u>et al.</u>, 1985).

Des résultats récents suggèrent que le phénomène

-53-

réversible d'"assemblage-désassemblage" des FI de desmine et de vimentine pendant la mitose est régulé par un mécanisme commun impliquant la phosphorylation enzymatique de sites spécifiques à l'intérieur du domaine N-terminal de ces molécules (INAGAKI <u>et al.</u>, 1987, 1988 ; EVANS, 1988a, 1988b).

Cette phosphorylation "site-spécifique" empêche la polymérisation des sous-unités FI et provoque la dépolymérisation des filaments.

La phosphorylation sur des sites extérieurs au domaine N-terminal ne semble pas être liée à la formation d'un filament endommagé.

D'une manière similaire, la cassure mitotique de la lamina nucléaire est provoquée par une phosphorylation transitoire des lamines A et C (BURK et GERACE, 1986).

NELSON et TRAUB (1983), TRAUB (1985), KAUFMAN <u>et al.</u> (1985) ont aussi suggéré que "l'assemblage-désassemblage" des FI serait provoqué par des protéinases Ca<sup>++</sup> dépendantes. La protéolyse limitée de la desmine et de la vimentine, libérant la région N-terminale de la sous-unité, affaiblirait la capacité du protofilament à polymériser.

On peut donc postuler à présent que la phosphorylation et la protéolyse limitée sont impliquées dans la modulation de l'état de polymérisation et le désassemblage réversible des FI.

D'après STEINERT et ROOP (1988), les protéines associées aux FI (IFAP, IF-associated Proteins) joueraient un rôle dans le maintien et/ou l'organisation des réseaux de FI dans la cellule.

Toutefois, dans le cas de la desmine (QUAX <u>et al.</u>, 1985 ; PIEPER <u>et al.</u>, 1989), de la vimentine (BLOEMENDAL et PIEPER, 1989) et d'un certain nombre de kératines (KREIS <u>et al.</u>, 1983 ; FRANKE <u>et al.</u>, 1984 ; KULESH et OSHIMA, 1988 ; DOMENJOUD <u>et</u> <u>al.</u>, 1988), des expériences de transfert de gène et d'injection d'ARNm dans des cellules hétérologues, montrent que la formation et l'assemblage <u>in vivo</u> de FI dans un réseau cytosquelettique ne nécessite pas de facteur spécifique d'une sous-unité ou d'un type cellulaire.

### 2. LES GENES DES FI

Les gènes des FI forment une famille de membres apparentés, dont le gène ancestral est unique. La vimentine, la desmine et la GFAP représentent les produits d'expression d'une seule copie d'un gène. Les protéines des NF sont codées par trois gènes différents. La trentaine de kératines identifiées est codée par un nombre identique de gènes (LAZARIDES, 1982 ; BLOEMENDAL et PIEPER, 1989).

Le premier gène des FI dont la structure a été élucidée est le gène codant la vimentine du hamster (QUAX <u>et al.</u>, 1983). La structure et l'organisation des gènes FI de toute

-55-

une variété de FI d'espèces différentes furent déterminés quelque temps plus tard ( STEINERT et al., 1984 ; BALCAREK et COWAN, 1985 ; JOHNSON et al., 1985 ; KRIEG et al., 1985 ; MARCHUK et al., 1985 ; QUAX et al., 1985 ; RIEGER et al., 1985 ; BADER et al., 1986 ; FERRARI et al., 1986 ; LEWIS et COWAN, 1986 ; MIYATANI et al., 1986 ; JULIEN et al., 1987 ; LEVY et al., 1987 ; MYERS et al., 1987 ; ZEHNER et al., 1987 ; LEES et al., 1988.

Les données acquises sur la structure de ces gènes et leurs homologies de séquence ont conduit à une classification des gènes FI en 5 types différents (Figure 7 & Tableau I).

La Figure 9 schématise la distribution intron-exon de plusieurs gènes représentatifs des FI des types I à IV. Les gènes de la desmine (QUAX <u>et al.</u>, 1985), du GFAP (BALCAREK et COWAN, 1985) et de la vimentine (FERRARI <u>et al.</u>, 1986) présentent une distribution exon-intron identique.

Par contre, les gènes des NF (type IV) sont organisés différemment : ils ne possèdent que 2 à 3 introns.

Ces gènes FI dériveraient d'un ancêtre commun par duplication d'un gène (LEES <u>et al.</u>, 1988).

Les études réalisées par LEWIS et COWAN, 1986 ; KLINGE <u>et</u> <u>al.</u>, 1987 ; BLUMENBERG, 1989, montrent que les premiers évènements dans l'évolution de la protéine FI correspondent à une divergence presque simultanée de l'ancêtre des kératines

-56-



Figure 9 : Position des introns dans les différentes
 protéines des FI
 NF-L (JULIEN et al., 1987)
 NF-M (MYERS et al., 1987
 NF-H (LEES et al., 1988)
 Vimentine (FERRARI et al., 1986)
 Desmine (QUAX et al., 1988)
 GFAP (BALCAREK et COWAN, 1985)
 Kératine 1 (MARCHUK et al., 1985)
 Kératine 2 (JOHNSON et al., 1985)

Remarquer les extensions C-terminales caractéristiques des NF (voir page 76).



Figure 10 : Modèle proposé par LEWIS et COWAN, 1986, montrant l'évolution de la famille multigénique des FI à partir d'une séquence ancestrale contenant 7 introns.

> T : évenement de transposition médié par l'ARNm, conduisant à l'intégration d'une séquence de gène FI exprimée qui acquiert plus tard 2 nouveaux introns dans le segment 2  $\alpha$ -hélicoïdal et un 3° intron (non montré) correspondant probablement au processus de recrutement de séquences adjacentes qui viendront coder le domaine C- $_{\rm tr}$  acide.

A : gène ancestral

Les flèches indiquent l'acquisition ou la perte d'un intron.

acides et basiques et des protéines des FI non-épithéliales (des types III et IV) (Figure 10) et des lamines.

Dans la branche non-épithéliale de l'arbre de l'évolution, les gènes codant pour les NF, la vimentine, la desmine et la GFAP divergent à partir d'un ancêtre commun.

De plus, en comparant les séquences protéiques et l'organisation génique, on pourrait conclure qu'il existe un ancêtre commun pour le domaine  $\alpha$ -hélicoïdal, alors que les domaines variables évolueraient à travers des séries de duplications en tandem et probablement par conversion génique.

3. EXPRESSION DES FI

3.1. Régulation de l'expression des gènes FI

Tous les Filaments Intermédiaires sont exprimés avec une spécificité tissulaire et selon un mode régulé par le développement (Revues : LAZARIDES, 1982 ; TRAUB , 1985 ; STEINERT et al., 1985 ; OSBORN et WEBER, 1986 ; STEINERT et ROOP, 1988).

Les "patterns" d'expression spécifiques des sous-unités ont été abondamment décrits mais les règles qui gouvernent l'expression des FI au niveau moléculaire commencent seulement à émerger. Cette régulation prend place au niveau de la transcription (FUCHS et GREEN, 1980 ; CAPETANAKI <u>et al.</u>, 1983, 1984 ; JORCANO <u>et al.</u>, 1984 ; TRAUB, 1985 ; STEINERT et ROOP, 1985 ; FERRARI <u>et al.</u>, 1986), avec cependant quelques exceptions (WINTER et SCHWEIZER, 1983 ; TYNER et FUCHS, 1986).

La formation et la composition en sous-unités des Filaments sont déterminées en premier lieu par la disponibilité des sous-unités solubles, mais à ce niveau, des mécanismes post-traductionnels (phosphorylation et protéolyse) se produisent et influencent l'assemblage des FI.

Peu d'informations sont disponibles sur les facteurs qui régulent l'expression des gènes FI, bien que de nombreux effecteurs aient été impliqués, dont l'environnement (DORAN et al., 1980 ; CONNEL et RHEINWALD, 1983 ; ASSELINEAU et al., 1985 ; BEN-ZE'EV, 1986 ; la Vit A (FUCHS et GREEN, 1981 ECKERT et GREEN, 1984 ; TSENG et al., 1984 ; GILFIX et ; ECKERT, 1985; KOPAN et al., 1987), les oestrogènes (ROOP et al., 1984 ; KRONENBERG et CLARK, 1985a, 1985b), et les promoteurs de tumeurs tel que le TPA (FERRARI et al., 1986 ; TOFTGARD et al., 1985 ; LASKIN et al., 1981 ; NELSON et al., 1982a, 1982b ; SCHWEIZER et WINTER, 1982). Mais leur mécanisme d'action reste inconnu.

La régulation de l'expression génique de la kératine diffère de celle des autres gènes FI : les FI de kératine sont obligatoirement des hétéropolymères , une sous-unité au moins de chaque type (I et II) est exprimée dans chaque tissu

-60-

épithélial, produisant des combinaisons spécifiques du type cellulaire .

Il est bien évident que si les kératines des types I et II exprimées par paires, sont trouvées en quantités équimolaires à l'intérieur des cellules, leurs taux d'expression doit être régulé. Il n'est pas clair jusqu'à présent que soient impliquées des séquences régulatrices.

Plusieurs gènes de la kératine du même type sont fortement liés dans le génome (POWELL <u>et al.</u>, 1986 ; RAYCHAUDHURY <u>et al.</u>, 1986 ; BLESSING <u>et al.</u>, 1987 ; ROSENBERG <u>et al.</u>, 1988) mais leurs "patterns" d'expression pris individuellement peuvent être complètement différent:s (BLESSING <u>et</u> <u>al.</u>, 1987).

En manipulant les taux d'expression de la kératine par transfection de différents types de gènes de kératine dans des cellules épithéliales et non épithéliales, on a montré que le sort des sous-unités de kératine d'un seul type est déterminé principalement par la présence et la quantité des sous-unités de l'autre type (KULESH et OSHIMA, 1988 ; DOMENJOUD <u>et al.</u>, 1988).

#### 3.2. Séquences régulatrices

régions en 5' de la plupart des gènes d'eucaryotes Les impliquées dans la régulation transcriptionnelle sont de l'expression des gènes. La comparaison des gènes de la vimentine (FERRARI et al., 1986 ; ZEHNER et al., 1987) et de la kératine, à l'intérieur d'une même espèce et chez différentes espèces (BLESSING et al., 1987), met en évidence des régions conservées au cours de l'évolution. Bien que dans certains cas des gènes de kératines coexprimés révèlent dans leur séquence en 5' des degrés d'homologies significatifs, il existe peu d'homologie dans ces régions régulatrices potentielles (d'après les mêmes auteurs). Par ailleurs, il existe abondance de données sur l'identification de séquences une régulatrices sur la base d'homologies, avec les facteurs de transcription Sp1 (QUAX et al., 1985; BADER et al., 1986), séquences "core" Enhancer du virus SV40 (QUAX et al., les 1985 ; TYNER et al., 1985 ; RAYCHAUDHURY et al., 1986), et même une séquence spécifique de l'épiderme (BLESSING et al., 1987). Il reste toutefois à établir si ces séquences sont réellement impliquées dans le processus de régulation.

Les régions en 5' des gènes de la desmine et de la vimentine présentent de fortes similitudes (QUAX <u>et al.</u>, 1985) mais des expériences de transfection transitoire ont montré que certaines de ces séquences peuvent être délétées sans effet sur le taux d'expression (PIEPER <u>et al.</u>, 1987).

-62-

La plupart des études fonctionnelles portant sur les séquences régulatrices des FI ont été réalisées jusqu'à présent sur le gène de la vimentine par des expériences de transfert de gène. L'introduction dans la lignée germinale de souris de gènes hybrides vimentine-desmine met en évidence que la réqion en 5' de 3,2 kbp de la vimentine contient tous les éléments régulateurs requis pour une expression "tissu spécifique" à taux élevé (KRIMPENFORT et al., 1988 ; PIEPER et al., 1989). Les différences inter-espèces dans l'expression de la vimentine sont aussi médiées par des séquences de vimentine en cis (NGAI et al., 1987). L'analyse par délétion des régions en 5' de la vimentine de l'homme (RITTLING et BASERGA, 1987) et du hamster (PIEPER et al., 1987) a montré que des éléments de séquences régulatrices (soit positifs, soit négatifs) existent dans cette région. Ils peuvent conférer un fort taux d'expression, l'inductibilité d'un facteur de croissance, ou une régulation négative pendant la myogenèse sur un gène reporter lié (PIEPER et al., 1987) et sont localisés de 2,6 à 3,1 kbp en amont du site d'initiation de la transcription (PIEPER et al., 1987). La région en 5' du gène la vimentine réqule aussi l'induction de l'expression de de vimentine dans les cellules en la culture d'origine non-mésenchymateuse (PIEPER et al., 1989).

Tous ces résultats suggèrent que le pattern d'expression complexe de la vimentine pendant le développement et la différenciation est régulé en cis.

-63-

Quant à la desmine, PIEPER <u>et al.</u> (1987) ont montré, par des expériences de transfection, qu'une séquence relativement courte, de -89 à +25 par rapport au site CAP, suffit à provoquer une expression spécifique du muscle à un taux élevé.

Pour le gène codant le NF-L humain, une séquence en 5' de 14 kbp permet une expression correcte à spécificité tissulaire dans les souris transgéniques (JULIEN <u>et al.</u> 1987).

Des éléments régulateurs en cis ont été identifiés dans la région en 5' des gènes de la kératine (JORCANO <u>et al.</u>, 1988).

La caractérisation des facteurs de transcription se liant aux séquences contrôlant les FI fournira une meilleure compréhension des mécanismes gouvernant l'expression des gènes FI.

#### 4. FONCTIONS DES FI

En dépit du nombre important de publications ayant trait aux Filaments Intermédiaires, aucune signification fonctionnelle équivoque ne peut leur être attribuée. Comme d'une part, certains types cellulaires ne semblent pas contenir de FI, et d'autre part, beaucoup de cellules en culture semblent fonctionner normalement et se divisent même après rupture de l'organisation de leur FI, il semble improbable que ces derniers possèdent des fonctions vitales. En se basant sur la complexité de la famille des gènes FI, leur expression à spécificité tissulaire et la diversité des propriétés de leurs domaines terminaux, il semble probable que les FΙ soient impliqués dans des fonctions spécialisées en relation avec l'état de différenciation de la cellule (GOLDMAN et al., 1986 ; FRANKE, 1987 ; FRASER et al., 1987). Ces fonctions comprendraient la coordination mécanique du cytosquelette de cellule ou du tissu, le transport d'information et la la transduction de signaux (GOLDMAN et al., 1986).

D'un autre côté, les lamines du complexe de la lamina nucléaire sont ubiquitaires et par conséquent essentielles à la coordination de la fonction et de la structure du noyau et de l'expression des gènes. Elles pourraient aussi réguler l'assemblage et l'état d'organisation du FI cytoplasmique dans chaque type cellulaire différencié. La famille des protéines FI reste une composante importante et énigmatique des cellules d'un intérêt permanent pour les biologistes cellulaires et moléculaires.

-65-

#### 5. LES NEUROFILAMENTS

Les Neurofilaments (NF) représentent les Filaments Intermédiaires (FI) spécifiques des neurones. Le neurone est une cellule très régionalisée, dans laquelle les synthèses protéiques sont confinées au corps cellulaire. C'est également une cellule très asymétrique, où le volume de l'axone représente plusieurs milliers de fois celui du corps cellulaire (Figure 11). Le maintien et le fonctionnement de l'axone et de sa terminaison nécessitent donc un ravitaillement massif et permanent, assuré par le transport axonal antérograde, lent (SCa, SCb : Slow Component a, Slow Component b) et rapide (Figure 12) (HOFFMAN et LASEK , 1975 ; LASEK et HOFFMAN, 1976). Les NF forment avec les microtubules réseau qui se déplace le long de l'axone à la vitesse du un transport lent (SCa : 0,2 à 1 mm/jour, Figure 12) et qui joue un rôle dans le maintien et la régénération de la structure de l'axone.

La détermination de la structure protéique des NF a fait l'objet de nombreuses controverses en raison des difficultés rencontrées pour obtenir une préparation de NF non contaminée par les filaments gliaux. HOFFMAN et LASEK , 1975 ; LASEK et HOFFMAN, 1976, ont étudié les NF par l'intermédiaire du transport axonal. Dans cette intention, ils ont injecté des acides aminés radioactifs dans le corps cellulaire du neurone de rat (Figure 12). Ils ont suivi le

-66-



Figure 11 : Un neurone typique de Vertébré.

.



Figure 12 : Le transport axonal : après application d'acides aminés marqués dans la région du corps cellulaire du neurone (a) et un délai correspondant à la synthèse des protéines, les composants du transport axonal rapide ("fast components"), vésicules (200-400 mm/j) et mitochondries (50 mm/j) migrent le long de l'axone (b). Quelqués jours à quelques semaines plus tard, deux autres composants apparaissent (c) : le "slow composent b" (SCb, 2-8 mm/j), le plus rapide des deux, dont la composition en protéines comprend l'actine et, dans certains axones, la tubuline; SCa (SCa, 0,2-1 mm/j), le plus lent, contient principalement la tubuline et les protéines de NF (d'après BRADY et LASEK, 1982 ; HOLLENBECK, 1989). devenir des protéines synthétisées et ont ainsi mis en évidence la présence de trois protéines de masse moléculaire 200, 145 et 68 kDa qui se déplacent simultanément et à la même vitesse que celle des NF. Ils en ont conclu que les NF étaient constitués par ces trois protéines, qu'ils ont appelées "le triplet des NF". La structure protéique des NF a été confirmée définitivement par SCHLAEPFER et LINCH, 1977 ; SCHLAEPFER et FREEMAN, 1978 ; LIEM <u>et al.</u>, 1978 ; ANDERTON <u>et al.</u>, 1978, 1980, grace à des études biochimiques et immunochimiques.

