

---

Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles /  
Université libre de Bruxelles Institutional Repository  
**Thèse de doctorat/ PhD Thesis**

**Citation APA:**

Peiffer, S. (1973). *La myoglobine du manchot empereur (Aptenodytes forsteri). Isolement. Caractérisation. Structure covalente* (Unpublished doctoral dissertation). Université libre de Bruxelles, Faculté des sciences, Bruxelles.

**Disponible à / Available at permalink :** <https://dipot.ulb.ac.be/dspace/bitstream/2013/214723/1/1a27c948-649e-489f-b70e-24fdd76932bb.txt>

---

(English version below)

Cette thèse de doctorat a été numérisée par l'Université libre de Bruxelles. L'auteur qui s'opposerait à sa mise en ligne dans DI-fusion est invité à prendre contact avec l'Université (di-fusion@ulb.be).

**Dans le cas où une version électronique native de la thèse existe, l'Université ne peut garantir que la présente version numérisée soit identique à la version électronique native, ni qu'elle soit la version officielle définitive de la thèse.**

DI-fusion, le Dépôt Institutionnel de l'Université libre de Bruxelles, recueille la production scientifique de l'Université, mise à disposition en libre accès autant que possible. Les œuvres accessibles dans DI-fusion sont protégées par la législation belge relative aux droits d'auteur et aux droits voisins. Toute personne peut, sans avoir à demander l'autorisation de l'auteur ou de l'ayant-droit, à des fins d'usage privé ou à des fins d'illustration de l'enseignement ou de recherche scientifique, dans la mesure justifiée par le but non lucratif poursuivi, lire, télécharger ou reproduire sur papier ou sur tout autre support, les articles ou des fragments d'autres œuvres, disponibles dans DI-fusion, pour autant que :

- Le nom des auteurs, le titre et la référence bibliographique complète soient cités;
- L'identifiant unique attribué aux métadonnées dans DI-fusion (permalink) soit indiqué;
- Le contenu ne soit pas modifié.

L'œuvre ne peut être stockée dans une autre base de données dans le but d'y donner accès ; l'identifiant unique (permalink) indiqué ci-dessus doit toujours être utilisé pour donner accès à l'œuvre. Toute autre utilisation non mentionnée ci-dessus nécessite l'autorisation de l'auteur de l'œuvre ou de l'ayant droit.

----- **English Version** -----

This Ph.D. thesis has been digitized by Université libre de Bruxelles. The author who would disagree on its online availability in DI-fusion is invited to contact the University (di-fusion@ulb.be).

**If a native electronic version of the thesis exists, the University can guarantee neither that the present digitized version is identical to the native electronic version, nor that it is the definitive official version of the thesis.**

DI-fusion is the Institutional Repository of Université libre de Bruxelles; it collects the research output of the University, available on open access as much as possible. The works included in DI-fusion are protected by the Belgian legislation relating to authors' rights and neighbouring rights. Any user may, without prior permission from the authors or copyright owners, for private usage or for educational or scientific research purposes, to the extent justified by the non-profit activity, read, download or reproduce on paper or on any other media, the articles or fragments of other works, available in DI-fusion, provided:

- The authors, title and full bibliographic details are credited in any copy;
- The unique identifier (permalink) for the original metadata page in DI-fusion is indicated;
- The content is not changed in any way.

It is not permitted to store the work in another database in order to provide access to it; the unique identifier (permalink) indicated above must always be used to provide access to the work. Any other use not mentioned above requires the authors' or copyright owners' permission.

---

UNIVERSITE LIBRE DE BRUXELLES

Faculté des Sciences

Laboratoire de Chimie Générale I

RECU le  
19 JAN. 1973  
Rép:.....

LA MYOGLOBINE DU MANCHOT EMPEREUR  
( APTENODYTES FORSTERI )

ISOLEMENT  
CARACTERISATION  
STRUCTURE COVALENTE

Thèse présentée pour l'obtention  
du titre  
de Docteur en Sciences chimiques



Serge PEIFFER

1973

Nous exprimons notre gratitude à Monsieur le Professeur Léonis de nous avoir, en 1964, dès la fin de notre licence, proposé et confié une charge d'assistant et de nous avoir ainsi permis de participer à la création et au développement d'un relativement grand Laboratoire d'enseignement et de recherche.

Nous le remercions d'avoir critiqué notre travail de doctorat pour nous permettre ainsi de le mieux construire.

Nous n'oublierons pas l'intérêt constant que Monsieur le Professeur Schnek n'a cessé de nous prodiguer et nous le remercions d'avoir facilité la réalisation de ce travail.

Que Monsieur le Professeur Dautrevaux, trouve ici les marques de notre reconnaissance et qu'il sache toute l'estime que nous lui portons, lui, qui si souvent nous accueillit simplement et amicalement à l'Université de Lille dans son laboratoire.

Nous remercions le Docteur K. Han des conseils et de l'aide fraternelle qu'il nous a toujours accordés avec humour et bonne humeur.

Nous remercions le Docteur Claudine Paul de ses conseils et de la contribution indispensable qu'elle a apportés, et à notre laboratoire et à nos travaux de détermination de structure de protéine.

Que Madame Josiane André sache que nous avons toujours apprécié son dévouement, de haute compétence, et sa constante gentillesse.

Nous souhaiterions dans l'avenir travailler encore avec Monsieur Marc Deconinck, c'est dire que nous sommes heureux du travail accompli avec lui.

# T A B L E . D E S . M A T I E R E S

<u>AVANT-PROPOS</u>	p. 1
<u>INTRODUCTION</u>	p. 3
<u>RESUME</u>	p. 6
<u>1ERE PARTIE</u> : ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE LA MYOGLOBINE DU MANCHOT EMPEREUR (APTENODYTES FORSTERI)	
I INTRODUCTION	p.10
II PREPARATION ET PURIFICATION	p.12
III CRITERES D'HOMOGENEITE	p.14
IV CARACTERISATION	p.18
V DISCUSSION DES RESULTATS	p.25
<u>2EME PARTIE</u> : STRUCTURE COVALENTE DE L'APOMYOGLOBINE DU MANCHOT EMPEREUR	
I INTRODUCTION	p.29
II HYDROLYSES ENZYMATIQUES	p.32
III HYDROLYSES CHIMIQUES	p.36
IV STRUCTURE DES PEPTIDES UTILISES POUR LA CONSTRUCTION DE LA SEQUENCE	p.37
V STRUCTURE COVALENTE DE LA MYOGLOBINE DE MANCHOT	p.46
VI COMPARAISON DES SEQUENCES DE MYOGLOBINE	p.62
VII DISCUSSION DES RESULTATS	p.68
<u>3EME PARTIE</u> : CONFORMATION THEORIQUE DE LA MYOGLOBINE DU MANCHOT EMPEREUR	
I CONFORMATION DE LA MYOGLOBINE DE CACHALOT	p.71
II COMPARAISON DES MYOGLOBINES DE MANCHOT ET DE CACHALOT	p.79
III COMPARAISON DES ZONES HYDROPHOBES DANS LES MYOGLOBINES	p.89
IV CONCLUSION	p.96
<u>CONCLUSIONS GENERALES</u>	p.97
<u>ANNEXES</u>	
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	

## AVANT-PROPOS

Lorsqu'en 1967, nous avons entrepris de réaliser l'isolement et l'étude structurale de la myoglobine de poule, nous nous attendions à rencontrer de multiples difficultés, particulièrement dans la séparation des peptides par chromatographie, où certains travaux menés dans notre laboratoire avaient échoué jusqu'alors. De plus, nous ne disposions pas à cette époque de l'équipement adéquat pour l'étude des structures séquentielles de peptides. L'appareillage nécessaire a été acquis progressivement par la suite.

Les déterminations de structure font partie de la biochimie descriptive, trop aisément regardée comme la parente pauvre de la biochimie dynamique. Néanmoins, isoler une protéine non décrite et préciser sa structure chimique nous est toujours apparu comme positif.

Positif, parce que tout ce qui concerne l'enzyme du point de vue de sa conformation et, par conséquent, de son activité biologique, est la résultante de sa structure primaire. L'interprétation des résultats obtenus par radiocristallographie n'est possible que si l'on peut s'aider de la structure primaire.

Positif également, parce que la structure primaire d'une protéine est l'expression d'un certain fragment de D.N.A. à travers toute la chaîne de transmission et de biosynthèse.

Notre expérience s'est forgée progressivement dans les contacts amicaux que nous entretenons, à l'Université de Lille, avec Messieurs Dautrevaux et Han. Une grande partie nous vient en outre de la méthode dite par "trial and errors". Nous avons profité également, faut-il le dire, de l'expérience et des déboires de nos compagnons thésiens.

*Nous tenons à remercier*

*Madame Josiane André, qui a collaboré avec efficacité, patience et gentillesse à toutes les approches techniques et aux études de structure primaire dans notre laboratoire;*

*Mademoiselle Claudine Paul qui, du laboratoire du Professeur Putnam, aux Etats-Unis, nous a fait profiter de ses conseils, de son travail et de son expérience du Sequencer;*

*Monsieur Michel Noyer, avec qui nous nous sommes fréquemment entretenu des problèmes liés à la séparation chromatographique des peptides, et qui a largement contribué à la construction d'un analyseur de peptides;*

*Ceux qui, dans notre laboratoire, se sont occupés de ces appareils aussi délicats qu'indispensables que sont les analyseurs automatiques;*

*et enfin, Monsieur Marc Deconinck, notre compagnon de travail depuis 1968, qui a établi sans ambiguïté la première structure séquentielle complète d'une protéine en notre laboratoire.*

*Nous souhaiterions voir se créer à l'Université de Bruxelles une unité spécialisée qui grouperait des moyens technologiques appropriés et bénéficierait des idées et de l'expérience des chercheurs qui ont approché les problèmes de structure primaire des protéines. Une telle unité pourrait accueillir et conseiller ceux qui n'abordent ces problèmes que de façon occasionnelle.*

*Elle serait à même de disposer d'un équipement plus complet et plus rationnel que celui dont un service isolé pourrait jamais faire l'acquisition. Le renouvellement de l'appareillage s'y ferait plus rapidement, s'il trouvait une utilisation fréquente. Et, sans doute, cela permettrait-il d'économiser les moyens financiers mis à la disposition de la recherche, tout en évitant d'inutiles pertes de temps pour chacun.*

## INTRODUCTION GÉNÉRALE

L'hémoglobine, qui est véhiculée dans le sang par les globules rouges, transporte l'oxygène du milieu extérieur vers les profondeurs de l'organisme. Par contraste, la myoglobine ne circule pas : elle se trouve en effet à l'intérieur des tissus musculaires et y reçoit son oxygène de l'hémoglobine. La myoglobine met donc en réserve l'oxygène et le délivre au moment venu, c'est-à-dire quand sa concentration intracellulaire diminue. Elle est par ailleurs responsable de la coloration des muscles.

Il n'est donc pas étonnant de trouver des quantités importantes de cette protéine dans les muscles des animaux qui, pour subvenir à leur alimentation, respirent dans l'atmosphère puis passent une partie de leur temps sous l'eau, en état d'happée. L'hémoglobine interrompt à ce moment son approvisionnement en oxygène au niveau des poumons. La durée et la quantité de l'effort musculaire sont alors liées à la teneur en myoglobine oxygénée présente dans le muscle. On sait que l'affinité pour l'oxygène est plus grande dans le cas de la myoglobine que dans celui de l'hémoglobine, ce qui explique le transfert de l'une vers l'autre. Ceci peut se traduire mathématiquement par les équations :



$$K = \frac{[\text{MbO}_2]}{[\text{Mb}][\text{O}_2]}$$

Si l'on exprime la concentration en oxygène par sa pression partielle, et représente par  $y$  la fraction molaire de la myoglobine oxygénée, on a :

$$K = \frac{y}{(1-y)(P_{\text{O}_2})}$$

D'une manière plus générale :

$$y = \frac{K(P_{\text{O}_2})^n}{1 + (K P_{\text{O}_2})^n}$$

avec  $n$  égal à 1 pour la myoglobine et supérieur à 1 pour les hémoglobines.

Sur le plan structural, il est bien connu que l'hémoglobine possède quatre chaînes polypeptidiques et quatre groupes prosthétiques, quatre hèmes. Par contre, la myoglobine ne possède qu'une seule chaîne polypeptidique et un seul hème. Au total, les deux hémoprotéines se distinguent donc entre elles par leurs masses molaires, par leurs affinités pour l'oxygène, et par le fait que l'une circule alors que l'autre est dissoute à l'intérieur du cytoplasme des cellules musculaires.

La myoglobine du cachalot fut la première protéine dont la structure spatiale a été révélée (Kendrew, J.C., et al., 1961). Edmundson a achevé la description de la structure covalente de cette molécule en 1965 (Edmundson, A.B., 1965).

Parallèlement, Perutz (1965) analysait la structure tridimensionnelle de l'hémoglobine. La comparaison a montré qu'il existe une grande analogie entre le repliement des chaînes de l'hémoglobine et celui de la chaîne unique de la myoglobine.

Les fonctions biologiques, on le savait depuis longtemps, sont identiques. Dans ce contexte Ingram (1961) avait émis l'hypothèse d'un lien de parenté génétique entre les deux hémoprotéines, postulant l'existence d'une protéine ancestrale d'où seraient dérivées (1) par de nombreuses mutations, les myoglobines actuelles et (2) par duplication du gène suivie de mutations, les différentes chaînes des hémoglobines que l'on trouve parmi les êtres vivants d'aujourd'hui.

La première duplication remonterait à une époque où la différenciation actuelle entre un poisson et un mammifère n'était pas encore apparue. Les globines contemporaines portent cependant en elles des informations permettant de préciser certains aspects des phénomènes évolutifs qui les ont engendrées. Dans leur diversité chimique, elles ont d'ailleurs conservé chacune la propriété initiale de fixer l'oxygène. Si l'on compare les structures primaires de deux protéines homologues prises dans deux espèces distinctes, le nombre des différences observées étant en première approximation proportionnel au temps écoulé depuis le moment où ces protéines ont commencé à se différencier, il est clair que l'étude détaillée des séquences doit permettre de préciser les relations phylétiques entre espèces.

Ces concepts sont illustrés par la figure 1.

L'étude structurale de diverses protéines dans la famille des hémoprotéines devrait également permettre d'éclaircir une autre question : comment des structures primaires différentes sont-elles compatibles avec une même structure tridimensionnelle et avec une même fonction biologique ?

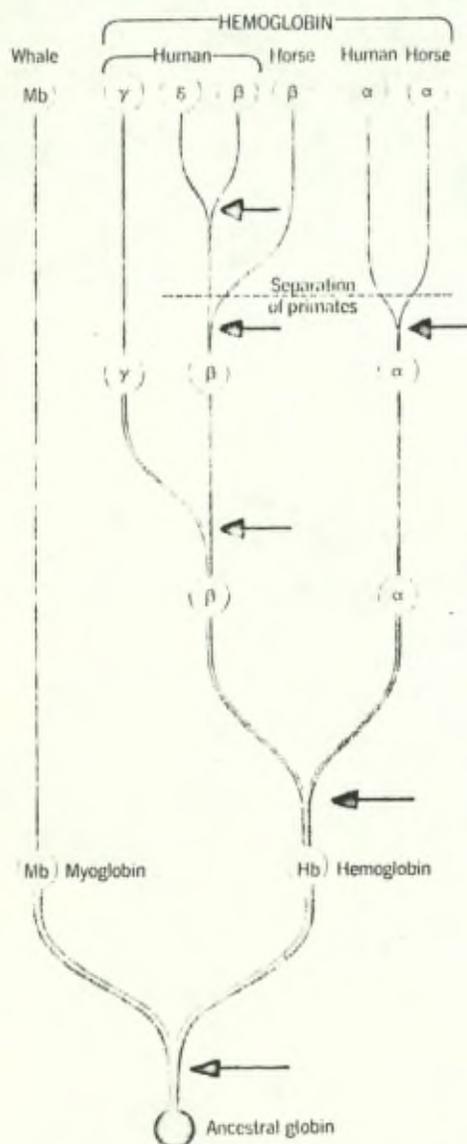
FIGURE I (\*)

1a

DIFFERENCES IN AMINO ACID SEQUENCES

Total Residues:	Horse $\alpha$	Human $\alpha$	Horse $\beta$	Human $\beta$	Human $\delta$	Human $\gamma$	Whale Mb
Horse $\alpha$	0	18	84	86	87	87	118
Human $\alpha$	18	0	87	84	85	89	115
Horse $\beta$	84	87	0	25	26	39	119
Human $\beta$	86	84	25	0	10	39	117
Human $\delta$	87	85	26	10	0	41	118
Human $\gamma$	87	89	39	39	41	0	121
Whale Mb	118	115	119	117	118	121	0

1b



THE EVOLUTION OF THE GLOBINS

Le tableau 1a est obtenu en comparant simplement les structures primaires par alignement, et en comptant le nombre d'acides aminés des différents entre les deux hémoprotéines considérées; les délétions ont été comptées comme une vingt-et-unième espèce d'acide aminé.

La seule interprétation rationnelle de ce tableau est donnée par l'arbre phylogénique représenté ci-contre, où les flèches indiquent une duplication. Les deux hémoglobines qui possèdent le moins de différences sont les hémoglobines humaines  $\delta$  et  $\beta$ ; viennent ensuite les chaînes  $\beta$  du cheval et de l'homme. C'est en procédant de la sorte qu'on établit l'arbre évolutif.

(\*) Extrait de Dickerson et Geis : "The Structure and Action of Proteins".

Quand nous avons abordé le présent travail, seules quelques myoglobines étaient connues : celle du cachalot et celle de la baleine (pour 60 résidus) (Edman, P., et al., 1967). La structure de la myoglobine de cheval (Dautrevaux, M., et al., 1969) et celle de quelques mammifères marins étaient en voie d'é-lucidation (Bradshaw, R.A., et al., 1969, a, b, c).

Il est assez curieux de constater que les hémoglobines de différents organismes ont été beaucoup plus étudiées que les myoglobines. Cela tient vraisemblablement à des considérations purement pratiques, liées à la dif-ficulté relative d'obtention de certaines protéines.

Depuis une dizaine d'années, plusieurs études sur les hémoglobines avi-aires étaient en cours dans notre laboratoire (Paul, C., 1969; Monier, C., 1972). L'étude de myoglobines d'oiseaux nous est apparue comme intéressante puisque toutes les myoglobines connues ou en voie de l'être étaient, à cette époque, et aujourd'hui encore, celles des mammifères.

Sur la base d'arguments biologiques, la classe des oiseaux est tradi-tionnellement subdivisée en trois sous-classes (Grasse et Devillers, 1965)

- les CARINATES (vingt ordres)
- les SPHENISCIFORMES (un ordre)
- - les RATITES (deux ordres actuels)

La poule est un représentant de la première, le manchot de la deuxième et l'autruche de la troisième sous-classe. L'étude des myoglobines de la pou-le et du manchot Empereur a déjà été entreprise (Deconinck, M., et al., 1972; Deconinck, M., 1973; Brown, W.D., 1971); celle de l'autruche le sera probable-ment avant longtemps. Dans la mesure où la classification qui précède est par-fois contestée (Storer, 1960) l'étude de la structure covalente de quelques pro-téines d'oiseaux permettra peut-être d'éclaircir ce problème.

Enfin, un dernier aspect revêt, à nos yeux, une importance non négligea-ble : c'est le développement des techniques pour l'analyse des structures pri-maires des protéines. Cet aspect, que l'on feint souvent d'ignorer, est impor-tant dans la mesure où la structure chimique d'une enzyme est nécessaire dans la discussion concrète de ses propriétés biologiques. Actuellement, on est trop souvent limité à la détermination de la structure primaire de protéines rela-tivement petites et seule la poursuite d'innovations sur le plan technologique permettra d'envisager l'étude de protéines de plus grande taille.

## RESUME

La myoglobine a été isolée à partir des muscles squelettiques du manchot par précipitation éthanolique en présence de sels de zinc et de plomb. Elle a été purifiée en premier lieu par filtration moléculaire sur gel de dextrane Sephadex, puis par chromatographie sur résine carboxyméthyl-Sephadex. La plus importante des fractions ainsi obtenues a été soumise aux tests de pureté par électrophorèse, sur divers supports et à différents pH.

Les principales caractéristiques physiques et chimiques de la myoglobine de manchot ont été déterminées. La masse molaire, le coefficient de sédimentation, la constante de diffusion, les coefficients d'extinction molaire des spectres ultraviolet et visible, ainsi que le spectre de dispersion rotatoire sont tous semblables aux valeurs trouvées pour les myoglobines de mammifères, et en particulier pour celle du cachalot que nous avons utilisée comme myoglobine de référence. Comme les autres myoglobines, celle du manchot est résistante à la dénaturation alcaline. Cet ensemble de données fait présumer une grande similitude dans les structures tridimensionnelles des deux hémoprotéines.

La composition en acides aminés distingue nettement la myoglobine de manchot des autres myoglobines. Comparativement, la teneur en méthionine y est particulièrement élevée, la proportion d'isoleucine faible, et le taux d'arginine élevé.

L'enchaînement des acides aminés dans la molécule a été établi à partir d'une variété de peptides. Ceux-ci ont été obtenus et isolés après coupure par la trypsine, par la chymotrypsine, par le bromure de cyanogène, ou encore par la trypsine après modification des résidus lysyls au moyen d'anhydride maléique. Les peptides, séparés et purifiés par différentes techniques chromatographiques et électrophorétiques, ont été analysés par la méthode de dégradation d'Edman couplée à la méthode de dansylation. Certains éléments de la structure primaire ont été obtenus ou confirmés par dégradation automatique au moyen de l'appareil dit "Sequencer".

L'enchaînement des acides aminés dans la myoglobine du manchot a été comparé à celui déjà établi pour divers mammifères.

Il ressort de cette comparaison que la myoglobine du manchot comporte un nombre de différences plus grand que pour les autres myoglobines. En particulier, quinze sites qui restent invariants dans ces dernières sont l'objet de substitutions dans la myoglobine du manchot. Toutefois, la majorité de ces substitutions sont conservatives.

L'analyse détaillée de la structure primaire de la protéine du manchot, en rapport avec la structure tridimensionnelle de la myoglobine du cachalot; semble indiquer que les interactions spécifiques existant dans la myoglobine du cachalot sont presque complètement conservées ici.

Un très haut degré de conservation des surfaces hydrophobes internes à la molécule a été mis en évidence.

# 1ERE PARTIE

## ISOLEMENT ET CARACTERISATION DE LA MYOGLOBINE DU MANCHOT EMPEREUR

(Aptenodytes Forsteri)

I	<u>INTRODUCTION</u>	p.10
II	<u>PREPARATION ET PURIFICATION</u>	p.12
	A. EXTRACTION	
	B. ISOLEMENT ET PURIFICATION	
	1) Filtration moléculaire	
	2) Chromatographie sur échangeurs d'ions	
	C. ELIMINATION DE L'HEME	
III	<u>CRITERES D'HOMOGENEITE</u>	
	A. CRITERES BASES SUR LA MASSE MOLAIRE	p.14
	1) Filtration moléculaire	
	2) Sédimentation et diffusion	
	B. CRITERES BASES SUR LA CHARGE	
	1) Electrophorèse	
	a) sur amidon	
	b) sur acétate de cellulose	
	c) sur gel de polyacrylamide	
	2) Electrofocalisation	
	C. CRITERES BASES SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE	p.16
	1) Résidu N-terminal	
	2) Enchaînement N-terminal	

## VI CARACTERISATION DE LA MYOGLOBINE

A. MASSE MOLAIRE	p.18
1) Dosage du Fer	
2) Masse molaire absolue, approximative, par filtration sur gel	
3) Sédimentation et diffusion	
a) vitesse de sédimentation	
b) constante de diffusion	
B. CHARGE	p.20
Electrofocalisation et pH isoléctrique	
C. PROPRIETES OPTIQUES	p.21
1) Spectres U.V. et visible	
2) Dispersion rotatoire; hélicité	
D. CARACTERISATION CHIMIQUE	p.22
1) Composition en acides aminés	
a) par hydrolyse acide directe	
b) par hydrolyse acide après oxydation à l'acide performique	
c) Détermination du tryptophane par la N-bromosuccinimide	
2) Résidus N-terminaux	
3) Dénaturation alcaline	
V DISCUSSION DES RESULTATS	p.25

## I INTRODUCTION

La première myoglobine que nous ayons examinée est celle isolée des coeurs de poulet. A cette époque, les méthodes de préparation utilisées pour les quelques myoglobines de mammifères déjà connues, consistaient à précipiter ou à cristalliser la protéine par des solutions salines concentrées (sulfate d'ammonium; phosphate; acétate de plomb; ou combinaison de plusieurs parmi ces sels; Kendrew et al., 1954; Theorell, H., 1932; Dautrevaux, M. et al., 1967).

Il était donc indispensable de relever les courbes de solubilité en fonction de la concentration en sulfate d'ammonium, par exemple, afin d'établir la meilleure zone de relargage. Les résultats obtenus n'étaient cependant guère reproductibles. La concentration en myoglobine étant, semble-t-il, variable d'un lot de coeurs à un autre, il a fallu se résoudre à utiliser une zone de précipitation assez large, avec l'inconvénient d'entraîner des quantités non négligeables d'autres protéines et notamment d'hémoglobine.

Nous avons été amené à poursuivre la purification par des méthodes chromatographiques. La méthode de Brown (1961), qui utilise la chromatographie sur DEAE-cellulose, s'est avérée insuffisante pour réaliser sur ce seul support la purification de la myoglobine précipitée. Les fractions obtenues de cette manière apparaissent en effet hétérogènes à l'électrophorèse. Nous avons alors recouru à des filtrations moléculaires sur gel de dextrane Sephadex G 75 et G 50; nous avons finalement adopté le Sephadex G 50 fine (Awad, 1963), qui permet d'obtenir une fraction homogène du point de vue de la masse molaire. Cette fraction a encore été soumise à des chromatographies sur différents supports : DEAE-cellulose, DEAE-Sephadex, CM-cellulose, etc.; c'est le CM-Sephadex qui a finalement été adopté comme support chromatographique pour la purification préparative de la myoglobine.

Dans le cas de la myoglobine de manchot, on se trouvait devant une quantité importante de muscles riches en myoglobine. C'est pourquoi nous avons pu adopter la méthode mise au point par Hardman (1966) pour la préparation de la myoglobine de cachalot. Cette méthode consiste à précipiter la myoglobine, en solution éthanolique à basse température, par des ions zinc et plomb. Un tel traitement a l'avantage d'être rapide et de limiter la durée des centrifugations au minimum; il conduit à une préparation "brute" déjà très riche en myoglobine.

Cette préparation a subi par la suite une filtration moléculaire sur gel de dextrane Sephadex G 50 fine. La fraction ainsi obtenue est homogène sous l'angle de la masse molaire; elle est alors soumise à une chromatographie sur résine CM-Sephadex C 50.

Plusieurs fractions sont ainsi séparées; les premières sont peu concentrées et de caractère non myoglobinique, les autres sont toutes des fractions myoglobiniques. Ceci témoigne d'un phénomène qui est général dans le cas des myoglobines : l'hétérogénéité des préparations. Actuellement, on ne sait pas de façon rigoureuse si cette hétérogénéité n'est pas due à une différence dans la structure covalente. Aussi avons-nous préféré travailler sur la fraction chromatographique la plus importante pour caractériser la myoglobine de manchot et en faire l'étude de la structure primaire.

## II. PREPARATION ET PURIFICATION

### A. EXTRACTION

L'oiseau dont nous avons prélevé les muscles nous a été donné généreusement par le Jardin Zoologique d'Anvers\*. Le manchot, gravement blessé après un combat, avait dû être sacrifié. Il avait été conservé à basse température (-25 °C). Les muscles, prélevés à température aussi basse que possible ( $\pm 3$  °C), ont été coupés en petits morceaux et soumis au traitement suivant.

Les fragments musculaires sont placés dans un volume d'eau équivalent et broyés au "mixer". La suspension est pressée au travers d'une étamine. L'extrait est centrifugé à faible vitesse et filtré à nouveau mais sur papier. L'extrait aqueux est ajusté à pH 6.5 avec NaOH 0.5 M. La solution est alors refroidie à -15 °C en même temps que l'on y ajoute de l'alcool éthylique ) 95 % pour obtenir une concentration finale de 25 % (v/v).

Une solution saturée d'acétate de plomb est alors ajoutée, jusqu'à une concentration finale de 4 mM/l. La suspension ainsi obtenue est agitée à basse température pendant une heure, puis centrifugée. Le précipité est éliminé.

Le surnageant est ajusté à pH 7.3 et la myoglobine est précipitée par addition d'acétate de zinc jusqu'à une concentration finale de 10 mM/l. Le précipité est centrifugé; il est ensuite dissous dans une solution d'éthylène diamine tétracétate (E.D.T.A.) à 4 °C, dialysé contre une solution millimolaire d'E.D.T.A., puis contre de l'eau. La solution de myoglobine ainsi obtenue est lyophilisée. Le rendement de l'opération est de l'ordre de 15 grammes de myoglobine "brute" par kilo de muscle.

---

\* Nous remercions la Direction du Jardin Zoologique d'Anvers de nous avoir procuré gracieusement le matériel de base pour nos investigations.

## B. ISOLEMENT ET PURIFICATION

### 1. Filtration moléculaire

La préparation brute de myoglobine est soumise à une filtration moléculaire sur gel de dextrane Sephadex G 50 fine. Le but de cette séparation est d'obtenir une fraction homogène du point de vue de la masse molaire, c'est-à-dire débarrassée des traces d'hémoglobine et des formes polymérisées de myoglobine. Rappelons que la masse molaire est le seul critère facilement accessible qui permette de distinguer la myoglobine de l'hémoglobine.

Les fractionnements de ce type ont été répétés de nombreuses fois afin d'accumuler le matériel protéinique nécessaire à la suite des opérations. La figure 2 présente le diagramme d'élution d'une de ces opérations et les conditions expérimentales utilisées. Le volume d'élution du pic principal est identique à celui de la myoglobine du cachalot (figure 4).

La fraction principale rechromatographiée dans les mêmes conditions, donne un seul pic, symétrique, dont le volume d'élution est identique à celui obtenu lors de la première chromatographie.

La myoglobine est dialysée et lyophilisée. La préparation obtenue après une lyophilisation trop longue peut présenter les signes de formation de dimères de myoglobine, comme le montre la figure 3.

