

Etude de l'hémocyanine d'un Crustacé décapode *Carcinus maenas* Linné par dichroïsme circulaire naturel et dichroïsme circulaire magnétique

Certaines hémocyanines ont déjà fait l'objet d'une étude par dichroïsme circulaire naturel: c'est le cas de l'hémocyanine d'*Octopus vulgaris* Lamarck par VAN HOLDE¹ ainsi que par TAKESADA et al.².

Nous exposons ici les résultats obtenus pour l'hémocyanine de *Carcinus maenas* L. d'abord par la technique de dichroïsme circulaire naturel (DC), ensuite par celle de dichroïsme circulaire magnétique (DCM).

L'oxyhémocyanine a été préparée selon une méthode mise au point par l'un des auteurs³, la désoxyhémocyanine et l'apohémocyanine sont obtenues à partir de cette solution par les techniques de TAKESADA et al.². Une étude spectrophotométrique nous a permis de déceler, dans le spectre d'absorption caractéristique de l'oxyhémocyanine, la présence de 3 pics situés respectivement au voisinage des longueurs d'onde de 280, 340 et 600 nm. Les spectres de DC et de DCM ont été obtenus sur le dichrographe Roussel-Jouan du département de Biologie du C.E.N. à Saclay (France). Cet appareil a été adapté par SCHNEIDER et THIERY⁴ pour permettre des mesures de DCM. Une bobine supraconductrice crée un champ magnétique de 7 Teslas dans le sens de propagation de la lumière. Une sortie numérisée est adaptée sur le dichrographe afin de permettre le traitement direct des spectres par ordinateur.

L'intensité du dichroïsme circulaire est donnée en degré $\times \text{cm}^2 \times \text{mole}^{-1}$; pour l'effet magnétique, elle est donnée dans la même unité pour un champ de 7 Teslas. La masse molaire de l'hémocyanine étant connue de façon trop peu précise, la valeur choisie est la valeur moyenne des résidus aminoacides ($M = 110$).

Les courbes de DC (Figure 1) de l'oxyhémocyanine et de l'apohémocyanine sont identiques dans la région de 270 nm et diffèrent de façon notable de celle de la désoxyhémocyanine. Par contre, une bande négative centrée à 338 nm, commune aux formes oxygénée et désoxygénée, fait place à un faible dichroïsme de signe opposé pour l'apohémocyanine.

La valeur du facteur d'anisotropie ($\Delta\epsilon/\epsilon = 1,3 \cdot 10^{-3}$) est en accord avec celle proposée par VAN HOLDE¹ pour l'hémocyanine d'*Octopus vulgaris* ($\Delta\epsilon/\epsilon = 1,5 \cdot 10^{-3}$) pour un maximum situé à 347 nm. Entre 240 et 300 nm, région où se manifeste l'activité optique des acides aminés aromatiques, seul le spectre de la désoxyhémocyanine indique une augmentation de l'activité optique par rapport à ceux des deux autres formes chimiques de la molécule. Nous pensons que le DC, dans cette région, est dû à la fois à une contribution des acides aminés aromatiques et à une contribution de la liaison cuivre-protéine. En nous appuyant sur les travaux de PARIS et al.⁵, nous dirons que la liaison cuivre-acide aminé (type I) apporte une contribution né-

gligeable alors que la liaison acide aminé-cuivre-acide aminé (type II) est cause d'un DC relativement important. Pour l'oxyhémocyanine, le DC dû au complexe cuivre-protéine est donc négligeable: liaisons du type I, et la courbe se confond avec celle de l'apohémocyanine où il n'y a pas de complexe. Pour la désoxyhémocyanine, le DC plus important est dû à la contribution de liaisons de type II. La bande centrée à 338 nm, négative pour l'oxyhémocyanine et la désoxyhémocyanine, fait place à un effet constant positif si le cuivre disparaît.