Les Neurofilaments (NF) des Mammifères sont composés de 3 sous-unités protéiques : NF-L, NF-M et NF-H, dont les masses moléculaires apparentes sur PAGE-SDS correspondent respectivement à 195-220 kDa (NF-H), 140-160 kDa (NF-M), et 68-73 kDa (NF-L) (JULIEN et MUSHYNSKI, 1982 ; SHAW et WEBER, 1982 ; HIROKAWA et al., 1984 ; KAUFMANN et al., 1984 ; CARDEN et 1985 ; DAHL et BIGNAMI, 1986). Les variations de masses al., moléculaires dépendent de l'espèce (LIEM et al., 1978 ; SHAW et al., 1984) (Tableau II) mais elles peuvent aussi refléter des différences subtiles dans la technique utilisée pour les caractériser (KAUFMANN et al., 1984). En effet, ces auteurs ont déterminé la masse moléculaire directe des trois protéi-NF de porc en utilisant les techniques nes des de qel filtration analytique et de centrifugation par sédimentation à l'équilibre. Leurs résultats (Tableau III) montrent que

-69-

### TABLEAU II

Masses moléculaires apparentes (en kDa) des protéines de NF

## de plusieurs espèces, déterminées par PAGE-SDS

(SHAW et al., 1984)

espèces	L	М	Н	
Vertébrés Supérieur	8			
rat	68	145	200	
souris	68	145	200	
cobaye	68	152	219	
lapin	68	152	203	
chat	68	152	217	
vache	72	168	212	
porc	72	173	217	
chèvre	72	160	190	
poulet	72	168	182	
Vertébrés Inférieur	8			
tortue	75	(1	45)	
lézard	75	(1	75)	
Invertébrés				
calmar	60		200	
myxicole		150 et 200		

Vertébrés Supérieurs : triplet de NF Vertébrés Inférieurs et Invertébrés : doublet de NF Le triplet de NF de rat sert de témoin.

Masses des trois	moléculair s protéines (KA	TABLEAU III ces apparentes de NF de por AUFMANN <u>et al.</u> , 1	et réell c et de l 984)	es (en kDa) eur domaine C-	T
Protéine	н	H "tail piece"	M	M "tail piece"	L
PAGE-SDS Gel filtration Sédimentation Valeur proposée	200-205 138 112 110-140	150-170 107 73	145-160 106 108 107	100-120 103	68-72 60 63 62

-70-

7

l'électrophorèse en gel de polyacrylamide-SDS surestime fortement les valeurs de NF-M et NF-H par rapport aux deux techniques précédemment citées. Cette discordance provient en fait des extensions C-terminales fortement acides chez ces deux protéines. Ce point sera discuté ultérieurement plus en détail dans la partie Résultats, chapitre II.

SCHLAEPFER (1978) a montré, par microscopie électronique, que les NF sont solubles uniquement après une exposition prolongée à bas pH ou à faible force ionique. Des NF du système nerveux central ou du système nerveux périphérique sont présents dans les surnageants d'homogénats de cerveau centrifugés à grande vitesse (75000 g, 30 min) (BERKOWITZ <u>et al.</u>, 1977 ; THORPE <u>et al.</u>, 1979 ; DELACOURTE <u>et al.</u>, 1980) et peuvent précipiter à chaud (DELACOURTE <u>et al.</u>, 1980).

Les études immunohistochimiques ont apporté des informations sur la distribution du triplet de NF. Les expériences d'immunofluorescence réalisées par SHAW <u>et al.</u>, 1981, sur le cerveau de rat montrent que le marquage par des anticorps spécifiques de chaque protéine est identique : il se situe au niveau des axones. Cependant, les corps cellulaires des cellules pyramidales du cortex sont mieux marquées par l'anticorps anti-145K et l'anticorps anti-68K que par l'anticorps anti-210K (Tableau IV).

Le marquage par des anticorps spécifiques du cerveau de

-71-

TABLEAU IV									
Distribution	du	triplet	de	NF	dans	le	cerveau	de	rat
		(SHAW	et a	<u>al.</u>	, 1981	L)			

	Н	M	L .	
axones	+	+	+	
dendrites et corps cellulaires des cellules pyramidales	+/-	+	+	
corps cellulaires d'un grand nombre de neurones du cerveau	+/-	+	+	
certains neurones tels que les cellules granulaires	-	-	-	

-----

,
rat au cours de son développement est comparable à celui du cerveau adulte (SHAW et WEBER, 1982). Seuls quelques profils montrent une absence de la protéine 210K mais tous possèdent les deux autres protéines du triplet, d'où l'hypothèse selon laquelle la protéine 210K serait exprimée plus tard que les protéines 145K et 68K.

Alors que les 3 sous-unités des NF présentent un domaine médian en baguette  $\alpha$ -hélicoïdal fortement conservé chez toutes les protéines des FI (voir paragraphe 1.2. page 45), NF-H et NF-M diffèrent par le caractère fortement acide de leur domaine C-terminal.

La différence de taille entre ces 3 protéines s'explique par leurs extensions C-terminales de plus en plus longues (GEISLER et al., 1983). Les régions C-terminales de NF-M et NF-H sont fortement phosphorylées, provoquant une migration de ces 2 protéines sur PAGE-SDS (JULIEN anormale & MUSHYNSKI, 1982, 1983; KAUFMANN et al., 1984; CARDEN et al., 1985). La phosphorylation, spécialement chez NF-H, jouerait un rôle dans l'interaction des NF avec d'autres composés neuronaux (les microtubules) (JULIEN et MUSHYNSKI, 1983 ; STERNBERGER et STERNBERGER, 1983 ; MINAMI et SAKAI, 1985).

Les 3 polypeptides sont plus ou moins phosphorylés , principalement sur les résidus sérine, avec respectivement, jusqu'à 22 (NF-H), 9 (NF-M), et 3 (NF-L) moles de phosphate

-73-

de protéine chez le rat. Leur degré de par mole phosphorylation peut être régulé d'une part en fonction du développement, d'autre part selon la localisation du neurone l'intérieur du système nerveux central, et enfin par le à microenvironnement intraneuronal. Ce degré de phosphorylation peut être essentiel à l'assemblage intraneuronal du réseau de neurofilament (SHAW et WEBER, 1982 ; JULIEN et MUSHYNSKI, 1982 ; KAUFMANN <u>et al.</u>, 1984 ; HIROKAWA et a ... 1984 ; CARDEN et al., 1985 ; DAHL et BIGNAMI, 1986 ; LIEBERBURG et al., 1989) ainsi qu'à son transport (Figure 13) (HOLLENBECK, 1989).

L'organisation des 3 protéines dans le polymère de NF natif reste à déterminer. Toutefois, la révélation immunohistochimique du tissu nerveux suggère que : - NF-L forme le "core" structural du NF - NF-H est impliqué dans la formation de pontages entre les NF (HIROKAWA et al., 1984).

La disposition de NF-M est moins certaine, bien qu'elle soit plus fortement associée au core du NF que NF-H (SHARP <u>et</u> <u>al.</u>, 1982 ; HIROKAWA <u>et al.</u>, 1984). Cette interprétation est fondée sur des expériences de reconstitutionen utilisant chacune des trois sous-unités des NF. Ainsi, NF-L peut s'autoassembler <u>in vitro</u> pour former des filaments de 10 nm (GEISLER et WEBER, 1981). Malgré les premières expériences négatives (GEISLER et WEBER, 1981), il semble que NF-M puisse Figure 13 : Rôle de la phosphorylation dans le transport et la dynamique des neurofilaments. Modèle proposé par HOLLENBECK (1989)



aussi s'autoassembler (au moins sous certaines conditions) pour former des filaments de 10 nm (GARDNER <u>et al.</u>, 1984 ; TOKUTAKE <u>et al.</u>, 1984). L'autoassemblage de NF-H aboutit à la formation de courts filaments, suggérant que l'incorporation de NF-H dans le core NF doit bloquer l'élongation du filament (GEISLER et WEBER, 1981). NF-H semble donc gouverner la formation de liaisons entre les sous-unités.

La protéine NF-L du porc est la première protéine de NF dont la structure primaire complète a été déterminée (GEISLER <u>et al.</u>, 1985). Elle contient 548 résidus d'acides aminés correspondant à une masse moléculaire de 61,9 kDa. La surestimation de sa valeur obtenue sur PAGE-SDS provient de la richesse en résidus Glu (44 %) de son domaine  $C_{-T}$ .

L'isolement et la séquence de clones d'ADN recombinant des gènes codant pour les NF-L, NF-M, et NF-H de souris (LEWIS et COWAN, 1985, 1986 ; JULIEN <u>et al.</u>, 1986 ; LEVY <u>et</u> <u>al.</u>, 1987), de rat (JULIEN <u>et al.</u>, 1985 ; ROBINSON <u>et al.</u>, 1986 ; NAPOLITANO <u>et al.</u>, 1987 ; BREEN <u>et al.</u>, 1988 ; DAUTIGNY <u>et al.</u>, 1988 ; LIEBERBURG <u>et al.</u>, 1989), et d'homme (JULIEN <u>et al.</u>, 1987 ; MYERS <u>et al.</u>, 1987 ; LEES <u>et al.</u>, 1988) confirment que les NF diffèrent des autres FI, non seulement par leurs régions N- et C-terminales, mais aussi par leur organisation intron-exon particulière (Figure 9 page 57). De plus, les séquences en acides aminés de NF-M et NF-H

-76-

contiennent toutes les deux dans leur région C-terminale la séquence Lys-Ser-Pro (-K-S-P-) répétée respectivement 13 et 40 fois chez l'homme (43 fois chez la souris et 51 fois chez le rat pour NF-H). Cette répétition se trouve dans la région de la protéine connue pour son taux de phosphorylation élevé (JULIEN et MUSHYNSKI, 1983) et qui représenterait ainsi un site de reconnaissance pour une kinase (MYERS <u>et al.</u>, 1987 ; GEISLER <u>et al.</u>, 1987 ; LEE <u>et al.</u>, 1988).

#### Pathologie des NF

Certaines tumeurs expriment de manière caractéristique les protéines des NF. Il s'agit des neuroblastomes, des ganglioneuroblastomes et des phéochromocytomes (OSBORN et WEBER, 1986). Cette expression peut d'ailleurs être utile dans le diagnostic différentiel de ces tumeurs.

Dans la plupart des désordres du système nerveux central, tels que la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, les neuropathies toxiques, et la "démence du pugiliste", il existe une preuve histologique de la dislocation de la structure et du transport du NF normal (GAJDUSEK, 1985).

On a longtemps cru que les NF étaient impliqués dans la formation des PFH, caractéristiques de la maladie d'Alzheimer. Cependant, il semble à présent certain qu'il n'en soit rien (NUKINA <u>et al.</u>, 1987). Comment ces auteurs en

-77-

sont-ils arrivé à ce constat?

Les dégénérescences neurofibrillaires (Neurofibrillary Tangles, NFT) et les plaques séniles sont les principaux signes anatomo-pathologiques de la maladie d'Alzheimer. Les NFT et les neurites des plaques séniles contiennent des paires de filaments hélicoïdaux (PFH), constitués de 2 filaments de 10 nm assemblés en double hélice. Pour déterminer la nature des protéines impliquées dans la formation de ces PFH, toutes les équipes de recherche se sont basées sur des techniques immunochimiques. Deux résultats apparemment conflictuels ont été obtenus :

- certains anticorps monoclonaux dirigés contre les NF (NF-M et NF-H) colorent les NFT (IHARA <u>et al.</u>, 1981 ; ANDERTON <u>et al.</u>, 1982 ; PERRY <u>et al.</u>, 1985 ; MILLER <u>et al.</u>, 1986)

- les anticorps polyclonaux préparés contre les PFH purifiés en milieu SDS (par suite de leur insolubilité) ne reconnaissent pas les protéines normales, dont les NF, sur des "blots" d'homogénats de cerveau humains (IHARA <u>et al.</u>, 1983).

Ces résultats ont été confirmés par plusieurs laboratoires. Mais en 1986, IHARA <u>et al</u>. rapportent que les anticorps polyclonaux anti-PFH incluent les anticorps anti-protéine tau, famille de phosphoprotéines associées aux MT. Les anticorps anti-protéine tau colorent les NFT de la maladie d'Alzheimer. De plus, les anticorps monoclonaux anti-NF reconnaissant les NFT sont dirigés contre des épitopes

-78-

phosphorylés (STERNBERGER et STERNBERGER, 1985). Ces faits ont conduit NUKINA <u>et al.</u>, 1987, à réexaminer certains anticorps monoclonaux anti-NF qui colorent les NFT : ils croisent tous avec les protéines tau, résultat confirmé par ailleurs par KSIEZAK-REDING <u>et al.</u>, 1987. Ils en ont déduit que ces anticorps anti-NF réagissent au niveau des PFH avec les protéines tau phosphorylées mais pas avec des NF.

Ces résultats posent le problème de l'utilisation d'anticorps dirigés contre des épitopes protéiques phosphorylés lors d'études immunochimiques. PARTIE II : RESULTATS PERSONNELS

----

CHAPITRE I

I. APPLICATION A L'ETUDE DES NEUROFILAMENTS

-

Introduction

-

La Figure 14 représente les données acquises sur la structure des NF au moment où nous avons entrepris nos travaux. Il semblait donc intéressant à l'époque d'établir les cartes peptidiques de ces trois protéines aprés coupure chimique des liaisons méthionyl, tryptophyl et cystéine dans le but d'approfondir nos connaissances sur les extensions C-<sub>T</sub> des sous-unités M et H dont la structure primaire était encore inconnue.

```
Rappel : NF-L (Low) = 70 kDA<sup>a</sup> ---> 68 kDA<sup>b</sup>
: NF-M (Middle) = 160 kDA<sup>a</sup> ---> 145 kDA<sup>b</sup>
: NF-H (High) = 210 kDA<sup>a</sup> ---> 200 kDA<sup>b</sup>
= : estimé sur PAGE-SDS
<sup>b</sup> : calculé à partir de MONTEIRO et CLEVELAND, 1989
= : LIEBERBURG <u>et al.</u>, 1989 : NF-L = 68-73
NF-M = 140-160
NF-H = 195-220
```



Figure 14 : Représentation schématique des trois domaines des protéines des NF de porc (NF-L, NF-M, NF-H) par comparaison avec la desmine (D). Les lettres W et C marquent les positions de certains résidus Trp et Cys dans ces protéines.

↓: épitope reconnu par un anticorps monoclonal (PRUSS <u>et al.</u>, 1981) et commun à tous les FI, situé sur le segment 2 du domaine médian. (GEISLER et WEBER, 1982 ; GEISLER <u>et al.</u>, 1982 , 1983). 1. Préparation des neurofilaments (NF)

Les NF sont préparés à partir de la moelle épinière fraîche de boeuf ou de porc, selon le protocole de DELACOURTE <u>et</u> <u>al.</u>, 1980, modifié. La purification de ces protéines est essentiellement basée sur la technique d'électrophorèse préparative en gel de polyacrylamide en présence de SDS. Après coloration et décoloration du gel, les bandes correspondant aux sous-unités L, M et H sont excisées (voir Matériel et Méthodes). Avant chaque coupure, nous contrôlons l'identité ainsi que l'homogénéité de ces protéines par des PAGE-SDS analytiques (Figure 15).

# 2. Composition en acides aminés des sous-unités L,M et H des NF de boeuf.

Dans l'étude de la structure primaire des protéines, la connaissance précise de la composition en acides aminés constitue une information essentielle pour le choix de l'agent de coupure (enzymatique ou chimique) à utiliser. Nous avons donc déterminé la composition en acides aminés des 3 protéines de NF. Celle-ci est tout à fait comparable à celle rapportée dans la littérature par HOGUE-ANGELETTI <u>et al.</u>, 1982, tel qu'en témoigne le Tableau V. Remarquons la richesse de ces protéines en résidus de lysine et de glutamine, qui reste une particularité observée uniquement chez les protéines de NF

-84-





Figure 15 : Contrôle de l'homogénéité des sous-unités L, M et H des NF de boeuf sur PAGE-SDS analytique.

NF-L	:	70	kDa					
NF-M	:	160	kDa					
NF-H	:	210	kDa					
S1								
	I	prote	éines	standards	de	masses	moléculaires	connues
S2	-							

.

	L	I	1	1	Н	
	 I	II	I	II	I	II
Résidus						
Сув	1-	3ъ	6-	6 <sup>12</sup>	10-	9 <del>-</del>
Asx	42	48	82	82	80	80
Thr	25	25	46	46	48	48
Ser	44	46	92	92	135	135
Glx	102	110	325	323	400	398
Pro	12	12	59	58	136	136
Gly	25	25	116	115	127	127
Ala	64	64	131	130	235	232
Val	27	27	112	112	117	117
Met	9	6	17	15	23	21
Ile	24	24	50	49	40	40
Leu	51	54	89	89	98	97
Fyr	20	18	28	17	30	15
Pĥe	17	13	24	20	22	20
His	7	7	21	21	20	19
Lvs	64	69	117	116	190	186
Arg	33	33	50	51	66	66
Trp	1	ND	4	ND	6	ND
Total	568	584	1369	1342	1783	1746

TABLEAU V : Composition en acides aminés des sous-unités L, M et H des NF de boeuf

Remarque : nos résultats (colonnes I) sont comparés avec ceux rapportés par HOGUE-ANGELETTI <u>et al.</u> (1982) (colonnes II).

: déterminé sous forme de CM-Cys
 : déterminé sous forme d'acide cystéique
 ND : Non Déterminé

-

parmi tous les FI. Pour NF-M et NF-H, nous remarquons l'abondance de résidus Ser (sites de phosphorylation au niveau de la partie C-terminale de NF-H et NF-M) et de résidus hydrophobes, glycocolle, alanine (qui caractérisent la partie N-terminale de NF-H) et valine.

Par contre, la faible fréquence des résidus de cystéine, de tryptophane et de méthionine, nous incite à tenter des coupures chimiques au niveau des liaisons peptidiques engageant ces résidus d'acides aminés.

#### 3. Clivage par le BNPS-skatole (voir Matériel et Méthodes)

Les sous-unités M et H des NF présentent un profil électrophorétique similaire après coupure chimique par le BNPS-skatole (Figures 16A et 16B) :

- 1 fragment de grande taille moléculaire résistant à la coupure chimique. Ce "core" est constitué d'un doublet de 180 et 175 kDA pour NF-H ; 135 et 125 kDA pour NF-M.