### 2. Chromatographie sur échangeurs d'ions

Après avoir essayé différents support chromatographiques, nous avons retenu le carboxyméthyl-Sephadex C 50 en raison de la reproductibilité du conditionnement de la résine et des résultats chromatographiques. L'échantillon de myoglobine est dissous dans le tampon de départ et traité pendant une heure par une petite quantité de  $K_3Fe(CN)_6$  solide qui a pour but de transformer complètement la myoglobine en "metmyoglobine". L'élution se fait par un gradient linéaire de pH et de force ionique. La figure 5 présente le diagramme d'élution. La fraction chromatographique la plus importante (fraction n°5), qui représente approximativement 60 % du matériel de départ, est celle qui a été ultérieurement caractérisée et dont

Absorbance  
(D.O. à 280 nm)

FILTRATION MOLECULAIRE DE LA MYOGLOBINE  
DE MANCHOT SUR GEL DE DEXTRANE SEPHADEX  
G 50 FINE

---

Colonne : 2,7 x 95 cm  
Eluant : tampon phosphate 0,05 à pH 6,5  
Température : 4 °C  
Fractions : 8 ml  
Débit : 40 ml/heure  
 $V_0$  : volume d'exclusion

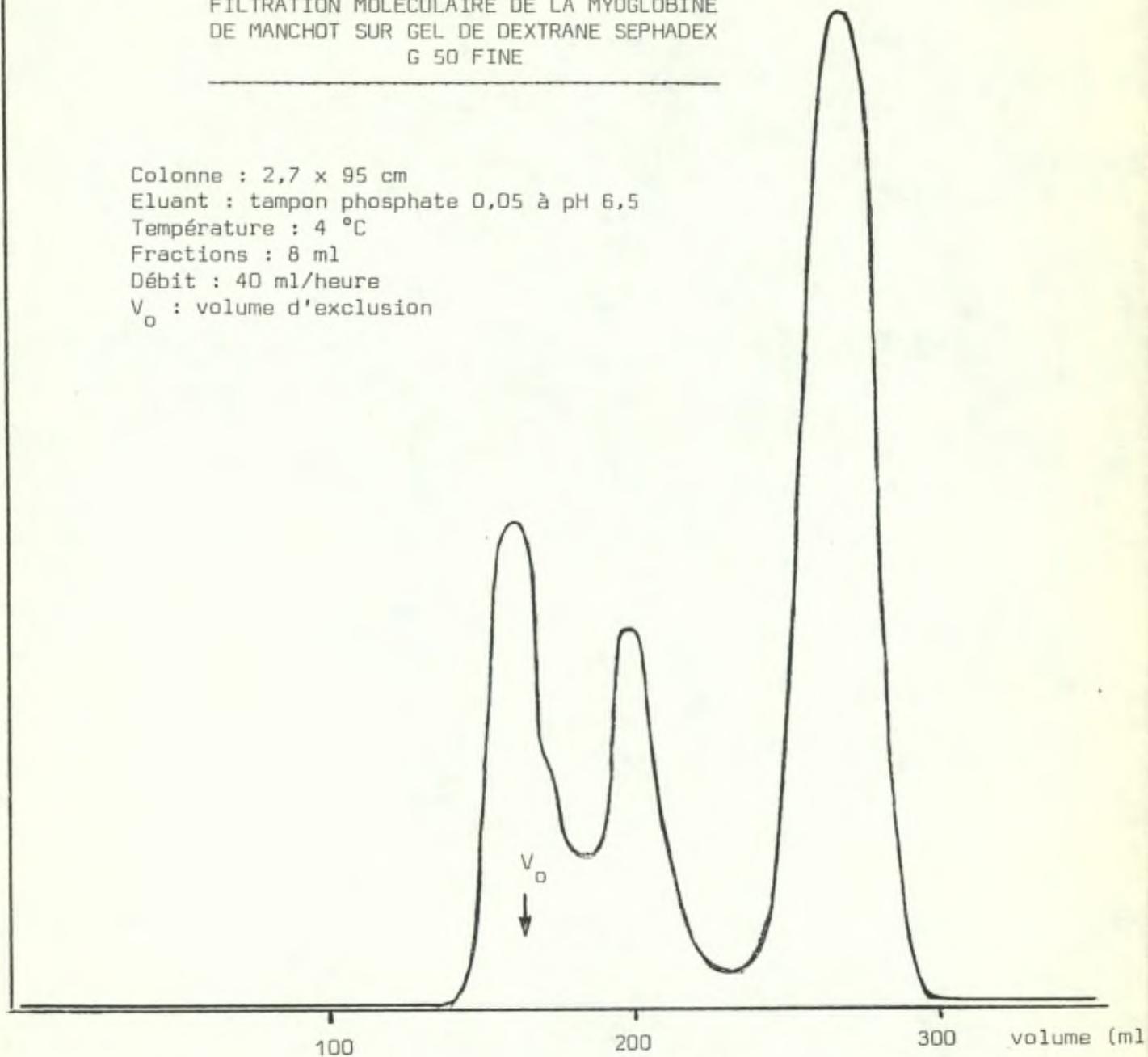


FIGURE 2

Absorbance  
(D.O. à 280 nm)

RECHROMATOGRAPHIE DE LA MYOGLOBINE DE MANCHOT  
ISOLEE SUR SEPHADEX G 50 FINE APRES LYOPHILISATION

---

Colonne : 2,7 x 95 cm  
Eluant : tampon phosphate 0,05 M à pH 6,5  
Température : 4 °C  
Fractions : 8 ml  
Débit 40 ml/heure  
 $V_0$  : volume d'exclusion

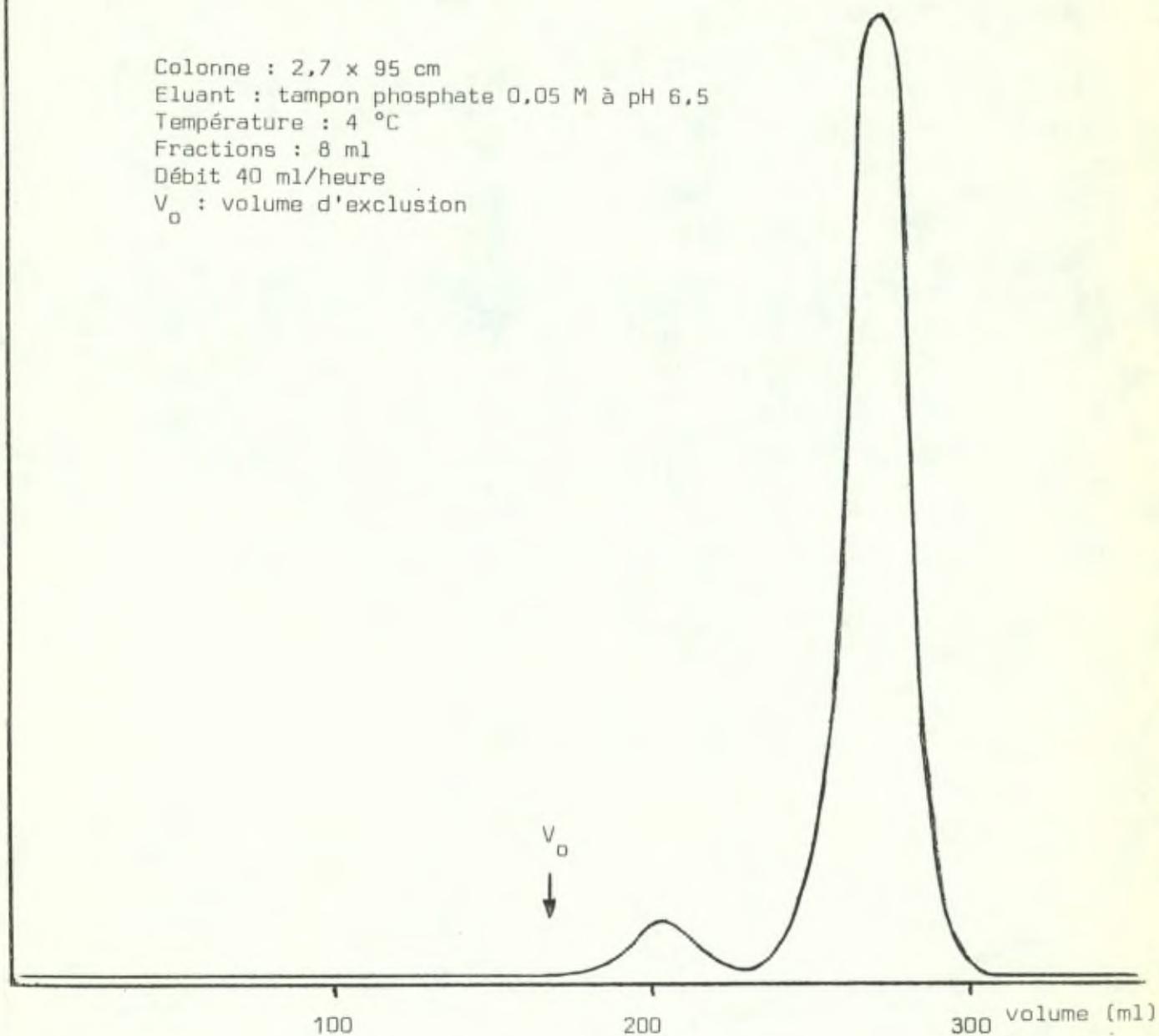


FIGURE 3

Absorbance  
(D.O. à 280 nm)

FILTRATION MOLECULAIRE DE LA MYOGLOBINE  
DE CACHALOT (Fluka) SUR GEL DE DEXTRANE  
SEPHADEX G 50 FINE

---

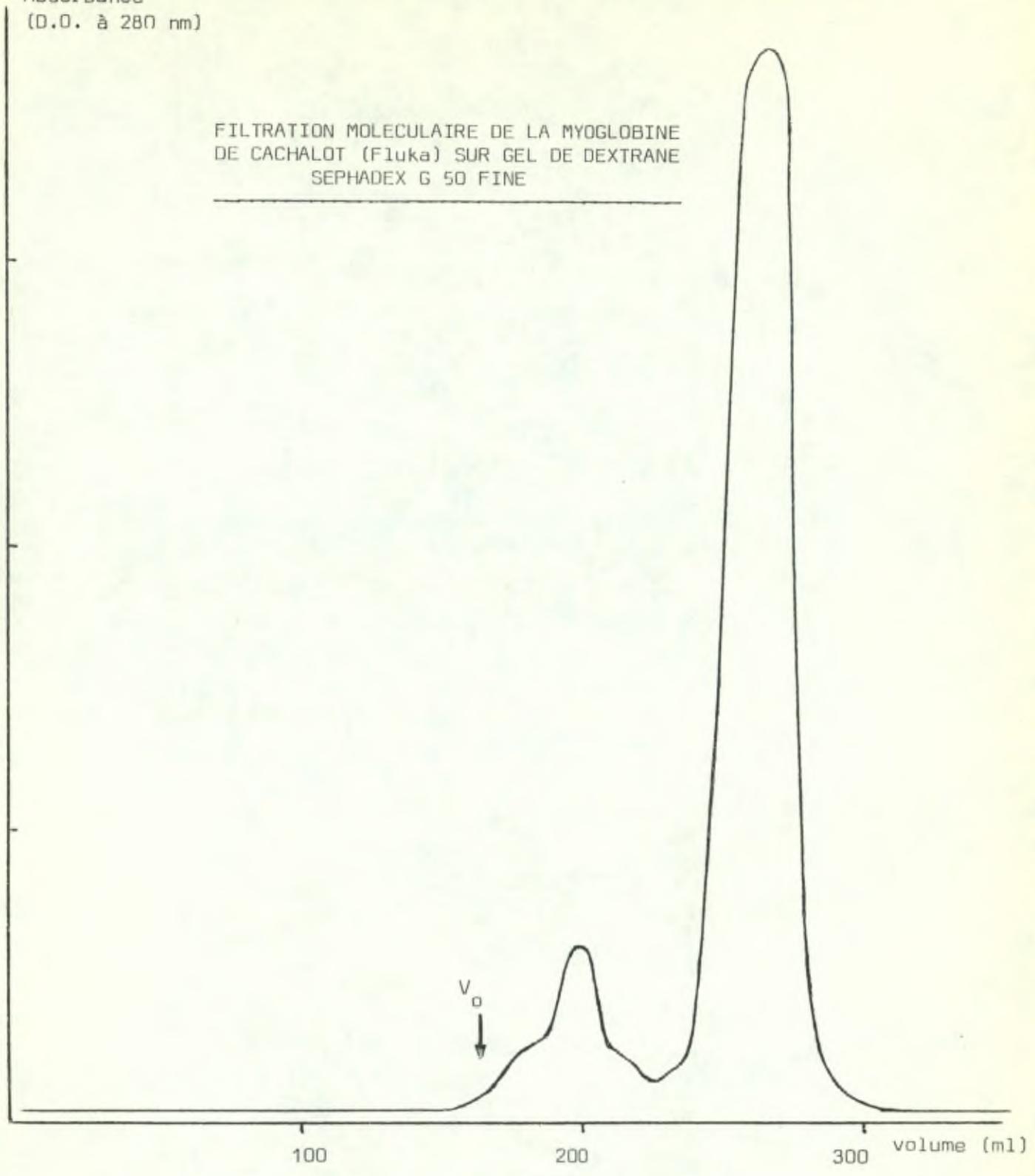


FIGURE 1

CHROMATOGRAPHIE SUR CARBOXYMETHYL-SEPHADEX C 50  
DE LA FRACTION MYOGLOBINIQUE ISOLEE SUR  
SEPHADEX G 50

Absorbance  
(D.O. à 280 nm)

Colonne : 5 x 50 cm  
Eluant : gradient linéaire  
tampon phosphate :  
1,5 l 0,05 M pH 6,5  
1,5 l 0,05 M pH 7  
Température : 4 °C  
Fractions : 15 ml  
Débit : 50 ml/heure

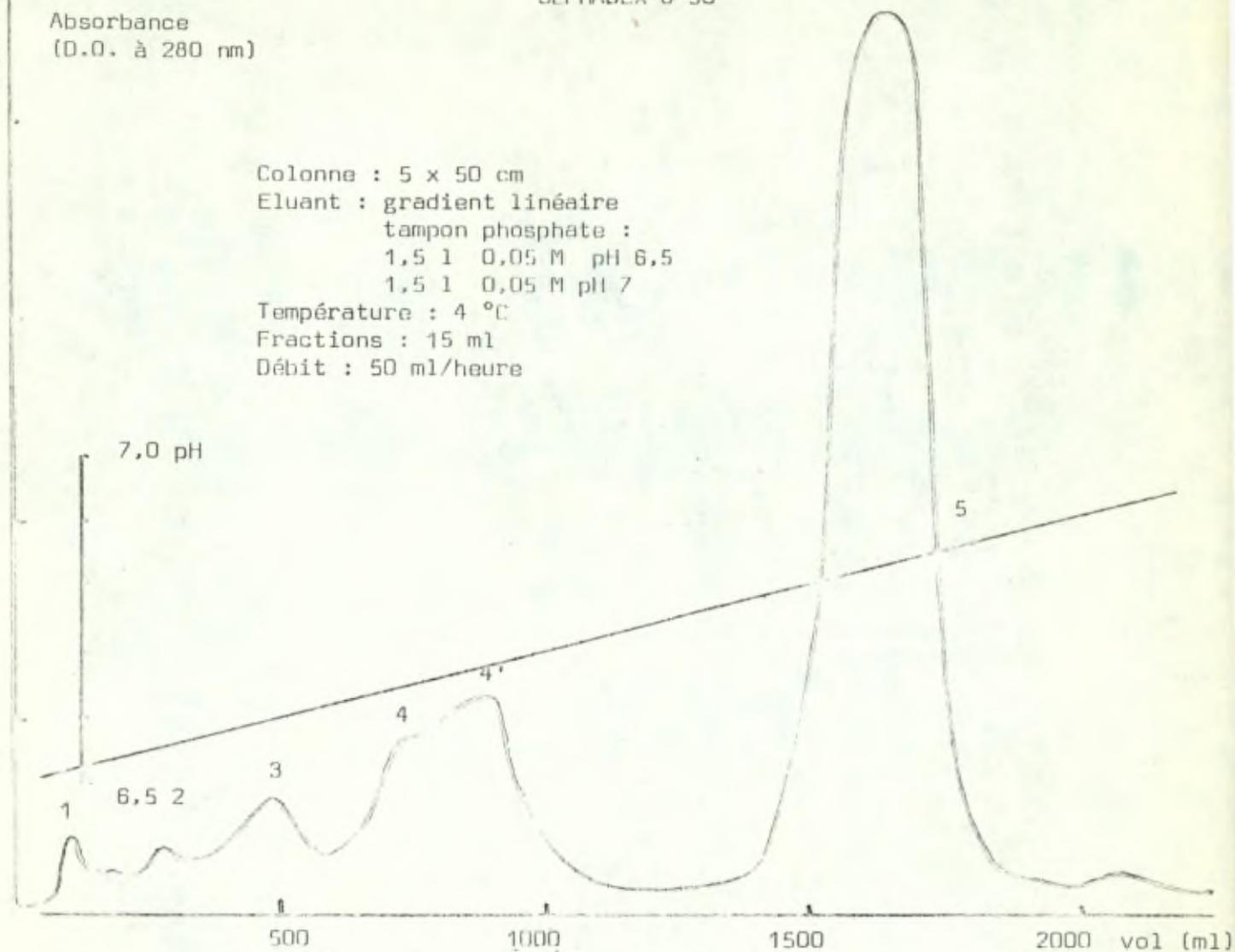


FIGURE 5

l'étude de la structure primaire a été entreprise. La figure 5 donne la chromatographie et les conditions expérimentales utilisées.

Le pic principal (fraction n°5) est ensuite dialysé contre du NaCl (0.1 M) puis contre de l'eau distillée, puis lyophilisé.

### C. ELIMINATION DE L'HEME

Nous avons utilisé la méthode décrite par Teale (1959) pour la séparation hème-globine. Elle consiste à émulsionner à 4 °C une solution aqueuse à pH 1.5 (HCl) de myoglobine avec de la méthyléthylcétone. L'apoprotéine reste en solution aqueuse tandis que l'hème passe dans la phase organique. Souvent, quand on acidifie la solution, il y a précipitation partielle de la myoglobine. Il nous a paru préférable d'ajouter goutte à goutte une solution aqueuse concentrée de myoglobine à une émulsion de méthyléthylcétone et d'HCl à pH 1.5.

L'extraction de la phase aqueuse est répétée trois fois et la solution limpide obtenue est dialysée d'abord contre une solution de bicarbonate de Na (50 mg/l), puis contre de l'eau distillée; elle est enfin lyophilisée.

### III CRITERES D'HOMOGENEITE

Certains des critères d'homogénéité cités ci-dessous sont issus d'expériences décrites ou reprises en détails soit dans le chapitre précédent, soit dans le suivant. Il s'agit de la filtration moléculaire, de la sédimentation et de la diffusion, de l'électrofocalisation et de la détermination du résidu N-terminal.

## A. CRITERES BASES SUR LA MASSE MOLAIRE

### 1. Filtration moléculaire

Les chromatographies sur Sephadex G 50 fine et rechromatographies sur le même support nous montrent que la préparation est homogène du point de vue de la masse molaire aux limites accessibles par ce genre d'expérience.

### 2. Sédimentation et diffusion

Le pic de sédimentation est unique et symétrique. Les franges de diffusion sont symétriques.

## B. CRITERES BASES SUR LA CHARGE

### 1. Electrophorèse

#### a) sur amidon

L'électrophorèse de la fraction principale de metmyoglobine de manchot n'a révélé qu'une seule bande directement visible.

Il en est de même après coloration à l'amido-schwartz. Le gel est préparé d'après la technique de Smithies (1959) en présence de tampon phosphate 0.04 M à pH 7.8 ; tampon d'électrode : phosphate 0.05 M à pH 7.4 . Conditions : 200 V, 15 mA, 1.30 heure.

#### b) sur acétate de cellulose

L'électrophorèse de la metmyoglobine sur acétate de cellulose (feuille 2,5 x 17 cm) en présence de tampon phosphate 0.04 M à différents pH entre 7 et 8 ne révèle qu'une seule bande.

Conditions : 200 V, 8 mA, 45 minutes.

c) sur gel de polyacrylamide

Sur gel de polyacrylamide à pH 9.5 (28,8 g de glycine et 6,0 g de trishydroxyméthylaminométhane/l) et à pH 4.3 (31,2 g de  $\beta$ -alanine et 8 ml d'acide acétique concentré/l) la fraction principale ne montre qu'une seule bande. Conditions : 200 V, 4 mA/tube, 150 minutes.

2. Electrofocalisation

L'électrofocalisation de la metmyoglobine, contrairement aux électrophorèses décrites dans le paragraphe précédent, montre une légère hétérogénéité par la présence de bandes de faible intensité relativement à la bande principale (voir graphique 6).

C. CRITESES BASES SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE1. Résidu N-terminal

Le résidu N-terminal a été déterminé par la méthode de carboxylation de Stark et Smyth (1963) comme étant la glycine.

Les autres acides aminés, dont le plus important est l'acide glutamique, ne sont pas représentés à plus de 4 %. La figure 7a montre l'analyse des acides aminés selon Moore et Stein identifiant la glycine comme résidu N-terminal. Le deuxième chromatogramme, superposé au premier, est celui du "blanc" correspondant. Celui-ci a été obtenu en traitant une quantité d'apomyoglobine équivalente à celle de la première courbe mais en omettant le traitement par le cyanate et par l'urée.

Il est d'usage de considérer la détermination du résidu N-terminal comme étant un critère de pureté. On ne peut toutefois affirmer qu'une protéine est pure que si on obtient pour elle une séquence unique, et non pas seulement le premier résidu de cette séquence.

Absorbance  
(D.O. à 280 nm)

FOCALISATION ISOELECTRIQUE DE LA  
MYOGLOBINE DE MANCHOT  
PURIFIEE SUR CM SEPHADEX C50

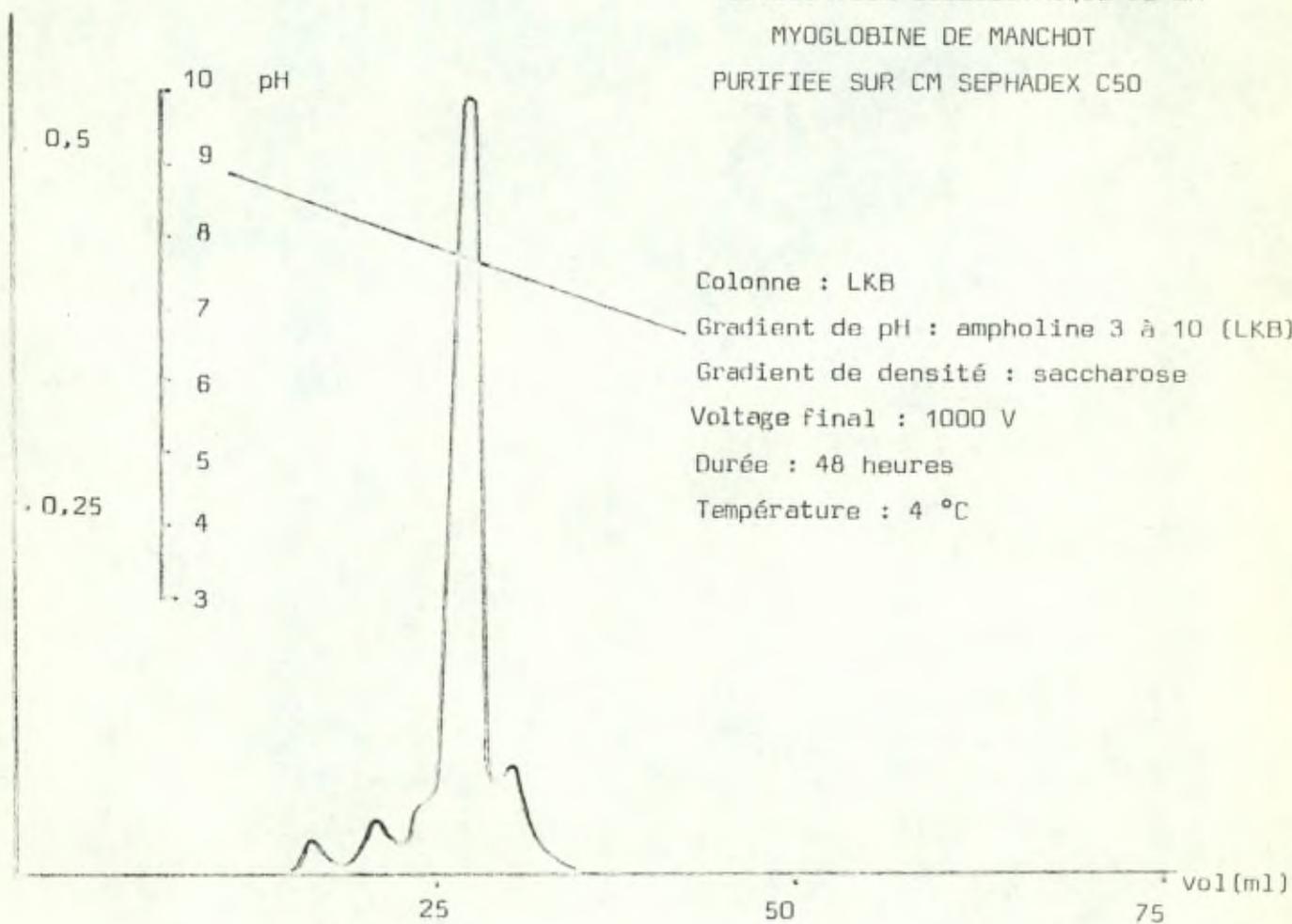
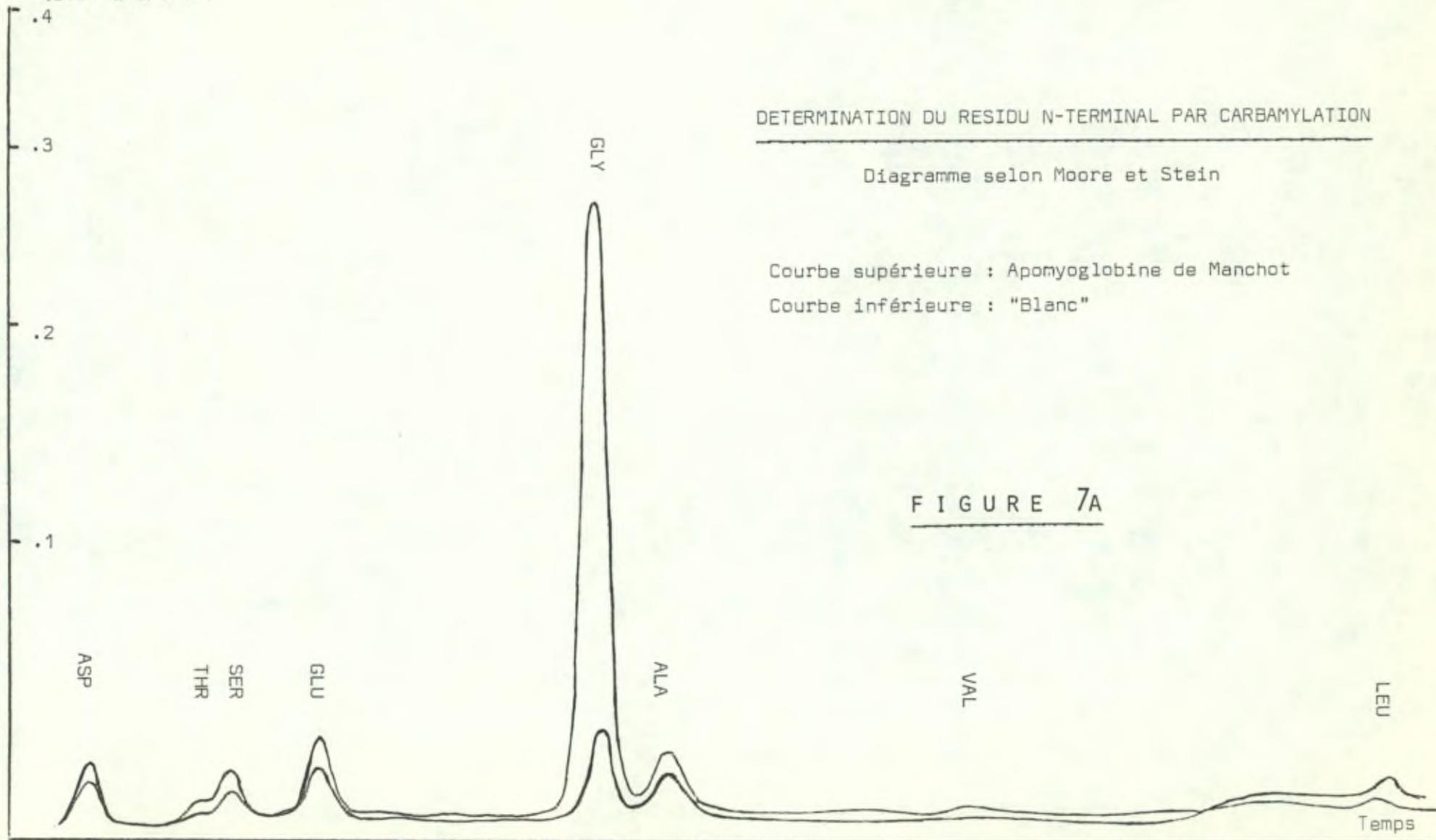


FIGURE 6

Absorbance  
(D.O. à 570 nm)



## 2. Enchaînement N-terminal

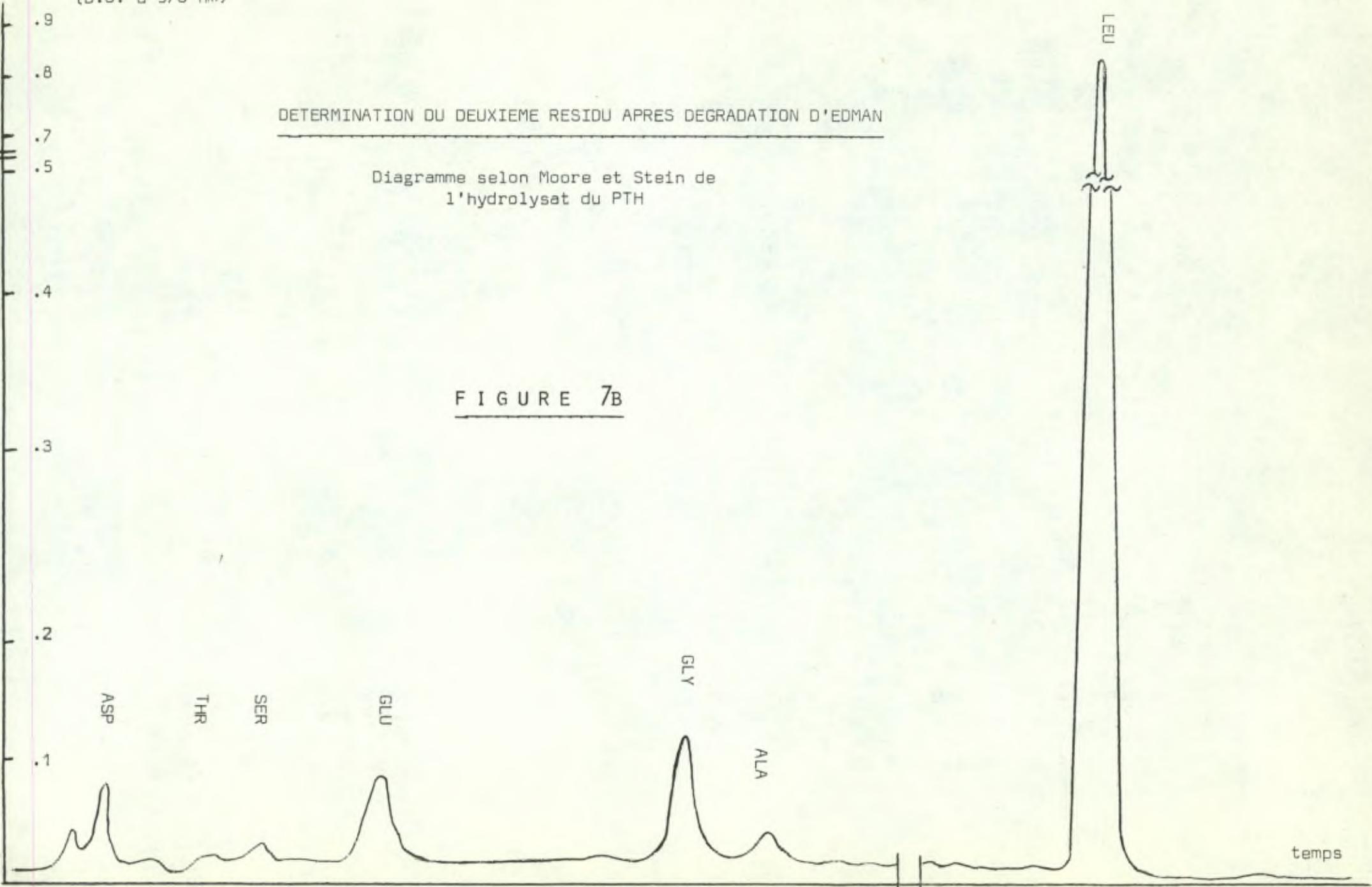
L'étude du début de la structure covalente de l'apomyoglobine du manchot sur un appareil de dégradation automatique nous a permis d'observer qu'à chaque stade de dégradation, et cela pour les dix-sept premiers résidus et aux limites de rendement de l'appareil, le résidu identifié était unique. Les graphiques 7b et 7c montrent les résidus de leucine résultant de l'hydrolyse de la phénylthiohydantoïne (P.T.H.) obtenue après la deuxième et à la onzième étape de dégradation automatique sur l'appareil dit "Sequencer".