Les spectres de DCM (Figure 2) ont une forme différente et des amplitudes nettement plus importantes que les spectres de DC. Entre 240 et 300 nm, les courbes indiquent, pour les 3 formes de l'hémocyanine, une bande négative importante centrée à 272 nm, un épaulement à 286 nm et une bande positive à 292 nm. L'effet dichroïque induit par le champ magnétique extérieur est plus intense pour l'oxyhémocyanine à 272 nm et 292 nm; en dessous de 255 nm, l'oxyhémocyanine et l'apohémocyanine ont un comportement analogue alors que la forme désoxygénée montre le début d'un important DCM négatif. Entre 300 et 400 nm, seule la forme désoxygénée présente un DCM positif appréciable centré sur 338 nm. La forme générale des courbes de DCM entre 240 et 300 nm rappelle celle des courbes du tryptophane⁶. Les variations enregistrées dans cette bande spécifique des acides aminés aromatiques semblent indiquer que les liaisons cuivre-oxygène, présentes dans l'oxyhémocyanine, modifient la configuration électronique de ceux d'entre eux qui se trouvent au voisinage immédiat du cuivre. Il en résulte une modification de l'amplitude de ces transitions lorsqu'on passe de la forme oxygénée aux formes ne contenant pas de liaisons cuivre-oxygène. La variation du pic à 272 nm peut indiquer que le tryptophane fait partie de ces acides aminés perturbés. Nous avons utilisé le fait que le DCM est, en première approximation, insensible aux changements de conformation moléculaire et que, par suite, tous les résidus acides aminés de même type interviennent de façon égale pour établir le rapport tyrosine/tryptophane dans l'hémocyanine⁶.

- ¹ K. E. VAN HOLDE, Biochemistry 6, 93 (1967).
- ² H. TAKESADA et K. HAMAGUCHI, J. Biochem. 63, 725 (1967).
- ³ G. GODBILLOU et R. FRENTZ, Bull. Acad. Soc. lorr. Sci., Fr., sous presse.
- ⁴ C. SCHNEIDER et J. THIERY, Séminaire Montpellier; Les applications du dichroïsme circulaire à l'étude des biopolymères (1970).
- ⁵ M. PARIS et M. PETIT-RAMEL, Colloque int. cent. natn. Rech. scient. 191, 223 (1970).
- ⁶ M. GABRIEL, Thèse Doct. Spécialité Physique du Solide, Nancy (1971).

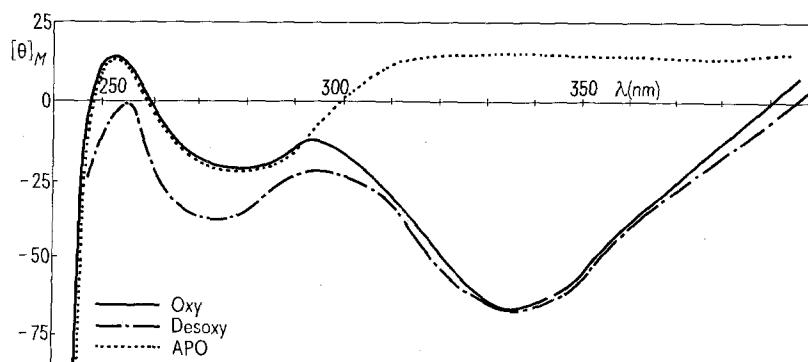


Fig. 1. Spectres de dichroïsme circulaire naturel.

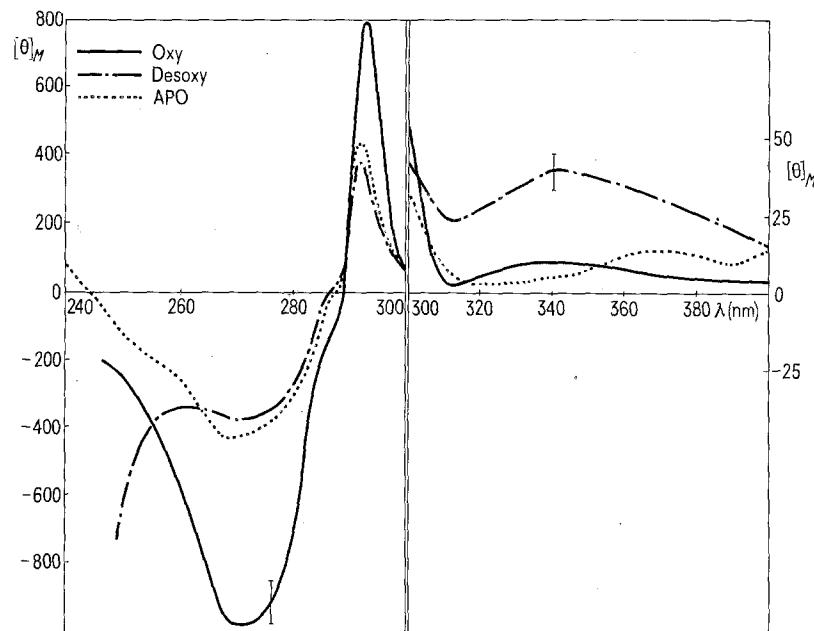


Fig. 2. Spectres de dichroïsme circulaire magnétique.

