

LES HÉMOGLOBINES DES AMPHIBIENS: CARACTÉRISATION PRÉLIMINAIRE DES CHAÎNES D'UNE HÉMOGLOBINE DE LA GRENOUILLE *RANA ESCULENTA* (L)

Jean Pierre CHAUVET et Roger ACHER

Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté des Sciences de Paris, France

Reçu le 6ème Septembre 1968

A frog (*Rana esculenta*) hemoglobin has been purified and two types of chain have been separated by countercurrent distribution. N- and C-terminal sequences of each chain have been determined. The N-terminal amino acids are Acetyl-Ala and Gly. The acetylated chain seems to belong to the α -chain series and the glycine chain to the β -chain series.

1. Introduction

Les hémoglobines des amphibiens présentent un intérêt particulier au point de vue de l'évolution en raison d'une part de la position centrale des batraciens dans l'échelle des vertébrés, d'autre part de l'existence du phénomène de métamorphose qui affecte la nature de l'hémoglobine [1]. Dans cette classe certaines espèces du genre *Rana* sont abondantes et constituent un matériel biologique particulièrement commode.

Les préparations d'hémoglobine de la grenouille adulte *Rana esculenta* paraissent contenir deux constituants ayant des comportements différents au cours de la chromatographie sur Carboxyméthyl-Sephadex à pH 6.0. L'hémoglobine majoritaire a été purifiée et deux chaînes A et B ont été séparées par distribution à contre-courant dans les conditions antérieurement décrites [2]. Ces deux chaînes diffèrent par leurs compositions en acides aminés, la nature des résidus N- et C-terminaux et les cartes chromatoelectrophorétiques ("fingerprints") des peptides résultant de l'hydrolyse trypsique. Les recherches décrites concernent la détermination des extrémités N- et C-terminales des deux chaînes.

2. Extrémités N-terminales

Les extrémités N-terminales ont été étudiées à l'aide de la méthode du dinitrofluoro-benzène de Sanger et de la technique au phénylisothiocyanate d'Edman dans les conditions précisées antérieurement [3, 4].

La chaîne A ne possède aucun acide aminé N-terminal réagissant et l'existence d'une extrémité acétylée, semblable à celle qui a été mise en évidence dans l'hémoglobine de la grenouille *Rana catesbeiana* [5] ou de la carpe [6] a été soupçonnée. La chaîne A a alors été soumise à l'action de la pepsine (Rapport pondéral enzyme/substrat 2%, 24 h, milieu HCl 0.01 N, pH 2.0, 37°) et l'éventuel peptide acétylé a été recherché dans la fraction non adsorbée sur le Dowex 50-X₂ (H⁺) [7]. Cette fraction est examinée par chromatographie sur papier soit dans le mélange *n*-butanol - acide acétique - eau (4:1:5 v/v/v), soit dans le mélange alcool isoamylique - pyridine - eau (30:30:35 v/v/v). La révélation est effectuée au moyen de la réaction de Rydon et Smith [8]. Deux peptides sont ainsi mis en évidence: celui dont le cheminement est le plus important fournit à l'analyse des quantités égales d'alanine et de leucine; l'autre

possède une composition plus complexe et est probablement impur.

Le dipeptide a été soumis à l'action de la carboxypeptidase A (Rapport pondéral enzyme/substrat 5%, 24 h, milieu bicarbonate d'ammonium 0.1 M, 37°) et les produits ont été analysés. L'enzyme libère 0.63 eq. de leucine mais pas d'alanine. La séquence Ala-Leu est ainsi démontrée et l'absence d'alanine libre indique que le groupe aminé de ce résidu est engagé dans une liaison non peptidique. Pour identifier le groupe bloquant l'extrémité aminée, le dipeptide a été soumis à l'hydrazinolyse et les hydrazides examinés par chromatographie sur papier dans le solvant pyridine-aniline-eau (9:1:4 v/v/v) dans les conditions décrites par Narita [7]. L'acétylhydrazide et la formylhydrazide ont été chromatographiés parallèlement et la révélation a été effectuée avec le nitrate d'argent ammoniacal [9]. L'acétylhydrazide a été identifié dans l'hydrazinolyse et la structure du peptide est donc Acetyl-Ala-Leu.

Dans le cas de la chaîne B les deux techniques de Sanger et d'Edman permettent d'identifier la glycine en position N-terminale. Les résultats obtenus rappellent ceux trouvés par De Witt et Ingram [5] dans le cas de l'hémoglobine de la grenouille *R. catesbeiana* adulte.

3. Extrémités C-terminales

Les extrémités C-terminales des chaînes ont été étudiées d'une part à l'aide des carboxypeptidases A et B, d'autre part par la technique d'hydrazinolyse [10].