Absorbance  
(D.O. à 570 nm)

DETERMINATION DU DEUXIEME RESIDU APRES DEGRADATION D'EDMAN

Diagramme selon Moore et Stein de  
l'hydrolysat du PTH

FIGURE 7B

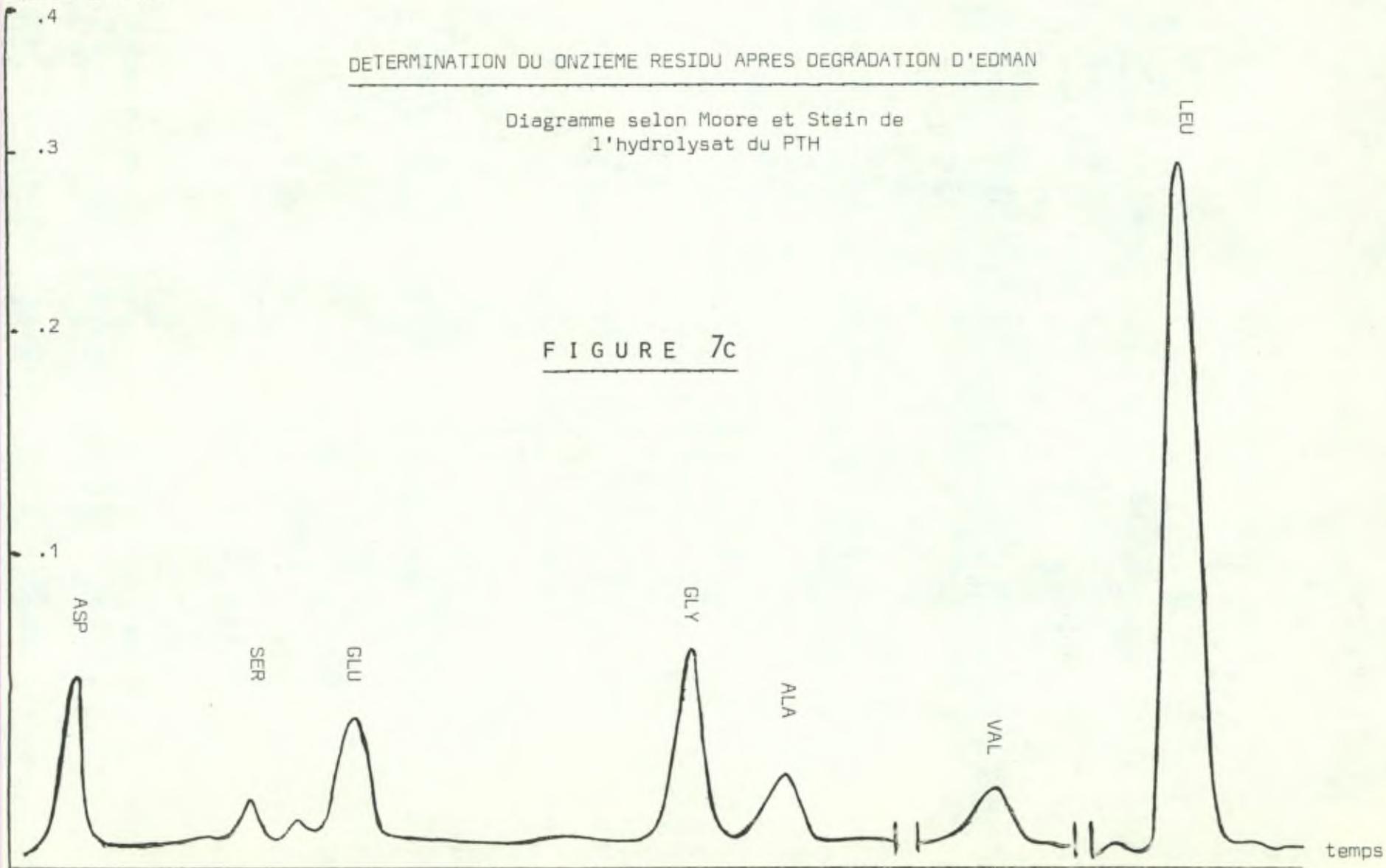


Absorbance  
(D.O. 570 nm)

DETERMINATION DU ONZIEME RESIDU APRES DEGRADATION D'EDMAN

Diagramme selon Moore et Stein de  
l'hydrolysat du PTH

FIGURE 7c



#### IV CARACTERISATION DE LA MYOGLOBINE

##### A. MASSE MOLAIRE

###### 1. Dosage du Fer et détermination de la masse molaire minimum

Si l'on admet la présence d'un atome de fer dans la molécule de myoglobine, la détermination du pourcentage de fer doit permettre de calculer la masse molaire à attribuer à cette hémoprotéine.

Nous avons utilisé la technique de A.D. Adler (1966) de dosage du fer dans les échantillons biologiques. Après minéralisation d'un échantillon de myoglobine, préalablement pesé, par un mélange d'acide perchlorique et d'eau oxygénée et réduction du fer à l'état de  $Fe^{++}$  par une solution d'hydroxylamine, on fait réagir la solution avec l'*o*-phénanthroline. Le  $Fe(II)$  donne avec ce composé un complexe fortement coloré. La densité optique, mesurée à 509 nm, est rapportée à une courbe de référence établie à partir de sel de Mohr. Trois essais indépendants nous ont permis d'attribuer la masse molaire minimum de  $18.500 \pm 1500$  u.m.a à la myoglobine de manchot.

###### 2. Détermination de la masse molaire absolue, approximative par filtration sur gel de dextrane

La filtration sur gel de dextrane Sephadex ou sur gel de polyacrylamide "Biogel" permet d'obtenir la masse molaire d'une protéine globulaire avec une bonne approximation (Determan, 1967).

Nous avons mesuré le volume d'exclusion ( $V_0$ ) d'une colonne de dextrane Sephadex G 50 fine avec une solution de bleu de dextrane ( $M > 300.000$ ). Nous avons mesuré sur la même colonne le volume d'élution d'une solution de myoglobine de manchot et également celui de la myoglobine de référence, celle du cachalot. Les valeurs obtenues étant confondues dans la limite d'erreur expérimentale, nous avons chromatographié sur la même colonne une solution contenant les deux myoglobines en mélange et avons

obtenu un seul pic symétrique, ce qui montre la similitude de masse molaire des deux myoglobines.

La masse molaire absolue approximative de la myoglobine de manchot est donc la même que celle du cachalot qui a pour valeur 17.400.

### 3. Sédimentation et diffusion

#### a) Vitesse de sédimentation (\*)

La vitesse de sédimentation a été mesurée sur des solutions de metmyoglobine en solution tampon (Tris 0.05 M pH 8) et préalablement dialysée contre le même tampon, la concentration en protéine allant de 2,5 à 10 mg/ml (ultracentrifugeuse Spinco Beckman, mod. E, à 59.780 tours/min., 20 °C).

<u>Concentration mg/ml</u>	<u>S</u> 10. <sup>-13</sup>
2,5	2,016
5,0	1,865
7,5	1,725
10,0	1,775

Valeur extrapolée à concentration nulle : 2,061

$\sigma$  : 0,035

Le coefficient de sédimentation a été déterminé par traitement des valeurs mesurées au microcomparateur sur les photographies prises en cours de sédimentation. La valeur extrapolée à concentration nulle est de 2,06 S. Les valeurs trouvées dans la littérature pour d'autres myoglobines sont situées entre 1,80 et 2,1 S

#### b) Constante de diffusion

Les mesures ont été réalisées au moyen de l'interféromètre à diffusion Zeiss réalisé selon les principes

---

(\*) Nous remercions Madame Hannequart et Monsieur Depuyt de l'Institut Pasteur qui ont effectué les mesures de vitesse de sédimentation.

développés par Antweiler (1952). La constante de diffusion a été déterminée suivant la méthode de Longworth (1953) à partir des clichés photographiques d'interférogrammes. Les solutions de metmyoglobine à 7,0 mg/ml en tampon Tris 0,05 M pH 8, avaient été préalablement dialysées contre le même tampon. La valeur du coefficient de diffusion est égale à  $0,98.10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ sec}^{-1}$ .

Considérant un volume spécifique partiel égal à 0,74 (Hill, 1964), nous avons pu, en combinant les valeurs obtenues pour les coefficients de sédimentation et de diffusion, obtenir une valeur approximative de 18.000 pour la masse molaire de la myoglobine de manchot.

Seule la valeur du coefficient de sédimentation est extrapolée à concentration nulle. C'est la raison pour laquelle notre valeur de masse molaire n'est qu'approximative.

## B. CHARGE

### Electrofocalisation et pH isoléctrique

Une solution de metmyoglobine (provenant de la fraction purifiée sur CM-Sephadex), préalablement traitée par le ferricyanure de potassium, a été appliquée à une colonne d'électrofocalisation contenant un gradient de pH allant de 3 à 10, réalisé à l'aide de solutions d'ampholines et supporté par un gradient de saccharose. Toute l'expérience est réalisée à 4 °C. Le voltage final est de 1000 V et l'expérience a été menée durant 48 heures.

Le diagramme d'élution de la colonne est présenté dans la figure 6. La mesure du pH à température ordinaire a permis d'établir la courbe de pH du gradient (pHmètre Radiometer mod. 26). Le pH isoélectrique de la myoglobine de manchot à 4 °C est de 7.95 pH (25 °C). A côté de la bande principale, on constatera la présence de bandes de faible intensité qui n'apparaissent dans aucun des tests électrophorétiques comme décrit dans le chapitre précédent.

## C. PROPRIETES OPTIQUES

### 1. Spectres U.V. et visible

La concentration massique de solutions de metmyoglobine a été déterminée par mesure de poids sec à 105 °C. Les spectres ultraviolet et visible ont été établis avec un spectrophotomètre CARY, modèle 14, après dilution quantitative de la solution initiale de concentration massique connue. La valeur du coefficient d'extinction molaire à 280 nm calculé sur la base de 18000 u.m.a. pour la valeur de la masse molaire, à partir de trois expériences indépendantes, est de  $(3,30 \pm 0,10) \times 10^4$ .

La valeur du coefficient d'extinction mesuré au maximum de la bande de Soret ( $\pm 409$  nm) est de  $(16,2 \pm 0,10) \times 10^4$ .

Les valeurs sont semblables à celles qui sont obtenues pour d'autres myoglobines (Bradshaw, 1968).

### 2. Dispersion rotatoire; hélicité (fig. 8)

Le spectre de dispersion rotatoire a été établi au moyen d'un spectropolarimètre Bellingham and Stanley Polarmatic, équipé de cellules en quartz de 1 cm de trajet optique.

Les spectres de plusieurs solutions de ferrimyoglobine (Metmyoglobine) ont été utilisés à des concentrations de l'ordre de 0,1 à 0,5 mg/ml.

Les pH des solutions s'étagaient dans la gamme de 6.0 à 7.0 et la force ionique était assurée par un tampon 0.05 M à 0.1 M constitué par l'acide 2-(N-morpholino)-éthane sulfonique ou par un tampon phosphate.

Les spectres de dispersion rotatoire ont été établis dans les mêmes conditions pour la myoglobine de poule et pour la myoglobine de cachalot prise comme protéine de référence.

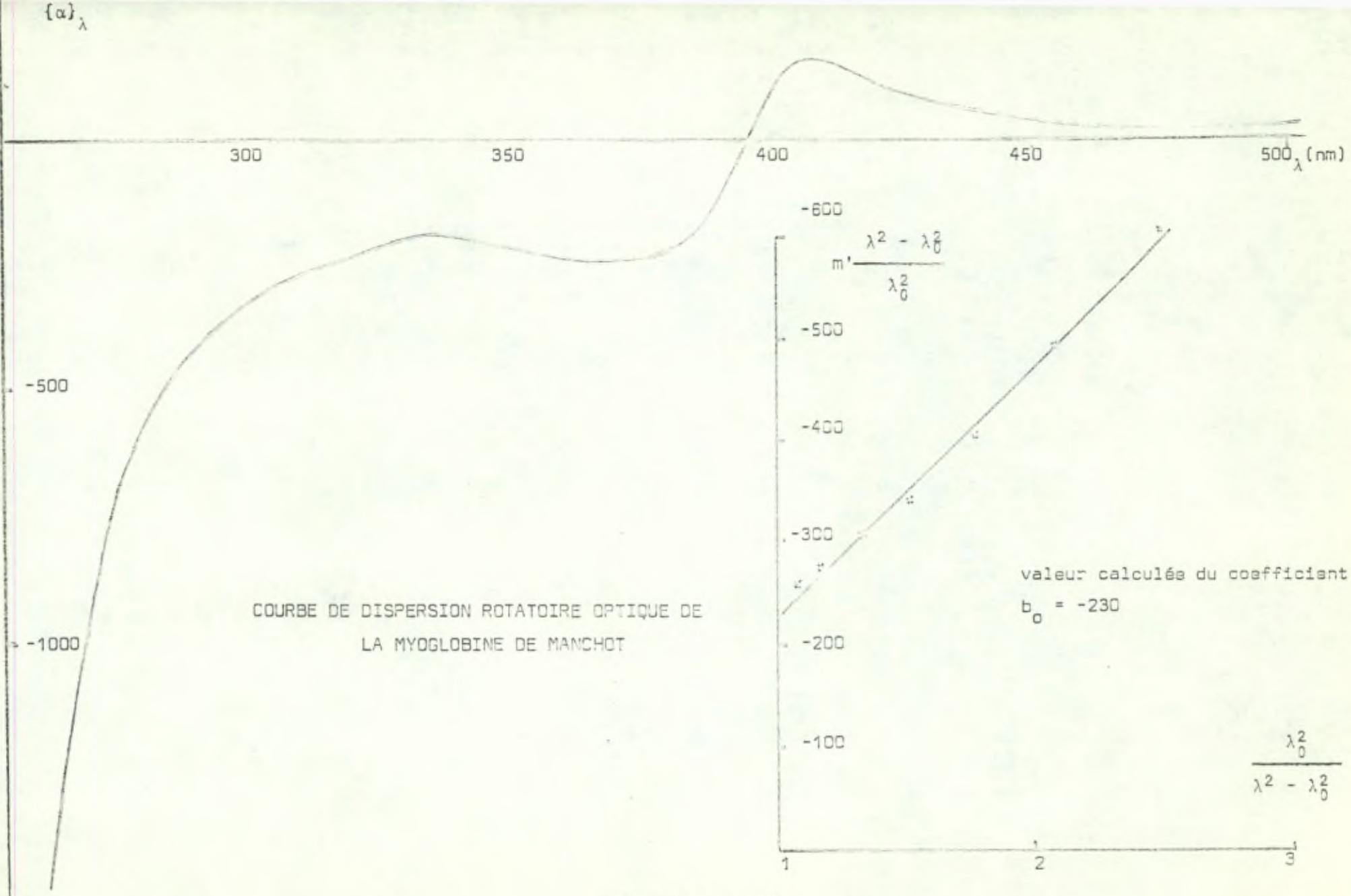


FIGURE 8

Le pourcentage de ces trois myoglobines en  $\alpha$ -hélices a été déterminé par l'équation de Yang et Moffit (1956) :

$$[m']_{\lambda} = \frac{a_0 \lambda_0^2}{\lambda^2 - \lambda_0^2} + \frac{b_0 \lambda_0^4}{(\lambda^2 - \lambda_0^2)^2} = (\alpha)_{\lambda} \frac{M_R}{100} \frac{3}{n_{\lambda}^2 + 2}$$

$[m']_{\lambda}$  : rotation moyenne par résidu

$(\alpha)_{\lambda}$  : rotation spécifique

$M_R$  : masse molaire moyenne par résidu trouvé, égale à 120 pour la myoglobine de manchot

$n_{\lambda}$  : indice de réfraction (considéré comme de l'eau)

Des valeurs de  $b_0 = -360$  pour une hélice parfaite  
 $b_0 = +70$  pour une pelote statistique  
ont été utilisées (Moffit, 1965)

Le calcul du paramètre de  $b_0$  a été limité à la partie du spectre comprise entre 250 et 300 nm, en raison de l'influence de l'hème au-delà de 300. La valeur de  $b_0$  est de -230.

Aucune différence significative n'a été décelée entre les trois protéines.

Les pourcentages d' $\alpha$ -hélices, semblables pour les trois myoglobines, sont de l'ordre de 70 %.

#### D. CARACTERISATION CHIMIQUE

##### 1. Composition en acides aminés

###### a) par hydrolyse acide directe

La composition de l'apomyoglobine de manchot a été déterminée après hydrolyse par l'acide chlorhydrique azéotropique en tubes scellés sous vide.

Les hydrolyses ont été poursuivies à 105 °C pendant des durées de 24, 48, 72 et 96 heures. Trois hydrolysats ont été examinés pour chaque temps d'hydrolyse. Les hydrolysats ont été analysés selon la technique de Spackman, Moore et Stein (1958), sur un analyseur Unichrom Beckman.

b) par hydrolyse acide après oxydation à l'acide performique

La méthionine est déterminée avec plus de précision sous forme de méthionine sulfone, c'est la raison pour laquelle nous avons procédé à l'oxydation performique de la protéine par la technique décrite par Hirs (1967). La protéine oxydée est ensuite soumise à une hydrolyse par l'HCl azéotropique pendant 20 heures à 110 °C.

Le tableau suivant donne la composition des myoglobines de manchot et de poule. Les valeurs entières sont déduites des valeurs expérimentales moyennes compte tenu de la libération progressive de certains acides aminés ou de leur destruction au cours du temps.

T A B L E A U : COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES  
 APOMYOGLOBINES DE LA POULE, DU  
 MANCHOT, DU CACHALOT ET DU CHEVAL

ACIDES AMINES	RESIDUS/MOLE (M = 17.000)				
	MANCHOT		POULE (a)	CACHALOT (b)	CHEVAL (c)
Lysine	18	18	20	19	19
Histidine	9	9	9	12	11
Arginine	6	5	3	4	2
Acide Aspartique	11	11	12	8	10
Thréonine	7	7	7	5	7
Sérine	7	5	6	6	5
Acide glutamique	20	22	22	19	19
Proline	4	4	4	4	4
Glycine	12	12	13	11	15
Alanine	12	12	12	17	15
Valine	8	8	7	8	7
Méthionine	8	7	4	2	2
Isoleucine	4	5	7	9	9
Leucine	14	15	15	18	17
Tyrosine	2	2	2	3	2
Phénylalanine	8	8	8	6	7
Tryptophane *	2	2	2	2	2
TOTAL	152	153	153	153	153
M.	17.000 à 17.200	16.920	16.871	16.729	16.532

\* déterminé par oxydation à la N-bromussiccinimide.

(a) Deconinck (1973)

(b) Edmundson (1965)

(c) Dautrevaux et al., (1969)

(d) Il reste un résidu non identifié.

c) Détermination du tryptophane par oxydation à la N-bromosuccinimide

Spande et Witkop (1967) ont décrit une méthode spectrophotométrique de titration du tryptophane, basée sur la disparition de l'absorbance à 280 nm quand on traite la solution protéique par la N-bromosuccinimide. La figure 9 montre la courbe de titration obtenue pour une solution de concentration connue d'apomyoglobine de manchot.

La valeur expérimentale moyenne calculée sur deux expériences indépendantes est de 1,88 tryptophane par mole de myoglobine, soit -arrondie- deux résidus tryptophane/mole, compte tenu d'une masse molaire de 17200 (apomyoglobine).

2. Résidus N-terminaux

Le résidu N-terminal a été déterminé qualitativement par la méthode de dansylation (Gray et Hartley, 1963) et quantitativement par la méthode de carbamylation, suivie de l'isolement et de l'hydrolyse acide de l'hydantoïne, décrite par Stark et Smyth (Stark, G.R. et Smyth, 1963).

Le graphique 7a montrait le diagramme obtenu pour l'analyse selon Moore et Stein du résidu terminal et du "blanc" correspondant.

Le tableau suivant donne les valeurs, exprimées en  $\mu$ moles, des différents acides aminés mis en évidence. Le rendement global de la réaction était de 60 %.

On notera l'absence totale de valine. Ceci exclut toute contamination de la myoglobine par de l'hémoglobine de manchot, puisque les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  de celle-ci ont chacune un résidu de valine comme groupement N-terminal (Monier, 1972).

Nombre de moles de tryptophane  
titrées par mole de protéine

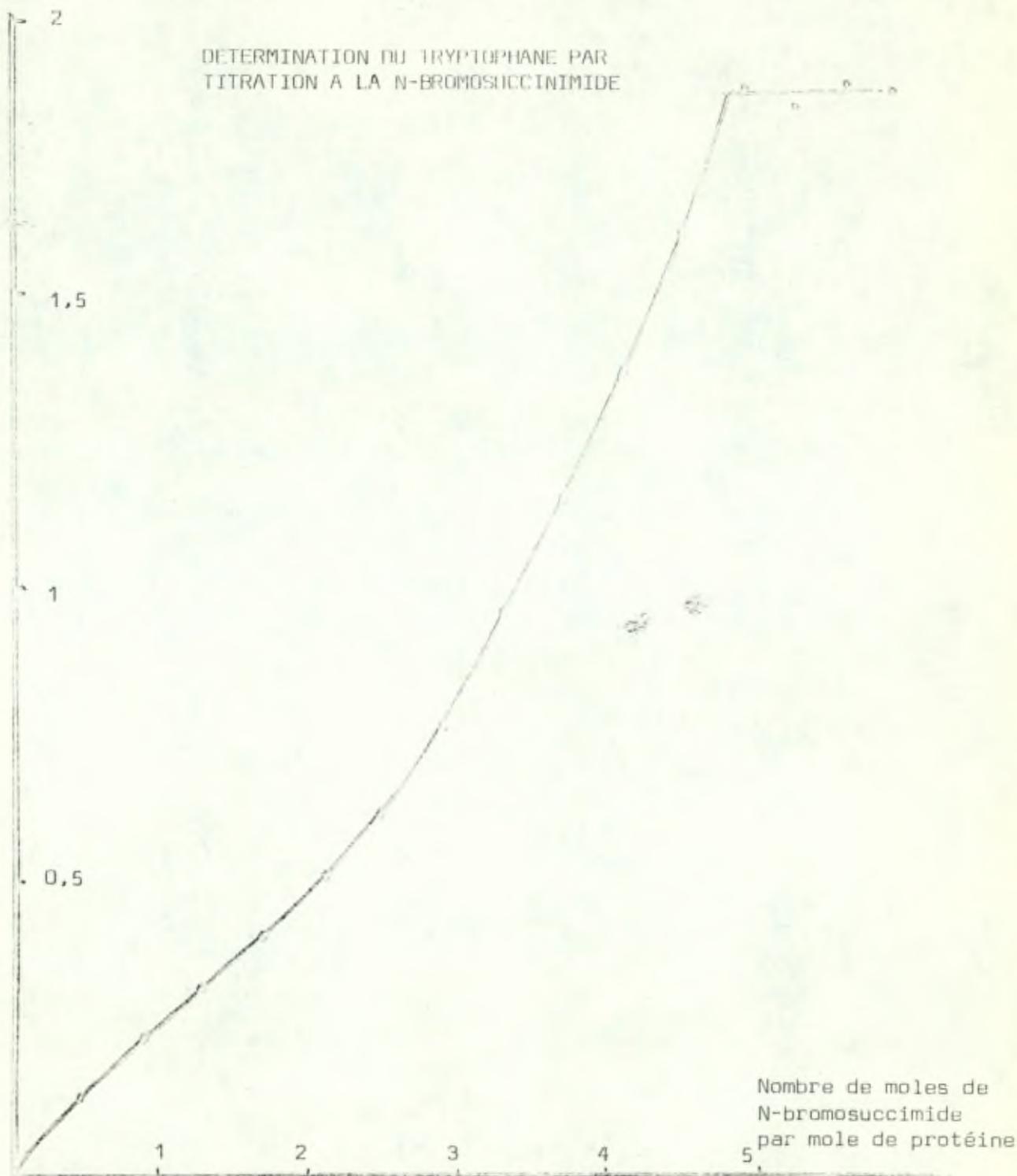


FIGURE 9

ACIDES AMINES DECELES	$\mu$ MOLE MYO. MANCHOT	$\mu$ MOLE BLANC	DIFFERENCE
Acide aspartique	0,006	0,004	0,002
Sérine	0,004	0,002	0,002
Acide glutamique	0,009	0,006	0,003
Glycine	0,091	0,011	0,080
Alanine	0,008	0,005	0,003

### 3. Dénaturation alcaline

La dénaturation alcaline a été provoquée à pH 12 par un tampon Borax soude 0.2 M. l'observation du phénomène se fait au maximum de la bande de Soret ( 409 nm). Comme les autres myoglobines, celle du manchot montre une résistance qui la différencie des hémoglobines.

Au début de nos travaux, le test de dénaturation alcaline a souvent été utilisé pour distinguer les fractions chromatographiques hémoglobiniques ou myoglobiniques.

## V DISCUSSION DES RESULTATS

A notre avis, les méthodes de préparation actuelles ne sont pas satisfaisantes. La précipitation au sulfate d'ammonium conduit à la transformation de la myoglobine en metmyoglobine. La zone de précipitation de la myoglobine dépend de la concentration de la solution en myoglobine et il n'existe aucune propriété qui permette de mesurer directement cette concentration dans l'extrait cellulaire. Les propriétés spectrales de l'hémoglobine et de la myoglobine sont trop semblables pour permettre d'utiliser ce critère dans un extrait cellulaire. Le degré de pureté de la préparation brute dépend également de la concentration en protéines contaminantes dans la solution initiale.

De son côté, la méthode de Hardman de précipitation de la myoglobine par les ions zinc et mercure en présence d'éthanol nous semble fort empirique, et ceci bien qu'elle ait été utilisée avec succès dans notre cas. Sans doute notre succès est-il dû tout simplement à la très haute concentration de la myoglobine dans le muscle du manchot.

Il conviendrait donc de supprimer les précipitations et de les remplacer par des filtrations moléculaires. Nous suggérons le schéma suivant :

- 1° Broyage des muscles en présence d'eau distillée, à l'abri de l'oxygène. Séparation des débris cellulaires par filtration directe et centrifugation.
- 2° Concentration de la solution sur membrane Amincon. Cette étape constitue déjà une première purification selon le choix de la membrane utilisée.  
L'utilisation d'une membrane excluant les masses molaires inférieures à 30.000 et d'une autre excluant à 10.000 permettrait d'obtenir une préparation déjà très homogène.
- 3° Filtration par Sephadex G 50 fine afin de séparer la fraction correspondant à la myoglobine.

Cette fraction pourrait être par la suite purifiée selon le processus que nous avons adopté.

L'homogénéité de la préparation a été testée de plusieurs façons différentes. Nous constatons que la préparation qui semble pure pour différents critères, ne l'est pas quand on utilise la méthode d'électrofocalisation. Le polymorphisme chromatographique est un phénomène général propre aux myoglobines de différentes espèces. Ce polymorphisme va croissant avec l'amélioration des supports chromatographiques. Et nous révélons par électrofocalisation une hétérogénéité qui n'apparaissait pas avec d'autres techniques électrophorétiques.

Vesterberg (1967, a, b) a étudié la myoglobine de cheval par électrofocalisation. Cet auteur montre notamment qu'il ne semble pas y avoir dans le système d'électrofocalisation d'interactions avec le milieu susceptibles d'engendrer l'hétérogénéité. Néanmoins, il n'explique pas d'où pourrait provenir l'hétérogénéité, sinon celle qui provient de l'état d'oxydation de l'hème. Theorell (1955) a fait des analyses d'acides aminés des différentes fractions électrophorétiques obtenues dans le cas de la myoglobine de cheval et ne trouve pas de différences significatives dans la composition ce qui n'implique pas qu'il n'y ait pas de différences. En l'absence d'explication et d'expérimentation approfondies, certaines hypothèses sont admises avec réserves, en ce qui concerne la possibilité de désamidation de certains résidus de glutamine ou d'asparagine, ou encore de légères différences conformationnelles.