- 4 polypeptides de tailles réduites de 44,5, 40,5, 34 et 30,5 kDA pour NF-M, et 46, 37, 33,5 et 30 kDA pour NF-H.

La même coupure donne, chez la sous-unité L :

- deux fragments majeurs de 40,5 et 30,5 kDa

- deux fragments mineurs de 33 et 37 kDA.



70 kDa



210 kDa

В

Α



#### TABLEAU VI

Coupure chimique des sous-unités L,M et H des NF de boeuf par le <u>BNPS-skatole</u>. Estimation en pourcentage des produits de coupure obtenus

Sous-unité	non coupée (%)	coupée (%)	produits de coupure(kDa)	pourcentage
NF-L	38	61	40,5 30,5	29 32
NF-M	28	71	135 125 44,5 40,5 34,0 30,5	21 24 6 5 5 7
NF-H	36	63	180-175 46 37 33,5 30,5	47 5 2 3 3

L'estimation en pourcentage des produits de coupure obtenus est calculée à partir de la lecture densitométrique des PAGE-SDS analytiques. La surface de chaque pic est découpée et pesée. Ces résultats (RICHARD <u>et al.</u>, 1985) joints à ceux de GEISLER <u>et al.</u>, 1983, se rapportant aux NF de porc, nous permettent d'aboutir aux interprétations suivantes, schématisées sur la Figure 17 :

A) Les 2 fragments majeurs de 30,5 et 40,5 kDA de la sous-unité L correspondraient respectivement aux parties Net C-terminales de la protéine, puisqu'elle contient un seul résidu tryptophyl localisé au milieu de la région médiane de 40 kDA (Figure 14).

B) Ce polypeptide de 30,5 kDA est aussi caractérisé parmi les produits de coupure obtenus chez NF-M et NF-H, ce qui milite en faveur d'une grande similitude dans la séquence N-terminale de ces trois protéines. NF-M et NF-H seraient fort probablement dotées d'un résidu de tryptophane localisé au même endroit que dans NF-L.

C) La similarité entre les cartes peptidiques des sous-unités M et H, caractérisée d'une part par la présence d'un doublet de grands fragments (résistants à la coupure) et d'autre part par 4 petits fragments (dont l'un commun à la sous-unité L) témoigne d'une certaine parenté entre ces sous-unités (Figure 16, Tableau VI)

D) Les doublets de grands fragments résistants à la coupure par le BNPS-skatole correspondraient très vraisemblablement à la partie C-terminale de NF-M et NF-H. Par conséquent, il y aurait de fortes chances pour que l'épitope reconnu par l'anticorps de PRUSS (commun à tous les FI, voir p. 53 et

-90-

Figure 17 : Interprétation des cartes peptidiques des sous-unités L, M et H des NF après coupure chimique : (A) : par le BNPS-skatole (B) : par le bromure de cyanogène W : résidu de Trp M : résidu de Met

Figure 17 : Interprétation des cartes peptidiques des sous-unités L, M et H des NF après coupure chimique : (A) : par le BNPS-skatole (A) (B) : par le bromure de cyanogène (B) \_\_\_\_\_ C T Α NF-L NT --40.5KD. 30,5KDo \_\_\_\_\_ C Ţ F-M NT--30,5KDo------- 135 K Da \_\_\_\_\_ C Ţ F-H NT. -30,5 KDo ------- 180 K Da ------NF-L NT \_\_\_\_\_ GT Β M NF-M NT\_ \_\_ C T 75 K Da 85 K Do M NF-H NT ...... \_\_\_CT 75 K Da 135 K Do

-91-

Figure 14 p. 93) soit localisé dans la séquence N-terminale de ces fragments. Ces derniers contiendraient donc à la fois des domaines communs à tous les FI (le segment 2 hélicoïdal du domaine médian) et des séquences spécifiques ("tail pieces" contenant des résidus glutamyl), d'où leur faible intérêt en temps qu'antigène. Par contre, des investigations portant sur les petits fragments peptidiques localisés dans la portion N-terminale des protéines des NF sembleraient plus intéressantes pour mettre en évidence une éventuelle analogie entre les régions N-terminales des sous-unités M et H.

#### 4. Clivage par le Bromure de cyanogène

Dans le but de déterminer les conditions optimales de coupure, nous avons incubé les protéines de NF en faisant varier les 3 paramètres suivants : la concentration en BrCN, le temps d'incubation et la présence ou non d'agent réducteur des thiols (dithiothréitol,DTT).

Nos résultats sont présentés sur la Figure 18. Nous constatons d'abord que la sous-unité L est plus facilement coupée que les sous-unités M et H, puisque la coupure de NF-L est déjà complète après seulement 2 heures d'incubation à 20° C en présence de 1 mg/ml de BrCN, alors qu'il n'en est rien pour NF-H (Figure 18, couloirs A,B) : nous obtenons plusieurs fragments , dont la distribution à l'intérieur du gel semble provenir d'une coupure incomplète de cette protéine. Cela nous a conduit à prolonger le temps d'incubation à 20 heures tout en augmentant la concentration en bromure de cyanogène à 2,5 mg/ml. Ces conditions optimales de coupure nous donnent les profils électrophorétiques présentés couloir H, pour NF-L, couloir F pour NF-M, couloirs C,D pour NF-H. L'addition de DTT ne modifie en rien ces profils (couloirs E,G,I).

Sur la Figure 19A sont regroupées les cartes peptidiques au bromure de cyanogène des trois sous-unités L, M et H dans les conditions optimales de coupure (rendement de 98 %). Celles-ci sont suivies des lectures densitométriques de PAGE-SDS sur la Figure 19B, qui ont permis la détermination de la masse moléculaire de chaque peptide (sur la moyenne de plusieurs expériences) ainsi que l'estimation en pourcentage des produits de coupure obtenus (Tableau VII).

De plus, nous avons pu adapté ce protocole à de faibles quantités de protéine (20  $\mu$ g) dont la carte peptidique est présentée sur la Figure 20.

Ainsi, les profils de coupure reproductibles nous permettent de dégager certains aspects d'ordre structural entre les trois protéines des NF (Figure 17B) (RICHARD <u>et al.</u>, 1985) :

A) Quatre liaisons méthionyl clivables de la sous-unité
 NF-L (GEISLER et al., 1985) sont localisées dans la partie
 N-terminale du segment 2 du domaine médian qui, rappelons

le, est commun aux 3 protéines des NF.

B) Les fragments de taille 85 kDa chez NF-M et 135 kDa chez NF-H correspondraient bien aux portions C-terminales spécifiques de ces protéines, appelées "tail pieces" (Figure 17), comme nous allons le voir plus loin au paragraphe 6.2. D'ailleurs, l'équipe de GEISLER, 1983, signale l'absence de résidus méthionyl dans le domaine C-terminal de ces protéines.

C) Par ailleurs, fait surprenant, les portions N-terminales complémentaires de ces 2 fragments possèdent la même taille (160 kDA - 85 kDa = 75 kDa pour NF-M et 210 kDa -135 kDa = 75 kDa pour NF-H). Par conséquent, NF-M et NF-H possèderaient ainsi le même résidu méthionyl en position "75 kDA", numéroté à partir du résidu N-terminal. Ces résultats reflètent en conséquence une similitude de séquence dans ce domaine. Seulement, le fragment 75 kDA N-terminal n'a pas été caractérisé parmi les produits de coupure de NF-H et NF-M, probablement parce que le segment 2 du domaine médian contient quatre liaisons méthionyl, comme nous l'avons vu précédemment.

-94-

Figure 18	8	: 0	in L,	étique de coupure analysée sur PAGE-SDS des sous-unités M et H des NF de boeuf par le <u>bromure de cyanogène.</u>
Couloirs	A	- A, C,	E B D E	<ul> <li>NF-H</li> <li>coupure en présence de 1 mg de BrCN / ml d'acide formique en solution aqueuse à 70 % pendant 2 h à 20°C.</li> <li>coupure en présence de 2,5 mg de BrCN / ml d'acide formique pendant 18 h 20°C (conditions optimales) sans dithiothréitol (DTT).</li> <li>conditions optimales mais avec DTT.</li> </ul>
Couloirs	F	-	G F G	: NF-M : coupure dans les conditions optimales sans DTT. : avec DTT.
Couloirs	н	-	I H I	: NF-L : coupure dans les conditions optimales sans DTT. : avec DTT.



-95-

Figure 19 :

 (A) Profils électrophorétiques des produits de coupure de NF-L, NF-M et NF-H par le bromure de cyanogène dans les conditions optimales de réaction sans addition de dithiothréitol.
 NF : préparation de neurofilaments de boeuf.
 S : protéines standards de masses moléculaires connues.

(B)

(B) Lecture densitométrique des fragments BrCN obtenus à partir des sous-unités L, M, H.



## TABLEAU VII

## Coupure chimique des sous-unités L,M et H des NF de boeuf par le <u>bromure de cyanogène</u>. Estimation en pourcentage des produits de coupure obtenus.

Sous-unité	non coupée (%)	coupée (%)	produits de coupure(kDa)	pourcentage
NF-L	1	98	33 28,5 23,5 17 15 12,5 10	17 8 18 12 17 18 5
NF-M	1	98	112 103 85 42,5 37 30 24 16 14 13	3 7 23 15 7 8 17 12 5 7
NF-H	1	98	160 135 48 36,5 32 19,2 17,6	16 31 4 8 16 10 12

L'estimation en pourcentage des produits de coupure obtenus est calculée à partir de la lecture densitométrique des PAGE-SDS analytiques. La surface de chaque pic est découpée et pesée.

- Figure 20 : PAGE-SDS analytique des produits de coupure au bromure de <u>cyanogène</u> des sous-unités L,M et H des NF de boeuf. La coupure chimique a été effectuée en présence de faibles quantités de protéine
  - (A) : 40 µg de sous-unité L,M ou H
  - (B) : 20 μg de sous-unité L,M ou H
     NF : préparation témoin de neurofilament de boeuf
  - contenant les 3 sous unités L ,M et H : protéines standards de masses moléculaires connues(KDa) : produits de coupure de la sous-unité L S
  - L' М M' 1
  - H H' .



5. Clivage par l'acide nitrothiocyanobenzoïque (NTCB)

La coupure de NF-L par le NTCB aboutit à la formation de 2 peptides de 28 et 36 kDa avec un taux de clivage de 55 % (Figure 21 et Tableau VIII). Ce résultat est cohérent avec l'existence d'un seul résidu de cystéine dans NF-L, comme le montrent, d'une part la composition en acides aminés que nous avons réalisée sur NF-L (Tableau V page 96), et d'autre part les travaux de GEISLER <u>et al.</u> (1983, 1985) qui positionnent cette cystéine dans la région N-terminale du domaine médian (domaine II, Cys 321).

Par contre, NF-M résiste à la coupure par le NTCB, malgré la présence de 6 résidus de cystéine (Composition en acides aminés, Tableau V page 96).

Le rendement de coupure de NF-H est d'environ 76 % (Tableau VIII). Quatre produits de coupure sont obtenus (Figure 21), de MM 173, 155, 324 et 18 kDa. Cette protéine possèderait au moins 2 résidus Cys.



Figure 21 : Profils électrophorétiques des sous-unités L et H des NF de boeuf après coupure de leur(s) liaison(s) X-Cys par l'<u>acide</u> <u>nitrothiocyanobenzoïque</u>.

S : protéines standards de masses moléculaires (Mr) connues, exprimées en kilodaltons (kDa).



TABLEAU VIII : Coupure chimique des sous-unités L et H par l'<u>acide nitrothiocyanobenzoïque (NTCB)</u>. Estimation en pourcentage des produits de coupure obtenus.

Sous-unité	non coupée (%)	coupée (%)	produits de coupure(kDa)	pourcentage
NF-L	45	54	36 28	17 37
NF-H	23	76	173 155 32 18	36 21 5 7

L'estimation en pourcentage des produits de coupure obtenus est calculée à partir de la lecture densitométrique des PAGE-SDS analytiques. La surface de chaque pic est découpée et pesée. 6. Etude comparative des sous-unités L, M et H des NF de boeuf et de porc.

6.1. Comparaison biochimique

L'étude comparative de la structure primaire des protéines par l'établissement de cartes peptidiques après hydrolyse enzymatique ou coupure chimique peut donner d'importants renseignements sur l'existence ou non d'analogies de structure entre deux ou plusieurs protéines.

SHAW et al., 1984, ont réalisé une étude immunologique des protéines de neurofilaments chez plusieurs espèces. 11 semble d'après ces travaux que le triplet de NF ait été bien conservé au cours de l'évolution des Mammifères et des Oiseaux. Il existe cependant de légères variations de masse moléculaire entre les mêmes sous-unités de NF d'espèces différentes (Tableau II page 79). De plus, NF-M et NF-H possèdent très peu de sites antigéniques communs, à l'exception du boeuf où il existerait une certaine identité de structure entre ces 2 protéines.

Ces résultats nous ont incité à effectuer une étude comparative des produits de coupure des protéines du triplet de NF de boeuf et de porc. La mise au point de la carte peptidique des produits de coupure au bromure de cyanogène des protéines de NF du boeuf nous a permis de préparer les produits de coupure C-terminaux des protéines NF-M et NF-H du boeuf, et d'obtenir par conséquent des anticorps dirigés spécifiquement contre ces régions qui semblent être impliquées dans les interactions des NF avec d'autres organites cellulaires (WEBER <u>et al.</u>, 1983).

La Figure 22 présente les profils électrophorétiques des produits de coupure au bromure de cyanogène des sous-unités L, M et H des NF de boeuf et de porc. Une lecture densitométrique de chaque couloir a été réalisée (Figure 23) dans le but de comparer quantitativement ces produits de coupure.

remarquons une grande similitude des Nous cartes peptidiques des NF-L de boeuf et de porc alors que les profils électrophorétiques divergent pour les deux plus grandes, NF-M et NF-H. La protéine NF-L de porc contient 10 résidus Met (GEISLER et al., 1985). Nous obtenons effectivement 11 peptides après action du bromure de cyanogène. La coupure est donc complète. La similitude des cartes peptidiques des protéines NF-L du porc et du boeuf laisse supposer une bonne conservation du gène codant pour NF-L au cours de l'évolution.

Par contre, cela semble moins évident dans le cas des deux autres protéines, NF-M et NF-H. En effet, leurs cartes peptidiques, après coupure au bromure de cyanogène, différent dans les deux espèces. Les 2 fragments C-terminaux obtenus chez le boeuf (85 kDa pour NF-M et 135 kDa pour NF-H) ne sont pas retrouvés parmi les produits de coupure chez le

-102-

Figure 22 : Comparaison des profils électrophorétiques des produits de coupure au BrCN des protéines de NF de boeuf (L<sub>B</sub>, M<sub>B</sub>, H<sub>B</sub>) et de porc (L<sub>P</sub>, M<sub>P</sub>, H<sub>P</sub>). L, M, H : protéines NF-L, NF-M, NF-H de boeuf témoins. S1 et S2 : protéines standards de masses moléculaires connues.



Figure 23 : Comparaison des diagrammes densitométriques des produits de coupure au BrCN des protéines de NF de boeuf et de porc.



.

porc.

Malgré ces résultats, nous ne pouvons écarter l'hypothèse d'une relative conservation des gènes codant pour ces protéisi l'on sait qu'une seule mutation ponctuelle - dans nes le cas présent, la mutation d'une Met par un autre acide aminé, Ile par exemple ou vice-versa - suffit pour obtenir des carpeptidiques complètement différentes, après coupure tes au bromure de cyanogène. Ce type de mutation se produit fréquemment chez des protéines par ailleurs fortement: conservées au cours de l'évolution. C'est le cas, par exemple, des myoglobines du coeur de mouton et de porc (HAN et al., 1972, ROUSSEAUX et al., 1976).

## 6.2. Comparaison immunochimique

Dans le but de compléter l'étude comparative des protéines de NF (NF-M et NF-H), nous avons utilisé des techniques immunochimiques à l'aide d'anticorps polyclonaux dirigés contre 2 produits de coupure au BrCN.

Avant d'exposer nos résultats, voici les conditions de préparation de ces antigènes (HAN <u>et al.</u>, 1986).

La technique de PAGE-SDS préparative permet l'isolement d'un antigène recherché en grande quantité. Par conséquent, elle offre un moyen à la fois simple et rapide (MENDEL-HARTVIG, 1982) de plus en plus utilisé de nos jours

-105-

pour la production des anticorps. Nous avons adopté cette méthodologie pour produire chez le lapin 2 immunsera dirigés contre 2 produits de coupure au BrCN :

- un immunserum anti-135 kDa (Ac 135K), dirigé contre le fragment C-terminal 135 kDa, obtenu après coupure de la sous-unité H des NF de boeuf.

- un immunserum anti-85 kDa (Ac 85K), dirigé contre le fragment C-terminal 85 kDa, obtenu après coupure de la sous-unité M des NF de boeuf.

Pour ce faire, après coloration et décoloration des gels préparatifs, la bande 85 kDa (ou 135 kDa) est excisée, électroéluée, dialysée ensuite abondamment contre une solution physiologique (NaCl 9 p. 1000) et enfin injectée par voies intradermiques à des lapins néo-zélandais blancs, selon le protocole de VAITUKAITIS <u>et al.</u>, 1971.

L'AC 135K et l'AC 85K ont d'abord été testés par immunorévélation des blots après PAGE-SDS sur les sous-unités L, M et H de boeuf et de porc avant coupure (Figure 24, parties B et C). Un anticorps réagissant avec le triplet de NF est utilisé en parallèle (partie A).

Sur la Figure 25 sont rassemblés les profils de reconnaissance des produits de coupure au BrCN des mêmes sous-unités par ces anticorps Ac 85K (partie A) et AC 135K (partie B).

Ces derniers ont servi par ailleurs à localiser les protéines de NF sur des coupes de cervelet de boeuf et sur le cortex humain, par immunohistochimie (MAHBOUB et al., 1986).