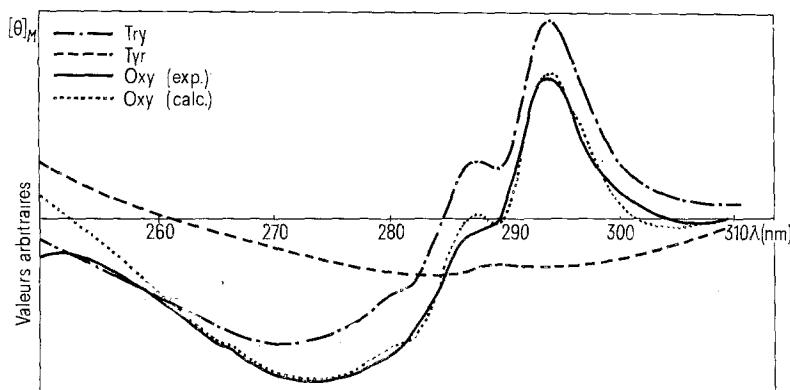


Fig. 3. Calcul du rapport tyrosine/tryptophane.

En effet, le spectre de DCM de l'hémocyanine (Figure 3) rappelle celui du tryptophane mais le rapport des nappes positives et négatives entre 240 et 300 nm est différent. De plus, l'épaulement situé à 286 nm est négatif dans le cas de l'hémocyanine alors qu'il est positif pour le tryptophane. Ces modifications sont dues à la tyrosine qui présente pour les pH alcalins une bande négative entre 260 et 310 nm⁶. Ayant à notre disposition, à pH 8, les spectres sous forme numérique de la tyrosine, du tryptophane et de l'hémocyanine, le traitement sur ordinateur permet de déterminer, par approches successives, le rapport tyrosine/tryptophane. Ce rapport correspond à la courbe calculée qui se superpose au mieux à la courbe expérimentale. Pour ce faire, il est nécessaire de décaler la courbe calculée de 4,5 nm vers les grandes longueurs d'onde. Cet effet bathochrome est général pour les protéines et se retrouve en absorption. Le rapport de 2,5 ainsi déterminé est en accord avec les valeurs trouvées pour les hémocyanines de différents Crustacés⁷. Parallèlement à ce travail, BARTH et al.⁸ ont utilisé le DCM pour la détermination du nombre de résidus tryptophane et tyrosine dans quelques molécules de masse connue. Notre méthode présente l'avantage de pouvoir s'appliquer pour des valeurs de pH où les effets de la tyrosine et du tryptophane se superposent.

Les techniques de DC et de DCM sont d'un grand intérêt pour le biologiste car elles permettent de détecter des modifications de la structure de l'hémocyanine au niveau des liaisons protéine-cuivre et cuivre-oxygène.

Summary. The hemocyanin of *Carcinus maenas* L. in the oxy, deoxy and apoforms is examined by CD and MCD. An interpretation of the results is given in relation to the problems raised by Cu-O² bond. The ratio tyrosin/tryptophan is determined by treatment of spectra by computer.

M. GABRIEL, G. GODBILLON, D. LARCHER,
H. RINNERT et C. THIRION

Laboratoire de Biologie animale 2,
Laboratoire de Physique expérimentale, Université Nancy I,
Case officielle 72, F-54 Nancy-01 (France),
21 mars 1972.

⁷ G. GODBILLON, Thèse Doct. Spécialité Biologie animale, Nancy (1971).

⁸ G. BARTH, R. RECORDS, E. BUNNENBERG, C. DJERASSI et W. VOELTER, J. Am. chem. Soc. 93, 2545 (1971).