Les caractéristiques de la myoglobine de manchot la font ressembler fortement aux myoglobines de mammifères. Les paramètres physico-chimiques tels que la masse molaire, les coefficients de diffusion et de sédimentation, les propriétés optiques sont fort semblables, sinon identiques à celles des myoglobines de mammifères. Cela laisse présager une similitude conformationnelle assez grande. La composition en acides aminés seule reflète des différences assez grandes au niveau du nombre de résidus de méthionine, d'arginine et d'isoleucine, ce qui laisse présager des différences plus marquées dans la structure covalente de la myoglobine de manchot.

## 2EME . P A R T I E

### STRUCTURE COVALENTE DE L'APOMYOGLOBINE DU MANCHOT EMPEREUR

<u>I</u>	<u>INTRODUCTION</u>	p.29
<u>II</u>	<u>HYDROLYSES ENZYMATIQUES</u>	p.32
	A. PAR LA TRYPSINE	
	B. PAR LA CHYMOTRYPSINE	
	C. PAR LA TRYPSINE APRES BLOCAGE DES RESIDUS DE LYSINE PAR L'ANHYDRIDE MALEIQUE	p.34
<u>III</u>	<u>HYDROLYSES CHIMIQUES</u>	
	A. PAR LE BROMURE DE CYANOGENE	p.36
	B. PAR LA N-BROMOSUCCINIMIDE	
<u>IV</u>	<u>STRUCTURE DES PEPTIDES UTILISES POUR LA CONSTRUCTION DE LA STRUCTURE COVALENTE</u>	
	A. TECHNIQUES EXPERIMENTALES	p.37
	1. <i>Composition</i>	
	2. <i>Dégradation d'Edman couplée à la dansylation</i>	
	3. <i>Hydrolyse par les carboxypeptidases A et B</i>	
	4. <i>Dégradation sur "Sequencer"</i>	
	B. RESULTATS EXPERIMENTAUX	p.41
<u>V</u>	<u>STRUCTURE COVALENTE DE LA MYOGLOBINE DE MANCHOT</u>	
	A. CONSTRUCTION GENERALE DE LA SEQUENCE	p.46
	B. CONSTRUCTION DE LA SEQUENCE N-TERMINALE	p.48
	C. CONSTRUCTION DE LA SEQUENCE C-TERMINALE	p.54
	D. CONSTRUCTION DE LA SEQUENCE MEDIANE	p.56
	E. RECAPITULATION DE LA SEQUENCE DE LA MYOGLOBINE DE MANCHOT	
<u>VI</u>	<u>COMPARAISON DES SEQUENCES DE MYOGLOBINE</u>	p.62
<u>VII</u>	<u>DISCUSSION DES RESULTATS</u>	p.68

## I INTRODUCTION

La méthode d'Edman (1971) est utilisée de façon routinière depuis une bonne vingtaine d'années dans les laboratoires qui ont à leur programme la détermination des structures covalentes de peptides et de protéines. Cette méthode de dégradation récurrente, quand elle est menée dans de bonnes conditions, permet la libération de dix, voire d'une quinzaine de résidus du côté  $\text{NH}_2$  terminal. La limite la plus importante du système manuel est la présence, dans le milieu, d'oxygène qui bloque la réaction. Ceci implique qu'il est impossible de pratiquer la dégradation d'une protéine sans l'avoir préalablement hydrolysée en peptides de longueurs accessibles à la dégradation d'Edman.

Il est évident que, plus la taille de la protéine est grande, plus le mélange de peptides est complexe. Il en va de même pour la séparation et la purification des peptides. La séparation des peptides et leur purification est le problème le plus délicat à résoudre.

Deux voies complémentaires s'ouvrent, qui permettraient d'étudier des protéines de masse molaire importante. La première consisterait à augmenter le nombre de résidus dégradables et identifiables sans ambiguïté. L'autre serait d'obtenir des peptides, moins nombreux, donc plus longs, pour diminuer un tant soit peu la complexité du problème de séparation.

Ces deux propositions ont déjà des solutions. Edman et Begg ont, en 1967 construit et décrit un appareil, le "Sequencer"\* destiné à faire la dégradation d'Edman de façon complètement automatisée. Le principal avantage de l'appareil est sans doute de travailler en atmosphère contrôlée à l'abri de l'oxygène avec pour conséquence de pouvoir pénétrer beaucoup plus profondément dans la séquence de la protéine étudiée. En principe, une cinquantaine de résidus pourraient être dégradés et identifiés. En pratique, quand il s'agit d'une protéine de séquence inconnue, une trentaine de résidus sont une bonne moyenne. Le deuxième avantage de cet appareillage a été trouvé dans l'amélioration des rendements de réaction.

---

\* Le "Sequencer" est l'appareil construit et commercialisé par la firme Beckman. Le nom donné par Edman et Begg à leur prototype, était "Sequanator".

En 1967, nous avons envisagé la construction d'un Sequencer. Après avoir analysé les possibilités de réalisation et mesuré les difficultés technologiques qui allaient se présenter, nous avons cru bon de renoncer à un tel projet. Le principe même de la méthode, qui consiste à opérer entre deux phases non miscibles, et les implications technologiques que cela impose, font du sequencer un appareil qui exige une mise au point parfaite.

Cet appareil actuellement sur le marché est un outil indispensable et complémentaire des techniques classiques de détermination de la structure de protéine. Complémentaire, parce que ce serait une idée fautive d'imaginer que la seule possession d'un appareillage de ce type permette d'éclaircir toute structure de protéine ou de peptide.

Une autre méthode, susceptible d'être automatisée et qui mérite une attention particulière, a été proposée par Laursen (1971). Le principe en est de fixer le peptide sur un support insoluble (une résine du type Dowex) par lien covalent. On procède ensuite à la dégradation d'Edman. La séparation du résidu clivé peut se faire par simple filtration (c'est la méthode de Merrefield, 1964, à l'envers).

La détermination de la séquence des acides aminés dans les oligopeptides par spectrométrie de masse a quelques brillants succès à son actif (Barber, M., et al., 1965 a).

Des conditions expérimentales ont été décrites telles qu'elles permettent la volatilisation des peptides après les avoir transformés chimiquement, la coupure en ions, notamment au niveau du lien peptidique (Bricas, E., et al., 1965), et l'obtention de spectres plus aisément interprétables que ce qui avait été obtenu précédemment sur les acides aminés (Biemann, K., et al., 1961).

La structure de peptides de masse molaire supérieure à 1.500 a pu être ainsi déterminée (Barber, M., et al., 1965 b).

Cette technique qui n'est qu'à ses débuts demande néanmoins un appareillage qui n'est pas aisément accessible.

Quelle que soit la méthode utilisée pour dégrader un peptide, la phase finale de l'opération est l'identification du résidu clivé. Les méthodes d'identification sont nombreuses, aucune n'est parfaite et ne peut être considérée comme méthode universelle. La combinaison de plusieurs

méthodes d'identification est souhaitable dans la mesure où un acide aminé ou son dérivé est presque toujours identifié par une grandeur du type volume d'élution ou Rf dans un système donné. Une légère modification du système qui ne serait pas perçue par l'expérimentateur peut conduire à des confusions regrettables. Quant aux méthodes très sensibles (dansylation), elles ne permettent de travailler que sur un matériel très pur, parce que la sensibilité est une qualité qui s'applique également à la détection des impuretés. Celles-ci peuvent provenir du matériel peptidique lui-même, mais aussi des solvants utilisés et s'accumuler ainsi au cours des différentes phases qui précèdent l'identification. Il est bien connu également, qu'au plus on s'éloigne du rendement de 100 % (au cours d'une réaction récurrente), au plus vite le mélange de peptide de différentes taille devient complexe et les résultats ininterprétables.

Deux procédés sont actuellement utilisés qui permettent d'obtenir les peptides de taille plus grande. Il s'agit de la coupure chimique par le bromure de cyanogène (Witkop, 1961) et de la trypsinolyse limitée aux résidus Arginyls. L'hydrolyse au bromure de cyanogène paraît la seule méthode chimique valable actuellement quand le nombre de méthionine de la protéine est petit. L'acide formique à 70 % qui est le milieu habituel dans lequel on travaille, conduit à des nombreuses coupures parasites qui viennent compliquer les chromatographies. Les peptides obtenus forment très souvent des agrégats. La méthode d'hydrolyse par la trypsine limitée aux résidus d'arginines donne quant à elle, d'excellents résultats et est susceptible de simplifier considérablement la séparation chromatographique. L'utilisation des méthodes d'obtention de peptides de grandes tailles ne peut être dissociée des méthodes de séparation de ces peptides par chromatographie.

On n'a, d'autre par, pas encore adopté de méthode chromatographique valable pour séparer les peptides de grande taille. Sur les résines échangeuses du type Dowex, on observe souvent des absorptions irréversibles. Sur les gels de filtration moléculaire, le pouvoir séparateur est faible, et la technique n'est valable que pour des mélanges de trois ou quatre peptides de tailles idéalement différentes.

## II HYDROLYSES ENZYMATIQUES

### A. HYDROLYSE PAR LA TRYPSINE

Les hydrolyses par la trypsine ont été effectuées dans des conditions classiques ( \* ) sur des échantillons d'apomyoglobine (fraction purifiée sur CM Sephadex). L'apomyoglobine, peu soluble à pH 8,5, est dissoute dans un petit volume de NaOH 0,01 M. La solution ainsi obtenue est ajoutée à une solution de bicarbonate d'ammonium 0,2 M, de telle sorte que la concentration en apomyoglobine soit approximativement de 1 %. Le pH est éventuellement ajusté à 8,5 par addition d'ammoniaque concentré. Souvent à ce stade la solution est opalescente. La solution est portée dans un bain-marie à 100 °C pendant cinq minutes de façon à dénaturer l'apopolyglobine. Elle est ensuite thermostatée à 40 °C. La trypsine traitée au TPCK (Carpenter, F.H., 1967), dissoute dans du carbonate d'ammonium, est ajoutée en deux fois à une heure d'intervalle et sa concentration finale par rapport au substrat, est de 4 %. L'hydrolyse se fait à 40 °C pendant 2 1/2 heures sous agitation. L'opalescence disparaît en général après 20 minutes de réaction avec la trypsine. Le mélange réactionnel est lyophilisé.

Avant la chromatographie, le mélange lyophilisé est dissous dans le tampon acide acétique-pyridine (0,1 M à pH 2,2), le matériel insoluble est centrifugé, et constitue le "core" insoluble de l'hydrolyse trypsique.

La chromatographie des hydrolysats trypsiques a été menée alors que nous n'avions pas d'exemple de séparation des peptides de myoglobine sur résine Dowex 50 X2. Edmundson (1965) avait séparé les peptides de la myoglobine de cachalot sur IRC 50. Dautrevaux et al. (1968) utilisaient une résine sphérique (Chromobead) du type Dowex mais fractionnaient préalablement les peptides sur Sephadex. Nous nous sommes débord inspiré de la méthode de Schroeder pour les chaînes d'hémoglobine (Schroeder, W.A., 1967).

L'utilisation d'un gradient curviligne de tampon pyridine-acide acétique de pH 3,1 à pH 5,5, ne s'est pas révélée convenable. La figure 9 montre la chromatographie obtenue de cette manière. Interprétant les résultats obtenus pour cette chromatographie, nous

\* Smyth, D.G. (1967)

C-ROMATOGRAPHIE DES PEPTIDES TRYPSIQUES SUR RESINE DOWEX 50 X 2

Colonne : 1,50 m x 1,4 cm

Eluant : 1) 150 ml tampon pyridine 0,2 M  
acide acétique pH 3,2

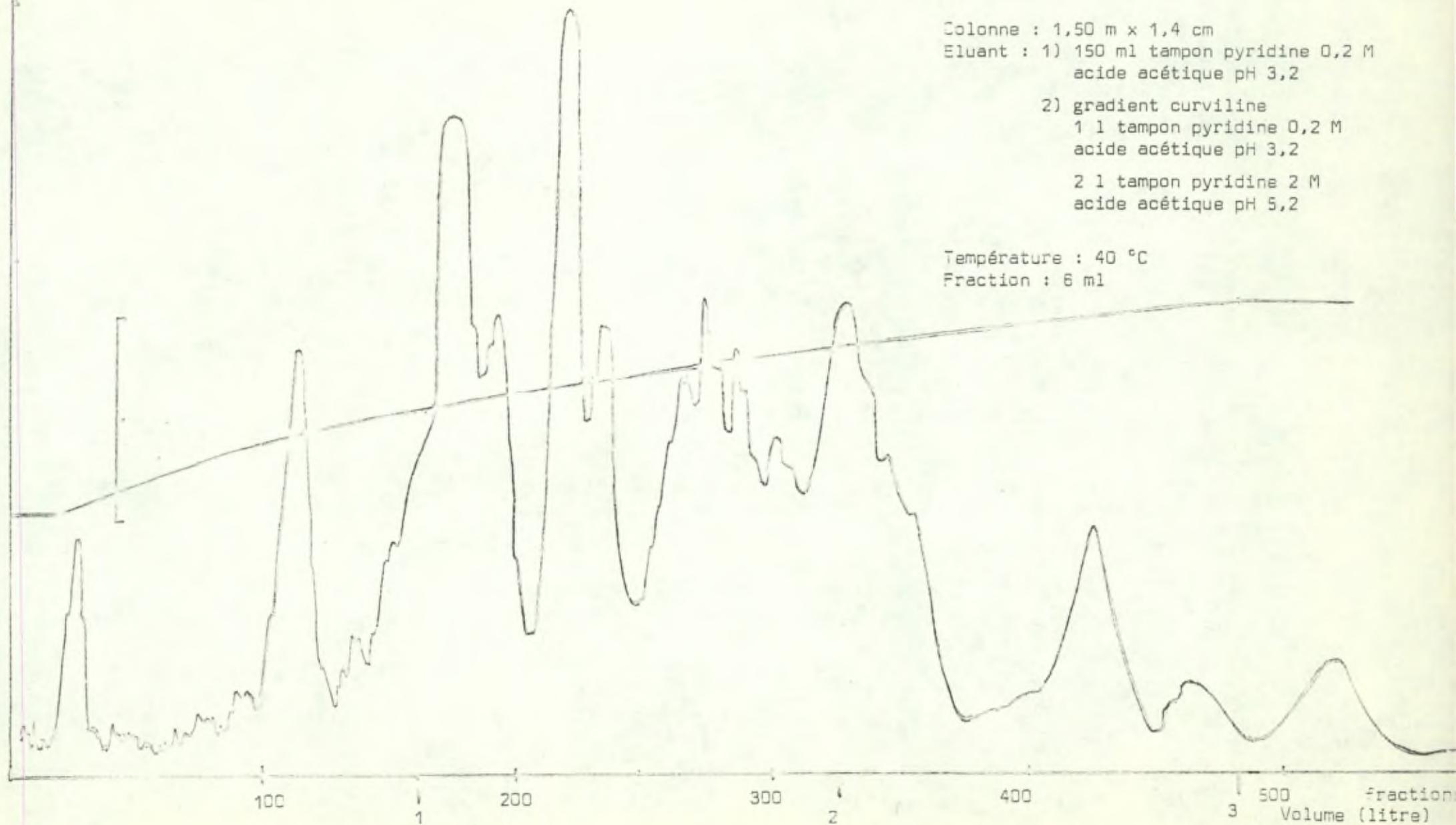
2) gradient curviligne

1 l tampon pyridine 0,2 M  
acide acétique pH 3,2

2 l tampon pyridine 2 M  
acide acétique pH 5,2

Température : 40 °C

Fraction : 6 ml



avons crû devoir la modifier de la façon suivante :

- commencer la chromatographie à un pH inférieur à 3,1
- remplacer le gradient curviligne par un gradient linéaire
- de plus, en augmentant le volume total de tampon, on pourrait aussi diminuer la pente du gradient. Tout ceci afin d'augmenter la séparation qui dans le cas précédent était très mauvaise.

Les résultats obtenus de cette façon pour la séparation de peptides trypsique se sont révélés satisfaisants et des conditions identiques ont été adoptées dès lors pour la séparation des peptides chymotrypsiques. La figure 10 présente la chromatographie des peptides chymotrypsiques \*.

Les fractions groupées ont été ensuite concentrées à l'évaporateur rotatif à 40 °C et conservées en solution à pH 6,5 tampon pyridine acide acétique eau. Ces fractions numérotées ont ensuite été purifiées sur papier par électrophorèse à haute tension.

#### B. HYDROLYSE PAR CHYMOTRYPSINE

L'apomyoglobine (250 mg - pic principal CM Sephadex) en solution à 1 % dans du bicarbonate d'ammonium 0,3 M pH 8, a été dénaturée par la chaleur (bain-marie 100 °C pendant 5 minutes).

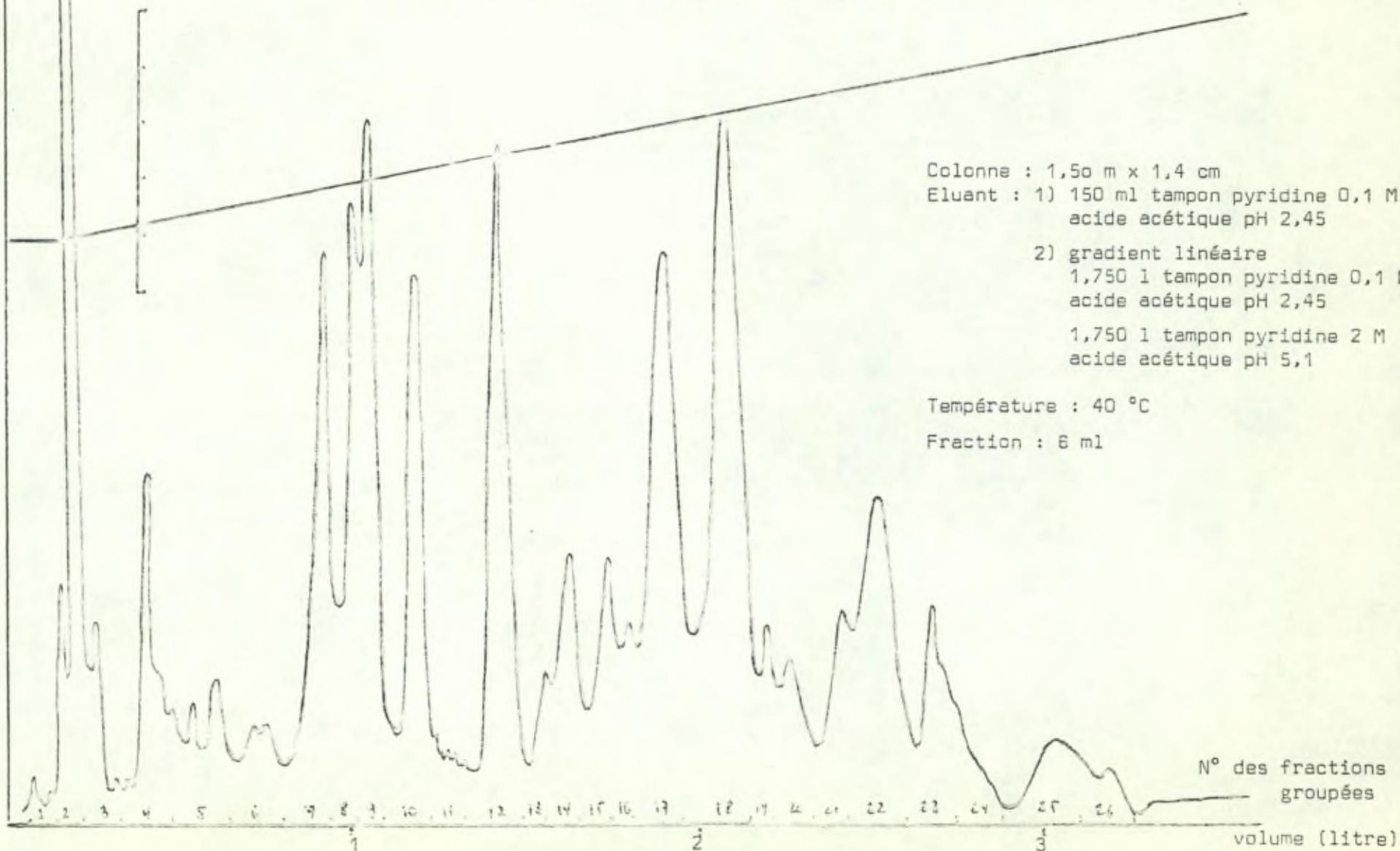
A la solution d'apomyoglobine thermostatisée à 40 °C, nous avons éjouté une solution de chymotrypsine en deux fois, à une heure d'intervalle, de façon à obtenir une concentration finale de 3 % de l'enzyme par rapport au substrat. La solution, souvent trouble en début de réaction, devient limpide après environ une demi-heure. Après trois heures de digestion, le mélange réactionnel est lyophilisé.

Les peptides ont été ensuite dissous dans un tampon pyridine 0,1 M acide acétique à pH 2,2 avant d'être placés au sommet d'une

---

\* Nous regrettons de ne pas pouvoir présenter le diagramme des peptides trypsiques qui a été détruit accidentellement en février 1970.

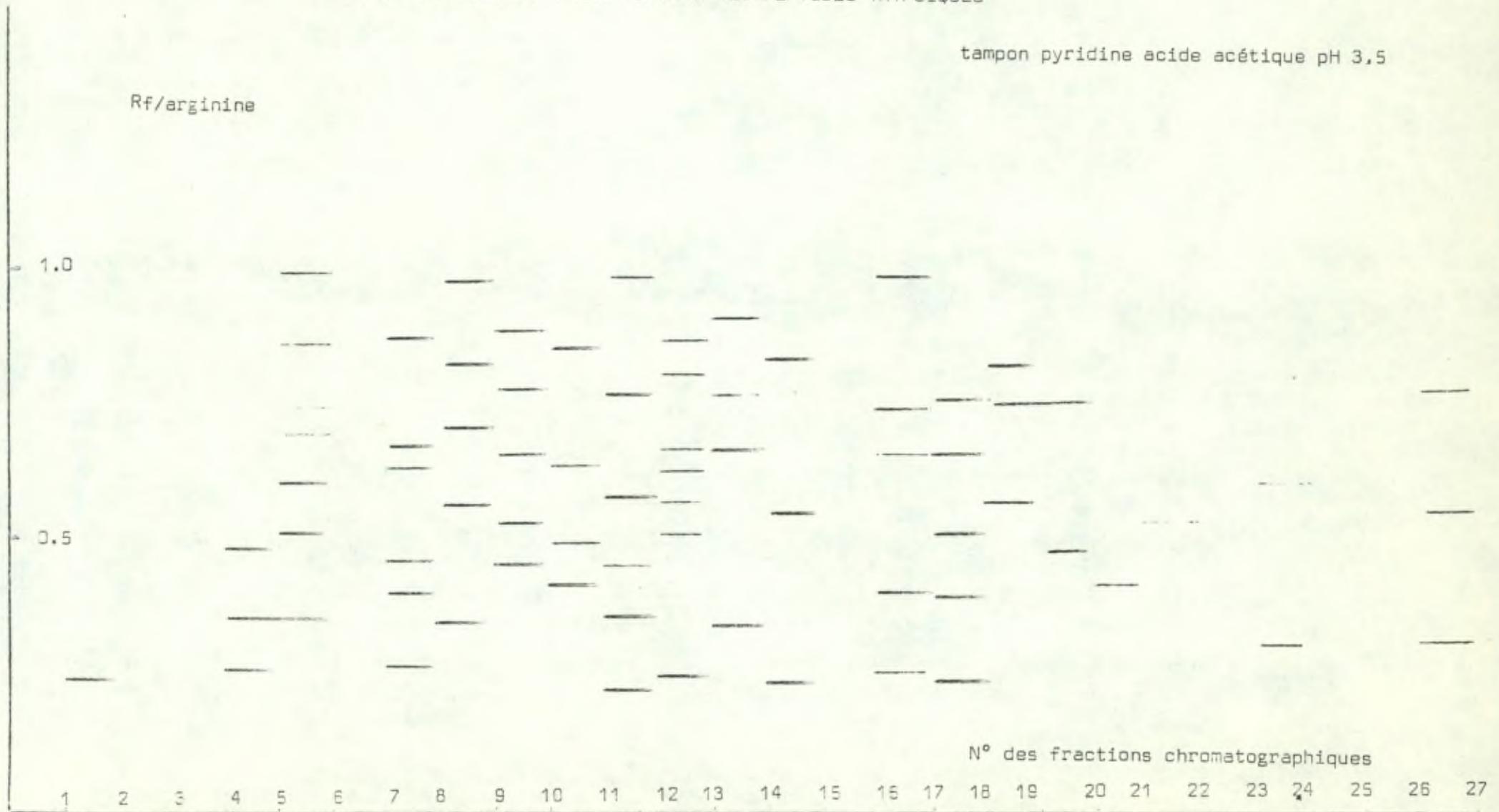
CHROMATOGRAPHIE DES PEPTIDES CHYMOTRYPSIQUES SUR RESINE DOWEX 50 X2



ELECTROPHORESE A HAUTE TENSION DES PEPTIDES TRYPSIQUES

tampon pyridine acide acétique pH 3,5

Rf/arginine

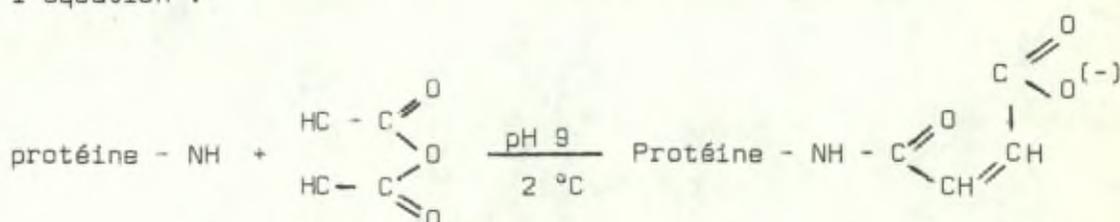


colonne de Dowex 50 X2 préalablement conditionnée à pH 2,5 par un tampon pyridine-acide acétique 0,1 M à pH 2,5.

Les fractions chromatographiques ont été groupées et numérotées comme il est indiqué sur le graphique 10 et évaporées à l'évaporateur rotatif (température de bain : 40 °C). Les fractions ont été soumises à des électrophorèses analytiques sur papier à pH 3,6 ou à pH 6,5. Chacune des fractions a été soumise à des électrophorèses préparatives sur papier 3 MM à pH 6,5 ou 3,5. L'arginine est utilisée comme référence pour la mesure de la migration électrophorétique. Le tableau 11 nous montre les résultats obtenus par électrophorèse.

### C. COUPURE PAR LA TRYPSINE APRES BLOCAGE A L'ANHYDRIDE MALEIQUE

L'anhydride maléique réagit rapidement avec les groupements  $\alpha$ -aminés et  $\epsilon$ -aminés des protéines et des peptides suivant l'équation :



Cette réaction a pour effet principal le blocage des lysines. Les maléyl-protéines sont en général plus solubles à pH neutre ou légèrement basique que les protéines non traitées. Nous avons utilisé cette réaction de blocage à deux occasions. Une fois pour éviter les phénomènes d'aggrégation entre les peptides obtenus par coupure au bromure de cyanogène. L'autre fois, pour modifier l'apomyoglobine afin d'obtenir une limitation de l'hydrolyse trypsique au niveau des résidus d'arginine.

Les conditions de réaction utilisées sont les suivantes.

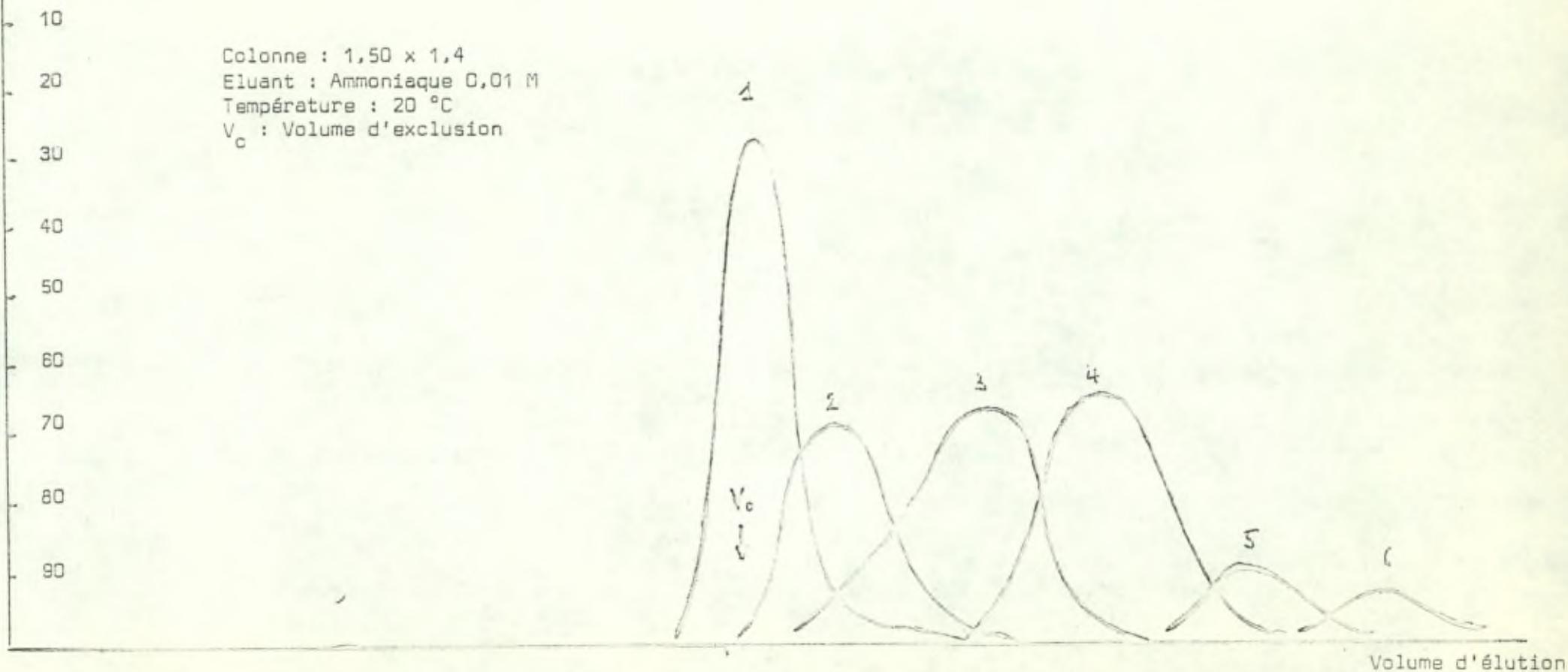
apomyoglobine 200 mg dissoute dans un tampon Borax 0.01 M à pH 9.  
La solution est maintenue à 2 °C dans un bain de glace, l'anhydride

% transmission (280 nm)

CHROMATOGRAPHIE DES PEPTIDES MALEYLES SUR GEL  
DE DEXTRANE SEPHADEX G 25 FINE

Volumes d'élutions relatifs des fractions re-  
chromatographiées

Colonne : 1,50 x 1,4  
Eluant : Ammoniaque 0,01 M  
Température : 20 °C  
 $V_c$  : Volume d'exclusion



Volume d'élution

maléique est ajouté (200 M/mole de lysine) à l'état solide et se dissout progressivement dans la solution. Après dissolution complète, la solution est lyophilisée.