La chaîne A soumise à l'action de la carboxypeptidase A (Rapport pondéral enzyme/substrat 1%, milieu bicarbonate d'ammonium 0.1 M, pH 8.0) fournit principalement 1 eq. de tyrosine et 0.22 eq. de lysine après 30 minutes. Lorsque la carboxypeptidase B est ajoutée après action de la carboxypeptidase A et que l'hydrolyse est poursuivie pendant 30 minutes la quantité de lysine libérée passe à 0.81 eq. alors que celle de tyrosine n'est pas augmentée. D'autres acides aminés sont également libérés. On peut déduire de ces résultats l'enchaînement C-terminal Lys-Tyr. D'autre part lorsque la chaîne A est soumise à l'action de la trypsine et les produits examinés par électrophorèse, il est possible de mettre en évidence de la tyrosine libre ce qui est conforme à la séquence déduite par

hydrolyse au moyen des carboxypeptidases A et B.

La chaîne B soumise à l'hydrazinolyse fournit 0.23 eq. d'histidine ce qui indique que ce résidu occupe la position C-terminale. La chaîne B attaquée par la carboxypeptidase A pendant 30 minutes fournit 0.89 eq. d'His, 1.0 eq. de Tyr, 0.91 eq. d'Ala, ce qui suggère qu'un résidu de tyrosine et un résidu d'alanine précèdent l'histidine. L'action successive des carboxypeptidases A et B fournit en outre 1 eq. de Lys, 0.61 eq. de Ser et 0.55 de Leu. D'autre part la chaîne B est soumise à l'action de la trypsine et les peptides résultants sont examinés par chromatographie électrophorèse [3]. Il est possible de caractériser un tripeptide Ala-Tyr-His, qui ne contenant pas de base représente le fragment C-terminal de la chaîne. L'ensemble des résultats suggère que l'enchaînement C-terminal de la chaîne B est Lys-Ala-Tyr-His.

En conclusion l'hémoglobine majoritaire de la grenouille *Rana esculenta* possède deux chaînes polypeptidiques séparables par distribution à contre-courant après réduction de la globine et ayant des extrémités N- et C-terminales différentes. Ces chaînes possèdent les caractéristiques suivantes:

	Extrémité N-terminale	Extrémité C-terminale
chaîne A	Ac-Ala-Leu	Lys-Tyr
chaîne B	Gly	Lys-Ala-Tyr-His

Ces résultats diffèrent sensiblement de ceux de Tentori et al. [11] qui utilisant une hémoglobine de *R. esculenta* non dissociée ont déduit la présence de la glycine en position N-terminale dans les deux chaînes et les enchaînements C-terminaux Tyr-Arg et Tyr-His. Il est possible que ces différences soient dues à l'existence de variétés distinctes dans l'espèce *Rana esculenta*. Cependant les résultats récents de Moss et Ingram [12, 13] ont révélé la présence d'une chaîne acétylée aussi bien dans l'hémoglobine de *R. catesbeiana* adulte que dans celle du têtard. L'hémoglobine de *R. catesbeiana* adulte ressemble à celle de *R. esculenta* par ses extrémités N-terminales puisque une chaîne est acétylée et l'autre possède un résidu N-terminal de glycine [5].

Chez le crapaud *Bufo bufo*, l'hémoglobine possède également une chaîne ayant une extrémité N-terminale

bloquée [14]. Il semble que ce caractère soit assez fréquent chez les amphibiens et peut-être d'une façon plus générale chez les vertébrés inférieurs.

Ces recherches ont bénéficié de l'aide de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique (Convention 66 00 146).

Bibliographie

- [1] V. M. Ingram, The Harvey Lectures, Série 61 (1965-1966) 43.
- [2] J.P. Chauvet et R. Acher, *Compt. Rend.* 265 (1967) 2084.
- [3] J.P. Chauvet, G. Nouvel et R. Acher, *Biochim. Biophys. Acta* 115 (1966) 130.
- [4] W.A. Schroeder, J.R. Shelton, J.B. Shelton, J. Cormick et R.T. Jones, *Biochemistry* 2 (1963) 992.
- [5] W. De Wilt et V.M. Ingram, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 27 (1967) 234.
- [6] K. Hulse, U. Sorger et G. Braunitzer, *Z. Physiol.* 344 (1966) 166.
- [7] K. Narita, *Biochim. Biophys. Acta* 28 (1958) 184.
- [8] H.N. Rydon et P.W.G. Smyth, *Nature* 169 (1952) 922.
- [9] K. Satake et T. Seki, *J. Chem. Japan* 4 (1950) 557; *Chem. Abstr.* 45 (1951) 4604.
- [10] C.I. Niu et H. Fraenkel-Conrat, *J. Am. Chem. Soc.* 77 (1955) 5882.
- [11] L. Tentori, G. Vivaldi, S. Carta, S. Velmi et R. Zito, *Biochim. Biophys. Acta* 133 (1967) 174.
- [12] B. Moss et V.M. Ingram, *J. Biol. Mol.* 32 (1968) 481.
- [13] B. Moss et V.M. Ingram, *J. Biol. Mol.* 32 (1968) 493.
- [14] J.P. Caffin, J.P. Chauvet et R. Acher, résultats non publiés.