Précisons tout d'abord que la sous-unité L n'est reconnue ni par Ac 135K ni par Ac 85K, puisqu'elle ne possède pas les extensions C-terminales caractéristiques de M et H.

1- Ac 135K

Seules les sous-unités H de porc et de boeuf ainsi que leurs produits de coupure réagissent positivement avec Ac 135K, avec toutefois une immunorévélation plus nette chez le boeuf que chez le porc (Figure 25, partie B, couloir 6).

De plus, cet anticorps reconnait chez le boeuf (bien que faiblement) un peptide de 39 kDa alors que celui-ci n'est pas détectable par la coloration au bleu de Coomassie. Ce résultat pourrait s'expliquer par la faible coupure d'une liaison Met-Ser ou Met-Thr (SCHROEDER <u>et al.</u>, 1969 ; HAN <u>et</u> <u>al.</u>, 1983).

### 2- Ac 85K

Il présente une immunoréactivité qui apparait plus intense sur la sous-unité M chez le boeuf, avant et après coupure au BrCN. Le profil de reconnaissance par cet anticorps des produits de coupure des 2 sous-unités M et H de boeuf et de porc est présenté sur le Tableau IX.






-108-

FIG 25

## TABLEAU IX

Réaction des sous-unités protéiques des NF de boeuf (L<sub>b</sub>, M<sub>b</sub>, H<sub>b</sub>), de porc (L<sub>p</sub>, M<sub>p</sub>, H<sub>p</sub>) et de leurs produits de coupure au BrCN (M'<sub>b</sub>, H'<sub>b</sub>, M'<sub>p</sub>, H'<sub>p</sub>) avec les anticorps Ac-135K et Ac-85K.

	Нь	Hp	Mb	M <sub>P</sub>	Lь	lρ	н'n	Ηp	Mb	Mp
A.c 135 K	+ +	++	-		-	_	180 ++ 170 ++ 155++ 135++ 39 +/-	une trainée	-	-
Ac 85 K	+/-	-	++++	++	-	-	160 + 155 + 135 +/ 110 +/- 82 +/-	_	110 + 85 + + `55 + 35,5 ∳−	_

b : boeuf

p : porc

L'ensemble de ces résultats plaide en faveur d'une localisation du fragment 135 kDa dans la région C-terminale de NF-H, car ni NF-L, ni NF-M ne sont reconnues par Ac 135K. Rappelons que NF-L possède dans sa région N-terminale une séquence commune aux trois protéines des NF (Figure 14). Puisque Ac 135 reconnait les NF-H de porc et de boeuf, ces deux espèces possèderaient plusieurs épitopes communs dans leur région C-terminale.

Cependant, la comparaison des cartes peptidiques au BrCN des NF-H de boeuf et de porc révèle des profils électrophorétiques tout à fait différents, dans la mesure où le peptide 135 kDa de boeuf n'est pas retrouvé chez le porc. N'existerait-il pas des résidus méthionyl dans cette région C-terminale chez le porc, contrairement aux résultats rapportés par GEISLER et al., 1983 ?

Par ailleurs, l'absence de réactivité de la protéine NF-L du boeuf par Ac 85K confirme la localisation du fragment 85 la partie C-terminale de NF-M. Cet kDa dans anticorps reconnait effectivement la NF-H de boeuf par son fragment 135kDa, prouvant ainsi la présence de séquences épitopiques communes aux parties C-terminales des NF-H et NF-M de boeuf. L'étude comparative des deux espèces à l'aide de Ac 85K montre que les produits de coupure BrCN des protéines NF-M de boeuf et de porc sont différents, avec des peptides de faible masse moléculaire pour le porc. Par conséquent, puisque nous n'observons pas de fragment 85 kDa parmi les produits de coupure chez le porc, il est permis de supposer, là encore, l'existence de résidus méthionyl dans cette partie C-terminale.

L'Ac 85K reconnait faiblement un produit de coupure BrCN de la sous-unité M de boeuf, laissant supposer l'existence d'une liaison Met-Ser ou Met-Thr à l'intérieur de ce fragment 85 kDa, dont la coupure par le bromure de cyanogène est limitée ( voir chapitre 2.2.1. page 21 ; SCHROEDER <u>et al.</u>, 1969 ; HAN <u>et al.</u>, 1983).

En résumé, l'ensemble des résultats portant sur la comparaison immunochimique des cartes peptidiques au BrCN des NF de boeuf et de porc et sur les études immunohistochimiques (MAHBOUB <u>et al.</u>, 1986), nous permettent d'aboutir aux conclusions suivantes :

- les protéines NF-M de boeuf et de porc semblent diverger au niveau de leur domaine C-terminal,

- par contre, une certaine identité de structure s'observe entre les sous-unités M et H de boeuf, que l'on ne retrouve pas chez le porc

- l'Ac 85K et l'Ac 135K marquent spécifiquement les NF de la substance blanche et de la substance grise (MAHBOUB <u>et</u> <u>al.</u>, 1986). II. SURESTIMATION DE LA MASSE MOLECULAIRE APPARENTE DES PROTEINES APRES MODIFICATION CHIMIQUE SUR PAGE-SDS

# **Evidence for the Overestimation of Molecular Masses of Proteins after Chemical Modification and Chemical Crosslinks on Sodium Dodecyl Sulfate/Polyacrylamide Gel Electrophoresis** (SDS-PAGE)<sup>†</sup>

#### Claude Richard and Kia-Ki Han‡

L'Unité N° 16 de l'INSERM & Laboratoire de Biochimie Structurale, Faculté de Médecine, Place de Verdun, 59.045-Lille cedex, France

Hui-Ling Yang and De-Xu Zhu

Department of Biochemistry, University of Nanjing, Hankou Road 11, Nanjing, People's Republic of China

Malika Balduyck and Jacques Mizon

Laboratoire de Biochimie, Faculté de Pharmacie, Avenue du Prof. Laguesse, 59.045-Lille cedex, France

Human trypsin inhibitor (home prepared), lactalbumin, trypsinogen, carbonic anhydrase, and bovine serum albumin were submitted to succinylation and their molecular masses were determined by SDS-PAGE according to the method of Weber and Osborn (1969 J. Biol. Chem. 244, 4406) before and after chemical modification. High estimates of their molecular masses were obtained. The monomer and dimer of arrowhead inhibitor proteinase-B (Chinese vegetable legume) obtained after chemical crosslink(s) were also submitted to SDS-PAGE and their apparent molecular masses were also determined and compared to the native arrowhead inhibitor proteinase-B. Abnormally high estimates of their molecular masses were obtained. Our results agree with those in the literature.

#### **INTRODUCTION**

Electrophoresis in polyacrylamide gels is one of the most effective, flexible and sensitive methods for fractionating and characterizing complex mixtures of biopolymers. It has an almost unrivalled ability to resolve mixtures of proteins and polypeptides. SDS-PAGE is a powerful analytical tool for physicochemical studies, molecular mass determinations, examination of protein patterns and peptide mapping after both enzymatic partial cleavage (Cleveland *et al.*, 1977) or chemical cleavage(s) (Mahboub *et al.*, 1986; Han *et al.*, 1986). SDS-PAGE is routinely used because polyacrylamide gel is an excellent support medium for electrophoresis, is transparent, is free from charged or reactive groups, has good mechanical properties and is easily prepared. Polyacrylamide gels typically yield higher resolution than other

<sup>†</sup> This work is the partial fulfilment of the Exchange programs between French Medical Research Council (French INSERM) and Academia Sinica (University of Nanjing). Grants No. CS-RN-739, HN-CP-1.045, and CS-RN-842 during the years of 1984, 1986, 1987 and 1989 for the tenure of four 3 months trips to China by Dr Kia-Ki Han.

This work is the partial fulfilment of the short visit of Prof. De-Xu Zhu to Lille, France during the month of September 1988 via French Association Recherche sur le Cancer's Channel (ARC Grant No. 6.715 to Dr Kia-Ki Han).

‡ Author to whom correspondence should be addressed.

Abbreviations: AI-B, arrowhead inhibitor proteinase-B; DMA, dimethyladipimidate; DMS, dimethyl suberimidate; EGS, ethylene glycol bis succinimidyl succinate. SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis;  $M_r$ , molecular masses; kDa, kilodaltons.

support media. The versatility of SDS-PAGE is reflected in the large number of special techniques and the huge literature concerning individual applications.

Weber and Osborn (1969) reported the reliability of molecular mass  $(M_r)$  determination by SDS-PAGE. This method provides a simple, accurate and yet powerful technique for  $M_r$  characterization of proteins. The  $M_r$ of the polypeptide under investigation is determined by comparing its electrophoretic mobility with those of protein standards of known  $M_r$ . Under ideal conditions, in SDS-PAGE, the steric resistance to movement experienced by different molecules in a uniform gel approximates to a logarithmic function of their molecular size. Commercial electrophoresis calibration kits with both high  $M_r$  and low  $M_r$  are now available.

Recently Feeney (1987) and Han *et al.* (1987) have extensively reviewed the chemical modification(s) and Han *et al.* (1984) have reviewed the chemical cross-links of proteins. Yang *et al.* (1988) have recently observed abnormal and unexpected apparent high  $M_r$  of arrowhead inhibitor proteinase-B (AI-B) in SDS-PAGE after chemical crosslinks using bifunctional reagent(s).

Means and Feeney (1971) stated that succinylation changes the cationic amino groups of protein to electrically acidic side chains (e.g., anionic residues). The resulting change from positive charge to negative leads to greater changes in electrostatic relationships and frequently brings about the dissolution of aggregated or subunit proteins or major conformational changes. Succinylation and maleylation are preferable to acetylation for the modification of amino groups because, in most cases, products of the former are likely to be more soluble in the medium at pH 8-9.

#### MOLECULAR MASSES OF PROTEINS



Figure 2. SDS-PAGE pattern of standard marker proteins of high  $M_r$  (S2) (bovine serum albumin, phosphorylase-b, LDH, catalase) and of low  $M_r$  (S1) (lactalbumin, trypsinogen, carbonic anhydrase, egg white albumin, bovine serum albumin and phosphorylase-b). The SDS-PAGE pattern of low  $M_r$  marker proteins succinylated in their mixture (S1 Suc). SAB Suc, serum albumin bovine succinylated individually; CA Suc, carbonic anhydrase succinylated individually; Lac Suc, lactal-bumin succinylated individually.

crosslinking were obtained according to their  $R_{\rm f}$  in SDS-PAGE and compared with protein standards of known  $M_{\rm r}$  as shown in Figure 5.

The following standard proteins, lactalbumin, trypsinogen, carbonic anhydrase, bovine serum albumin, phosphorylase-b and egg albumin in the mixture, and lactalbumin, trypsinogen, carbonic anhydrase and bovine serum albumin individually, were submitted to





Figure 4. The SDS-PAGE pattern of native arrowhead inhibitor proteinase-B (AI-B), monomer of AI-B, dimer of AI-B obtained by chemical crosslinking by DMA, DMS and EGS. a, native AI-B; b, monomer of AI-B crosslinked by DMA; d, standard markers of proteins (from lactalbumin, trypsin inhibitor, carbonic anhydrase, ovalbumin, bovine serum albumin, phosphorylase-b); c and e, dimer of AI-B crosslinked by DMS and EGS; f and g, monomer of AI-B crosslinked by DMS and by EGS. Stained by Coomassie Blue.

succinylation. The succinyl-protein(s) were submitted to SDS-PAGE and their apparent  $M_r(s)$  were calculated.

Table 1 summarizes the apparent  $M_r$  before and after succinylation and the lysine contents of lactalbumin, trypsinogen, carbonic anhydrase and SAB.

Table 2 summarizes the  $M_r(s)$  of AI-B cross-linked by DMA, DMS and by EGS.

The use of labelled succinic anhydride is frequently recommended since detection of succinyl-protein(s) by Coomassie Blue was inefficient because the sensitivity was drastically decreased. Even by using the silver staining technique, irregular and non-reproducible results occur on the quantitation of their sensitivity on SDS-PAGE staining of the succinyl-protein(s). Therefore



Figure 3. Determination of the apparent M, of standard marker protein before and after succinylation obtained according to their  $R_{\rm f}$  in the SDS-PAGE pattern. Lactalbumin, trypsinogen, carbonic anhydrase, bovine serum albumin were succinylated individually and the  $M_{\rm r}$  line was established by measuring the  $R_{\rm f}$  of classical marker proteins (from lactalbumin, trypsinogen, carbonic anhydrase, egg white albumin, bovine serum albumin and phosphorylase-b.)

**Figure 5.** Determination of the apparent *M*, of AI-B before and after chemical cross linking performed according to their *R*, in SDS-PAGE and compared with those of protein standard markers of known *M*, (lactalbumin, trypsin inhibitor-soybean, carbonic anhydrase, ovalbumin, bovine serum albumin and phosphorylase-b). a, Native AI-B; b, monomer of AI-B crosslinked by DMA; c and e, dimer of AI-B crosslinked by DMS and EGS. f and g, monomer of AI-B crosslinked by DMS and by EGS; d, standard marker proteins.

#### 115

#### MOLECULAR MASSES OF PROTEINS

- Mahboub, S., Richard, C., Delacourte, A. and Han, K. K. (1986). Anal. Biochem. 154, 171.
- Means, G. E., and Feeney, R. E. (1971). Chem. Mod. of Proteins, Editor Holden-Day, San Francisco.
- Ochs, D., McConkey, E. H. and Sammon, D. W. (1981) Electrophoresis 2, 304.
- Sammons, D. A., Adams, L. D. and Nishizawa, E. E. (1981). *Electrophoresis* 2, 135.
- Steele, J. C. H. Jr. and Nielsen, T. B. (1978). Anal. Biochem. 84, 218.
- Tung, J. S. and Knight, C. A. (1971). Biochem. Biophys. Res. Commun. 42, 1117.
- Weber, K. and Osborn, M., (1969). J. Biol. Chem. 244, 4406.
- Williams, J. G. and Gratzer, W. B. (1971). J. Chromatogr. 57, 121.
- Yang, H. L., Qin, X. F, Xu, L. X., Zhu, D. X., Boersma, A., and Han, K. K. (1988). Comparative Biochem. Physiol. 91B, 497–502.

Received 8 November 1988; accepted 21 November 1988.

## CONCLUSION

Le recours à la biologie moléculaire était nécessaire pour déterminer la structure primaire complète des 3 protéines de neurofilament chez la souris, le rat et l'homme, par déduction à partir des séquences nucléotidiques des ADN complémentaires (ADNc) codant pour ces protéines. Quant aux structures primaires complètes des protéines de NF de boeuf et de porc, elles ne sont pas encore élucidées jusqu'à présent, exceptée la NF-L du porc.

Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéréssés à la structure des sous-unités L, M et H des NF de boeuf et de porc, plus particulièrement aux extensions C-terminales de M et H, dans le but de détecter d'éventuelles homologies de séquence entre ces protéines.

Notre méthodologie d'étude a été la suivante :

- obtenir d'abord des cartes peptidiques sur gel de polyacrylamide en milieu SDS des trois protéines après coupure par différents agents chimiques (bromure de cyanogène, BNPS-skatole, NTCB) et les comparer les unes aux autres,

- caractériser ensuite ces fragments de coupure par des sondes immunologiques dirigées contre certaines régions de ces protéines.

L'ensemble des résultats découlant de ces analyses nous ont conduit aux conclusions suivantes :

- les domaines C-terminaux des protéines NF-M et NF-H du porc contiendraient au moins un résidu de méthionine - l'existence d'un résidu de méthionine en position 75 kDa est localisé dans les protéines NF-M et NF-H de boeuf

- les protéines NF-M de boeuf et de porc semblent diverger au niveau de leur domaine C-terminal

- par contre, une certaine identité de structure s'observe entre les protéines NF-M et NF-H de boeuf, que l'on ne retrouve pas chez le porc.

Rappelons que ces conclusions sont basées uniquement sur la coupure chimique par le bromure de cyanogène.

Les régions C-terminales de NF-M et NF-H sont fortement phosphorylées, provoquant une migration anormale de ces 2 protéines sur PAGE-SDS. Nous avons observé, pour notre part, une surestimation de la masse moléculaire apparente des protéines sur PAGE-SDS après succinylation ou après pontage par des réactifs bifonctionnels. L'introduction de groupes chargés négativement et le blocage de charges positives par modification chimique augmentent la masse moléculaire apparente de 25 à 62 %

# MATERIEL ET METHODES

ŗ

1.	Préparation des Neurofilaments (NF)124
2.	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu
	dénaturant (PAGE-SDS) (LAEMMLI,1970)124
3.	Diagrammes densitométriques des gels128
4.	Calcul des taux de clivage128
5.	Détermination de la composition
	en acides aminés129
б.	Coupure des liaisons méthionyl par le bromure de
	cyanogène, d'après LONSDALE-ECCLES et al., 1981129
7.	Coupure des liaisons tryptophyl par le BNPS-skatole,
	d'après HUNZIKER et al., 1980130
8.	Coupure des liaisons cystéine par le NTCB, d'après
	DEGANI et PATCHORNIK, 1974131
9.	Transfert des protéines du gel de polyacrylamide
	analytique sur feuille de nitrocellulose
	("Western Blot") (TOWBIN et al., 1979)
10.	Immunorévélation des "Western Blot"133
11.	Succinylation des protéines, d'après HABEEB
	et al., 1958

#### 1. Préparation des Neurofilaments (NF)

Les NF sont préparés à partir de moelle épinière fraîche de boeuf ou de porc, suivant une modification de la technique mise au point par DELACOURTE *et al.* (1980).

- 300 g de moelle épinière sont homogénéisés à +4°C dans 500 ml de tampon MES 0,1 M pH 6,5, EGTA 1 mM, MgCl<sub>2</sub>, si× fois 15 secondes : 3 fois à petite vitesse puis 3 fois à grande vitesse, avec des intervalles d'arrêt de 15 secondes.

- l'homogénat est centrifugé à 66000 g (rotor 70Ti,
 Beckman) pendant 30 min à +4°C.

- le surnageant est prélevé puis additionné de tampon MES contenant 20 % de glycérol.