La protéine est ensuite chromatographiée sur Sephadex G 50 (éluant ammoniacale 0.01 M) afin de séparer la protéine de l'acide maléique formé.

Le pic correspondant à la protéine modifiée est ensuite lyophilisé.

L'hydrolyse par la trypsine a été faite dans les conditions décrites précédemment, sauf la dénaturation par la chaleur qui est omise et la durée d'hydrolyse qui est de quatre heures.

Le mélange de peptides est lyophilisé puis séparé sur une colonne contenant comme support du Sephadex G 25 fine. La lecture a été faite à l'aide d'un UVICORD 280 et par lecture au spectrophotomètre Zeiss à 260 nm.

Le groupement maléyl absorbe fortement à cette longueur d'onde. Le graphique montre la séparation obtenue. Les fractions obtenues ont été numérotées, lyophilisées et rechromatographiées dans les mêmes conditions. Le déblocage a été obtenu par traitement à l'acide acétique 0.1 M pendant 48 heures à 45 °C. La séparation des peptides maléylés par électrophorèse à haute tension exige le déblocage préalable. (Le blocage des résidus de lysine par l'anhydride maléique confère au peptide une charge globale nettement négative qui différencie beaucoup moins les peptides entre eux du point de vue de la charge).

Le diagramme 12 montre les volumes d'élutions obtenus pour les différents pics rechromatographiés.

Les pics numérotés 4, 5 et 6 ont ensuite été purifiés par électrophorèse H.T. à pH 6.5.

### III HYDROLYSES CHIMIQUES

Comparativement à d'autres myoglobines, celle du manchot contient un grand nombre de méthionine. On sait que le bromure de cyanogène coupe en milieu acide les chaînes polypeptidiques après chaque résidu de méthionine. Il nous a donc semblé intéressant de tenter la coupure d' l'apomyoglobine de manchot par

le bromure de cyanogène afin d'isoler l'un ou l'autre peptide qui compléterait les résultats obtenus par coupure enzymatique.

Notre succès a été très limité puisqu'un seul peptide obtenu de cette manière est utilisé dans la séquence. L'hydrolyse par la N-bromo-succinimide était destinée à nous permettre d'obtenir les peptides à tryptophane faisant partie de la partie N-terminale de la séquence de l'apomyoglobine de manchot.

#### A. HYDROLYSE PAR LE BROMURE DE CYANOGENE

Nous avons tenté à plusieurs reprises de couper l'apomyoglobine de manchot par le bromure de cyanogène dans l'acide formique à 70 % et en utilisant un poids de bromure de cyanogène équivalent au poids de la protéine mise en oeuvre. La réaction était poursuivie pendant 24 h. à température ordinaire.

La séparation des peptides a été faite par chromatographie et rechromatographie sur gel (Sephadex G 50 et G 25) suivies d'électrophorèse sur papier. Nous avons constaté que le rendement de la coupure peut être amélioré si l'on travaille sur une protéine réduite ( $\text{NaBH}_4$ ) à l'abri de l'oxygène (tube scellé) et dans un milieu préalablement dégazé (barbotage d'azote).

Certains phénomènes d'agglomération ont été constatés, ils peuvent être évités si l'on traite les peptides, obtenus après coupure, par l'anhydride maléique.

Néanmoins, on ne peut éviter un grand nombre de coupures parasites, dues vraisemblablement à l'acide formique. Elles se manifestent sous la forme de nombreuses bandes électrophorétiques ou par de nombreux pics chromatographiques quand la séparation se fait sur résine échangeuse d'ions.

#### B. HYDROLYSE PAR LA N-BROMOSUCCINIMIDE

La possibilité de couper une protéine par la N-bromosuccinimide (NBS) a été signalée par plusieurs auteurs. Généralement, la coupure est mise en évidence par l'apparition des groupes N-

terminaux nouveaux. Nous avons procédé à l'oxydation de l'apomyoglobine par la NBS dans les conditions décrites par (Ramachandran, L.K. et B. Witkop (1967)).

Nous n'avons pas pu isoler les peptides attendus par filtration sur Biogel P<sub>2</sub>. Comme l'oxydation des tryptophanes a pu être constatée par spectrophotométrie, nous supposons que c'est le rendement de l'hydrolyse qui n'est pas suffisant. Ce genre d'essai n'a pas été poursuivi.

#### IV STRUCTURE DES PEPTIDES UTILISES POUR LA CONSTRUCTION DE LA STRUCTURE

##### COVALENTE

##### A. TECHNIQUES EXPERIMENTALES

###### 1. Composition

Des aliquotes des solutions de peptides obtenues après purification par électrophorèse à haute tension ont été placées dans des tubes en verre pyrex et évaporées à sec. Après dessiccation complète (dessiccateur sous vide) on procède à l'hydrolyse acide (HCl azéotropique, 110 °C, 24 heures, tube scellé sous vide). Le contenu du tube après ouverture de celui-ci est transvasé dans un ballon et évaporé à l'évaporateur totatif. Le résidu sec est ensuite repris par du tampon citrate de Na pH 2.2 , et analysé sur analyseur automatique UNICHROM Beckman.

###### 2. Dégradation d'Edman couplée à la dansylation

###### a) Dégradation des peptides

Les dégradations par le phénylthiocyanate (PITC) selon Edman ont été effectuées dans les conditions décrites par Hartley (1970) et Dopheide (1967).

La purification des réactifs et des solvants a été faite selon les prescriptions d'Edman et Begg (1967).

0.02 à 1  $\mu$ mole de peptide sont dissous dans 200  $\mu$ l d'eau distillée. Après dissolution on prélève 10  $\mu$ l destinés à la dansylation. Aux 190  $\mu$ l restants on ajoute 200  $\mu$ l d'une solution à 5 % (v/v) de phénylisothiocyanate dans la pyridine

Le milieu est saturé de  $N_2$  et la réaction de couplage est poursuivie durant 1 heure à la température de 45 °C. La solution est évaporée sous vide (pompe à palette  $10^{-2}$  mm Hg) dans un dessiccateur chauffé à 65 °C en présence d'agents déshydratants tels que  $P_2O_5$  et NaOH.

La cyclisation est réalisée à l'aide d'acide trifluoracétique dont 200  $\mu$ l sont ajoutés au résidu solide. Elle est menée pendant 30 minutes à 45 °C. La solution est évaporée sous vide à 65 °C et le résidu solide dissous dans 250  $\mu$ l d'eau distillée. La solution aqueuse est extraite trois fois par des aliquotes de 750  $\mu$ l d'acétate de butyle saturé d'eau. Après l'extraction, la phase aqueuse est évaporée à sec, le résidu repris par 200  $\mu$ l d'eau et l'opération complète recommence.

#### b) Dansylation

La méthode utilisée est celle préconisée par Gray et Hartley (1963, a et b). La solution de peptides contenant 1 à 5 nanomoles est évaporée à sec dans un tube de verre pyrex 0,5 x 6 cm. Le résidu est dissous dans 20  $\mu$ l d'hydrogénéocarbonate de Na 0.2 M. La solution obtenue est évaporée à sec. Le résidu sec est dissous dans 20  $\mu$ l d'eau et le pH, qui doit être supérieur à 8, est vérifié à l'aide de peptier indicateur (Gros, C., et al., 1969) 20  $\mu$ l d'une solution de chlorure de diméthyl aminonaphtalène-5-sulfonyle (DNS-Cl) à 3 mg/ml dans l'acétone sont ajoutés. La réaction est menée à la température de 40 °C pendant une heure à l'abri de la lumière. La solution est ensuite évaporée à sec et au résidu solide sont ajoutés 50  $\mu$ l de chlorure d'hydrogène azéotropique.

Le tube est ensuite scellé sous vide et l'hydrolyse est menée à 105 °C durant une période de 4 heures à 12 heures. Le tube est ouvert, l'HCl est évaporé sous vide.

#### Identification des dansyls amino acides

L'identification des dansyls amino acides a été faite par chromatographie sur couche mince à deux dimensions sur des plaques de polyamide de 5 cm sur 5.

Les éluants préconisés par Woods K.R. (1967) ont été utilisés, soit : pour la première dimension : acide formique 90 % - eau 1,5/100 v/v

pour la deuxième dimension : acide acétique glacial - benzène 1/9 v/v.

L'identification est faite par rapport aux DNS acides aminés standard et en considérant également les sous-produits de la réaction qui sont le DNS-OH, produit d'hydrolyse du réactif lui-même et du DNS-NH<sub>2</sub>, produit de réaction du réactif avec l'ammoniaque.

Les couches minces sont examinées par la fluorescence visible des dérivés dansylés sous une lampe à U.V.

### 3. Hydrolyse par les carboxypeptidases A et B

Les carboxypeptidases A et B (CPA et CPB) toutes deux de marque Sigma et traitées par le di-isopropylfluorophosphate (DFP) sont en suspension à raison de 90 et de 7 mg/ml respectivement, et des activités annoncées de 55 et 90 unités/mg de protéine.

Elles ont été utilisées selon la méthode préconisée par Ambler R.P. (1967) et en se basant sur les résultats de Han (1970). Cinq  $\mu$ l de CPA et dix de CPB sont dilués chacun dans 100  $\mu$ l d'une solution à 10 % de chlorure de lithium et utilisés après les avoir maintenus dans ce milieu pendant 16 h à 4 °C.

Les peptides sont dissous dans 2 ml de tampon acétate d'ammonium 0.1 M à pH 7,5 et thermostatisés à 37 °C. Des volumes de l'ordre de 5 à 10 µl de solution de CPA et de 25 µl de solution de CPB sont ajoutés et la thermostatisation est poursuivie pendant l'hydrolyse.

Des prélèvements sont faits après des durées variables et l'hydrolyse est arrêtée par simple congélation. Les acides aminés libérés sont ensuite dosés à l'auto-analyseur.

#### 4. Dégradation sur "Sequencer"

Les dégradations automatiques ont été effectuées sur "Sequencer" Beckman mod. 890 selon les principes et le mode opératoire décrits par Edman et Begg (1967).

Les thiazolinones, obtenues après dégradation, ont été transformées en phénylthiohydantoïnes (PTH) par traitement à l'HCl 1 M pendant 10 minutes à 80 °C. La PTH a ensuite été extraite de la phase aqueuse par de l'acétate d'éthyle.

L'identification des PTH a été effectuée par chromatographie en phase gazeuse, par injection directe de la solution de PTH ou par injection du PTH après silylation par les techniques décrites par PISANO (1969).

En cas d'ambiguïté ou de doute sur les résultats obtenus par chromatographie en phase gazeuse, l'identification des résidus libérés a également été effectuée par analyse selon Moore et Stein de l'acide aminé libéré à la suite de l'hydrolyse du PTH par l'HCl 6 M à 120 °C pendant 16 heures.

---

Nous remercions Monsieur le Professeur DIRKX de l'Université de l'Etat à Mons de nous avoir permis d'utiliser son appareillage.

Nous remercions Monsieur le Professeur PUTNAM de l'Université d'Indiana (U.S.A.) et le Docteur C. Paul d'avoir mis leur temps, leur appareillage et les réactifs nécessaires à l'analyse de certains de nos échantillons.

	T 17.3	T 19.3	T 20.2	T 22.3	T 26.3	TM 1	TM 4.2	TM 16.4	TM 16.5
ASP						1,2	2,1	1,1	1,0
THR					2,0	3,5	0,4	1,3	1,0
SER					0,9	2,0	1,0	0,7	
GLU			2,2	1,1	3,0	5,0	2,0	1,3	1,0
PRO					1,0	0,2		1,0	1,0
GLY	1,0		1,9		1,0	4,2	2,0	0,2	1,0
ALA				1,0	2,0	3,1	1,0		
VAL						2,1	0,2		
MET						1,2	0,9	0,9	1
ILE						1			
LEU	1,1			1,9	2,8	4		0,3	1
TYR		1,0	0,6			0,2	0,8		
PHE			2,0	1,2		0,3	2,0	0,9	
LYS	1,1	1,3	1,0		2	6,0	2,0	1,0	1,0
HIS					2,8	5,0		0,9	
ARG				11,3		0,7		0,9	1,0
TOT	3	2	8	6	18	±36	14	11	9

COMPOSITION EN ACIDES AMINES DES DIFFERENTS PEPTIDES  
UTILISES DANS LA CONSTRUCTION DE LA SEQUENCE

	C 5.2	C 6.1	C 11.4	C 14.1	C 16.1	C 17.1	C 18.1	C 19.3	C 21.3	C 22.1
ASP	2	1			2		1			
THR		0,9	1	1					2,0	2
SER	1						0,9		1,0	
GLU	2	1,2	1,1			1,1	1,1	1,0	4,2	
PRO		0,8							0,9	
GLY	1,1			1			2,4		1,1	
ALA	4,4						1,9	1,0	2	
VAL				1,8			1,8	0,7		
MET	0,9	0,9					0,8			
ILE										
LEU				1			2,8		2	
TYR										
PHE	1				2	1,0				2
LYS	1	1	1		0,7	1,1	2	1,7	3,9	1
HIS							3	1,0	4,1	
ARG					1,2					1
TOT	13	6	4	5	6	3	15	7	21	6

	C22.2	C22.5	C23.2	C23.8	C25.2	BrCN12.2	T 6.4	T10.4	T11.5	T12.3	T14.2	T14.3	T15.2	T16.2	T17.1
ASP	1					1	1,2	1,4				1,0		1,1	
THR		1,8		1			1,0						2	0,9	
SER	0,9					0,9		1,0				1,0		0,7	
GLU	1,0	1,1	1,0			1	1,1			1,0	1,0	1,0		0,2	
PRO							0,9							1,2	1,0
GLY				1		1				1,0	1,2	2,0			
ALA	2,2	1,2	1,0					1,1				2,0			
VAL	0,8			1,8								2,0			
MET						0,7*	0,9	0,8				0,8		0,9	
ILE	0,8								1,0		0,9				
LEU			2,0	0,9					1,0		1,9	2,0			
TYR															
PHE	1,0		1,0		1,0					1,0				1,0	1,0
LYS	2,0	1,0	1,0	1,1				1,0	1,0		1,0			1,0	
HIS	1,1	1,9		1,0								2,0			1,0
ARG					1,1	1	1					1,0		1,1	
TOT	11	7	6	7	2	6	6		3	3	6	15			

\*homosérinelactose

CONVENTIONS D'ECRITURE

Nous signalons au fur et à mesure de la description de la séquence les peptides qui ont servi à l'établir ainsi que les renseignements structuraux obtenus pour chacun d'eux.

La numérotation de 1 à 153 est celle de la myoglobine de cachalot.

Une flèche vers la droite indique un résidu qui a été isolé après dégradation d'Edman et identifié soit par chromatographie en phase gazeuse, soit par dansylation et chromatographie sur couches minces à deux dimensions, soit par analyse Moore et Stein après hydrolyse du PTH.

Un tiret en dessous du dernier résidu d'un peptide signifie que la nature de ce résidu correspond à la spécificité de l'enzyme.

Une flèche vers la gauche indique un résidu identifié par la cinétique d'hydrolyse par carboxypeptidase A et B.

Une double ( ) englobe une région dans laquelle la composition a été déterminée expérimentalement mais dans laquelle la séquence complète n'a pas été déterminée.

Le symbole (.) indique que l'acide aminé qui précède a été remplacé par homologie avec les séquences connues, avec un haut degré de confiance.

C : indique un peptide obtenu par coupure à la chymotrypsine

T : indique un peptide obtenu par coupure à la trypsin

TM : indique un peptide obtenu par coupure à la trypsin après maléylation des lysines

BrCN : indique un peptide obtenu par coupure au bromure de cyanogène

Le premier nombre qui suit la lettre correspond au numéro de la fraction chromatographique, le deuxième à celui de la bande d'électrophorèse préparative.

Nomenclature des acides aminés

ACIDE ASPARTIQUE	ASP	D	VALINE	VAL	V
ASPARAGINE	ASN	N	METHIONINE	MET	M
THREONINE	THR	T	ISOLEUCINE	ILE	I
SERINE	SER	S	LEUCINE	LEU	L
ACIDE GLUTAMIQUE	GLU	E	TYROSINE	TYR	Y
GLUTAMINE	GLN	Q	PHENYLALANINE	PHE	F
PROLINE	PRO	P	LYSINE	LYS	K
GLYCINE	GLY	G	HISTIDINE	HIS	H
ALANINE	ALA	A	ARGININE	ARG	R
CYSTEINE	CYS	C			inconnu x
			TRYPTOPHANE	TRP	W

## V STRUCTURE COVALENTE DE LA MYOGLOBINE DE MANCHÔT

### A. CONSTRUCTION GENERALE DE LA SEQUENCE

Les principales étapes de la construction de la séquence (voir Tableau 13) peuvent être résumées comme suit :

Un certain nombre de peptides provenant de nos différentes hydrolyses ont pu être placés par analogie ou homologie avec les séquences de myoglobines connues. D'autres peptides n'ont pu être placés de cette manière parce que trop différents. D'autres enfin n'étaient pas purs et n'avaient pas une concentration suffisante pour subir une dégradation ou bien avaient été perdus. Nous avons pu ainsi constater les endroits non recouverts par des peptides et ceux où les recouvrements entre zones étaient faibles. Le hasard de la séquence de la myoglobine fait que très souvent on trouve des résidus sensibles à la trypsine, à la chymotrypsine et au bromure de cyanogène, situés les uns à côté des autres. Cela ne permet pas des zones de recouvrement particulièrement larges. C'est alors que nous avons dû recourir à une coupure tryptique après maléylation de l'apomyoglobine.

La séquence du résidu N-terminal au résidu 70 a pu être établie en combinant les renseignements fournis par une série de peptides issus d'hydrolyses de divers types. Elle a été complétée ou simplement confirmée par dégradation sur "Sequencer" des résidus 1 à 51, puis sur un peptide "maleyl" à partir du résidu 57 jusqu'à 70.

La séquence de la partie C-terminale a pu être établie en combinant les renseignements fournis par différents peptides et nous permet de couvrir logiquement la partie allant du 131ème au 153ème résidu.

La séquence allant du résidu N-terminal à 70 contient toutes les arginines de l'apomyoglobine, moins deux. La séquence

C-terminale contient une arginine. La dernière doit se situer nécessairement entre les résidus 70 et 132.

Les éléments de la structure qui précède nous permettent de prévoir, l'endroit de la structure où est situé le dernier résidu d'arginine.

A part un peptide "maleyl" de 31 résidus, contenant les deux tryptophanes de la myoglobine (Séquence 1 - 31), la taille des peptides "maleyl" correspond à un nombre de résidus variant de cinq à une quinzaine. Puisqu'une arginine doit être localisée entre les résidus 70 et 132, nous devons donc nous attendre à obtenir au moins un grand peptide "maleyl" avec une taille maximum de l'ordre de 70 résidus, ou deux grands peptides dont la taille minimum aurait été de l'ordre de 35 résidus (suivant la place de cette arginine). Nous avons obtenu deux peptides de tailles légèrement différentes. L'un commence par une partie connue de la séquence N-terminale (1 - 70), qui va du résidu 56 au résidu 70 -ce qui permet d'affecter ce peptide (par sa composition) au recouvrement de la séquence jusqu'au résidu 100-, l'autre doit nécessairement suivre le premier et couvrir la séquence de 100 à 139.

Nous pouvons de ce fait tenir compte de peptides qui avaient été placés par analogie entre 70 et 130 et couvrir également une zone pour laquelle nous n'avions pas de peptides (peptides insolubles).

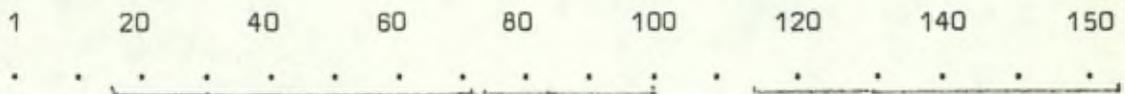
Le tableau ci-après résume les étapes de la construction de la séquence.

## TABLEAU 13

### Chronologie de la construction de la structure covalente

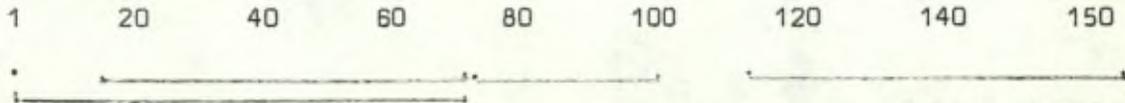
#### 1ère étape

La structure est partiellement couverte par les peptides issus des hydrolyses par la trypsine et la chymotrypsine



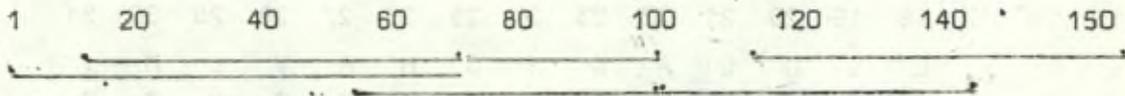
#### 2ème étape

La partie N-terminale de l'apomyoglobine est obtenue/ou vérifiée par dégradation sur Sequencer.



#### 3ème étape

L'obtention de peptides tryptiques après maléylation de la protéine permet d'achever le recouvrement de la séquence. Les deux grands peptides centraux sont partiellement étudiés sur Sequencer.





## B. CONSTRUCTION DE LA SEQUENCE N-TERMINALE

(du résidu N-terminal ou résidu 70)

Aucun des peptides que nous avons isolés ne pouvait expliquer les quatorze premiers résidus. Nous nous attendions à ce fait dans la mesure où cette séquence constitue un des peptides tryptiques insolubles dans toutes les myoglobines. Cette partie de la structure covalente a été déterminée par dégradation automatique sur "Sequencer"; l'identification des acides aminés libérés a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse (GLC) directe de la phénylthiohydantoïne (PTH), avec ou sans silylation; ou, en cas d'ambiguïté dans les résultats obtenus par GLC, par analyse selon Moore et Stein après hydrolyse du PTH. Les résultats du Sequencer permettent le recouvrement avec des peptides dont la structure avait été déterminée précédemment par la technique nouvelle.

La séquence représentée par les résidus 15, 16 et 17, c'est-à-dire : G K V constitue la partie N-terminale du peptide chymotryptique C.18.2. Ce peptide chymotryptique, qui comporte 15 résidus, couvre la région nécessairement allant de 15 à 29.

Les résidus numérotés 17, 18, 19 du peptide C.18.2 constituent la séquence N-terminale du peptide tryptique T 14.3.

Le peptide C 18.1 contenant 16 résidus, couvre, par sa composition en acides aminés, la région 15 à 30.

L'ensemble de la structure qui est ainsi couverte a été dans un deuxième stade confirmée par dégradation automatique sur l'apomyoglobine.

La structure de l'apomyoglobine allant du premier résidu au trentième se trouve ainsi établie.

	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
C 25.2	R	L	F														
	→	→	→														
		(L	F	K	S	H	P	E	T	M	D	R)			TM 16.4		
		L	F	K	S	(H	P	E	T	M	D	R)			T 16.2		
		→	→	→	→												
											D	R	F	D	K	F C 22.1	
											→	→	→	→	→	→	
											D	R	F	D	K	F C 16.1	

Résidus confirmés par Séquen- L F . . H P E T M . . F . .  
cer → → → → → → → → → → → → → → →

L'ensemble de ces résultats nous permet d'établir la suite de la séquence :

31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46
R	L	F	K	S	H	P	E	T	M	D	R	F	D	K	F

	46	47	48	49	50	51	
T 15.2	F	R					
	→	→					
Séquen-							
cer	F	.	G	L	.	T	<i>fin de la dégradation de l'apomyoglobine sur</i>
	→	→	→	→	→	→	<i>Sequen-</i>

|G L K T P E D M R| Peptide maleyl TM 16.5

|G . L . K| T 17.3

|K T P E D M| C 6.1

|T P E D M R| T 64  
→ →

46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56
F	R	G	L	K	T	P	(E . D)	M	R	

Constatons ici qu'il serait pratiquement impossible de construire la séquence sur la base des peptides tryptiques, chymotryptiques ou obtenus par coupure au bromure de cyanogène. Nous avons dans les positions 29, 30, 31, 32 et 33, une série de résidus qui sont tous sensibles à l'un ou l'autre de ces agents d'hydrolyse et les recouvrements entre séquences sont nécessairement limités à un et au maximum à deux résidus.

Le peptide C 25.2 de structure R L F a été placé dans la position 31, 32, 33 par analogie avec les séquences connues et le peptide C 22.1 de séquence D R F D K F aux positions 41 à 46. Le peptide maleyl T M 16.4 opère le recouvrement entre les positions 32 et 42. Ce peptide est lui-même recouvert par d'autres peptides dont un peptide tryptique non clivé au niveau du résidu de lysine 34.

Un seul peptide peut expliquer la séquence pour les résidus 46, 47, c'est le peptide T 25.2 de séquence F R. Remarquons que la séquence F R se présente aussi dans les positions 138-139. La coupure serait dans ce cas de type chymotryptique ayant eu lieu après une leucine (Leu 137). Il ne faut pas exclure ce genre de possibilité quoiqu'il soit plus vraisemblable de placer ce peptide dans les positions 46 et 47.

La liaison avec la suite de la séquence est obtenue par le Sequencer qui donne G L K T pour les positions 48, 49, 50 et 51 qui constituent la séquence N-terminale du peptide maleyl TM 16.5 lui-même recouvert par d'autres peptides.

La structure de l'apomyoglobine du manchot allant du 31ème au 56ème résidu se trouve ainsi établie.

Le résidu d'acide aspartique et glutamique occupant les positions 53 et 54 sont replacés par homologie avec les structures des myoglobines connues. Il subsiste pour eux une possibilité de permutation. La position de l'arginine 47 est fondée uniquement sur un dipeptide et sur la présence d'un peptide maleyl qui commence immédiatement après cette position.

L'étude du peptide maleylé qui va du résidu 43 au résidu 47 permettra de confirmer cette position.



Les peptides tryptiques T 8.2 et T 8.4 avaient été initialement placés par homologie pour couvrir la zone allant des résidus 57 à 63. Le peptide BrCN 12.2 couvre les deux peptides qui précèdent et permet de connecter la structure 1 à 56.

Le peptide C 14.1 lui-même recouvert par le peptide C 23.8 ont été placés par homologie à la couverture des positions 63 à 69. L'ambiguïté qui subsistait quant à l'emplacement de ces peptides a été levée par l'étude du peptide maleyl TM 1.

TM 1: Un des deux grands peptides obtenus après trypsinolyse de l'apomyoglobine maléylée commence également en position 57. Il couvre par sa composition et par la connaissance partielle de la structure covalente de la partie médiane, la partie de l'apomyoglobine allant de la 57ème à la 98ème position.

Ce peptide qui est contaminé par l'autre grand peptide maléylé a pu toutefois être dégradé partiellement par dégradation automatique au Sequencer.

Une quinzaine de dégradations a permis d'obtenir des résultats qui confirment ceux obtenus par dégradation manuelle, un blocage de la réaction dû à des causes indéterminées n'a pas permis de poursuivre la dégradation au delà du résidu n°70.

Ces résultats permettent toutefois de certifier les positions couvertes par les petits peptides décrits précédemment mais qui ne se couvraient pas entre eux au niveau de la position 63.

|N D M A S K Y K E F G Q F G TM 4.2  
 |E F G Q F G| T 12.3  
 + + + + + +  
 |K E F| C 17.1  
 + +  
 |Y K| T 19.3  
 |D (M . A . S .)K| T 10.4  
 + |Y . K . E . F . G . Q . F . G| T 20.2

133 134 135 136 137 138 139  
 |K A L (E . L) F| C 23.2  
 + +  
 |A L (E . L) F R| T 22.3  
 + +

La séquence de la partie C-terminale est donc représentée par :

133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153  
 K A L (E . L) F R N D M (A . S) K Y K E F G F Q G

### C. CONSTRUCTION DE LA SEQUENCE C-TERMINALE

(du résidu 133 ou résidu C-terminal)

Le peptide T 12.3 ne contient pas de résidu lysine ou arginine. Sa composition reflète la présence de glycine, de phénylalanine et d'acide glutémique en quantités molaires équivalentes.

Nous avons considéré qu'il devait constituer la partie C-terminale de l'apomyoglobine.

La séquence de ce peptide a montré qu'il ne s'agissait pas d'un tripeptide mais d'un hexapeptide de séquence :

148	149	150	151	152	153
E	F	G	F	Q	G
+	+	+	+	+	+

La spécificité de la trypsine implique que le résidu 148 soit précédé par une arginine ou une lysine. Le peptide chymotrypsique C 17.1 de séquence K E F répond à cette condition et couvre les deux premiers résidus du peptide T 12.3.

Un peptide "maleyl" ne contient pas d'arginine. Ce peptide, pour les mêmes raisons qui sont évoquées plus haut, doit constituer la partie C-terminale.

Il est lui-même couvert par différents peptides :

Le peptide maleyl TM 42 implique une arginine dans la position qui précède son résidu N-terminal. Le peptide chymotrypsique C 23.2 et le trypsique T 22.3 ont des séquences qui se couvrent presque totalement. Cette séquence se retrouve dans toutes les myoglobines actuellement connues.

La structure covalente de la partie C-terminale de l'apomyoglobine du manchot se trouve ainsi établie. La nature amidique de l'asparagine 140 n'a pas été établie chimiquement. La présomption est basée sur l'homologie.



D. CONSTRUCTION DE LA SEQUENCE MEDIANE

(du résidu 70 ou résidu 133)

La partie centrale de la séquence est couverte par deux grands peptides obtenus par coupure trypsique après maleylation.

Un peptide (TM 1) débute au niveau du résidu 57; l'autre peptide (TM 2) s'achève au résidu d'arginine 139. Etant de taille semblable, l'un s'achève au niveau du résidu 98 et l'autre commence immédiatement après.

56	57	58	59	60	61	...	98	99	100	101	102	103	...	138	139				
R		G	S	E	D	M	...	R			V	P	V	K	Y	...	F	R	
<i>peptide maleyl TM 1</i>								<i>peptide maleyl TM 2</i>											

obtenus par séparation sur Sephadex G 50 et purifiés sur le même support par plusieurs rechromatographies. Ils ne sont pas totalement séparés et se contaminent l'un l'autre. Il a été néanmoins possible d'étudier ces deux peptides sur Sequencer. Cela a permis de confirmer la position de peptides trypsiques et chymotrypsiques qui avaient été placés par analogie dans cette partie de la séquence.

Il faudra purifier ces peptides par chromatographie d'échange ionique et leur faire subir une nouvelle hydrolyse enzymatique pour pouvoir les étudier complètement.

Le peptide T 14.2 dont la structure a été déterminée comme étant L G Q I L K a été placé par analogie avec les séquences connues, et couvre les positions 72 à 77. La seule différence entre ce peptide et les séquences connues est le remplacement en position 74 de l'alanine, glycine ou asparagine par une glutamine.

Le peptide T 115 de structure I L K couvre les trois derniers résidus numérotés 75, 76, 77. Ce peptide trypsique, obtenu avec un rendement élevé et dans un état de pureté exceptionnel, s'explique difficilement à cet endroit si l'on tient compte de la spécificité de la trypsine. Il n'est néanmoins pas possible de lui trouver un autre emplacement dans la séquence de la myoglobine de manchot.

Le résidu qui précède le résidu 72 n'a pu être identifié. Il se trouve être de l'alanine dans toutes les séquences connues mais on expliquerait mal encore une fois, la non-spécificité de la trypsine. Nous préférons donc laisser cette position ouverte, le sequencer n'ayant plus donné de résultats interprétables à la suite, semble-t-il, d'un blocage de la réaction. L'étude ultérieure du peptide TM 1 permettra d'établir la nature de ce résidu.

Les peptides C 21.3 et T 26.3 couvrent la séquence du résidu 78 au résidu 97 et sont revouverts eux-mêmes dans la partie C-terminale par de petits peptides qui confirment une partie de la structure proposée pour les deux précédents.

La seule différence est le remplacement de l'alanine en position 90 par une sérine. Nous avons choisi cette position plutôt qu'une autre pour deux raisons :

- La sérine placée à cet endroit n'implique qu'un remplacement dans le restant du peptide.
- La présence de sérine est compatible avec la coupure chymotrypsique qui a donné naissance aux peptides C 22.5 et C 11.4

Le résidu 98 qui est la lysine dans toutes les séquences connues, ne fait partie d'aucun de nos peptides, sauf du maleyl TM 1. Nous attribuons à cette place un résidu de lysine ou d'arginine puisque commence en position 99 le peptide maleyl TM 2. La présence d'arginine en cette position n'ayant pas été prouvée chimiquement. La seule présomption étant liée à la spécificité de la trypsine sur la protéine maléylée. L'étude du peptide TM 1 par les carboxypeptidases A et B nous permettra au moment où ce peptide sera purifié, d'abolir ce doute.

Le peptide "maléylé" TM 2 qui est contaminé par 30 % du peptide TM 1 doit comporter approximativement une quarantaine d'acides aminés. Le seul endroit de la structure où pourrait s'insérer ce peptide est la région de 99 à 139.

Ce peptide a été dégradé sur "Sequencer". Seuls les 18 premiers résidus de ce peptide ont pu être identifiés, ensuite les PTH libérés n'ont pu être identifiés à la suite d'artefacts qui peuvent être dûs à l'état d'impureté du peptide.



L'identification par chromatographie en phase gazeuse des PTH libérés lors des quinze premières dégradations nous a donné la succession permettant de couvrir la structure des résidus 99 à 117

La comparaison de la séquence d'acides aminés ainsi obtenue avec les séquences connues confirme l'hypothèse que nous avons faite quant à l'emplacement de ce peptide dans la structure totale, et la valine N-terminale de ce peptide dans la myoglobine de manchot porte donc bien le numéro 99.

Deux peptides chymotrypsiques, le C 19.3 et le C 22.2 sont compatibles avec les 4 derniers résidus identifiés dans le peptide TM 2

110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120				
A	I	M	.	V	I	A	Q	.	.	.	"Sequencer"			
			K	V	I	A	Q	K	<u>H</u>		C 19.3			
			K	V	I	A	Q	K	H	A	S	N	<u>F</u>	C 22.2

Le peptide C 5.2 trop peu concentré pour être dégradé, a été remplacé par homologie de composition avec les séquences de myoglobines connues et opère le raccord avec la séquence C-terminale précédemment décrite.

Il nous semble néanmoins nécessaire de poursuivre la purification du peptide "maleyl" TM 2 afin de pouvoir l'étudier complètement dans le but de préciser ou de confirmer la structure que nous avons proposée.

Nos expériences sur la détermination de la structure covalente de l'apomyoglobine de manchot nous permettent de proposer la séquence des acides aminés de cette protéine qui est récapitulée dans le tableau 14 et également dans le tableau 15 \*.

Certaines indéterminations persistent, il s'agit du résidu 71 et du résidu 97 où il reste la possibilité d'avoir un résidu d'arginine ou de lysine.

Quelques éléments sont remplacés par homologie dans les séquences connues, il s'agit en général de zones relativement invariantes dans les myoglobines.

---

\* Nomenclature des acides aminés à trois lettres.

Toutefois, dans la mesure où la structure covalente de la myoglobine de manchot est la structure qui comporte le plus de différences par rapport aux autres myoglobines, nous envisageons de confirmer ces éléments ultérieurement. On ne peut pas exclure des inversions semblables à celles que nous avons au niveau des résidus 116 et 117

Dans les myoglobines connues on trouve que :

- la position 115 est occupée par un résidu de leucine ou d'isoleucine
- la position 116 par l'histidine ou la glutamine
- la position 117 par la sérine ou l'alanine
- la position 118 par la lysine ou l'arginine.

En se basant uniquement sur la composition des peptides qui couvrent cette région dans la myoglobine du manchot on conclurait par la séquence :

115	116	117	118
I	Q	A	K

or nous avons trouvé

I	A	Q	K
---	---	---	---

La localisation des zones où il reste des éléments à confirmer étant faite, on constate que celles-ci sont couvertes intégralement par deux grands peptides, que nous avons obtenus par coupure enzymatique par la trypsine, après modification des résidus lysine. Ces peptides purifiés par chromatographie et rechromatographiés sur gel de dextrane sephadex, n'avaient pu être obtenus avec un degré de pureté suffisant.

Nous envisageons donc de séparer ces peptides par chromatographie d'échange d'ions.

La détermination de la structure complète de ces peptides permettra vraisemblablement de confirmer intégralement la structure que nous avons proposée.

RECAPITULATION DE LA SEQUENCE DE LA MYOGLOBINE DE MANCHOT

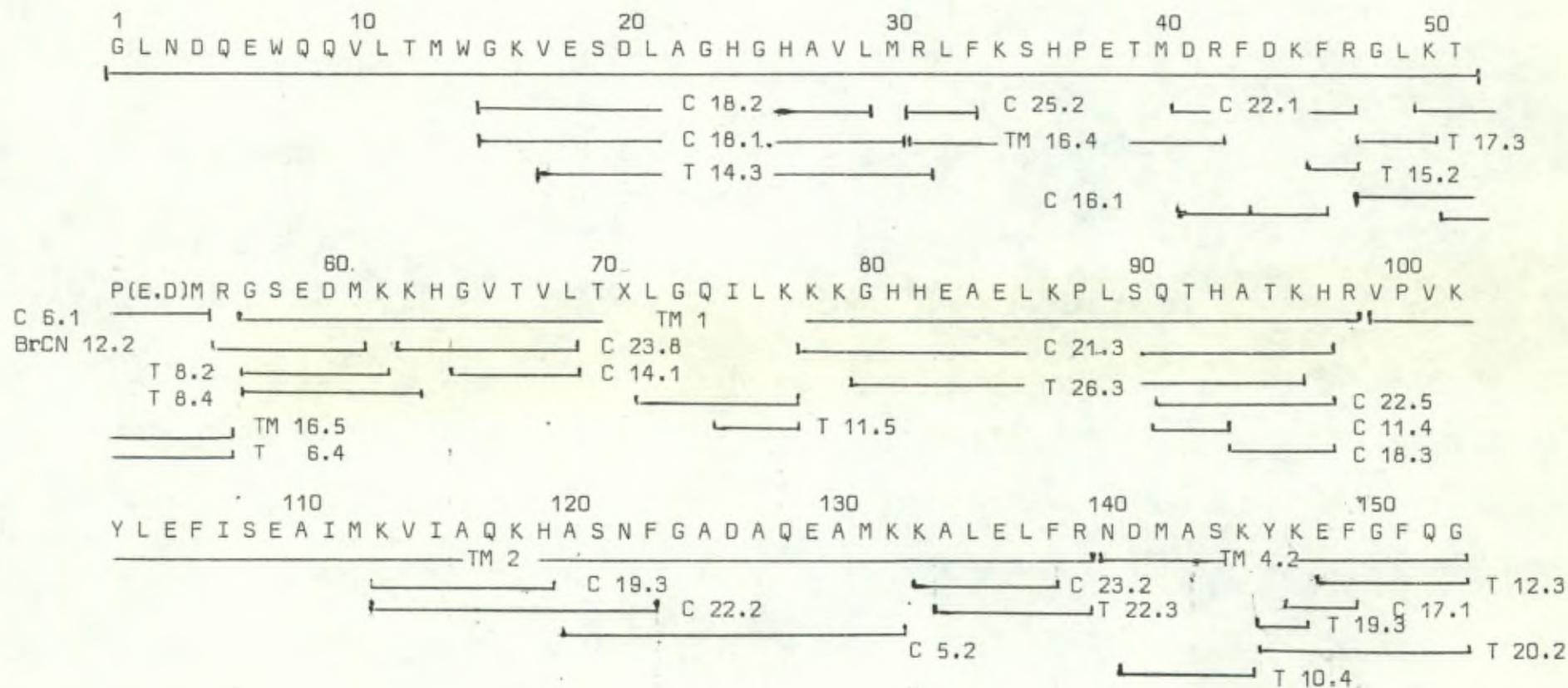


TABLEAU 14

#### IV COMPARAISON DES SEQUENCES DES MYOGLOBINES

La comparaison de la séquence des acides aminés de la myoglobine du manchot avec d'autres myoglobines nous montre qu'un certain nombre de résidus qui étaient invariants dans ces dernières ont été mutés dans le manchot. Ils sont cités et comparés dans la liste ci-dessous.

	<u>AUTRES MYOGLOBINES</u>	<u>MYOGLOBINE DE MANCHOT</u>	
Position :	3	SER	ASN
	5	GLY	GLN
	30	ILE	MET conservatif
	40	LEU	MET conservatif
	41	GLU	ASP conservatif
	42	LYS	ARG conservatif
	47	LUS	ARG conservatif
	48	HIS	GLY
	52	GLU	PRO
	71	ALA	non déterminée
	90	ALA	SER
	92	SER	THR conservatif
	98	LYS	ARG ou LYS conservatif
	112	ILE	MET conservatif

Dans d'autres positions on peut rencontrer à travers les différentes structures covalentes des acides aminés de type différent. Nous nous bornerons à citer les positions pour lesquelles, dans la myoglobine de manchot apparaissent des acides aminés qui n'avaient pas été rencontrés antérieurement et le nombre de cas où tel où tel acide aminé a été rencontré.

Position :	12	ASN (8) HIS (1)	THR
	13	VAL (5) ILE (1) ALA (1)	MET
	19	THR (2) ALA (6) ILE (1)	SER
	26	LYS (1) GLN (7) GLU (1)	HIS
	27	ASP (4) GLU (5)	ALA
	53	ASP (4) ALA (5)	GLU
	57	ALA (8) ARG (1)	GLY
	74	ASN (1) GLY (7) ASN (1)	GLN
	129	GLY (5) ALA (3)	(GLX)

Si certaines substitutions sont purement conservatives, d'autres ne le sont pas et l'importance éventuelle de ces dernières sera traitée dans la troisième partie du travail où sera étudiée, plus particulièrement la structure spatiale théorique de la myoglobine de manchot.

Si on examine l'ensemble des structures covalentes de toutes les myoglobines et hémoglobines connues on s'aperçoit que certaines positions sont occupées par le même résidu d'acide aminé. D'autres positions sont dans le même cas sauf pour quelques globines (2).

Les deux premières colonnes du tableau ci-dessous donnent la liste des sites invariants dans toutes les globines actuellement connues et l'état d'occupation du même site dans la myoglobine du manchot.

Les deux dernières colonnes donnent la liste des sites presque toujours invariants dans les globines et l'état d'occupation de chacun des sites dans la myoglobine du manchot.

SITES INVARIANTS				SITES PRESQUE TOUJOURS INVARIANTS			
		Globines (1)	Myoglob. de manchot			Globines (2)	Myoglob. de manchot
25	B6	GLY	GLY	16	A14	LYS	LYS
43	CD1	PHE	PHE	31	B12	ARG	ARG
64	E7	HIS	HIS	39	C4	PHE	PHE
89	F4	LEU	LEU	62	E5	LYS	LYS
93	F8	HIS	HIS	68	E11	VAL	VAL
133	H9	LYS	LYS	123	GH5	PHE	PHE
146	H22	TYR	TYR	123	GH5	PHE	PHE

(1) A toutes fins utiles cette colonne donne la numérotation correspondant à la structure tridimensionnelle (voir 3ème partie)

(2) globines : toutes les hémoglobines et myoglobines. Depuis la connaissance de la structure tridimensionnelle des erythrocytines il semble que l'on pourrait classer certaines d'entre elles sous le même vocable.

## COMPARAISON PHYLOGENIQUE DES MYOGLOBINES

Si on dresse un tableau reprenant les nombres de différences en acides aminés relevé par comparaison de protéines homologues, on constate qu'en première approximation, ces nombres peuvent être considérés comme étant proportionnels au temps depuis lequel les gènes correspondants ont commencé à évoluer indépendamment (Zuckermandl et Pauling, 1962). Il apparaît dès lors possible d'établir des relations phylétiques entre les espèces animales à partir de la comparaison des séquences de protéines homologues.

Pour les myoglobines, on remarquera en examinant le tableau à la page suivante, que la protéine du manchot présente un plus grand nombre de différences en acides aminés relativement aux autres myoglobines (celles de mammifères).

Ceci semble montrer qu'au niveau moléculaire la divergence évolutive entre le manchot (représentant la classe des oiseaux) et les mammifères est antérieure à la divergence des mammifères entre eux.

A l'opposé, on n'observe qu'une seule substitution d'acide aminé entre la myoglobine de l'homme et celle du singe, ce qui tend à confirmer la différenciation récente de ces deux espèces.

Certains auteurs ont voulu approcher le phénomène non plus seulement au niveau des acides, mais à celui du gène lui-même (Jukes (1963), Fitch et Margoliash (1967) mesurent la divergence évolutive sur la base du nombre minimum de différences de bases (M.B.D.)

Dayhoff et al. (1969) utilisent le P.A.M.S. (punit accepted mutation/100 résidus), paramètre plus élaboré faisant intervenir des facteurs statistiques.

Holmquist et al. (1972) introduisent le paramètre R.E.H. (random evolutionary hits : one step nucleotide base changes, corrected for multiple hit phenomena and the degeneracy of the genetic code, but not corrected for the number of variable codons).

	<i>cachalot</i>	<i>cheval</i>	<i>phoque</i>	<i>marsouin</i>	<i>homme</i>	<i>singe</i>	<i>boeuf</i>	<i>kangourou</i>	<i>mouton</i>	<i>manchot</i>
<i>cachalot</i>		19	26	15	24	25	30	31	27	46
<i>cheval</i>			20	16	18	19	18	25	16	36
<i>phoque</i>				17	24	25	28	27	26	38
<i>marsouin</i>					20	21	24	28	23	41
<i>homme</i>						1	28	23	24	41
<i>singe</i>							29	24	25	40
<i>boeuf</i>								35	36	43
<i>kangourou</i>									31	36
<i>mouton</i>										-
<i>manchot</i>										

DIFFERENCES EN ACIDES AMINES DES SEQUENCES DE MYOGLOBINES

Ces différents paramètres se distinguent par leur contenu mathématique mais, heureusement, grandissent qualitativement dans le même sens. Holmquist (1972,b) présente un tableau donnant la relation entre le nombre d'acides aminés différents dans deux protéines homologues et la distance évolutionnelle mesurée en fonction de ces différents paramètres. Nous reproduisons ci-dessous une partie de ce tableau.

Nombre de différences en acides aminés observées par cent co- dons	Distance évolutionnelle exprimée en		
	P.A.M.S.	R.E.H.S	M.B.D.S.
1	1	1,5	1,0
5	5	7,5	5,2
10	11	15	10
15	17	22	16
20	23	31	21
25	31	40	27
30	39	50	32
35	48	62	38
40	58	75	45
45	70	88	51
50	83	101	57

Ne manipulant pas l'outil mathématique avec la dextérité de ces auteurs, nous nous bornerons à utiliser leurs résultats pour tenter de situer la myoglobine de manchot parmi les autres.

Dayhoff et al. dans l'édition 1972 de l'Atlas of Protein Sequence présentent un tableau montrant les divergences évolutionnelles entre les différentes myoglobines de mammifères, mesurées en P.A.M.S..

Considérant le nombre d'acides aminés différents (ramenés pour 100 résidus) entre deux protéines, nous avons, en utilisant le tableau de Holmquist, transformé ce nombre en événements évolutionnels mesurés en P.A.M.S. pour les myoglobines de cachalot, de boeuf, de kangourou et de manchot.

Les valeurs ainsi trouvées sont réunies dans la grille à la page suivante.

	boeuf	cachalot	kangourou	manchot
boeuf	0			
cachalot	225	0		
kangourou	29	28	0	
manchot	36	39	29	0

Différences évolutives mesurées en P.A.M.S

L'ensemble des valeurs de la grille nous permet de construire le schéma suivant et de situer la myoglobine de manchot par rapport à celles de mammifères. La comparaison pourra aussi être faite avec le schéma de Dayhoff.

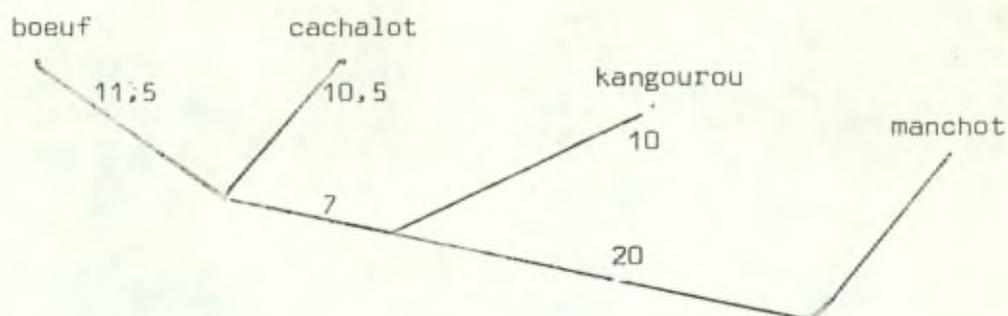
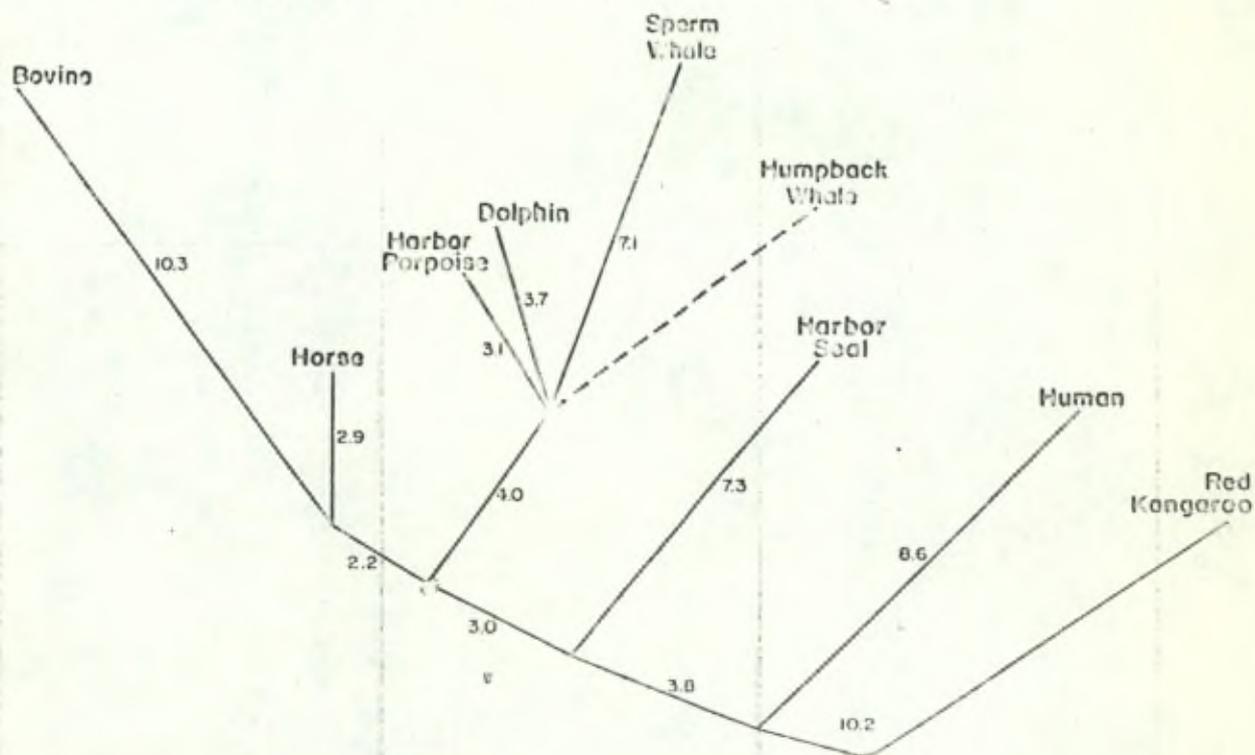


Schéma de Dayhoff

Extrait de Atlas of Protein Sequence édition 1972



## VII DISCUSSION DES RESULTATS

Si certaines positions de la chaîne de l'apomyoglobine du manchot n'ont pas été dégradées chimiquement, le nombre de peptides qui recouvre la séquence d'un bout à l'autre de la chaîne est suffisant pour que la structure proposée le soit avec un bon degré de certitude.

Une étude plus complète des peptides maléylés permettra d'achever complètement la description totale de cette protéine.

La structure covalente de la myoglobine du manchot fait apparaître en moyenne plus de différences en acides aminés que les myoglobines des mammifères.

Les sites considérés comme invariants ou presque toujours invariants dans les hémoglobines et myoglobines se retrouvent tous dans la myoglobine du manchot.

Quatorze sites qui, dans les myoglobines des mammifères étaient occupés par des acides aminés de même nature, le sont dans le manchot par des acides aminés différents.

Plus de la moitié de ces substitutions sont en fait conservatives et elles ne devraient donc pas influencer la conformation ou les propriétés biologiques de la myoglobine du manchot. L'implication éventuelle des autres substitutions sera étudiée plus particulièrement dans la troisième partie de ce travail.

Une comparaison phylogénique des myoglobines fait apparaître celle du manchot relativement bien détachée du groupe des mammifères. La comparaison qui sera faite avec la myoglobine de poule (M. Deconinck, 1973) et ultérieurement avec la myoglobine d'autruche permettra sans doute de faire une comparaison à l'intérieur même de la classe des oiseaux.

## 3<sup>EME</sup> PARTIE

### CONFORMATION THEORIQUE DE LA MYOGLOBINE DE MANCHOT

I	<u>CONFORMATION DE LA MYOGLOBINE DE CACHALOT</u>	p.71
	A. DESCRIPTION GENERALE DE LA MOLECULE	
	B. TABLEAU DESCRIPTIF DES INTERACTIONS PARTICULIERES	p.73
II	<u>COMPARAISON DES MYOGLOBINES DE MANCHOT ET DE CACHALOT</u>	p.79
	A. ZONES HELICOIDALES	
	B. INTERACTIONS A MOYENNES DISTANCES	p.79
	C. INTERACTIONS A LONGUES DISTANCES	p.85
	1) du type hydrophobe (Ch. III)	
	2) du type polaire	
	D. INTERACTION AVEC LE GROUPE PROSTHETIQUE	p.87
	1) du type polaire	
	2) du type hydrophobe	
III	<u>COMPARAISON DES ZONES HYDROPHOBES DANS LES MYOGLOBINES</u>	p.89
	A. REPRESENTATION DES $\alpha$ -HELICES SELON DUNHILL	
	B. COMPARAISON DES DIAGRAMMES DE DUNHILL	
	C. COMPARAISON DES ZONES HYDROPHOBES DANS LES MYOGLOBINES	p.92
IV	<u>CONCLUSIONS</u>	p.96

Nous examinerons dans ce chapitre si la structure covalente de la myoglobine de manchot est compatible avec une conformation moléculaire semblable à celle de la myoglobine de cachalot.

## I CONFORMATION DE LA MYOGLOBINE DE CACHALOT

### A. DESCRIPTION GENERALE DE LA MYOGLOBINE DE CACHALOT (Watson, H.C., 1968)

Cent vingt et un des cent cinquante trois acides aminés qui constituent la myoglobine de cachalot appartiennent à huit segments hélicoïdaux qui ont la structure d' $\alpha$ -hélices. Ces hélices déterminent entre elles, deux-à deux, des articulations que nous appellerons "charnières".

Les huit segments hélicoïdaux sont numérotés A, B, C, D, E, F, G, H. Les charnières sont définies par les lettres désignant les deux hélices qu'elles articulent.

Les hélices B, C, E, F, G et H, ainsi que la charnière C D, forment ensemble les parois de la poche hydrophobe dans laquelle vient s'enfouir l'hème.

Les résidus d'acides aminés fortement hydrophobes (telles la valine, la leucine, l'isoleucine, la méthionine et la phénylalanine) apparaissent à l'intérieur de la molécule, tandis que les résidus polaires ou chargés apparaissent à sa surface.

Il n'existe que peu de liaisons spécifiques entre résidus distants dans la structure covalente.

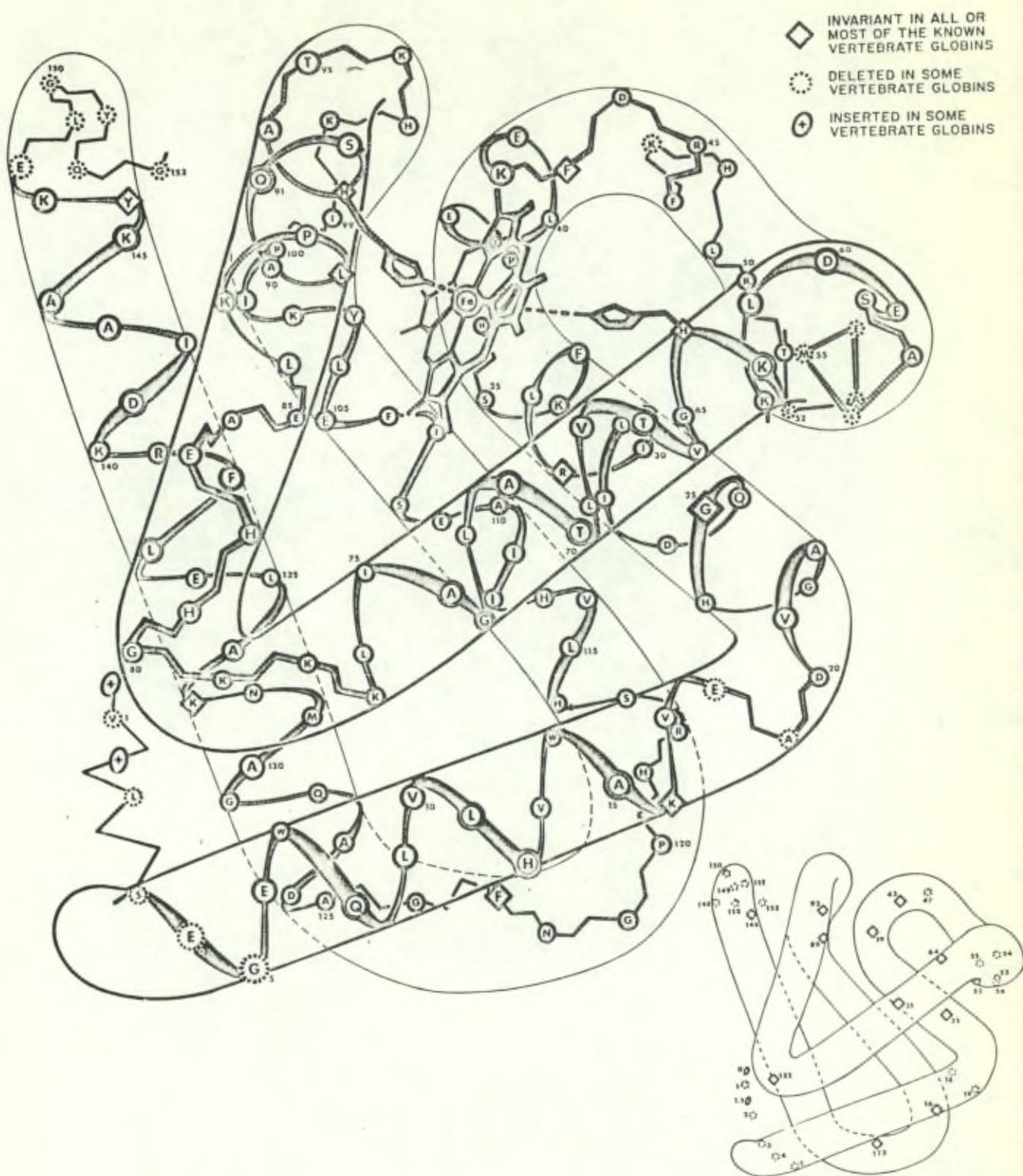
La plupart d'entre elles mettent en oeuvre le groupe carboxylique de résidus d'acide aspartique ou d'acide glutamique avec le groupe-ment basique appartenant à la lysine, l'histidine ou l'arginine.

La plupart des résidus de sérine et de thréonine forment par leur fonction alcool, des liaisons d'hydrogène, mais en grande majorité à l'intérieur d'une même hélice plutôt qu'entre résidus éloignés appartenant à des hélices différentes.

La stabilité de l'édifice moléculaire est assurée par un grand nombre d'interactions hydrophobes qui ont lieu soit d'hélice à hélice, soit par l'interaction d'une hélice ou d'une charnière avec l'hème. Celui-ci est enfoui dans une poche hydrophobe; seuls dépassent de la cavité deux groupes propionyles qui sont en interaction électrostatique avec deux résidus basiques de l'apomyoglobine.