- le mélange est incubé 15 min à 37°C et centrifugé 1 h à 222 000 g à 27°C.

les culots de centrifugation contenant les NF bruts
 sont homogénéisés dans du tampon réducteur de LAEMMLI et ana lysés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide.

# 2. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu dénaturant (PAGE-SDS) (LAEMMLI, 1970)

Cuve à électrophorèse verticale : Protean Double Slab Electrophoresis Bio Rad (réf. 716 514 20).

#### 2.1. Solutions

-124-

-125-

Solution A à 5 % d'acrylamide

Acrylamide	50,00 g
Bis acrylamide	1,33 g
Tris	45,30 g
SDS	1,00 g
TEMED	0,3 ml
HC1 5,6 N	qsp pH 8,8
Eau ultra pure	qsp 1,0 1

# Solution B à 20 % d'acrylamide

Acrylamide	200,00 g
Bis acrylamide	5,32 g
Tris	45,30 g
SDS	1,00 g
TEMED	0,3 ml
HC1 5,6 N	qsp pH 8,8
Eau ultra pure	qsp 1,00 l

## Solution C de concentration

Acrylamide	30,00 g
Bis acrylamide	0,80 g
Tris	15,10 g
SDS	1,00 g
TEMED	0,5 ml
HCl 5,6 N	qsp pH 6,8
Eau ultra pure	qsp 1,00 l

Solution aqueuse de persulfate d'ammonium à 10 % (p/v)

## (à préparer extemporanément)

Tampon d'électrophorèse (4 fois concentré, à diluer au 1/4e

avant emploi)

Tris	12,0 g
Glycocolle	57,2 g
SDS	4,0 g
HCl 5,6 N	qsp pH 8,3
Eau ultra pure	qsp 1,00 1

Tampon de dénaturation des protéines

Tris-HCl	62,5 mM p	н 6,8
EDTA	3 mM	
EGTA	3 mM	
SDS	5 % (p/v	)
$\beta$ -mercaptoéthanol	5 % (	v/v)
glycérol	10 % (	v/v)

## Standards protéiques (Kit Bio Rad)

-1	<u>Standards de haute masse moléculaire :</u>		
	Myosine	200,000	kDa
	β-galactosidase (E. coli) 116,250	kDa	
	Phosphorylase b (muscle du lapin)	97,400	kDa
	Albumine sérique (boeuf)	66,200	kDa
	Ovalbumine (poule)	42,699	kDa

-127-

-<u>Standards de basse masse moléculaire :</u>

Phosphorylase b (muscle du lapin)	97,400	kDa
Albumine sérique (boeuf)	66,200	kDa
Ovalbumine (poule)	42,699	kDa
Anhydrase carbonique (boeuf)	31,000	kDa
Inhibiteur trypsique (soja)	21,500	kDa
Lysozyme (blanc d'oeuf de poule)	14,400	kDa

Solution de coloration des gels

Bleu Brillant de Coomassie R250		1,00 g
Acide trichloracétique 50 % $(p/v)$		0,25 1
Méthanol		0,25 1
Eau ultra pure	qsp	1,00 1

## Solution de décoloration des gels

Acide acétique	0,16	1
Méthanol	0,50	l
Eau ultra pure	1,30	1

2.2. Mode opératoire

## Electrophorèse analytique

Celle-ci est réalisée sur un gradient de concentration en acrylamide de 5 à 20 % préconisé par THORPE et al.(1979).

## Electrophorèse préparative

Le protocole utilisé reste identique, exceptée l'épaisseur des gels (3,0 mm au lieu de 1,5 mm). 2 à 5 mg de NF dénaturés 3 min à 100 °C sont séparés pendant une nuit sous un courant de 20 mA. Les bandes de gel colorées correspondant aux 3 protéines des NF sont découpées séparément et stockées à -20°C jusqu'au moment de leur utilisation pour les coupures chimiques. L'homogénéité de chaque bande est contrôlée sur PAGE-SDS analytique.

## 3. Diagrammes densitométriques des gels

La lecture densitométrique des couloirs électrophorétiques des gels colorés au CBB-R250 est effectuée à 540 nm sur un photomètre intégrateur enregistreur Vernon modèle PHI-6.

## 4. Calcul des taux de clivage

L'estimation du taux de coupure chimique des 3 protéines des NF s'obtient à partir de la lecture densitométrique des PAGE-SDS analytiques. La surface de chaque pic est découpée et pesée. Ce calcul est approximatif mais il donne néanmoins une idée sur le rendement de la coupure chimique.

## 5. Détermination de la composition en acides aminés

Après un PAGE-SDS préparatif des protéines de NF, la bande de gel correspondant à l'une ou l'autre des protéines est découpée en petits cubes ( environ 100 cubes par protéine et par gel). 2 à 4 morceaux de gels (2 à 4 nmol de protéine) sont homogénéisés dans un potter Elvehjem contenant 2 ml de tampon phosphate 0,05 M , pH 7,5-8,0 et centrifugés. Le surnageant obtenu est ensuite dilué à 5 ml avec de l'eau distillée.

A 1 ml de cette solution sont ajoutés 1 ml d'acide chlorhydrique 11,6 N et 20µl d'une solution aqueuse de phénol à 5 % L'hydrolyse de la protéine s'effectue à 105°C pendant 24 h dans un tube scellé sous vide.

La composition en acides aminés est déterminée sur l'hydrolysat lyophilisé à l'aide d'un Analyseur Multichrome Beckman.

La composition en tryptophane est obtenue après hydrolyse de la protéine en présence d'acide mercaptoéthane sulfonique (PENKE et al., 1974).

# 6. Coupure des liaisons methionyl par le bromure de cyanogène, d'après LONSDALE-ECCLES et al., 1981.

Immédiatement avant traitement par le BrCN, les bandes de gels de polyacrylamide correspondant à chacune des 3 protéi-

-129-

nes des NF sont équilibrées pendant 10 min dans 5 ml d'une solution aqueuse d'acide formique à 70 % (v/v). Chaque bande de gel est ensuite découpée en petits cubes que l'on place dans des tubes où l'on rajoute 8 ml d'une solution d'acide formique à 70 % contenant 20 mg de BrCN. Les contrôles sont effectués parallèlement dans l'acide formique mais sans BrCN. Après 24 h d'incubation à température ambiante à l'obscurité sous atmosphère d'azote, les milieux réactionnels sont dialysés à +4°C successivement contre :

- une solution d'acide acétique à 10 % (4 fois 100 ml)

- du tampon d'électrophorèse 4 fois concentré

du tampon d'électrophorèse contenant 2 % de
 2-mercaptoéthanol et 20 % de glycérol.

Les solutions contenant les fragments polypeptidiques ou leurs contrôles sont ensuite concentrées en plaçant les boudins de dialyse à +4°C pendant 72 h sur une feuille de papier Whatman N°3 saupoudrée de Sephadex G200 ou de polyéthylène glycol.

 Coupure des liaisons Tryptophyl par le BNPS-skatole, d'après HUNZIKER et al., 1980.

La bande de gel préparatif contenant une des 3 protéines des NF est équilibrée dans une solution aqueuse d'acide acétique à 70% (v/v) contenant 0,1% de phénol. Le gel est prélevé, coupé en dés que l'on transfère et que l'on broye dans un potter à l'aide de 10 ml de la solution précédente (par bande de gel).

La coupure au BNPS-skatole s'effectue dans un Erlenmeyer à col rodé et à double paroi pendant 48 heures à température ambiante à l'obscurité en présence de 10 équivalents (10 mg) de réactif par bande de gel .

Après addition de  $\beta$ -mercaptoéthanol (20 µl/gel) et incubation 5 heures à 37°C, la solution protéique est placée dans un boudin et dialysée contre du tampon d'électrophorèse (Tris/Gly/SDS) 4 fois concentré contenant 20% de glycérol (changer plusieurs fois de tampon) puis contre du tampon d'électrophorèse (Tris/Gly/SDS) contenant 20% de glycérol, 2% de 2-mercaptoéthanol.

La solution protéique est ensuite concentrée en laissant le boudin en contact avec du Sephadex G200 sur un papier filtre pendant un week-end.

# Coupure des liaisons cystéine par le NTCB, d'après DEGANI et PATCHORNIK, 1974.

Les bandes de gels de polyacrylamide correspondant à chacune des 3 protéines des NF sont équilibrées pendant 4 h dans 10 ml de tampon Tris-HCl 0,1 M, pH 8,2, KCl 0,5 M, urée 6 M, EDTA 3mM. Les morceaux de gel sont séchés dans un dessicateur puis réhydratés dans une solution fraîche du même tampon auquel a été rajouté le NTCB, à raison de 10 mg de réactif par bande de gel (excès 10 fois). Le pH est immédiatement réajusté à 8,2 et le milieu réactionnel laissé à 37°C pendant 40 h sous atmosphère d'azote et sous agitation. La réaction est stoppée en diminuant le pH à 4,0 avec de l'acide acétique.

9. Transfert des protéines du gel de polyacrylamide analytique sur feuille de nitrocellulose ("Western Blot") (TOWBIN et al., 1979)

#### <u>Matériel</u>

Appareil LKB 2005 Transphor Electroblotting Unit (Broma, Sweden)

Nitrocellulose Schleicher & Schull, réf. BA 85  $(0, 45 \mu)$ 

## Tampon de transfert

Tris-HCl	25	mΜ,	рН	8,3
Glycocoll	le		150	) mM
Méthanol			20	8

### Mode opératoire

Le gel de polyacrylamide est placé en contact avec la feuille de nitrocellulose préalablement équilibrée dans le tampon. Le transfert s'effectue pendant 5 h à 60 V, en évitant l'échauffement de la cuve à l'aide d'une circulation d'eau courante. Après électrotransfert, les protéines sont colorées pendant 5 min par une solution aqueuse de Rouge Ponceau à 0,2 % contenant 3 % d'acide trichloracétique. Après plusieurs lavages de la feuille de nitrocellulose à l'eau distillée, celle-ci est, soit séchée puis stockée à température ambiante, soit utilisée immédiatement pour l'immunorévélation.

10. Immunorévélation des "Western Blot"

## <u>Réactifs et tampons</u>

-	TBS	:	Tris-HCl	10	mM,	рН	7,4
			NaCl	150	mM		

-	TNT	:	(à préparer extempor	extemporanément)		
			Tween 20	1 g		
			TBS	qsp 1 l		

- Révélateur :	(à préparer extemporanémer	nt)	
	4-chloro-1-naphtol (Sigma	C8890) 50	mg
	à dissoudre dans 17 ml de	méthanol	
	TBS	<b>qsp 100</b>	ml
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %, v/v)	60	μl

11. Succinylation des protéines (HABEEB et al., 1958)

O,1 à 3 mg de protéine purifiée sont dissous dans 1 ml de tampon phosphate pH 9,5 ; 1 à 4 mg d'anhydride succinique <sup>14</sup>C cristallisé (soit 50  $\mu$ Ci, 1,85 Mbq) sont ajoutés à la solution en agitation toutes les 10 min pendant 70 min. Il est conseillé de dissoudre préalablement le réactif marqué dans une solution de dioxane. Le milieu réactionnel est maintenu à pH 8,0-9,5 avec de la soude 0,1 N. Après avoir laissé la réaction se poursuivre pendant 16 h à 20°C sous agitation, on la stoppe par dilution avec de l'eau distillée (qsp 50 ml) puis lyophilisation.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

.

AEBI V., COHN J., BUHLE C.J. & GERACE L. (1986) The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments. Nature 323 : 560-564 ALBERS K. & FUCHS E. (1987) expression of mutant epidermal keratin cDNAs The transfected in simple epithelial and squamous cell carcinoma lines. J. Cell Biol. 105 : 791-806 ALETTA J.M., SHELANSKI M.L. & GREENE L.A. (1989) Phosphorylation of the peripherin 58-kDa neuronal intermediate filament protein. J. Biol. Chem. 264 : 4619-4627 ALLEN G. (1981) Sequencing of proteins and peptides. Ed. by WORK T.S. & BURDON R.H. Elsevier, Amsterdam. AMBLER R.P. (1965) The behaviour of peptides formed by cyanogen bromide cleavage of proteins. Biochem. J. 96 : 32P ANDERTON B.H., AYERS M. & THORPE R. (1978) Neurofilaments from mammalian central and peripheral nerve share certain polypeptides. FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett 96 : 159-163 ANDERTON B.H. (1979) The polypeptides of isolated brain 10 nm filaments and their association with polymerized tubulin. J. Biochem. 181 : 275-284 ANDERTON B.H., THORPE R., COHEN J., SILVENDRAN S. & WOODHAMS P. (1980) Specific neuronal localization by immunofluorescence of 10 nm filament polypeptides. J. Neurocytol. 9 : 835-844 ANDERTON B.H., BREINBURG D., DOWNES M.J., GREEN P.J., TOMLINSON B.E., ULRICH J., WOOD J.N. & KAHN J. (1982) Monoclonal antibodies show that neurofibrillary tangles and neurofilaments share antigenic determinants. Nature 298 : 84-86

ANGELIDES K.J., SMITH K.E. & TAKEDA M. (1989) Assembly and exchange of intermediate filament proteins of neurons : neurofilaments are dynamic structures. J. Cell Biol. 108 : 1495-1506

-136-

ASSELINEAU D., BERNHARD B., BAILLY C. & DARMON M. (1985) Epidermal morphogenesis and induction of the 67 kd polypeptide by culture of human keratinocytes at the liquid-air interface. Exp. Cell Res. 159 : 536-539 BADER B.L., MAGIN T.M., HATZFELD M. & FRANKE W. W. (1986) Amino acid sequence and gene organization of cytokeratin nº 19, an exceptional tail-less intermediate filament protein. EMBO ( Eur. Mol. Biol. Organ.) J. 5 : 1865-1875 BALCAREK J.M. & COWAN N.J. (1985) Structure of the mouse glial fibrillary acidic protein gene : implications for the evolution of the intermediate filament multigene family. Nucleic Acids Res. 13 : 5527-5543 BARSH G.S. & BYERS P.H. (1981) Reduced secretion of structurally abnormal type procollagen in a form of osteogenesis imperfecta. Ι Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 : 5142-5146 BARTNIK E., OSBORN M. & WEBER K. (1986) Intermediate filaments in muscle and epithelial cells of nematodes. J. Cell Biol. 102 : 2033-2041 BEN-ZE'EV A. (1986) The relationship between cytoplasmic organization, gene expression and morphogenesis. Trends Biochem. Sci. 11: 478-781 BERKOWITZ S.A., KATAGIRI J., BINDER H.K. & WILLIAMS R.C. (1977) Separation and characterization of microtubule proteins from calf brain. Biochemistry 16 : 5610-5617 BLESSING M., ZENTGRAF M. & JORCANO J.L. (1987) Differentially expressed bovine cytokeratin genes. Analysis of gene linkage and evolutionary conservation of 5'-upstream sequences. EMBO J. 6 : 567-575 BLOEMENDAL H. & PIEPER F.R.(1989) Intermediate Filaments : known structure, unknown function. Biochim. Biophys. Acta 1007 : 245-253

-137-

BLUMENBERG M. (1989) cité par BLOEMENDAL H. & PIEPER F.R. (1989) BLUMENTHAL K.M. & KEM W.R. (1983) Primary structure of Stoïchactis helianthus cytolysin III. J. Biol. Chem. 258 : 5574-5581 BONNER W.M. & LASKEY R.A. (1974) A film detection method for tritium labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. Eur. J. Biochem. 46 : 83-88 BORDIER C. & CRETTOL-JÄRVINEN A. (1979) Peptide mapping of heterogeneous protein samples. J. Biol. Chem. 254 : 2565-2567 BORNSTEIN P. (1969) The nature of hydroxylamine sensitive bond in collagen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 36: 957-964 BORNSTEIN P. (1970) Structure of  $\alpha_1$ -chain-CB-8, a large cyanogen bromide produced fragment from  $\alpha_1$ -chain of rat collagen. The nature of hydroxylamine sensitive bond and composition of tryptic peptides. Biochemistry 9: 2408-2421 BORNSTEIN P. & BALIAN G. (1977) Cleavage at Asn-Gly bonds with hydroxylamine. Meth. Enzymol. 47 : 132-145 BRADY.T. & LASEK R.J. (1982) The slow components of axonal transport : movements, composition and organization. In "Axoplasmic Transport" D. Weiss, Ed. Springer-Verlag. Berlin 207-217 BREEN K.C., ROBINSON P.A., WION D. & ANDERTON B.H. (1988)Partial sequence of the rat heavy neurofilament polypeptide (NF-H). Identification of putative phosphorylation sites. FEBS Lett. 244 : 213-218 BURK B. & GERACE L. (1986) A cell free system to study reassembly of the nuclear envelope at the end of mitosis. Cell 44 : 639-652

-138-

BUTLER W.T. (1969) Identity of a hydroxylamine sensitive bond in  $\alpha_1$ -chain of skin collagen. J. Biol. Chem. 244 : 3415-3417

CAPETANAKI Y.G., NGAI J., FLYTZANIS C.N. & LAZARIDES E. (1983) Tissue-specific expression of two mRNA species transcribed from a single vimentin gene. Cell 35 : 411-420

CAPETANAKI Y.G., NGAI J. & LAZARIDES E. (1984) Characterization and regulation in the expression of a gene coding for the intermediate filament protein desmin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 6909-6913

CARDEN M.J., SCHLAEPFER W.W. & LEE M.Y. (1985) The structure, biochemical properties and immunogenicity of neurofilament peripheral regions are determined by phosphorylation state. J. Biol. Chem. 260 : 9805-9817

CARREY E. & HARDIE D.G. (1986) Mapping of radiolabeled peptides derived from proteolysis of polypeptides bound to nitrocellulose after "Western" blotting. Anal. Biochem. 158 : 431-435

CELIS J.E., MOSE-LARSEN P., FEY S.J. & CELIS A. (1983) Phosphorylation of keratin and vimentin polypeptides in normal and transformed mitotic human epithelial ammion cells : behavior of keratin and vimentin filaments during mitosis. J. Cell Biol. 97 : 1425-1434

CHANG X.J. & PIPERNO G. (1987) Cross-reactivity of antibodies specific for flagellar tektin and intermediate filament subunits. J. Cell Biol. 104 : 1563-1568

CHUBA P.J. & PALCHAUDHURI S. (1986) Requirement for cysteine in the color silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 156 : 136-139

CLEVELAND D.W., FISCHER S.G., KIRSCHNER M.W. & LAEMMLI U.K. (1977) Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 252 : 1102-1106 CONNELL N.D. & RHEINWALD J.G. (1983) Regulation of the cytoskeleton in mesothelial cells : reversible loss of keratin and increase in vimentin during rapid growth in culture. Cell 34 : 245-253 CONWAY J.F. & PARRY D.A.D. (1988) cité par STEINERT et ROOP (1988) CREWTHER W.G., GOUGH K.H., INGLIS A.S. & Mc KEON N.M. (1978)Text. Res. J. 48 : 160-173 CUNNIGHAM B.A., GOTTLIEB P.D., KONIGSBERG W.H. & EDELMAN G.M. (1968) The covalent structure of a human IG-immunoglobulin. V. Partial amino acid sequence of the light chain. Biochemistry 7 : 1983-1995 DAHL D. & BIGNAMI A. (1986) Neurofilament phosphorylation in developement. A sign of axonal maturation ? Exp. Cell Res. 162 : 220-230 DAUTIGNY A., PHAM-DINH D., ROUSSEL C., FELIX J.M., NUSSBAUM J.L. & JOLLES P. (1988) The large neurofilament subunit (NF-H) of the rat : cDNA cloning and in situ detection. Biochem. Biophys. Res. Commun. 154 : 1099-1106 DAWSON P.J., HULENE J.S. & LLOYD C.W. (1985) Monoclonal antibody to intermediate filament antigene cross-reacts with higher plant cells. J. Cell Biol. 100 : 1793-1798 DELACOURTE A., FILLIATREAU G., BOUTTEAU F. & BISERTE G. (1980)Study of the 10 nm filament fraction isolated during the standart microtubule preparation. Biochem J. 191 : 543-546 DEBUIRE B., HAN K.K., DAUTREVAUX M. & BISERTE G. (1977) Amino acid sequence of CNBr fragment containing the 2 tryptophanyl residues of Lobster arginine kinase. J. Biochem. 81 : 611-619 DEGANI Y. & PATCHORNIK A. (1974) Cyanylation of SH-groups by nitrothiocyanobenzoïc acid : high yield modification and cleavage of peptides at cysteine residues. Biochemistry 13 : 1-11

DELACOURTE A., FILLIATREAU G., BOUTTEAU F. & BISERTE G. (1980) Study of the 10 nm filament fraction isolated during the standart microtubule preparation. Biochem. J. 191 : 543-546

DETKE S. & KELLER J.M. (1982) Comparison of the proteins in HeLa cell interphase nucleoskeletons and metaphase chromosome scaffolds. J. Biol. Chem. 257 : 3905-3911

DOMENJOUD L., JORCANO J.L., BREUER B. & ALONSO A. (1988) Synthesis and fate of keratins 8 and 18 in nonepithelial cells transfected with cDNA. Exp. Cell Res. 179 : 352-361

DOOLITTLE F.R., GOLDBAUM D.M. & DOOLITTLE L.R. (1978) Designation of sequences involved in the "coiled-coil" interdomainal connections in fibrinogen : construction of an atomic scale model. J. Mol. Biol. 120 : 311-325

DORAN T.I., VIDRICH A. & SUN T.T. (1980) Intrinsic and extrinsic regulation of the differentiation of skin, corneal and esophageal epithelial cells. Cell 22 : 17-25

ECKERT R.L. & GREEN H. (1984) Cloning of cDNA specifying vitamin A-responsive human keratins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 4321-4325

EDMAN P. (1950) Stepwise degradation of peptides. Acta Chem. Scand. 4 : 283-293

EVANS R.M. & FINK L.M. (1982) An alteration in the phosphorylation of vimentin - type intermediate filaments is associated with mitosis in cultured mammalian cells. Cell 29 : 436-452

EVANS R.M. (1988a) The intermediate - filament proteins vimentin and desmin are phosphorylated in specific domains. Eur. J. Cell Biol. 46 : 152-160 EVANS R.M. (1988b) Cyclic AMP-dependent protein kinase-induced vimentin filament disassembly involves modification of the N-terminal domain of intermediate filaments subunits. FEBS Lett. 234 : 73-78

EYLAR E.H., JACKSON J.J., BENNETT C.D., KNISKERN P.J. & BROSTOFF S.W. (1974) The chicken Al protein. J. Biol. Chem. 249 : 3710-3716

FAIRBANKS G., LEVINTHAL C. & REEDER R.H. (1965) Analysis of <sup>14</sup>C-labelled proteins by disc electrophoresis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 20: 393-399

FERRARI S., BATTINI R., KACZMAREK L., RITTLING S. & CALABRETTA B., KIM DE RIEL J., PHILIPONIS V., WEI J.F. & BASERGA (1986) Coding sequence and growth regulation of human vimentin gene. Mol. Cell. Biol. 6 : 3614-3620

FEY S.J., MOSE-LARSEN P. & CELIS J.E. (1985) Evidence for coordinated phosphorylation of keratins and vimentin during mitosis in transformed human amnion cells. FEBS Lett. 157 : 165-169

FISHER D.Z., CHAUDHARY N. & BLOBEL G. (1986) cDNA sequencing of nuclear lamins A and C reveals primary and secondary structural homology to intermediate filament proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 6450-6454

FONTANA A. (1972) Modification of tryptophanyl residues with BNPS-skatole. Meth. Enzymol. 25: 419-423

FONTANA A., VITA C. & TONIOLO C. (1973) Selective cleavage of the single tryptophanyl bond in the horse heart cytochrome c. FEBS Lett. 32 : 139-142

FRANKE W.W. (1987) Nuclear lamins and cytoplasmic intermediate filament proteins : a growing multigene family. Cell 48 : 3-4

Integration of different keratins into the same filament system after microinjection of mRNA for epidermal keratins into kidney epithelial cells. Cell 36 : 813-825 FRASER D.D.B., STEINERT P.M. & STEVEN A.C. (1987) Focus on intermediate filaments. Trends Biochem. Sci. 12: 43-45 FUCHS E. & GREEN H. (1980) Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. Cell 19 : 1033-1042 FUCHS E. & GREEN H. (1981) Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin A. Cell 25 : 617-625 GAJDUSEK D.C. (1985) Sounding board . Hypotheses : interference with axonal transport of neurofilament as a common pathogene mechanism in certain disease of the central nervous svstem. New Engl. J. Med. 312 : 714-719 GARDNER E.E., DAHL D. & BIGNAMI A. (1984) Formation of 10 nanometer filaments from the 150 k-dalton neurofilament protein in vitro.
J. Neurosci. Res. 11 : 145-155 GEISLER N. & WEBER K. (1981) Comparison of the proteins of two immunologically disintermediate-sized filaments by tinct amino acid sequence analysis : desmin and vimentin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 : 4120-4123 GEISLER N. & WEBER K. (1982) The amino acid sequence of chicken muscle desmin provides a common structural model for intermediate filament proteins. EMBO J. 1 : 1649-1656 GEISLER N., KAUFMANN E. & WEBER K. (1982a) Protein chemical characterization of three structurally

Protein chemical characterization of three structurally distinct domains along the protofilament unit of desmin 10 nm filaments. Cell 30 : 277-286

JORCANO J.L. (1984)

FRANKE W.W., SCHMID E., MITTNACHT S., GRUND C. &

GEISLER N., PLESSMAN U. & WEBER K. (1982b) Related amino acid sequences in neurofilaments and non-neuronal intermediate filaments. Nature 296 : 448-450

GEISLER N., KAUFMANN E., FISCHER S., PLESSMAN U. & WEBER K. (1983) Neurofilament architecture combines structural principles of intermediate filaments with carboxy-terminal extensions increasing in size between triplet proteins. EMBO J. 2 : 1295-1302

GEISLER N., FISCHER S., VANDEKERCKHOVE J., PLESSMAN U. & WEBER K. (1984a) Hybrid character of a large neurofilamentprotein (NF-M): intermediate filament type sequence followed by a long and acidic carboxy-terminal extension. EMBO J. 3 : 2701-2706

GEISLER N., FISCHER S., VANDEKERCKHOVE J., PLESSMAN U. & WEBER K. (1984b) Protein-chemical characterization of NF-H, the largest mammalian neurofilament component ; intermediate filament-type sequences followed by a unique carboxy-terminal extension. EMBO J. 4 : 57-63

GEISLER N., PLESSMAN U. & WEBER K. (1985) The complete amino acid sequence of the major mammalian neurofilament protein (NF-L). FEBS Lett. 182 : 475-478

GEISLER N., VANDEKERCKHOVE J. & WEBER K. (1987) Location and sequence characterization of the major phosphorylation sites of the high molecular mass neurofilament proteins M and H. FEBS lett., 221 : 403-407

GEORGATOS S.D., WEAVER D.C. & MARCHESI V.T. (1985) Site specificity in vimentin - membrane interactions : intermediate filament subunits associate with the plasma membrane via their head domains. J. Cell Biol. 100 : 1962-1968

GEORGATOS S.D. & BLOBEL G. (1987) Two distinct attachment sites for vimentin along the plasma membrane and the nuclear envelope in avian erythrocytes : a basis for a vectorial assembly of intermediate filaments. J. Cell Biol. 105 : 105-115

GEORGATOS S.D., WEBER K., GEISLER N., et BLOBEL G. (1987)Binding of two desmin derivatives to the plasma membranes and the nuclear envelope of avian erythrocytes : evidence for a conserved site - specificity intermediate filament - membrane interactions. Proc. Natl. Acad Sci. USA 84 : 6780-6784 **GERACE L. (1986)** Nuclear lamina and organization of nuclear architecture. Trends Biochem. Sci. 11: 443-446 GILFIX B.M. & ECKERT R.L. (1985) Coordinate control by vitamin A of keratin gene expression in human keratinocytes. J. Biol. Chem. 260 : 14026-14029 GOLDMAN A.E., MAUL G., STEINERT P.M., YANG H.Y. & GOLDMAN R.D. (1986) Keratin-like prote protein that coisolate with intermediate filaments of BHK-21 cells are nuclear lamins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 3839-3843 GREGORY H., HARDY P.M., JONES D.S., KENNER G.W. SHEPPARD R.C. (1964) & The antral hormone gastrin. Structure of gastrin. Nature 204 : 931-933 GROSS E. & WITKOP B. (1961) cleavage of methionyl Selective peptide bonds in ribonuclease with cyanogen bromide. J. Am. Chem. Soc. 83 : 1510-1511 GROSS E. & WITKOP B.J. (1962) Non enzymatic cleavage of peptides bonds : the methionine residues in bovine pancreatic ribonuclease. J. Biol. Chem. 237 : 1856-1860 HABEEB A.F.S.A., CASSIDY H.G. & SINGER S.J. (1958) Molecular structural effects produced in proteins by reaction with succinic anhydride. Biochim. Biophys. Acta 29 : 587-593 HAN K.K., TETAERT D., MOSCHETTO Y. & DAUTREVAUX M. (1972)The covalent structure of sheep heart myoglobin. Eur. J. Biochem. 27 : 585-593 HAN K.K., RICHARD C. & BISERTE G. (1983) Current developments in chemical cleavage of proteins. Int. J. Biochem. 15 : 875-884

-145-

HAN K.K., RICHARD C., ZHANG G-Y. & DELACOURTE A. (1986) Sequence homology analysis of proteins by chemical cleavages using a mono and two dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Int. J. Biochem. 18: 1073-1082

HATZFELDS M. et FRANKE W.W. (1985) Pair formation and prosmiscuity of cytokeratins : formation in vitro of heterotypic complexes and intermediate sized filaments by homologous and heterologous recombinations of purified polypeptides. J. Cell Biol. 101 : 1826-1841

HIROKAWA N., GLICKSMAN M.A. & WILLARD M.B. (1984) Organization of mammalian neurofilament polypeptides within the neuronal cytosqueleton. J. Cell Biol. 98 : 1523-1536

HOFMANN T. (1964) The purification and properties of fragments of trypsinogen obtained by cyanogen bromide cleavage. Biochemistry 3: 356-364

HOFFMAN P.N. & LASEK R.J. (1975) The slow component of axonal transport : identification of major structural polypeptides and their generality among mammalian neurons. J. Cell Biol. 66 : 351-366

HOGUE-ANGELETTI, R.A., WU H.L. & SCHLAEPFER W.W. (1982) Preparative separation and amino acid composition of neurofilament triplet proteins. J. Neurochem. 38 : 116-120

HOLLENBECK P. (1989) The transport and assembly of the axonal cytoskeleton. J. Cell. Biol. 108 : 223-227

HUNZIKER P.E., HUGHES G.J. & WILSON K.J. (1980) Peptide fragmentation suitable for solid phase sequencing : use of NBS and BNPS-skatole. Biochem. J. 187 : 515-519

IHARA Y., NUKINA N., SUGITA H. & TOYOKURA T. (1981) Proc. Jpn. Acad. 57B : 152-156

IHARA Y., ABRAHAM C. & SELKOE D.J. (1983)
Antibodies to paired helical filaments in Alzheimer's
disease do not recognize normal brain proteins.
Nature 304 : 727-730
IHARA Y., NUKINA N., MIURA R. & OGAWARA M. (1986) Phosphorylated Tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. J. Biochem. 99 : 1807-1810 INAGAKI M., NISHI Y., NISHIZAWA K., MATSUYAMA M. & SATO C. (1987) Site specific phosphorylation induces diassembly of vimentin filaments in vitro. Nature 328 : 649-652 INAGAKI M., CONDA Y., MATSUYAMA M., NISHIZAWA K., NISHI Y. & SATO C. (1988) Intermediate filament reconstitution in vitro : the role of phosphorylation on the assembly-disassembly of desmin. J. Biol. Chem. 263 : 5970-5978 INGRAM V.M. (1956) A specific chemical difference between the globins of normal human and sickle-cell anemia hemoglobin. Nature 178 : 792-794 INGRAM V.M. (1957) Gene mutation in human hemoglobin : chemical difference between normal and sickle cell hemoglobin. Nature 180 : 326-328 INGRAM V.M. (1958) Abnormal human hemoglobins. Comparison of normal human and sickle-cell hemoglobins by fingerprint. Biochim. Biophys. Acta 28 : 539-545 ISOBE T., ICHIMURA T. & OKUYAMA T. (1986) Identification of the C-terminal portion of a protein by comparative peptide mapping. Anal. Biochem. 155 : 135-140 JACOBSON G.R., SCHAFFER M.H., STARK G.R. & VANAMAN T.C. (1973)Specific chemical cleavage in high yield at the amino peptide bonds of cysteine and cystine residues. J. Biol. Chem. 248 : 6583-6591 JAUREGUI-ADELL J. & MARTI J. (1975) Acidic cleavage of Asp-Pro bond and limitation of the reaction. Anal. Biochem. 69 : 468-473

-147-

JOHNSON L.D., IDLER W.W., ZHOV X.M., ROOP D.R. 2 STEINERT P.M. (1985) Structure of gene for the human epidermal 67-kDa keratin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 1896-1900 JORCANO J.L., MAGIN T.M. & FRANKE W.W. (1984) Cell type specific expression of bovine keratin genes as demonstrated by the use of complementary DNA clones. J. Mol. Biol. 176 : 21-37 JULIEN J.P. & MUSHYNSKI W.E. (1982) sites in mammalian Multiple phosphorylation neurofilament polypeptides. J. Biol. Chem. 257 : 10467-10470 JULIEN J.P. & MUSHYNSKI W.E. (1983) The distribution of phosphorylation sites among identified proteolytic fragments of mammalian neurofilaments. J. Biol. Chem. 258 : 4019-4025 JULIEN J.P., RAMACHANDRAN K. & GROSVELD F. (1985) Cloning of a cDNA encoding the smallest: neurofilament protein from the rat. Biochim. Biophys. Acta 825 : 398-404 JULIEN J.P., MEYER D., FLAVELL D., HURST J. & GROSVELD F. (1986) Cloning developmental expression of murine and neurofilament gene family. Mol. Brain Res. 1 : 243-250 JULIEN J.P., GROSVELD F., YASDANBAKSH K., FLAVELL D., MEIJER D. & MUSHYNSKI W.E. (1987) The structure of a human neurofilament gene (NF-L) : a unique exon-intron organization in the intermediate filament gene family. Biochim. Biophys. Acta 909 : 10-20 KAMP R.M. (1976) Separation of peptides. in "Advanced methods in protein microsequence analysis" edited by WITTMANN-LIEBOLD, SALNIKOW J. & ERDMANN V.A., 1986, Springer-Verlag, New-York, Berlin, Heidelberg, Tokyo, pp19 KAUFMANN E., GEISLER N. & WEBER K. (1984) SDS-PAGE strongly overestimates the molecular masses of the neurofilament proteins. FEBS Lett. 170 : 81-84

KAUFMANN E., WEBER K. & GEISLER N. (1985) Intermediate filament forming ability of desmin derivatives lacking either the amino terminal 67 or the carboxy terminal 27 residues. J. Mol. Biol. 185 : 733-742

KLINGE E.M., SYLVESTRE Y.R., FREEDBERG I.M. & BLUMENBERG M. (1987) J. Mol. Evol. 24 : 319-329

KOPAN R., TRASKA G. & FUCHS E. (1987) Retinoids as important regulators of terminal differentiation : examining keratin expression in individual epidermal cells at various stages of keratinization. J. Cell Biol. 105 : 427-440

KOURY S.T. & ECKERT B.S. (1984) Further characterization of intermediate filament-like proteins from <u>Dictyostelium discoïdeum</u>. J. Cell Biol. 99 : 320a

KREIS T.E., GEIGER B., SCHMID E., JORCANO J.L. & FRANKE W.W. (1983) <u>De novo</u> synthesis and specific assembly of keratin filaments in nonepithelia cells after microinjection of mRNA for epidermal keratin. Cell 32 : 1125-1137

KRIEG T.M., SCHAFER M.P., CHENG C.K., FILPULA D., FLAHERTY P., STEINERT P.M. & ROOP D.R. (1985) Organization of a type keratin gene. J. Biol. Chem. 260 : 5867-5870

KRIMPENFORT P.J., SCHAART G., PIEPER F.R., RAMAEKERS F.C.S., CUYPERS H.T., VAN DEN HEUVEL R.M., VREE EGBERTS W.T., VAN EYS G.J., BERNS A. & BLOEMENDAL H. (1988) Tissue-specific expression of a vimentin-desmin hybrid gene in transgenic mice. EMBO J. 7 : 941-947

KROHNE G., DABAUVALLE M. & FRANKE W.W. (1981) Cell type-specific differences in protein composition of nuclear pore complexe-lamina structures in oocytes and erythrocytes of <u>Xenopus laevis</u>. J. Mol. Biol. 151 : 121-141

KROHNE G. & BENAVENTE R. (1986) The nuclear lamins. A multigene family of proteins in evolution and differentiation. Exp. Cell Res. 162 : 1-10 KRONENBERG M.S. & CLARK J.H. (1985a) Identification and analysis of keratin polypeptides from isolated rat vaginal epithelium. Endocrinology 117 : 1469-1479 KRONENBERG M.S. & CLARK J.H. (1985b) Changes in keratin expression during the estrogen-mediated differentiation of rat vaginal epithelium. Endocrinology 117 : 1480-1489 KSIEZAK-REDING H., DICKSON D.W., DAVIES P. & YEN S.-H. (1987) Recognition of tau epitopes by anti-neurofilament antibodies that bind to Alzheimer neurofibrillary tangles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 3410-3414 KULESH D.A. & OSHIMA R.G. (1988) Cloning of the human keratin 18 gene and its expression in non epithelial mouse cells. Mol. Cell. Biol. 8 : 1540-1550 KYTE J. (1971) Purification of the sodium and potassium-dependent adenosine triphosphate from canine renal medulla. J. Biol. Chem. 246 : 4157-4165 LAEMMLI U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227 : 680-685 LAEMMLI U.K. & FAVRE M. (1973) Maturation of the head of bacteriophage T4. I.DNA packaging events. J. Mol. Biol. 80 : 575-599 LAM K.S. & KASPER C.B. (1979) Electrophoretic analysis of three major nuclear envelope polypeptides. Topological relationship and sequence homology. J. Biol. Chem. 254 : 11713-11720 LAM K.S. & KASPER C.B. (1980a) Sequence homology analysis of a heterogenous protein population by chemical and enzymic digestion using a two-dimensional sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide qel system.