L'atome de fer de l'hème, qui est à l'état d'oxydation  $Fe^{++}$  dans les formes biologiquement actives, fixe par quatre liaisons coordinatives les quatre atomes d'azote du cycle prophyrinique. Il est lié par une liaison du même type avec un des atomes d'azote du cycle de l'histidine  $H_8$  (histidine proximale). Cette dernière est maintenue dans sa position par un lien d'hydrogène formé entre le deuxième atome d'azote de son cycle et l'oxygène du carbonyle du résidu  $F_4$ . La dernière liaison de coordination avec le  $Fe^{++}$  est disponible pour assurer la fixation de la molécule dioxygène. L'histidine  $E_7$  (histidine distale) est trop éloignée du  $Fe^{++}$  pour pouvoir former une liaison avec lui, sinon par l'intermédiaire de la molécule d'oxygène.

La figure de la page suivante illustre de manière schématique le repliement général de la myoglobine du cachalot.



STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DE LA MYOGLOBINE DE CACHALOT  
 (tiré de Atlas of Protein Sequence and Structure 1972, 5, 27  
 Ed. M.O. Dayhoff; The National Biomedical Research Foundation)

## B. TABLEAU DESCRIPTIF DES INTERACTIONS PARTICULIERES

Le tableau ci-après reprend les principaux éléments qui caractérisent la structure tridimensionnelle de la myoglobine de cachalot, tels qu'ils ont été présentés par Watson (1968) à partir des résultats de Kendrew.

Les résidus sont caractérisés d'une part de façon numérique, de 1 à 153, et d'autre part par le système de lettres désignant les segments hélicoïdaux ou les charnières.

A titre comparatif, la première colonne reprend la séquence des acides aminés obtenus pour la myoglobine de manchot. Les acides aminés de la myoglobine du manchot qui apparaissent pour la première fois dans une myoglobine ont été soulignés.

La dernière colonne reprend les divers types de résidus d'acides aminés rencontrés, dans une position donnée, pour les autres myoglobines connues.

On a relié par un trait continu les groupes NH et CO des liens peptidiques qui forment entre eux une liaison d'hydrogène.

Sont également indiqués les groupes responsables d'interactions à courte ou à longue distance, qui ont lieu à l'extérieur des  $\alpha$ -hélices.

	M <sup>(1)</sup>	C <sup>(2)</sup>	NH	CO		AUTRES MYOGLOBINES
1	GLY	VAL	NA1	.	.	GLY, VAL
2	LEU	LEU	NA2	.	.	LEU
3	<u>ASN</u>	SER	A1	.	OH	SER
4	ASP	GLU	A2	.	COO <sup>(-)</sup> ... LYS EF <sub>2</sub>	ASP, GLU
5	<u>GLN</u>	GLY	A3	.		ALA, GLY
6	GLU	GLU	A4	.	COOH	GLU
7	TRY	TRY	A5	/		TRY
8	GLN	GLN	A6	/		GLN, HIS
9	GLN	LEU	A7	/		LEU, GLN, ALA
10	VAL	VAL	A8	/		VAL
11	LEU	LEU	A9	/		LEU, ILE
12	<u>THR</u>	HIS	A10	/		HIS, ASN
13	<u>MET</u>	VAL	A11	/		VAL, ILE
14	TRY	TRY	A12	/		TRY
15	GLY	ALA	A13	/		ALA, GLY
16	LYS	LYS	A14	/		LYS
17	VAL	VAL	A15	/		VAL
18	GLU	GLU	A16	.	COO <sup>(-)</sup> ... LYS E20	GLU
19	<u>SER</u>	ALA	AB1	.		ALA, THR
20	ASP	ASP	B1	.	COO <sup>(-)</sup> ... ARG G19	ASP
21	LEU	VAL	B2	.		LEU, ILE, VAL
22	ALA	ALA	B3	.		ALA, GLY
23	GLY	GLY	B4	.		GLY
24	HIS	HIS	B5	.	Nδ	HIS
25	GLY	GLY	B6	/		GLY
26	HIS	GLN	B7	/	CONH <sub>2</sub> ... CO D6	GLN, HIS, LYS
27	<u>ALA</u>	ASP	B8	/	COO <sup>(-)</sup> ..(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ...ARG G19	ASP, GLU
28	VAL	ILE	B9	/		ILE, VAL
29	LEU	LEU	B10	/		LEU
30	<u>MET</u>	ILE	B11	/		ILE

(1) Myoglobine de Manchot

(2) Myoglobine de cachalot

AUTRES  
MYOGLOBINES

	M	C	NH	CO		
31	ARG	ARG	B12	/	/	ARG
32	LEU	LEU	B13	/	/	LEU
33	PHE	PHE	B14	/	/	PHE
34	LYS	LYS	B15	/	/	LYS, THR
35	SER	SER	B16	.	.	GLY, SER, THR
36	HIS	HIS	C1	/	/	HIS
37	PRO	PRO	C2	*	.	PRO
38	GLU	GLU	C3	.	.	GLU
39	THR	THR	C4	.	.	THR
40	<u>MET</u>	LEU	C5	/	/	LEU
41	<u>ASP</u>	GLU	C6	/	/	GLU
42	ARG	LYS	C7	/	/	LYS
43	PHE	PHE	CD1	/	/	PHE
44	ASP	ASP	CD2	.	.	ASP
45	LYS	ARG	CD3	.	.	LYS
46	PHE	PHE	CD4	/	/	PHE
47	ARG	LYS	CD5	/	/	LYS
48	<u>GLY</u>	HIS	CD6	.	.	HIS
49	LEU	LEU	CD7	/	/	LEU
50	LYS	LYS	CD8	/	/	LYS
51	THR	THR	D1	.	.	THR, SER
52	<u>PRO</u>	GLU	D2	.	.	GLU
53	( <u>GLU</u> )	ALA	D3	.	.	ALA, ASP
54	( <u>ASP</u> )	GLU	D4	/	/	GLU, ASP
55	MET	MET	D5	/	/	MET
56	ARG	LYS	D6	/	/	LYS, ARG
57	<u>GLY</u>	ALA	D7	/	/	ALA, ARG
58	SER	SER	E1	/	/	SER
59	GLU	GLU	E2	.	.	GLU
60	ASP	ASP	E3	.	.	ASP
61	<u>MET</u>	LEU	E4	/	/	LEU
62	LYS	LYS	E5	/	/	LYS, ARG
63	LYS	LYS	E6	/	/	LYS
64	HIS	HIS	E7	/	/	HIS
65	GLY	GLY	E8	/	/	GLY

Diagram annotations:
 

- OH
- $N_{\epsilon} \dots SO_4(NH_4)_2 \dots$  GLU G10
- $N_{\delta} \dots SO_4(NH_4)_2$
- COOH<sup>(-)</sup>
- poche hydrophobe du hème
- $NH_3^+$  CO FG4
- poche hydrophobe du hème
- lien d'H avec un groupe propionyl du hème
- $N_{\epsilon}$
- poche hydrophobe du hème
- OH
- COO<sup>(-)</sup>
- GLN B7
- OH
- COO<sup>(-)</sup> ... ARG CD3
- $NH_3^+$
- $N_{\epsilon} \dots SO_4(NH_4)_2 \dots Fe^{++}$

	M	C	NH	CO		AUTRES MYOGLOBINES
66	VAL	VAL	E9	/		VAL, ALA, ILE,
67	THR	THR	E10	/	OH	THR ASN, THR
68	VAL	VAL	E11	/	poche hydrophobe du hème	VAL
69	LEU	LEU	E12	/		LEU
70	THR	THR	E13	/	OH	THR
71	<u>(X)</u>	ALA	E14	/		ALA
72	LEU	LEU	E15	/		LEU
73	GLY	GLY	E16	/		GLY
74	<u>GLN</u>	ALA	E17	/		ALA, GLY, ASN
75	ILE	ILE	E18	/		ILE
76	LEU	LEU	E19	/		LEU
77	LYS	LYS	E20	/	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ... GLU A16	LYS
78	LYS	LYS	EF1	/		LYS
79	LYS	LYS	EF2	/	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup> ... GLU A2	LYS
80	GLY	GLY	EF3	/		GLY
81	HIS	HIS	EF4	/		HIS
82	HIS	HIS	EF5	/	N <sub>ε</sub> ... ASP H17	HIS
83	GLU	GLU	EF6	/	COO <sup>(-)</sup>	GLU, ASP
84	ALA	ALA	EF7	/		ALA
85	GLU	GLU	EF8	/	COO <sup>(-)</sup>	GLU, ASP
86	LEU	LEU	F1	/		LEU, VAL, ILE
87	LYS	LYS	F2	/		LYS
88	PRO	PRO	F3	*		PRO, HIS
89	LEU	LEU	F4	/	lien H avec HIS F8	LEU
90	<u>SER</u>	ALA	F5	/	liaison avec Fe <sup>++</sup>	ALA
91	GLN	GLN	F6	/		N <sub>ε</sub>
92	<u>THR</u>	SER	F7	/	OH	SER
93	HIS	HIS	F8	/		HIS
94	ALA	ALA	F9	/		ALA
95	THR	THR	FG1	/	OH	THR, ASN
96	LYS	LYS	FG2	/		LYS
97	HIS	HIS	FG3	/	N <sub>ε</sub> lien avec groupe propionyl du hème	HIS
98	<u>(ARG)</u>	LYS	FG4	/	LYS C7	LYS
99	VAL	ILE	FG5	/	TYR H22	ILE, VAL
100	PRO	PRO	G1	*		PRO

	M	C	NH	CO		AUTRES MYOGLOBINES
101	VAL	ILE	G2	.		ILE, VAL
102	LYS	LYS	G3	.		LYS, GLN
103	TYR	TYR	G4	.		TYR
104	LEU	LEU	G5	.		LEU
105	GLU	GLU	G6	.		GLU
106	PHE	PHE	G7	.		PHE
107	ILE	ILE	G8	.		ILE
108	SER	SER	G9	.		SER
109	GLU	GLU	G10	.		GLU, ASP
110	ALA	ALA	G11	.		ALA, SER, $\frac{1}{2}$ CYS
111	ILE	ILE	G12	.		ILE
112	MET	ILE	G13	.		ILE, VAL
113	<u>LYS</u>	HIS	G14	.		HIS, GLY, GLN
114	VAL	VAL	G15	.		VAL
115	<u>ILE</u>	LEU	G16	.		LEU
116	<u>ALA</u>	HIS	G17	.		HIS, GLY, GLN
117	<u>GLN</u>	SER	G18	.		SER, ALA
118	LYS	ARG	G19	.		ARG, LYS
119	HIS	HIS	GH1	.		HIS
120	ALA	PRO	GH2	*		PRO, ALA
121	SER	GLY	GH3	.		GLY, ALA, SER
122	ASN	ASN	GH4	.		ASN, GLU
123	PHE	PHE	GH5	.		PHE
124	GLY	GLY	GH6	.		GLY, ALA
125	ALA	ALA	H1	.		ALA
126	ASP	ASP	H2	.		ASP
127	ALA	ALA	H3	.		ALA
128	GLN	GLN	H4	.		GLN
129	<u>GLX</u>	GLY	H5	.		GLY
130	ALA	ALA	H6	.		ALA
131	MET	MET	H7	.		MET
132	LYS	ASN	H8	.		SER, THR, LYS
133	LYS	LYS	H9	.		LYS
134	ALA	ALA	H10	.		ALA
135	LEU	LEU	H11	.		LEU

NH<sup>+</sup>  
poche hydrophobe du hème  
COO<sup>(-)</sup>

poche hydrophobe du hème

LOH  
COO<sup>(-)</sup> ... HIS C1

{ N<sub>n</sub> 1 ... ASP B8  
N<sub>n</sub> 2 ... ASP B1

COO<sup>(-)</sup>

	M	C	NH	CO		AUTRES MYOGLOBINES
136	GLU	GLU	H12	///		GLU
137	LEU	LEU	H13	///		LEU
138	PHE	PHE	H13	///	poche hydrophobe du hème	PHE
139	ARG	ARG	H15	///		ARG
140	ASN	LYS	H16	///		HIS, LYS, ASN
141	ASP	ASP	H17	///	COO <sup>(-)</sup> ... HIS EF5	ASP
142	MET	ILE	H18	///		ILE, MET
143	ALA	ALA	H19	///		ALA
144	SER	ALA	H20	///		ALA, THR, SER
145	LYS	LYS	H21	///		LYS, ASP, GLU
146	TYR	TYR	H22	///	OH ... CO FG5	TYR
147	LYS	LYS	H23	///		LYS
148	GLU	GLU	H24	///		GLU
149	PHE	LEU	HC1	///		PHE, LEU
150	GLY	GLY	HC2	///		GLY
151	PHE	TYR	HC3	///		PHE
152	GLN	GLN	HC4	.		HIS, GLN
153	GLY	GLY	HC5	.		GLY

## II COMPARAISON DES MYOGLOBINES DE MANCHOT ET DE CACHALOT

### A. ZONES HELICOIDALES

Il ne semble pas y avoir d'incompatibilité entre la structure covalente de la myoglobine de manchot et la présence de zones hélicoïdales similaires à celles de la myoglobine de cachalot.

Le résidu de proline qui apparaît dans la protéine du manchot en position 52 est compatible avec la croissance de l'hélice D.

Elle intervient comme deuxième résidu de l'hélice D, or on sait que les groupes -NH- (du lien peptidique) des trois premiers résidus d'une  $\alpha$ -hélice ne forment pas de liens d'hydrogène avec les groupes -CO- (du lien peptidique) qui les précèdent.

C'est la première fois qu'une proline intervient en cette position dans une myoglobine, mais on retrouve la même situation dans quelques chaînes  $\beta$  d'hémoglobine de mammifères. (voir annexe 4).

### B. INTERACTIONS A MOYENNE DISTANCE

Sont nommées ainsi, pour les distinguer des interactions directement responsables de la formation d' $\alpha$ -hélices, celles qui ont lieu par l'intermédiaire de la fonction alcool des résidus de thréonine et de sérine avec le groupe NH ou CO d'un lien peptidique.

Sont également rassemblées sous ce vocable les interactions qui mettent en oeuvre la fonction carboxyle des résidus des acides aspartique ou glutamique avec le groupe NH ou CO, ainsi que les quelques interactions faisant intervenir une fonction azotée.

La caractéristique générale des interactions rassemblées sous ce titre est qu'elles font intervenir des résidus d'acides aminés proches dans la structure covalente (située en moyenne à un tour d' $\alpha$ -hélice).

Les liaisons qui s'établissent de cette façon n'entrent donc pas dans la catégorie des liaisons formatrices d' $\alpha$ -hélices, mais elles contribuent par leur existence à stabiliser les hélices ou à aider la formation de charnières entre zones hélicoïdales.

Le tableau suivant récapitule les interactions non covalentes et à moyenne distance qui ont été observées dans la myoglobine de cachalot.

Les résidus d'acides aminés impliqués dans une liaison de ce type sont caractérisés par leur numéro ainsi que par le groupe polaire responsable de l'interaction. Nous indiquons parallèlement la nature des résidus d'acides aminés qui occupent la même position dans la myoglobine de manchot.

TABLEAU RECAPITULATIF DES INTERACTIONS NON COVALENTES  
A MOYENNE DISTANCE

a) Résidus de sérine ou de thréonine

MANCHOT			CACHALOT				MANCHOT		
Acide	Aminé	n°	GROUPES POLAIRES		n°	Acide	Aminé		
ASN	SER	A1	OH	..... NH	A4	GLU	GLU		
SER	SER	B16	OH	..... CO	B12	ARG	ARG		
THR	THR	C4	OH	..... CO	C1	HIS	HIS		
THR	THR	D1	OH	..... NH	D4	GLU	ASP		
SER	SER	E1	OH	..... NH	E4	LEU	LEU		
THR	THR	E10	OH	..... CO	E6	LYS	LYS		
THR	THR	E13	OH	..... CO	E9	VAL	VAL		
THR	SER	F7	OH	..... CO	F4	LEU	LEU		
THR	THR	FG1	OH	..... CO	F6	GLN	GLN		
SER	SER	G9	OH	..... CO	G5	LEU	LEU		
GLN	SER	G18	OH	..... CO	G14	HIS	LYS		

b) Résidus d'acide aspartique ou d'acide glutamique

MANCHOT			CACHALOT				MANCHOT		
Acide	Aminé	n°	GROUPES POLAIRES		n°	Acide	Aminé		
GLU	GLU	A4	COOH	..... NH	A2	SER	ASN		
ASP	ASP	B1	COOH	..... NH	B4	GLY	GLY		
ASP	GLU	D4	COOH	..... CO	CD8	LYS	LYS		
ASP	ASP	H2	COOH	..... NH	H2	ASP	ASP		

c) Fonctions azotées et autres

MANCHOT			CACHALOT				MANCHOT	
Acide	Aminé	n°	GROUPES POLAIRES		n°	Acide	Aminé	
TRP	TRP	A5	NH	SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> NH	NA2	SER	ASN	
LEU	VAL	B2	CO	SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO	A16	GLU	GLU	
HIS	HIS	B5	CO	.....COOH	B1	ASP	ASP	
GLY	HIS	CD6	N <sub>ε</sub>	..... CO	CD3	ARG	LYS	

Nous supposerons que la conservation d'un résidu pour une même position dans la myoglobine du manchot implique également la conservation de l'interaction et nous discuterons uniquement les positions pour lesquelles la myoglobine du manchot présente des différences.

Position A1 : Dans toutes les myoglobines actuellement connues, la position A1 est occupée par un résidu de sérine.

Il nous semble raisonnable de penser que l'interaction entre le groupe amide du résidu d'asparagine A1, de la myoglobine de manchot, et le résidu A4 devrait persister. L'asparagine et la sérine étant de dimensions semblables, la longueur du lien devrait être conservée.

Cette hypothèse se vérifie sur modèle

Position F7 : Occupée par un résidu de sérine dans toutes les myoglobines actuellement connues, et par la thréonine dans celle du manchot. L'interaction pourrait être conservée. Les dimensions entre la sérine et la thréonine sont différentes, mais pas les distances entre fonctions. Ce changement intervient dans une position qui est importante puisqu'elle est adjacente à "l'histidine proximale".

On peut se demander s'il n'y a pas une relation entre ce changement et celui de la position F5, où l'on rencontre un résidu d'alanine dans toutes les myoglobines mais un résidu de sérine dans le cas du manchot. Ce dernier résidu pourrait d'ailleurs former un lien d'hydrogène avec le groupe  $-CO-$  de la position F2.

Position G18 : remplacement de la sérine, habituellement trouvée dans les myoglobines, par un résidu de glutamine. On peut admettre l'existence d'un lien d'hydrogène entre la position amide de la glutamine avec le groupe CO de la lysine G14.

Cette interaction n'est sans doute pas de première importance, la sérine étant parfois remplacée par l'alanine dans certaines myoglobines (kangourou). Après vérification sur modèle, l'existence de l'interaction dans la myoglobine du manchot est très plausible.

Position CD6 : l'histidine qui occupe la position CD6 dans toutes les myoglobines est remplacée par un résidu de glycine dans la myoglobine du manchot.

L'interaction ne peut donc pas exister dans ce cas-ci.

### C. INTERACTIONS A LONGUE DISTANCE

On définit comme interactions à longue distance, celles qui ont lieu entre des résidus éloignés dans la séquence.

Elles ont en général pour effet de maintenir la position des hélices les unes par rapport aux autres.

Ces interactions sont de deux types.

#### 1°) Hydrophobes

Nombreuses et fort importantes dans le maintien de la conformation de la myoglobine de cachalot, elles seront traitées séparément dans le troisième chapitre.

#### 2°) Polaires

Il s'agit essentiellement d'interactions ioniques, de liens d'hydrogène, ou encore d'interactions dipôle-dipôle qui se font par l'intermédiaire de molécules de sulfate d'ammonium dans le cristal de myoglobine de cachalot.

Le tableau suivant récapitule les interactions à longue distance qui ont été observées dans la myoglobine du cachalot.

Les résidus d'acides aminés responsables d'interactions sont identifiés par leur nature, par leur numéro et par la fonction impliquée dans l'interaction. Les résidus d'acides aminés qui occupent les mêmes positions dans la myoglobine de manchot sont indiqués dans les colonnes extérieures.

TABLEAU RECAPITULATIF DES INTERACTIONS NON COVALENTES  
A LONGUE DISTANCE

MANCHOT			CACHALOT				MANCHOT		
Acide	Aminé	n°	GROUPES POLAIRES			n°	Acide	Aminé	
ASP	GLU	A2	COO <sup>(-)</sup>		NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	EF2	LYS	LYS	
GLU	GLU	A16	COO <sup>(-)</sup>		NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>	E20	LYS	LYS	
ASP	ASP	B1	COO <sup>(-)</sup>		N <sub>n</sub> <sup>2</sup>	G19	ARG	LYS	
HIS	GLN	B7	CONH <sub>2</sub>		CO	D6	LYS	ARG	
ALA	ASP	B8	COO <sup>(-)</sup>	...SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ...	N <sub>n</sub> <sup>1</sup>	G19	ARG	LYS	
HIS	HIS	C1	N <sub>δ</sub>		COO <sup>(-)</sup>	G10	GLU	GLU	
ARG	LYS	C7	NH <sub>3</sub> <sup>+</sup>		CO	FG4	LYS	(ARG)	
LYS	ARG	CD3	N <sub>n1</sub>	propyl hème					
LYS	ARG	CD3	N <sub>ε</sub>		COO <sup>(-)</sup>	E3	ASP	ASP	
HIS	HIS	EF5	N <sub>ε</sub>	...SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ...	COO <sup>-</sup>	H17	ASP	ASP	
TYR	TYR	H22	-OH		CO	FG5	ILE	VAL	

Position A2 : le remplacement de l'acide glutamique par un résidu d'acide aspartique devrait maintenir l'interaction avec la lysine EF2

Position B1 : le deuxième élément du couple, l'arginine G19 est remplacé dans la myoglobine de manchot par un résidu de lysine, l'interaction devrait subsister.

Position B8 : l'acide aspartique est remplacé par une alanine, il ne peut donc plus avoir d'interaction avec le groupe G19. Celui-ci qui était un résidu d'arginine dans la myoglobine de cachalot, est remplacé par une lysine dans le manchot. La lysine G19 comme nous venons de le voir dans le paragraphe précédent est en interaction avec le résidu d'acide aspartique B1.

La lysine ne pouvant se lier deux fois, l'acide aspartique B8 n'a plus semble-t-il de raison d'être.

Position C7 : l'arginine est remplacée par un résidu de lysine. L'interaction avec le groupe CO en position FG4 devrait persister.

Position CD3 : l'arginine est remplacée par un résidu de lysine. La myoglobine de cachalot est la seule à posséder une arginine en cette position, toutes les autres myoglobines ayant une lysine à cet endroit de leur structure.

L'arginine CD3 est en interaction avec des groupes propyles de l'hème et également avec le groupe carboxyle de l'acide aspartique E3. Il semble logique que l'interaction avec le groupe propyle persiste après le remplacement par la lysine et que la deuxième interaction n'existe que dans le cas de la myoglobine de cachalot.

Toutes les autres interactions à longue distance seraient conservées dans la myoglobine de manchot.

#### D. INTERACTIONS AVEC LE GROUPE PROSTHETIQUE

##### 1°) Polaires

L'histidine F8 (dite histidine proximale) et l'histidine E7 (dite histidine distale) sont conservées dans la myoglobine de manchot. Ces deux histidines sont en relation avec l'atome de fer du noyau prosthétique.

Les deux groupes propionyles de l'hème forment des liens d'hydrogène avec l'apomyoglobine : l'un avec l'histidine FG3 qui est conservée, l'autre avec l'arginine CD3 qui est remplacée par une lysine dans le cas du manchot (comme c'est le cas dans toutes les myoglobines connues, la myoglobine de cachalot étant la seule à posséder une arginine à cette position).

2°) Hydrophobes

L'importance de l'environnement hydrophobe du groupe prosthétique est très grande puisqu'il lui permet d'acquérir ses propriétés particulières.

Le tableau suivant récapitule les résidus qui sont en contact direct avec l'hème dans la myoglobine de cachalot, dans celle du manchot, ainsi que dans toutes les autres myoglobines.

<u>RESIDUS HYDROPHOBES EN CONTACT AVEC LE HEME</u>			
	CACHALOT	AUTRES MYOGLOBINES	MANCHOT
C5	LEU	LEU	<u>MET</u>
CD1	PHE	PHE	PHE
CD4	PHE	PHE	PHE
CD7	LEU	LEU	LEU
E14	ALA	ALA	<u>(X)</u>
E11	VAL	VAL	VAL
G5	LEU	LEU	LEU
G8	ILE	ILE	ILE
H14	PHE	PHE	PHE

On constate donc le très haut degré de conservation des résidus hydrophobes entourant le noyau prosthétique dans les myoglobines. Seul le manchot voit la leucine C5 remplacée par un résidu de méthionine.

Vu la grande similitude dans les dimensions et les propriétés hydrophobes de la leucine et de la méthionine, ce changement est purement conservatif et ne devrait pas modifier l'environnement de l'hème.

La position E14 n'ayant pas pu être déterminée dans la structure primaire, une deuxième possibilité de substitution subsiste.

### III COMPARAISON DES ZONES HYDROPHOBES

Le tableau et le chapitre précédents rendaient compte des interactions spécifiques non covalentes qui ont été relevées sur le modèle cristallographique de la myoglobine de cachalot.

La comparaison de la séquence des acides aminés dans la myoglobine du manchot nous a permis de postuler l'existence de la grande majorité de ces interactions dans la structure tridimensionnelle de cette protéine.

Cette analogie de conformation n'apparaît néanmoins que lorsqu'on analyse point par point la possibilité d'existence de chacune des interactions particulières.

Un autre type d'interaction est important dans le maintien de la conformation de la molécule : ce sont les interactions hydrophobes. Ces interactions ne sont que rarement le fait d'un couple d'acides aminés particuliers, comme c'est le cas pour les interactions spécifiques, mais procèdent plutôt entre groupes d'acides aminés qui voisinent dans la structure repliée de la molécule.

Il nous faudrait un schéma dans lequel on pourrait mieux faire apparaître les voisinages et les parentés dans la structure repliée de la protéine, ce qu'un simple alignement séquentiel n'est pas capable de montrer.

C'est une des raisons pour lesquelles nous allons utiliser une représentation qui fait beaucoup mieux apparaître les relations pouvant exister entre résidus dans la structure hélicoïdale de la protéine.

## A. REPRESENTATION DES $\alpha$ -HELICES SELON DUNHILL

Dunhill (1968) a proposé de représenter l'arrangement des acides aminés des protéines sous forme de diagramme en réseau ("net diagram"). Le principe de la méthode simple, si l'on admet que la protéine peut être représentée comme une seule  $\alpha$ -hélice.

L'hélice  $\alpha$ - est schématisée sous la forme d'un cylindre autour duquel la chaîne des acides aminés s'enroule à raison de 3,61 résidus par tour. Le diagramme lui-même est obtenu en coupant le cylindre suivant une génératrice, et en développant sur le plan la surface obtenue.

Ce mode de représentation a l'avantage de montrer les relations pouvant exister entre des résidus parfois distants de 10 à 15 positions dans l'alignement, et qui participent, dans la protéine, à une caractéristique d'ensemble. En précisant par des signes distincts certaines familles d'acides aminés, on peut faire apparaître certaines propriétés de la protéine telle qu'elle se trouve à trois dimensions. Ce mode de représentation convient particulièrement bien aux myoglobines, dont la structure tridimensionnelle comporte un pourcentage élevé de résidus dans la conformation  $\alpha$ -hélicoïdale.\* Il traite malheureusement de la même manière les parties non hélicoïdales de la protéine et ne pourrait être généralisé aux protéines qui ne contiennent que peu de résidus dans la conformation des  $\alpha$ -hélices.

\*Le spectre de dispersion rotatoire, discuté dans la première partie de ce travail, indiquait en effet que c'est vraisemblablement le cas pour la myoglobine de manchot.

## B. COMPARAISON GENERALE DES MYOGLOBINES

La figure 3.1 représente les diagrammes relatifs aux myoglobines de cachalot et de manchot. Le troisième diagramme présente les points communs à toutes les myoglobines, ainsi que les différents résidus trouvés dans une position déterminée pour toutes ces molécules.

Dans le diagramme de la myoglobine de cachalot, un trait plein circonscrit les résidus qui sont décrits d'après le modèle cristallographique comme étant à l'intérieur de la molécule. Nous avons extrapolé ces zones à la myoglobine de manchot. Les régions extérieures sont entourées d'un trait discontinu.

En comparant les trois diagrammes, on observera une analogie frappante entre les myoglobines.

Les zones entourées d'un trait continu, qui correspondent aux régions situées à l'intérieur de la molécule, ne contiennent que des résidus hydrophobes; on y trouve à la rigueur un résidu de petite taille, glycine ou alanine. Tandis qu'à l'extérieur de ces zones, des acides aminés de type polaire, en grande majorité, se trouvent mélangés à d'autres de type hydrophobe.

En comparant la myoglobine de cachalot avec celle du manchot et aussi avec toutes les autres, on remarquera que les résidus conservés sont proches des zones internes. On observera également que la grande majorité des changements, d'un myoglobine à l'autre, sont du type conservatif : tels le remplacement d'un groupe polaire par un autre groupe polaire, et plus généralement d'un groupe chargé par un groupe chargé de même signe, ou d'un résidu hydrophobe par un autre résidu hydrophobe.