Anal. Biochem. 108 : 220-226

LAM K.S. & KASPER C.B. (1980b) Selective endogenous phosphorylation of two liver microsomal polypeptides in the presence of micromolar levels of Mg<sup>2+</sup> ion. J. Biol. Chem. 255 : 259-266 LANDON M. (1977) Cleavage at Asp-Pro bonds. Meth. Enzym. 47 : 145-149 LASEK R.J. & HOFFMAN P.N. (1976) The neuronal cytoskeleton, axonal transport and axonal growth. Cell. Motility 3 : 1021-1049 LASEK R.J., PHILLIPS L., KATZ M.J. & AUTILIO - GAMBETTI L. (1985) Function and evolution of neurofilament proteins. Ann. N.Y. Acad. Sci. 455 : 462-478 LASKIN J.D., MUFSON A.R., PICCINI L., ENGELHARDT D.L. & WEINSTEIN I.B. (1981) Effects of tumor promoter 12-0-tetradecanoyl-phorbol 13 acetate on Newly synthesized in mouse epidermis. Cell 25 : 441-449 LAZARIDES E. (1980) Intermediate filaments as mechanical integrators of cellular espace. Nature 283 : 249-256 LAZARIDES E. (1982) Intermediate filaments : a chemically heterogeneous, developmentally regulated class of proteins. Annu. Rev. Biochem. 51 : 219-250 LAZARIDES E. & WEBER K. (1974) Actin antibody-specific vizualization of actin filaments in nonmuscle cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71 : 2268-2272 LEE V.M.Y., OTVOS L., CARDEN M.J., HOLLOSI M., DIETZSCHOLD B. & LAZZARINI R.A. (1988) Identification of the major multiphosphorylation site in mammalian neurofilaments. Proc. Natl. Acad Sci. USA 85 : 1998-2002 LEES J.F., SHNEIDMAN P.S., SKUNTZ S.F., CARDEN M.J. S. LAZZARINI R.A. (1988) The structure and organization of the human heavy neurofilament subunit (NF-H) and the gene encoding it. EMBO J. 7 : 1947-1955

LEONARD D.G.B., GORHAM J.D., COLE P., GREENE L.A. & ZIFF E.B. (1988) A nerve growth factor-regulated messenger RNA encodes a new intermediate filament protein. J. Cell Biol. 106 : 181-193

LEVY E., LIEM R.K.H., D'EUSTACHIO P. & COWAN N.J. (1987) Structure and evolutionary origin of the gene encoding mouse NF-M, the middle molecular-mass neurofilament protein. Eur. J. Biochem. 166 : 71-77

LEWIS S.A. & COWAN N.J. (1985) Genetics, evolution, and expression of the 68,000-mol-wt neurofilament protein : isolation of a cloned cDNA probe. J. Cell Biol. 100 : 843-850

LEWIS S.A. & COWAN N.J. (1986) Anomalous placement of introns in a member of the intermediate filament multigene family : an evolutionary conundrum. Mol. Cell. Biol. 6 : 1529-1534

LIEBERBURG I., SPINNER N., SNYDER S., ANDERSON J., GOLDGABER D., SMULOWITZ M., CARROLL Z., EMANUEL B., BREITNER J. & RUBIN L. (1989) Cloning of a cDNA encoding the rat molecular weight neurofilament peptide (NF-H) : developmental and tissue expression in the rat, and mapping of its human homologue to chromosomes 1 and 22. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 2463-2467

LIEM R.K.H., YEN S.H., SALOMON G.D. & SHELANSKI L. (1978) Intermediate filaments in nervous tissue. J. Cell. Biol. **79**: 637-645

LINCK R.W. & LANGEVIN G.L. (1982) Structure and chemical composition of insoluble filamentous components of sperm flagellar microtubules. J. Cell. Sci. 58 : 1-22

LINCK R.W., AMOS L.A. & AMOS W.B. (1985) Localization of tektin filaments in microtubules of sea urchin sperm flagellar by immunoelectron microscopy. J. Cell Biol. 100 : 126-135 LINCK R.W. & STEPHENS R.E. (1987) Biochemical characterization of tektins from sperm flagellar doublet microtubules. J. Cell Biol. 104 : 1069-1064

LISCHWE M.A. & SUNG M.T. (1977) Use of N-chlorosuccinimide/urea for the selective cleavage of tryptophanyl peptide bonds in proteins. J. Biol. Chem. 252 : 4976-4980

LISCHWE M.A. & OCHS D. (1982) A new method for partial peptide mapping using N-chlorosuccinimide/urea and peptide silver staining in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 127 : 453-457

LOEWINGER L. & Mc KEON F. (1988) Mutations in the nuclear lamin proteins resulting in their aberrant assembly in the cytoplasm. EMBO J. 7 : 2301-2309

LOMPRE A.M., HAN K.K., BOUVERET P., RICHARD C. & SCHWARTZ K. (1984) Comparison of the tryptic digestion pattern of sub-fragments I from V1 and V3 rat cardiac isomyosins. Eur. J. Biochem. 139 : 459-465

LONSDALE-ECCLES J.D., LYNLEY A.M. & DALE B.A. (1981) Cyanogen bromide cleavage of proteins in sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gels. Biochem. J. 197 : 591-597

Mc KEON F.D., KIRSCHNER M.W. & CAPUT D. (1986) Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. Nature 319 : 463-468

Mc LACHLAN A.D. (1978) Coiled-coil formation and sequence regularities in the helical regions of  $\alpha$ -keratin. J. Mol. Biol. 124 : 297-304

Mc TAVISCH C.F., NELSON W.J., & TRAUB P. (1983) The turnover of vimentin in Ehrlich ascites tumour cells. FEBS Lett. 154 : 251-256 MAHBOUB S., RICHARD C., DELACOURTE A. & HAN K.K. (1986) Applications of chemical cleavage procedures to the peptide mapping of neurofilament triplet protein bands in sodium dodecyl sulfate-polyacryl-amide gel electrophoresis. Anal. Biochem. 154 : 172-182 MAHONEY W.C. & HERMODSON M.A. (1979) High yield cleavage of tryptophanyl peptide bonds by 0-iodosobenzoïc acid. Biochemistry 18: 3810-3814 MAHONEY W.C., SMITH P.K. & HERMODSON M.A. (1981) Fragmentation of proteins with 0-iodosobenzoïc acid : chemical mechanism of identification of 0-iodooxybenzoïc acid as a reactive contaminant that modifies tyrosine residues. Biochemistry 20 : 443-448 MARCHUK D., Mc CROHON S. & FUCHS E. (1985) Complete sequence of a gene encoding a human type I keratin : sequence homologous to enhancer elements in the regulatory region of the gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 1609-1613 MATSUIDARA P. (1987) Sequence from picomole proteins quantities of electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. J. Biol. Chem. 262 : 10035-10038 MENDEL-HARTVIG I. (1982) A simple and rapid method for the isolation of peptides from sodium dodecyl sulfate-containing gels. Anal. Biochem. 121 : 215-217 MERRIL C.R., DUNAU M.I. & GOLDMAN D. (1980) A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 110 : 201-207 MERRIL C.R., GOLDMAN D., SEDMAN S.A. & EBERT M.H. (1981)Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. Science 211 : 1437-1438

-154-

MILLER C.J., BRION J.P., CALVERT R., CHIN T.K., EAGLES P.A.M., DOWNES M.J., FLAMENT-DURAND J., HAUGH M., KAHN J., PROBST A., ULRICH J. & ANDERTON B.H. (1986) Alzheimer's paired helical filaments share epitopes with neurofilament side arms. EMBO J. 5 : 269-279 MINAMI Y. & SAKAI H. (1985) Dephosphorylation suppresses the activity of neurofilament to promote tubulin polymerization. FEBS Lett. 185 : 239-242 MIYAMOTO & SCHMIDT (1931) The apparent dissociation constants of phenylalanine and dihydroxyphenylalanine and the apparent free energy and entropy changes of certain amino acids due to ionization. J. Biol. Chem. 90 : 165-178 MIYATANI S., WINKLES J.A., SARGENT T.D. & DAWID I.B. (1986)Stage-specific keratins in Xenopus laevis embryos and tadpoles : the XK81 gene family. J. Cell Biol. 103 : 1957-1965 MONTEIRO M.J. & CLEVELAND D.W. (1989) Expression of NF-L and NF-M in fibroblasts reveals coassembly of neurofilament and vimentin subunits.

MYERS M.W., LAZZARINI R.A., LEE V.M.Y., SCHLAEPFER W. & NELSON D.L. (1987) The human mid-size neurofilament subunit: a repeated protein sequence and the relationship of its gene to the intermediate filament gene family. EMBO J. 6 : 1617-1626

J. Cell Biol. 108 : 579-593

NAPOLITANO E.W., CHIN S.S.M., COLMAN D.R. & LIEM R.K.H. (1987) Complete amino acid sequence and <u>in vitro</u> expression of rat NF-M, the middle molecular weight neurofilament protein. J. Neurosci. 7: 2590-2599

NARITA K. & TITANI K. (1968) The amino acid sequence of cytochrome c from <u>Candida</u> <u>kruiser</u>. J.Biochem. 63 : 226-241 NELSON W.J. & TRAUB P. (1982) Intermediate filament proteins and the Ca<sup>2+</sup>-activated proteinase specific for vimentin and desmin in the cells from fish to man. J. Cell Sci. 57 : 25

NELSON K.G. & SLAGA T.J. (1982) Keratin modifications in epidermis, papillomas and carcinomas during two-stage carcinogenesis in the SENCAR mouse. Cancer Res. 42 : 4176-4181

NELSON K.G., STEPHENSON K.B. & SLAGA T.G. (1982) Protein modifications induced in mouse epidermis by potent and weak tumor-promoting hyperplasiogenic agents. Cancer Res. 42: 4164-4175

NELSON W.J. & TRAUB P. (1983) Proteolysis of vimentin and desmin by the Ca<sup>2+</sup> activated proteinase specific for these intermediate filament proteins. Mol. Cell. Biol. 3: 1146-1156

NGAI J., BOND G., WOLD B.J. & LAZARIDES E. (1987) Expression of transfected vimentin genes in differentiating murine erythroleukemia cells reveals divergent cis - acting regulation of avian and mammalian vimentin sequences. Mol. Cell. Biol. 7: 3955-3970

NIKODEM V. & FRESCO J.R. (1979) Protein fingerprinting by SDS-PAGE after partial fragmentation with CNBr. Anal. Biochem. 97 : 382-386

NISSLEY P., CITTANOVA N. & EDELHOCH H. (1969) The properties of thyroglobulin. XVIII. Isolation of thyroglobulin subunits. Biochemistry 8: 443-448

NUKINA N., KOSIK K.S. & SELKOE D.J. (1987) Recognition of Alzheimer paired helical filaments by monoclonal neurofilament antibodies is due to crossreaction with tau protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84 : 3415-3419

OAKLEY B.R., KIRSCH D.R. & MORRIS N.R. (1980) A simplified ultrasensitive silver stain for detecting proteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 105 : 361-363 OCHS D., Mc CONKEY E.H. & SAMMONS D.W. (1981) Silver stain for proteins in polyacrylamide gels : a comparison of 6 methods. Electrophoresis 2 : 304-307

O'FARRELL P. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250 : 4007-4021

OSBORN M. & WEBER K. (1986) Intermediate filament proteins : a multigene family distinguishing major cell lineages. Trends Biochem. Sci. 11 : 469-472

OZOLS J. & GERARD C. (1977) Cleavage of tryptophanyl peptide bonds in cytochrome-b5 by cyanogen bromide. J. Biol. Chem. 252 : 5986-5989

PARRY D.A.D. & FRASER R.D.B. (1985) Int. J. Biol. Macromol. 7 : 203-213

PARRY D.A.D., CONWAY J.F. & STEINERT P.M. (1986)
Structural studies on lamin. Similarities and
differences between lamin and intermediate-filament
proteins.
Biochem. J. 238 : 305-308

PARRY D.A.D., CONWAY J.F., GOLDMAN A.E., GOLDMAN R.D. & STEINERT P.M. (1987) Int. J. Biol. Macromol. 9 : 137-145

PARYSEK L.M. & GOLDMAN R.D. (1987) Characterization of intermediate filaments in PC 12 cells. J. Neurosci. 7: 781-791

PATCHORNIK A., LAWSON W.B., GROSS E. & WITKOP B. (1960) The use of N-bromosuccinimide and N-bromoacetamide for the selective cleavage of C-tryptophyl peptide bonds in model peptides and glucagon. J. Am. Chem. Soc. 82 : 5923-5927

PERRY G., RIZZUTO N., AUTILIO-GAMBETTI L. & GAMBETTI P. (1985) Paired helical filaments from Alzheimer disease patients contain cytoskeletal components. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 3916-3920 PENKE B., FERENCZI R. & KOVACS K. (1974) A new acid hydrolysis method for determining tryptophan in peptides and proteins. Anal. Biochem. 60 : 45-50

PIEPER F.R., SLOBBE R.L., RAMAEKERS F.C.S., CUYPERSH.T. & BLOEMENDAL H. (1987) Upstream regions of the hamster desmin and vimentin genes regulate expression during <u>in vitro</u> myogenesis. EMBO J. 6 : 3611-3618

PIEPER F.R., SCHAART G., KRIMPENFORT P.J., HENDERIK J.B., MOSHAGE M.J., VAN DE KEMP A., RAMAEKERS F.C.S., BERNS A., & BLOEMENDAL H. (1989) Transgenic expression of the muscle-specific intermediate filament protein desmin in nonmuscle cells. J. Cell Biol. 108 : 1009-1024

PISZKIEWICZ D., LANDON M. & SMITH E.L. (1970) Anomalous cleavage of aspartyl-prolyl peptide bonds during amino acid sequence determination. Biochem. Biophys. Res. Commun. 40 : 1173-1178

POEHLING H.M. & NEUHOFF V. (1981) Electrophoresis 2: 141-147

PORTIER M.M., BRACHET P., CROIZAT B. & GROS F. (1984) Peripherin a new member of the intermediate protein family. Dev. Neurosci. 6 : 335-344

POWELL B.C., CAM G.R., FIETZ M.G. & ROGERS G.E. (1986) Clustered arrangement of keratin intermediate filament genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 : 5048-5052

PRUSS R.M., MIRSKY R., THORPE R., DOWDING A.J. & ANDERTON B.J. (1981) All classes of intermediate filaments share a common antigenic determinant defined by a monoclonal antibody. Cell 27 : 419-428

QUAX W., VREE EGBERTS W., HENDRIKS W., QUAX-JEUKEN Y. & BLOEMENDAL H. (1983) The structure of the vimentin gene. Cell. 35 : 215-223

QUAX W., KHAN P.M., QUAX-JEUKEN Y. & BLOEMENDAL H. (1985) The human desmin and vimentin genes are located on different chromosomes. Gene 38: 189-196

OUAX W., VAN DEN BROECK L., VREE EGBERTS W., RAMAEKERS F. & BLOEMENDAL H. (1985) Characterization of the hamster gene : expression and formation of desmin filaments in nonmuscle cells after gene transfer. Cell 43 : 327-338 QUINLAN R.A. & FRANKE W.W. (1982) Heteropolymer filaments of vimentin and desmin in vascular smooth muscle tissue and cultured baby hamster kidney cells demonstrated by chemical cross-linking. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 3452-3456 QUINLAN R.A., HATZFELD M., FRANKE W.W., LUSTIG A., SCHULTHESS T. & ENGEL J. (1986) Characterization of dimer subunits of intermediate filament proteins. J. Mol. Biol. 192 : 337-349 DUNIA I., DODEMONT H.J., BENEDETTI RAMAEKERS F.C.S., E.L. & BLOEMENDAL H. (1982) Lenticular intermediate - sized filaments : biosynthesis and interaction with plasma membrane. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79 : 3208-3212 RAYCHAUDURY A., MARCHUK D., LINDHURST M. & FUCHS E. (1986)Three tightly linked genes encoding human type Т keratins: conservation of sequence in the 5'-untranslated leader and 5'-upstream regions of coexpressed keratin genes. Mol. Cell. Biol. 6 : 539-548 REYNOLDS J.A. & TANFORD C. (1970) The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. J. Biol. Chem. 245 : 5161-5165 REYNOLDS J.A. & TANFORD C. (1970) Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 66 : 1002-1003 MAHBOUB S., DELACOURTE A., HEMON B. & HAN RICHARD C., K.K. (1985) Comparative studies of the neurofilament triplet protein peptide mapping by chemical cleavage. Comp. Biochem. Physiol. 83B : 707-712

-159-

RICHARD C., HAN K.K., YANG H-L, ZHU D-X, BALDUICK M. 2 MIZON J. (1989) Evidence for the overestimate of molecular masses of proteins after chemical modification and chemical cross-links on sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. Biomed. Chromato. 3 : 131-135 RIEGER M., JORCANO J.L. & FRANKE W.W. (1985) Complete sequence of a bovine type I cytokeratin gene : conserved and variable intron positions in genes of polypeptides of the same cytokeratin subfamily. EMBO J. 4 : 2261-2267 RITTENHOUSE J. & MARCUS F. (1984) Peptide mapping by polyacrylamide gel electrophoresis after cleavage at Aspartyl-Prolyl peptide bonds in S0dium dodecyl sulfate-containing buffers. Anal. Biochem. 138 : 442-448 RITTLING S.R. & BASERGA R. (1987) Functional analysis and growth factor regulation of the human vimentin promoter. Mol. Cell Biol 7 : 3908-3915 ROBINSON P.A., WION D. & ANDERTON B.H. (1986) Isolation of a cDNA for the rat heavy neurofilament polypeptide (NF-H). FEBS Lett. 209 : 203-205 ROOP D.R., TOFTGARD R., YUSPA S.H., KRONENBERG M.S. & CLARK J.H. (1984) In "The molecular biology of the cytoskeleton". ed G.G. BORISTY, D.W. Cleveland, D.B. MURPHY pp 409-414 N.Y. Cold Spring Harbor Lab. ROSENBERG M., RAYCHAUDHURY A., SHOWS T.B., LE BEAU M.M. & FUCHS E. (1988)
A group of type I keratin genes on chromosome 17 : characterization and expression. Mol. Cell. Biol. 8 : 722-736 ROUSSEAUX J., DAUTREVAUX M. & HAN K.K. (1976) The covalent structure of porcine myoglobin. Biochim. Biophys. Acta 439 : 55-62 SALINOVITCH O. & MONTELARO R.C. (1986) Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.

Anal. Biochem. 156 : 341-347

SAMMONS D.A., ADAMS L.D. & NISHIZAWA E.E. (1981) Silver staining techniques of proteins. Electrophoresis 2: 135-141

SARIS C.J., VAN ENBERGEN J., JENKS B.G. & BLOEMERS H.P.J. (1983) Hydroxylamine cleavage of proteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 132 : 54-67

SAVIGE W.E. & FONTANA A. (1977) Cleavage of the tryptophanyl peptide bonds by dimethylsulfoxide-hydrobromic acid. Meth. Enzymol. 47: 459-469

SCHLAEPFER W.W. & LYNCH R.G. (1977) Immunofluorescence studies of neurofilaments in the rat and human peripheral nerve and central nervous system. J. Cell Biol. 74 : 241-250

SCHLAEPFER W.W. (1978) Deformation of isolated neurofilaments and the pathogenesis of neurofibrillary pathology. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 37 : 244-254

SCHLAEPFER W.W. & FREEMAN L.A. (1978) Polypeptides of neurofilaments isolated from rat peripheral and central nervous systems. J. Cell Biol. 78: 653-662

SCHLIWA M. (1986) The cytosqueleton : an introductory survey. New York : Springer Verlag, 1986.

SCHROEDER W.A., SHELTON J.B. & SHELTON J.R. (1969) An examination of conditions for the cleavage of polypeptide chains with cyanogen bromide : application to catalase. Arch. Biophys. Biochem. 130 : 551-556

SCHWEIZER J. & WINTER H. (1982) Keratin polypeptide analysis in fetal and in terminally differentiating newborn mouse epidermis. Differentiation 22 : 19-24

SCOTT M.G., CRIMMINS D.L., Mc COURT D.W., TARRAND J.J., AYERMAN M.C. & NAHM M.H. (1988) A simple <u>in situ</u> cyanogen bromide cleavage method to obtain internal amino acid sequence of proteins electroblotted to polyvinyldifluoride membranes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 155 : 1353-1359 SHAPIRO A.L., VINUELA E. & MAIZEL J.V. (1967) Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels. Biochem. Biophys. Res. Commun. 28 : 815-820

SHARP G.A., SHAW G. & WEBER K. (1982) Immunoelectron microscopical localization of the three neurofilament triplet proteins along neurofilaments of cultured dorsal root ganglion neurons. Exp. Cell Res. 137 : 403-413

SHAW G. & WEBER K. (1981) The distribution of the neurofilament triplet proteins within individual neurones. Exp. Cell Res. 136 : 119 - 125

SHAW G. & WEBER K. (1982) Differential expression of neurofilament triplet proteins in brain development. Nature 298 : 277-279

SHAW G., DEBUS E. & WEBER K. (1984) The immunological relatedness of neurofilament proteins of higher vertebrates. Eur. J. Cell Biol. 34 : 130-136

SHECHTER Y., PATCHORNIK A. & BURSTEIN Y. (1976) Selective chemical cleavage of tryptophanyl peptide bonds by oxidative chlorination with N-chlorosuccinimide. Biochemistry 15 : 5071-5075

SHELTON K.R., GUTHRIE V.H. & COCHRAN D.L. (1982) Oligomeric structure of the major nucleolar envelopes protein lamin B. J. Biol. Chem., 257 : 4328-4332

SHIVELY J.E., PAXTON R.J. & LEE T.D. (1989) Highlights of protein structural analysis. Trends Biochem. Sci. 14 : 242-252

SIMPSON R.J., MORITZ R.L., BEGG G.S., RUBIRA M.R. & NICE E.C. (1989) Micropreparative procedures for high sensitivity sequencing of peptides and proteins. Anal. Biochem. 177 : 221-236

SOLL D.R. & MITCHELL L.H. (1983) Filament ring formation in dimorphic yeast <u>Candida</u> <u>albicans</u>. J. Cell Biol. 96 : 486-493 SONDEREGGER P., JAUSSI R., GEHRING H., BRUNSCHWEILER K. CHRISTEN P. (1982) 2 Peptide mapping of protein bands from polyacrylamide gel electrophoresis by chemical cleavage in gel pieces and re-electrophoresis. Anal. Biochem. 122 : 298-301 STARK G.R. (1977) Cleavage at cysteine after cyanylation. Meth. Enzymol. 47 : 129-132 STEELE J.C.H. & NIELSEN T.B. (1978) Evaluation of cross-linked polypeptides in SDS gel electrophoresis. Anal. Biochem. 84 : 218-224 STEINERT P.M., IDLER, W.W. & ZIMMERMAN, S.B. (1976) Self-assembly of bovine epidermal keratin filaments in vitro. J. Mol. Biol. 108 : 547-567 STEINERT P., PARRY D., RACOOSIN E., IDLER W., STEVEN A. & ROOP D. (1984) The complete cDNA and deduced amino acid sequence of а type II mouse epidermal keratin of 60,000 Da : analysis of sequence differences between type I and type II keratins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 5709-5713 STEINERT P.M. & PARRY D.A.D. (1985) Intermediates filaments : conformity and diversity of expression and structure. Annu. Rev. Cell Biol. 1 : 41-65 STEINERT P.M., STEVEN A.C. & ROOP D.R. (1985) The molecular biology of intermediate filaments. Cell 42 : 411-419 STEINERT P.M. & ROOP D.R. (1988) Molecular and cellular biology of intermediate filaments. Annu. Rev. Biochem. 57 : 593-625 STERNBERGER L.A. & STERNBERGER N.M. (1983) Monoclonal antibodies distinguish phosphorylated and nonphosphorylated forms of neurofilaments in situ. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 6126-6130 STRALFORS P. & BELFRAGE P. (1983) Electrophoretic elution of proteins from polyacrylamide ael slices. Anal. Biochem. 128 : 7-10

SZEWCZYK B. & SUMMERS D. (1988) Preparative elution of proteins blotted to immobilon membranes. Anal. Biochem. 168: 48-53

SWANK R.T. & MUNKRES K.D. (1971) Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. Anal. Biochem. 39 : 462-477

SWITZER R.C., MERRILL C.R. & SHIFRIN S. (1979) A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 98 : 231-237

TAKEDA A. & CONE R.E. (1984) Two-dimensional peptide mapping by polyacrylamide-gel electrophoresis with limited proteolysis in SDS. Biochim. Biophys. Res. Commun. 122 : 932-937

TANIUCHI H. & ANFINSEN C.B. (1966) The amino acid sequence of an extracellular nuclease of <u>Staphylococcus aureus.</u> J. Biol. Chem. 141 : 4366-4385

THORPE R., DELACOURTE A., AYERS M., BULLOCK C. & FIELDS K.L. (1979) The polypeptides of isolated brain 10 nm filaments and their association with polymerized tubulin. Biochem. J. 181 : 275-284

TOKUTAKE S., LIEM R.K.H. & SHELANSKI L. (1984) Each component of neurofilament assembles itself to make component-specific filament. Biomed. Res. 5 : 235-238

TOFTGARD R., YUSPA S.H. & ROOP D.R. (1985) Keratin gene expression in mouse skin tumors and in mouse skin treated with TPA. Cancer Res. 45: 5845-5850

TOWBIN H., STAEHELIN T. & GORDON J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets : procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 : 4350-4354

TRAUB P. (1985) Intermediate filaments - A review. Springer-verlag, Berlin - Heidelberg - New York - Tokyo TRAUB P. & VORGIAS C.E. (1983) Involvement of the N-terminal polypeptide of vimentin in the formation of intermediate filaments. J. Cell Sci. 63: 43-67

TSENG S.C.G., HATCHELL D., TIERNEY N., HUANG A.J.W. & SUN T.T. (1984) Expression of specific keratin markers by rabbit corneal, conjunctival and esophageal epithelia during vitamin A deficiency. J. Cell Biol. 99 : 2279-2286

TUNG J-S. & KNIGHT C.A. (1971) Effect of charge on the determination of molecular weight of proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 42 : 1117-1121

TYNER A.L., EICHMAN M.J. & FUCHS E. (1985) The sequence of a type II keratin gene expressed in human skin : conservation of structure among all intermediate filament genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 : 4683-4687

**TYNER A.L. & FUCHS E. (1986)** Evidence for postranscriptional regulation of the keratins expressed during hyperproliferation and malignant transformation. J. Cell Biol. **103 :** 1945-1955

VAITUKAITIS J., ROBBINS J.B., NIESCHLAG E. & ROSS G.T. (1971) A method for producing specific antisera with small doses of immunogen. J. Clin. Endocr. 33 : 988-991

VAN DEN HEUVEL R.M.M., VAN EYES G.J.J.M., RAMAEKERS F.C.S., QUAX W.J., VREE EGBERTS W.T.M., SCHAART G., CUYPERS T.M. & BLOEMENDAL H. (1987) Intermediate filament formation after transfection with modified hamster vimentin genes. J. Cell Sci. 88 : 475-482

WANG E., CAIRNCROSS J.G. & LIEM R.K.H. (1984) Identification of glial filament protein and vimentin in the same intermediate filament system in human glioma cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 : 2102-2106

WEBER K. (1986) Link between lamins and intermediate filaments. Nature 320 : 402 WEBER K. & OSBORN M. (1969) The reliability of MW determination by SDS-PAGE. J. Biol. Chem. 244 : 4406-4412 WEBER K. & KUTER D.J. (1971) Reversible denaturation of enzymes by sodium dodecyl sulfate. J. Biol. Chem. 244 : 4406-4412 WEBER K. & OSBORN M. (1975) in "The Proteins" (NEURATH H. & HILL R., eds) 3<sup>rd</sup> Ed, Vol.1, pp.179-223, Academic Press, New York WEBER K., SHAW G., OSBORN M., DEBUS E. & GEISLER G. (1983)Neurofilaments, a subclass of intermediate filaments : structure and expression. Cold Spring Harbor Laboratory, XLVIII : 717-729 WEDRYCHOWSKI A., OLINSKI R. & HNILICA L.S. (1986) Modified method of silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 159 : 323-328 WESTWOOD J.T., CHURCH R.B. & WAGENAAR J.B. (1985) Changes in protein phosphorylation during the cell cycle of chinese hamster ovary cells. J. Biol. Chem. 260 : 10308-10313 WIBLE B.A., SMITH K.E. & ANGELIDES K.J. (1989) Resolution and purification of a neurofilament-specific kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. 86 : 720-724 WILLIAMS J.G. & GRATZER W.B. (1971) Limitations of the detergent-polyacrylamide qel electrophoresis for molecular weight method determination of proteins. J. Chromato. 57 : 121-125 WILSON K.J. (1989) Micro-level protein and peptide separations. Trends Biochem. Sci. 14 : 252-255 WINTER H. & SCHWEIZER J. (1983) Keratin synthesis in normal mouse epithelia and in squamous cell carcinomas : evidence in tumors for masked mRNA species coding for high molecular weight keratin polypeptides. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80 : 6480-6484

-166-

WRAY W., BOULIKAS T., WRAY V.P. & HANCOK (1981) Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Anal. Biochem. 118 : 197-208

YANG H-L., QIN X-F., XU L-X., ZHU D-X., BOERSMA A. & HAN K.K. (1988) Isolation and characterization of the chemically cross-linked vegetable proteinase inhibitor B (<u>Sagittoria sagittifolia linn</u>) by using bifunctional reagents and by high pressure liquid chromatography. Comp. Biochem. Physiol. 91B : 497-502

ZACKROFF R.V., GOLDMAN A.E., JONES IC.R, STEINERT P.M. & GOLDMAN R.D. (1984) Isolation and characterization of keratin-like proteins from cultured cells with fibroblastic morphology. J. Cell Biol. 98 : 1231-1237

ZEHNER Z., LI Y., ROE R.A., PATERSON B.M. & SAX C.M. (1987) The chicken vimentin gene. Nucleotide sequence, regulatory elements and comparison to the hamster gene. J. Biol. Chem. 262 : 8112-8120

ZINGDE S.M., SHIRSAT N.V. & GOTHOSKAR B.P. (1986) Peptide mapping of proteins in gel bands after cleavage with acidic cyanogen bromide vapors. Anal. Biochem. 155 : 10-13



## RICHARD Claude

## UTILISATION DES CARTES PEPTIDIQUES POUR L'ETUDE DE LA STRUCTURE PRIMAIRE DES NEUROFILAMENTS

THESE DE DOCTORAT EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE (UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS) 16 JUILLET 1990 - N° 515

Mots Clefs : Carte Peptidique / Coupure Chimique / Structure Primaire / Neurofilaments / Filaments Intermédiaires

## RESUME DE LA THESE

Le principe de la méthode de Cleveland a été utilisé pour établir des homologies entre différentes protéines mais en remplaçant la fragmentation protéolytique des protéines étudiées par des coupures chimiques. Nous avons appliqué cette méthode coupure chimique/analyse électrophorétique avec révélation chimique ou immunologique à la comparaison des protéines des Neurofilaments (NF) de la moelle épinière de boeuf ou de porc, NF-L (70K), NF-M (160K) et NF-H (210K). Les données de la littérature indiquent que ces trois protéines ont une partie qui leur est commune. Le clivage par le BNPS-skatole permet de découper les différentes sous-unités des NF de boeuf au niveau d'un résidu de tryptophane situé dans la partie qui leur est commune. Le clivage au bromure de cyanogène conduit, à partir de NF-M et de NF-H, à deux fragments majeurs, 85K à partir de NF-M et 135K à partir de NF-H qui correspondent à l'extrémité C-terminale de ces deux chaînes. Le clivage au NTCB découpe NF-L en deux fragments de 36 et 28 K. Il est sans action sur NF-M malgré la présence de cystéine et a une action limitée sur NF-H.

Cette technique a ensuite été utilisée pour comparer les protéines des NF chez le porc et le boeuf après préparation d'anticorps anti-protéines NF ou anti-fragments obtenus après coupure au BrCN (135 K et 85 K). Chez NF-L, les cartes peptidiques obtenues chez le porc et le boeuf ont une grande similitude. L'analogie est moins nette pour les deux autres protéines NF-M et NF-H. Les fragments majeurs obtenus chez le boeuf (85 K et 135 K) ne sont pas retrouvés chez le porc. Des immunsérums préparés à partir de ces deux fragments réagissent aussi bien avec les chaînes de boeuf correspondantes avant clivage qu'après clivage. Les mêmes anticorps réagissent (plus faiblement) avant clivage des sous-unités de porc NF-H et NF-M, mais plus du tout après clivage au BrCN. Ces études aboutissent à la notion d'une certaine analogie entre chaînes H et M chez le boeuf mais de moins d'homologies entre boeuf et porc.

La surestimation de la masse moléculaire apparente des NF sur PAGE-SDS observée au cours de ce travail nous a incité à étudier le comportement électrophorétique de protéines modifiées chimiquement par succinylation ou par pontages de réactifs bifonctionnels.

Précède une revue bibliographique portant d'une part sur les cartes peptidiques en électrophorèse sur gel de polyacrylamide en milieu SDS, et, d'autre part, sur les Filaments Intermédiaires, famille de protéines à laquelle