FIGURE 3.1 (w)

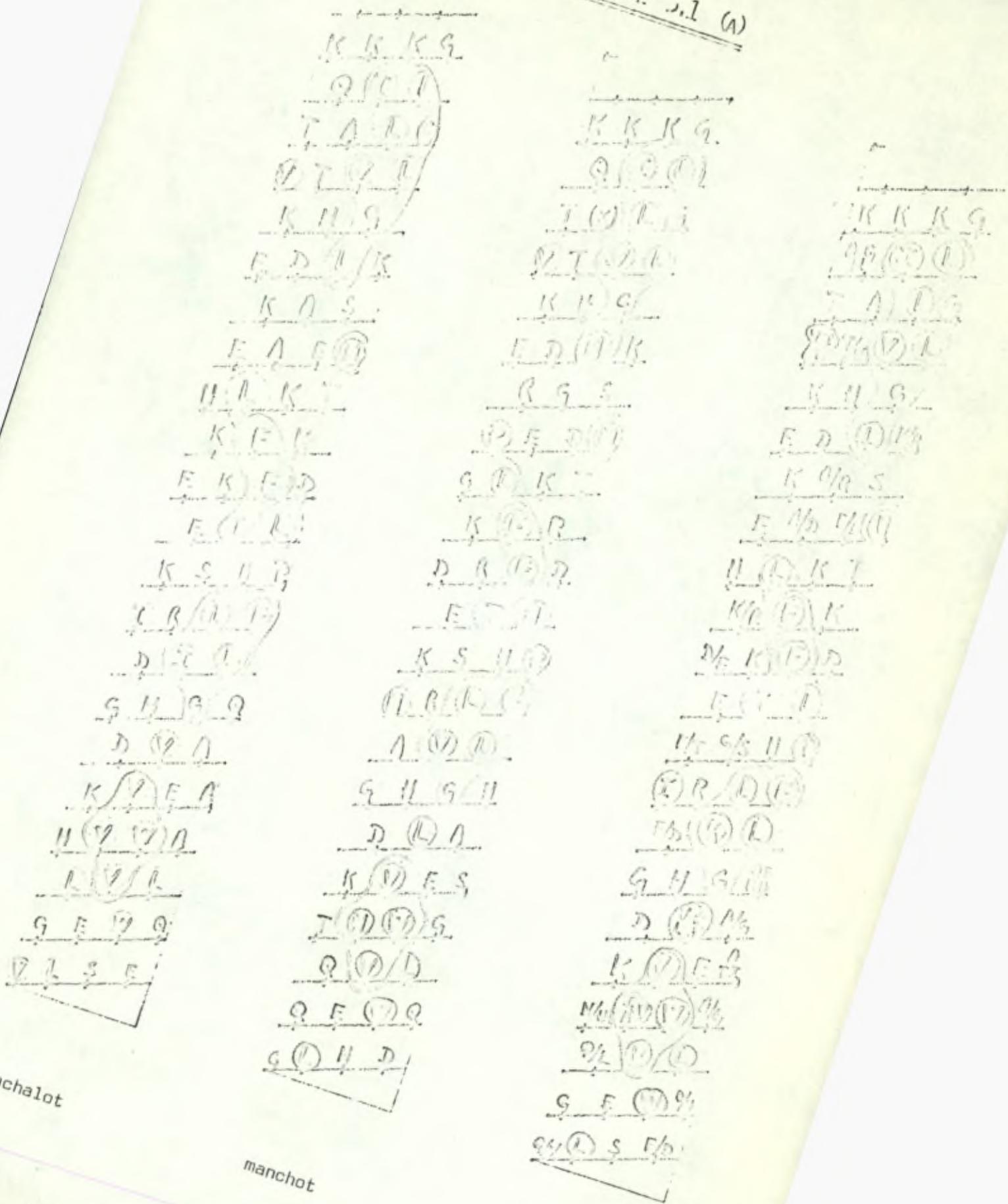


FIGURE 3.1 (b)

G  
 (D) S (R) R  
 (W) K E  
 (A) A A  
 (S) R R  
 (D) E (D)  
 (H) V K A  
 L R A A  
 S A A  
 (H) G (H) (H)  
 S R H  
 H R R H  
 E R (H)  
 G S S  
 K (H) (H) E  
 (H) (H) A  
 T K H R  
 R S H A  
 (H) (H) A  
 A E (H) R  
 H H E

G  
 (D) S (R) R  
 (W) K E  
 (A) A A  
 (S) R R  
 (D) E (D)  
 (H) V K A  
 L R A A  
 S A A  
 (H) S (H) (H)  
 R K H  
 K (H) (H) H  
 E (H) (H) H  
 G R E  
 K (H) (H) E  
 (H) (H) (H)  
 T K H A  
 R T H A  
 (H) (H) S  
 A E (H) R  
 H H E

G  
 (D) S (R) R  
 (W) K E  
 (A) A A  
 (S) R R  
 (D) E (D)  
 (H) V K A  
 L R A A  
 S A A  
 (H) S (H) (H)  
 S R H  
 H R R H  
 E R (H)  
 G R S  
 K (H) (H) E  
 (H) (H) (H)  
 H R H H  
 R S H A  
 (H) (H) A  
 A E (H) R  
 H H E

*cachalot*

*manchot*

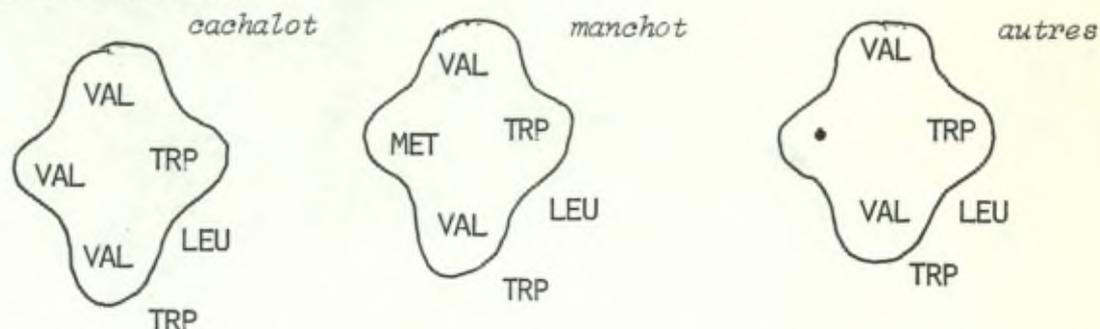
*Autres myoglobines*

COMPARAISON DES SURFACES HYDROPHOBES INTERNES

Il nous a aussi paru intéressant de comparer les zones hydrophobes internes des myoglobines actuellement connues.

Nous appellerons "surface hydrophobe X" une zone hydrophobe interne. La lettre caractérisant la surface correspond à la numérotation du segment hélicoïdal dans lequel se trouve cette surface. La représentation utilise les éléments des diagrammes de Dunhill. Les résidus entourés d'un trait sont ceux qui sont situés à l'intérieur de la molécule repliée.

Surface hydrophobe A

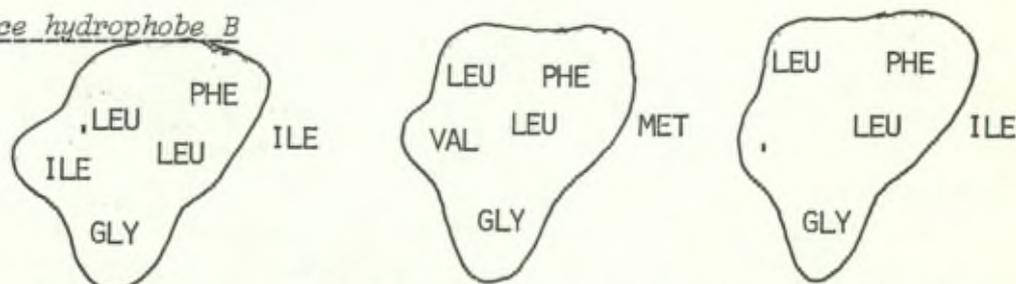


La position non spécifiée dans le troisième schéma est occupée soit par l'isoleucine, soit par l'alanine dans les autres myoglobines.

Notons au passage que dans l'hémoglobine de l'anémie falciforme, le résidu acide aspartique ou glutamique A4 de la chaîne est remplacé par une valine. Ce qui a pour effet de prolonger la surface hydrophobe A jusqu'aux deux premiers résidus hydrophobes VAL et LEU de la chaîne.

Ce changement est suffisant pour modifier sensiblement la solubilité de l'hémoglobine, en provoquant sa précipitation partielle dans le globule rouge.

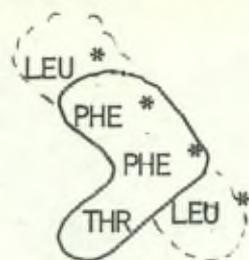
Surface hydrophobe B



La position non indiquée dans le troisième schéma est soit la leucine, soit la valine.

Surface hydrophobe CD

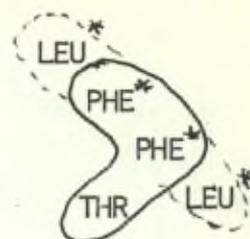
Cette surface, située à l'angle entre les hélices C et D, est particulièrement importante puisqu'elle est en contact avec le hème et qu'elle forme une des parois de la poche où il s'insère.



*cachalot et  
autres myo-  
globines*



*manchot*



*autres myoglobines*

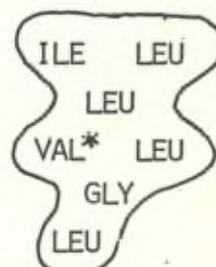
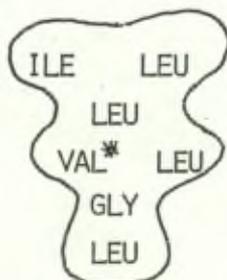
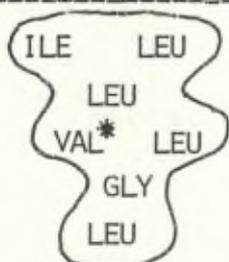
Bien que la chaîne polypeptidique ne soit pas à cet endroit dans la conformation des  $\alpha$ -hélices, les quatre résidus en contact avec l'hème forment un alignement très proche de la représentation donnée par le schéma.

La surface proprement dite se retrouve dans toutes les myoglobines, et le prolongement hydrophobe supérieur est toujours représenté par un résidu de leucine.

Il en est de même pour le prolongement inférieur, sauf dans la myoglobine de manchot où on trouve la méthionine.

Surface hydrophobe D

Elle est représentée par un seul résidu d'acide aminé qui est la méthionine dans toutes les myoglobines.

Surface hydrophobe E

Cette zone est relativement étendue et est identique dans toutes les myoglobines, sauf dans celle du manchot où le résidu de leucine situé au bas de la surface est remplacé par la méthionine.

Cette zone est partiellement en contact avec le hème et partiellement en contact avec d'autres hélices.

\*caractérise un résidu en contact direct avec le hème

Surface hydrophobe F

Elle est représentée par un seul résidu, le premier de l'hélice F qui est la leucine ou la valine dans toutes les myoglobines.

Surface hydrophobe FG

Elle se présente sous forme d'un résidu d'isoleucine ou de valine dans toutes les myoglobines. Elle est en contact avec la zone hydrophobe G.

Surface hydrophobe G

La leucine située à la partie supérieure de la zone est remplacée par l'isoleucine dans le cas du manchot. Par contre, l'isoleucine située de façon contigüe à la partie droite de la zone est remplacée par une méthionine dans la protéine du manchot. La deuxième position non spécifiée dans le troisième schéma est occupée par la valine, l'alanine ou même la cystéine.

Surface hydrophobe H

\* caractérise un résidu en contact direct avec le hème.

La position non spécifiée dans le troisième schéma est occupée par la méthionine ou l'isoleucine. Un certain nombre de positions adjacentes à la surface sont également conservées, ou subissent le remplacement par des acides aminés aux propriétés analogues.

L'examen des surfaces hydrophobes pour les diverses myoglobines actuellement connues montre un très haut degré de conservation. Celui-ci intéresse, non pas tellement l'un ou l'autre résidu en particulier, mais des résidus parfois séparés par quinze liaisons peptidiques et qui, à plusieurs, forment un ensemble auquel est dévolu un rôle particulier.

Ces surfaces servent en effet, soit à former une enveloppe hydrophobe pour le hème, soit à former entre les hélices des interactions de Van der Waals qui contribuent au maintien général de la conformation. Ces liaisons, qui isolément seraient de faible énergie, agissent le plus souvent par coopération dans l'espace.

On constatera que les surfaces hydrophobes devraient également être conservées dans la myoglobine de manchot.

Les rares substitutions qui interviennent à l'intérieur des surfaces se font en conservant le caractère hydrophobe de celle-ci. Il en est de même pour les résidus hydrophobes qui sont directement contigus aux surfaces internes dans les différents schémas.

De ce point de vue, la structure primaire de la myoglobine du manchot est également compatible avec une conformation proche de celle du cachalot, sinon identique.

## CONCLUSIONS

La comparaison de la structure séquentielle de la myoglobine de manchot avec celle du cachalot est l'analyse des interactions qui, selon le modèle cristallographique, sont responsables de la structure tridimensionnelle de cette dernière, nous permet de postuler que :

- les zones hélicoïdales devraient être pratiquement identiques dans les deux protéines;
- les interactions spécifiques non covalentes sont maintenues dans leur grande majorité.

Les interactions hydrophobes sont groupées, dans la structure tridimensionnelle, en surfaces contenant uniquement des résidus hydrophobes. Ces surfaces interagissent soit l'une avec l'autre, soit avec le groupe prosthétique. Ici il semblerait de prime abord que ce soit la conservation de la surface qui soit importante.

Les substitutions, quand elles ont lieu, se font en conservant les caractéristiques hydrophobes des résidus changés. Nous assistons ici à un phénomène de conservation qui affecte des résidus éventuellement distants de dix à quinze résidus dans la chaîne polypeptidique, et qui crée, par effet coopératif, une surface d'interaction dont le contenu semble assez invariant.

Toutes ces considérations théoriques devraient pouvoir trouver une solution expérimentale à la fois dans l'étude de l'activité biologique et dans l'étude cristallographique de la myoglobine du manchot.

## C O N C L U S I O N S . . . G E N E R A L E S

La myoglobine du manchot, que nous avons isolée et pour laquelle nous avons étudié les principales caractéristiques physico-chimiques, paraît très semblable, du point de vue de la masse molaire et des propriétés optiques, aux myoglobines de la seule classe zoologique pour laquelle il existait jusqu'ici des structures connues : les mammifères. Seule la composition en acides aminés laissait en entrevoir une probabilité de différences plus considérables, au niveau de la structure covalente.

La reconstitution de la séquence des acides aminés dans l'apomyoglobine de manchot, qui a suivi la caractérisation générale de la molécule, a été nouée par l'étude de peptides obtenus et purifiés à partir d'hydrolysats consécutifs à l'action de la trypsine, de la chymotrypsine, de la trypsine après modification des résidus de lysine, ou encore par l'examen de peptides résultant de coupures chimiques. Ces dernières ne nous ont toutefois pas donné les résultats escomptés.

Après avoir analysé la composition des peptides ainsi obtenus, leur structure a été déterminée par dansylation couplée à la dégradation d'Edman ou par l'action des carboxypeptidases A et B.

L'apomyoglobine elle-même ainsi que deux peptides de grande taille ont également été étudiés par dégradation au moyen de l'appareil automatique dit "Sequencer".

L'ensemble des résultats qui ont été obtenus nous a permis de proposer une formule structurale pour l'apomyoglobine de manchot. Il subsiste néanmoins deux indéterminations, dont l'une partielle, et quelques résidus situés dans des zones relativement invariantes ont dû être replacés par homologie avec les séquences connues. C'est pourquoi nous nous proposons de confirmer cette structure en complétant l'étude des peptides, particulièrement ceux obtenus par modification des résidus de lysine suivie d'hydrolyse par la trypsine.

La comparaison de la structure covalente de la myoglobine de manchot à celles des mammifères fait apparaître dans le cas de l'oiseau un nombre plus grand de résidus différents que ce n'est le cas pour les myoglobines de mammifères comparées entre elles. Parmi ces résidus, une quinzaine étaient invariants dans la dizaine de myoglobines de mammifères actuellement connues, mais se révèlent différents dans la myoglobine de manchot.

Le nombre des différences observées dans la structure covalente de la myoglobine de manchot montre assez clairement que, dans la chaîne évolutive des êtres vivants, la différenciation biologique des oiseaux est antérieure à la différenciation des mammifères entre eux.

La grande majorité des substitutions observées dans la structure séquentielle de la myoglobine de manchot sont conservatives. La comparaison détaillée de cette structure avec celle du cachalot, et l'examen des différentes interactions qui sont responsables de la structure tridimensionnelle de cette dernière, permet de supposer que :

- la plupart des liaisons de type ionique qui existent entre résidus distants dans la myoglobine de cachalot se retrouvent dans la myoglobine du manchot.
- Toutes les interactions à courtes distances doivent se retrouver, et quelques unes pourraient exister en plus de celles qui sont définies dans la structure de la myoglobine de cachalot.
- Les zones hydrophobes qui sont responsables d'interactions de Van der Waals entre hélices, ainsi que les résidus hydrophobes qui entourent le noyau prosthétique dans la myoglobine de cachalot, sont conservés ou substitués de façon conservative dans la myoglobine de manchot.
- Les deux résidus d'histidine qui sont proches de l'atome de fer de l'hème sont conservés, ainsi que les liaisons entre les deux groupes propionyles de l'hème et l'apomyoglobine.

Il ressort de cette comparaison que la séquence des acides aminés dans la myoglobine de manchot présente toutes les caractéristiques qui devraient lui donner une structure spatiale identique à celle de la seule myoglobine pour laquelle une telle structure soit actuellement connue.

A N N E X E 4

Dans la myoglobine du manchot la proline 52 remplace l'acide glutamique 52 de la myoglobine du cachalot. Il est intéressant de remarquer que cette substitution est compatible avec les critères stériques qu'impose la présence de la proline.

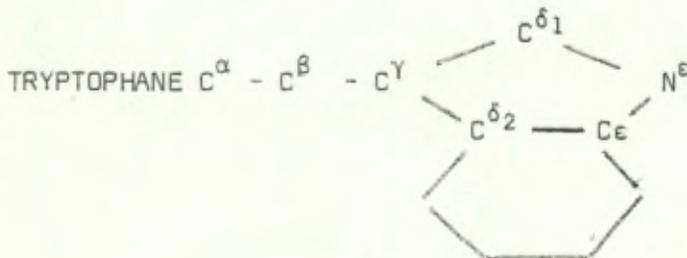
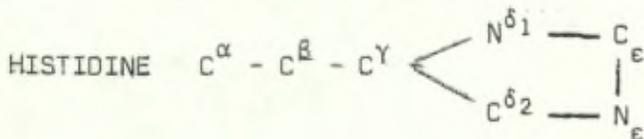
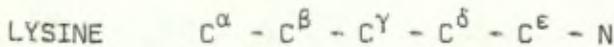
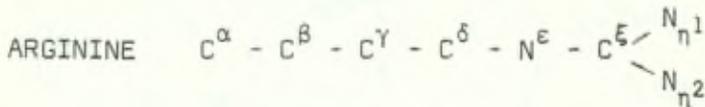
Les angles de rotation de l'acide glutamique 52 ( $\phi = -67^\circ$ ,  $\psi = -41^\circ$ ) (réf. 1) représentent aussi une des conformations de basse énergie de la proline (réf. 2), tandis que ceux de la thréonine 51 ( $\phi = -118^\circ$ ,  $\psi = 170^\circ$ ) sont compatibles avec la présence de la proline dans la position 52 (réf. 2)

réf. 1 : Watson (1968)

réf. 2 : Statistical mechanics of chain molecules, J.P. Flory, Intersciences, p. 270 et p. 271.

°   °  
°

Convention pour la numérotation des atomes dans quelques acides aminés





	D <sub>1</sub>	E <sub>1</sub>	60	70	EF <sub>1</sub>	80	F <sub>1</sub>	F <sub>5</sub> 90	FG <sub>1</sub>	G <sub>1</sub> 100
1 cachalot	T E A E M K A S E D L K K H G V T V L T A L G A I L K K K G H H E A E L K P L A Q S H A T K H K I P									
2 cheval	T E A E K A	L K	T	G I	E L P A Q S	T	I			
3 phoque	S E D D R R	L R	N	G I	E L P A Q S	T	I			
4 marsouin	T E A E K A	L K	N	G I	N L P A Q S	T	I			
5 homme	S E D E K A	L K	A	G I	E I P A Q S	T	V			
6 singe	S E D E K A	L K	A	G I	E I P A Q S	T	V			
7 boeuf	T E A E K A	L K	N	G I	E V H A E S	N	V			
8 mouton	T E A E K A	L K	N	G I	E V H A E S	N	V			
9 kangourou	S E D E K A	L K	I	N I	E L P A Q S	T	I			
10 poule	T E P D K G	L K	Q	A Q	D L P A Q S	T	I			
11 manchot	T P E D R G	M K	V	Q I	E L P S Q T	T	V			

SEQUENCE DES ACIDES AMINES DES MYOGLOBINES

ANNEXE 5 (b)

		110			$\text{GH}_1$ 120		$\text{H}_1$		130			140		$\text{HC}_1$ 150	
1	cachalot	I K Y L E F I S E A I I H V L H S R H P G N F G A D A Q G A M N K A L E L F R K D I A A K Y K E L G F Q G													
2	cheval	I K Y	D A	I H	L H S K	P G N	G		G	T		N	I	A K	E L Q
3	phoque	I K Y	E A	I H	L H S K	P A E	G		A	K		N	I	A K	E L H
4	marsouin	I K Y	E A	I H	L H S R	P A E	G		G	N		K	I	T K	E L H
5	homme	I K Y	E C	I Q	L Q S K	P G D	G		G	N		K	M	S N	E L Q
6	singe	I K Y	E C	I Q	L Q S K	P G D	G		G	N		K	M	S N	E L Q
7	boeuf	I K Y	D A	I H	L H A K	P S N	A		G	S		N	A	E K	V L H
8	mouton	I K Y	D A	I H	L H A K	P S N	G		G	S		N	M	A E	V L Q
9	kangourou	V Q F	D A	I Q	I Q S K	A G N	G		A	K		H	M	A K	E F Q
10	poule	V K Y	E V	I K	I A E K	A S D	G		A	K		D	M	S K	E F Q
11	manchot	V K Y	E A	M K	I A Q K	A S N	G		E	K		N	M	S K	E F Q

SEQUENCE DES ACIDES AMINES DES MYGLOBINES

ANNEXE 5 (a)

## B I B L I O G R A P H I E

- Adler, A.D. et George, P. (1966)  
Analytical Biochem. 11, 159.
- Air, G.M. et Thompson E.O.P. (1971)  
Aust. J. Biol. Sci., 24, 75
- Åkeson, A. et Theorell, H. (1960)  
Arch. Biochim. Biophys., 91, 319
- Ambler, R.P. (1967)  
Dans Methods in Enzymology Vol. 11 - p. 498  
S.P. Colowick and N.O. Kaplan (Editors)  
Academic Press, New York.
- Antweiler, H.J. (1952)  
Chemie-Ingenieur-Technik, 24, 284
- Awad, E., Cameron, B. et Kotite, L. (1963)  
Nature, 198, 1201
- Barber, M., Wolstenholme, W.A., Guinand, M., Michel, G., Das, B.C.  
et Lederer, E. (1965)  
Tetrahedron letters, 1965, p. 1331
- Biemann, K., Capp, J. et Seibl, J. (1961)  
J. Am. Chem. Soc. 81, 2274
- Boulton, F.E., Huntsman, R.G., Romero Herrera, A., Lorkin, P.A. et  
Lehmann, H. (1971)  
Biochim. Biophys. Acta, 229, 716
- Bradshaw, R.A., Garner, W.H. et Gurd F.R.N. (1969,a)  
J. Biol. Chem., 244, 2149

- Bradshaw, R.A. et Gurd, F.R.N. (1969,a)  
J. Biol. Chem., 244, 2167
- Bradshaw, R.A. Kretsinger, R.H. et Gurd, F.R.N. (1969,b)  
J. Biol. Chem., 244, 2159
- Bricas, E., Van Heijenoort, J., Barber, W.A., Wolstenholme, B.C.  
Das, B.C. et Lederer, E. (1965)  
Biochemistry, 12, 2254
- Brown, W.D. (1961)  
J. Biol. Chem., 236, 2238
- Brown, W.D. (1962)  
J. Food Sci., 27, 26
- Dautrevaux, M. Boulanger, Y., Han, K. et Biserte, G. (1969)  
Eur. J. Biochem., 11, 267
- Dayhoff, M.O., Eck, R. et Park, C.M. (1972)  
Dans Atlas of Protein Sequence and Structure, 5, 89
- Deconinck, M., Peiffer S., Schnek, A.G. et Léonis, J. (1972,a)  
Biochimie, 54, 969
- Deconinck, M., Peiffer, S., Schnek, A.G. et Léonis, J. (1972,b)  
Arch. Int. Physiol. Biochim., sous presse
- Deconinck, M., Depreter, J., Paul, C., Peiffer, S., Schnek, A.G., Putnam, F.W.  
et J. Léonis (1972,c)  
F.E.B.S., 23, 279
- Deconinck, M. (1973)  
Thèse de Doctorat, Université Libre de Bruxelles
- Determann, H. (1967)  
Dans gel filtration
- Dopheide, T.A.A., Moore, S. et Stein, W.H. (1967)  
J. Biol. Chem., 242, 1833

- Dumur, V., Dautrevaux, M. et Han K. (1972)  
F.E.B.S. Letters, 26, 241
- Dunhill, P. (1968)  
Biophys. J., 8, 865
- Edman, P. et Begg, G. (1967)  
Eur. J. Biochem., I, 80
- Edmundson, A.B. et Hirs, C.H.W. (1962)  
J. Mol. Biol., 5, 663
- Edmundson, A.B. (1965)  
Nature, 205, 883
- Fitch, W.M. et Margoliash, E. (1967)  
Science, 155, 279
- Goldbloom, D.E. et Brown, W.D. (1971)  
Arch. Biochem. Biophys., 147; 367
- Grassé, P.P. et Devillers, C. (1965)  
Précis de Zoologie, Masson et Cie, Vol II p. 900
- Gray, W.R. et Hartley, B.S. (1963,a)  
Biochem. J., 89, 59
- Gray, W.R. et Hartley, B.S. (1963,b)  
Biochem. J., 89, 379
- Gray, W.R. et Smith, J.F. (1970)  
Anal. Biochemistry, 33, 36
- Gros, C. et Labouesse, B. (1969)  
Eur. J. Biochem., 7, 463
- Han, K., Dautrevaux, M., Chaila, W. et Biserte, G. (1970)  
Eur. J. Biochem., 18, 465
- Han, K. (1970)  
Thèse de Doctorat, Université de Lille

- Han, K., Tetaert, D., Moschetto, Y., Dautrevaux, M. et Kopeyan, C. (1972)  
Eur. J. Biochem., 27, 585
- Hapner, K.D., Bradshaw, R.A., Hartzell, C.R. et Gurd, F.R.N. (1968)  
J. Biol. Chem., 243, 683
- Hardman, K.D., Eylar, E.H., Ray, D.K., Banaszak, L.J. et Gurd, F.R.N. (1966)  
J. Biol. Chem., 241, 432
- Hartley, B.S. (1970)  
Biochem. J., 119, 805
- Hirs, C.H.W., Moore, S. et Stein, W.H. (1956)  
J. Biol. Chem., 219, 623
- Hill, R.L., Perkoff, G.T., Brown, D.M. et Tyler F.H. (1962)  
J. Biol. Chem., 237, 282
- Holmquist, R. (1972,a)  
J. Molec. Evolution, 1, 115
- Holmquist, R. (1972,b)  
J. Molec. Evolution, 1, 134
- Holmquist, R. (1972,c)  
J. Molec. Evolution, 1, 211
- Holmquist, R., Cantor, C. et Jukes, T. (1972)  
J. Mole. Biol., 64, 145
- Ingram, V.M. (1961)  
Nature, 189, 704
- Jegorov, C., Keil, B. et Sorm, F. (1965)  
Collect. Czechoslov. Chem. Commun., 30, 105
- Karadjova, M., Nedkov, P., Bekardjieva, A. et Genov, N. (1970)  
Biochim. Biophys. Acta, 221, 136

- Kendrew, J.C., Parrish, R.G., Manack, J.R. et Orlans, E.S. (1954)  
Nature, 174, 946
- Kendrew, J.C., Watson, H.C., Stranberg, B.E., Dickerson, R.E.,  
Phillips, D.C. et Shore, V.C. (1961)  
Nature, 190, 666
- Kendrew, J.C. (1963)  
Science, 139, 1259
- Kohn, J. (1960)  
Dans Chromatographic and Electrophoretic Techniques, 2, 56  
Edité par I. Smith, Interscience, New-York
- Kostka, V. et Carpenter, F.H. (1964)  
J. Biol. Chem., 239, 1799
- Laursen, R.A. (1971)  
Eur. J. Biochem., 20, 89
- Longworth, L.G. (1953)  
J. Am. Chem. Soc., 79, 4155
- Margoliash, E., et Schejter, A. (1966)  
Adv. Protein Chem., 21, 113
- Merrifield (1964)  
Biochemistry, 3, 1385
- Moffitt, W. et Yang, J.T. (1956)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 42, 596
- Moffitt, W. et Yang, J.T. (1965)  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 53, 438
- Monier, C. (1972)  
Thèse de doctorat, Université Libre de Bruxelles

- Moore, S. et Stein, W.B. (1954)  
J. Biol. Chem., 211, 907
- Moore, S. (1963)  
J. Biol. Chem., 238, 235
- Ornstein, L. (1964)  
Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 321
- Paul, C. (1969)  
Thèse de doctorat, Université libre de Bruxelles
- Perutz, M.F. (1965)  
J. Mol. Biol., 13, 646
- Perutz, M.F. (1970)  
Nature, 228, 726
- Pisano, J.J. et Bronzert, T.J. (1969)  
J. Biol. Chem., 244, 5597
- Rumen, N.M. (1959)  
Acta Chem. Scand., 13, 1542
- Smithies, O. (1959)  
Biochem. J., 61, 629
- Spackman, O., Stein, W.H. et Moore, S. (1958)  
J. Anal. Chem., 30, 1190
- Spande, T.F. et Witkop, B. (1967)  
Dans Methods in Enzymology, 11, 498  
S.P. Colowick and N.O. Kaplan (Editors) Academic Press, New-York
- Spies, J.R. et Chambers, D.C. (1949)  
Anal. Chem., 21, 1249
- Stark, G.R. et Smyth, D.G. (1963)  
J. Biol. Chem., 238, 214

- Storer, R.W. (1960)  
Dans *Biology and Comparative Physiology of Birds*  
Academic Press N.Y., 1, 57
- Teale, F.N.J. (1959)  
*Biochim. Biophys. Acta*, 35, 543
- Theorell, H. (1932)  
*Biochem. Zeitschr.*, 252, 1
- Theorell, H. (1955)  
*Ann. Acad. Scient. Fennicae, A II* 6, 303
- Urnes, P.J. (1965)  
*J. Gen. Physiol.*, 49, 75
- Van Orden, H. et Carpenter, F. (1964)  
*Biochem. Biophys. Research Communic.*, 14, 399
- Vesterberg, O. et Svensson, H. (1966)  
*Acta Chem. Scand.*, 20, 820
- Vesterberg, O (1967)  
*Acta Chem. Scand.*, 21, 206
- Watson, H.C. (1968)  
*Progress in Stereochemistry*, 4, 299
- Woods, K.R. et Wang, K.T. (1967)  
*Biochim. Biophys. Acta*, 133, 369
- Yang, J.T. (1967)  
Dans *Poly- $\alpha$  Amino Acids* - p. 239  
Ed. G.D. Fasman, Marcel Dekker Inc., New-York
- Zmrhal, Z., Jegorov, C. et Keil, B. (1964)  
*Collect. Czechoslov Chem. Commun.*, 29, 943
- Zuckerkindl, E. et Pauling, L. (1962)  
Dans *Horizons in Biochemistry* - p. 189  
M. Kasha et B. Pullman Ed., Academic Press, New-York

