Université de Montréal

Modifications radio-induites dans les protéines: Etude de la fragmentation et de la polymérisation en solutions aqueuses liquide et gelée.

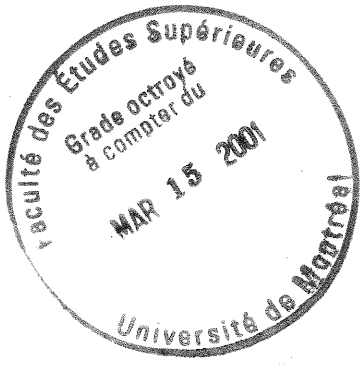
Par
Marilyne Audette-Stuart

Département de biochimie, Université de Montréal
Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures
En vue de l'obtention du grade de
Philosophiæ Doctor (Ph.D.)
en biochimie

Juillet, 1999

© Marilyne Audette-Stuart, 1999



W
4
U58
2001
v. 024

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée
Modifications radio-induites dans les protéines: Etude de la fragmentation et de la polymérisation en solutions aqueuses liquide et gelée.

Présentée par :
Marilyne Audette-Stuart

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Guy Boileau	président-rapporteur
Michel Potier	directeur de recherche
Chantal Houée-Levin	codirecteur de recherche
Muriel Aubry	membre du jury
Darel Hunting	examinateur externe
Denis Gravel	représentant du doyen

Thèse acceptée le : 26 janvier 2001

Sommaire

Dans ce travail consacré à l'étude des modifications radio-induites dans les protéines, nous avons caractérisé les dommages dans les chaînes polypeptidiques qui sont induits par le rayonnement ionisant en milieu aqueux liquide et gelé. L'irradiation de β-galactosidase de *Escherichia Coli* en solution liquide entraîne un rendement de perte d'intégrité de la protéine beaucoup plus important qu'en solution congelée. Des différences dans les mécanismes radiolytiques semblent exister suivant l'état de phase de l'eau lors de l'irradiation. A –78°C, l'examen de la fragmentation à l'aide de l'α-lactalbumine de cochon d'Inde, de la citrate synthase de cœur de porc et du lysozyme de blanc d'œuf de poule a montré que la fréquence comme la répartition des sites de clivage dépendent de la conformation de la protéine. Par exemple, une relation linéaire se dessine entre le rapport de la surface sur le volume et le rendement de coupure. La fragmentation semble initiée par les électrons éjectés par le rayonnement ionisant. Les sites de coupure finaux sont issus de réarrangements qui ont lieu en surface des protéines principalement dans les boucles et les retours de chaînes accessibles au solvant. En solution liquide diluée les processus oxydants sont à l'origine de la majeure partie des réorganisations, par polymérisation et par fragmentation, de la chaîne principale. En isolant la réaction d'oxydation monoélectronique de résidus tryptophane (par l'emploi du radical de l'azoture) dans le lyzozyme de poule, nous avons localisé quelques sites altérés. Ainsi, des résidus tyrosine, en position 23 et 53, participent aux dimérisations par formation de ponts bityrosine. Les résidus tryptophane 108 et/ou 111, sont également oxydés, vraisemblablement en N-Formylkynurénine, et la chaîne polypeptidique est clivée entre l'asparagine 103 et la glycine 104. Les résultats ci dessus accompagnés de l'étude de d'autres paramètres dont l'espèce (à l'intérieur de la famille des lyzozymes de type C), la concentration protéique, la température d'irradiation et le débit de dose ont permis de proposer des schémas réactionnels. Ils apportent des bases expérimentales pour les modélisations des transferts d'électrons dans les protéines et sont utiles pour l'identification de dérivés protéiques qui interviennent, par exemple, dans la signalisation intracellulaire.

Table des matières

Partie I

I-Introduction.....1

1-SITUATION DU SUJET..... 1
1.1-Informations structurales..... 1
1.2-Préservation et stérilisation..... 3
1.3-Implications biologiques..... 3

2-RESUME DES CONNAISSANCES ACTUELLES 5
2.1-Définition des types d'interactions rayonnement-protéine..... 5
2.2-Réactions de l'électron avec les protéines..... 6
2.3-Réactions du radical hydroxyle avec les protéines..... 7
2.4-Sélection des radicaux libres dans l'eau liquide..... 8
2.5-Devenir des résidus tyrosine et tryptophane..... 9

3-FORMULATION DES OBJECTIFS DE TRAVAIL..... 9

4-PLAN DE TRAVAIL..... 10

5-SELECTION DES PROTEINES MODELES 11
5.1-β-Galactosidase de *Escherichia Coli*..... 11
5.2-Citrate synthase de cœur de porc..... 11
5.3-α-Lactalbumine de lait de cochon d'Inde..... 12
5.4-Lysozyme..... 12
5.4.1-Lysozyme de blanc d'œuf de poule..... 13
5.4.2-Lysozyme de blanc d'œuf de dinde..... 13
5.4.3-Lysozyme d'œuf de tortue..... 13
5.4.4-Lysozyme de lait humain..... 13

Partie II

II-Mécanismes de la radiolyse..... 15

1-INTERACTION DU RAYONNEMENT AVEC LA MATIERE 15
1.1-Evénements d'excitation..... 15
1.2-Evénements d'ionisation..... 15
1.3-Espèces radicalaires formées..... 16
1.4-Unités de mesure..... 16

2.-RADIOLYSE DE L'EAU 16
2.1-Etape d'excitation et d'ionisation..... 17
2.2-Etape diffusionnelle..... 18
2.3-Etape homogène..... 18

3-RADIOLYSE DE LA GLACE..... 19

3.1-Etape d'excitation et d'ionisation..... 19
3.2-Réactions de recombinaisons.....20
3.3 Rendements de production..... 20

4-SELECTION DES ENTITES RADICALAIRES..... 20
4.1-Capture du radical hydroxyle par le Tris(hydroxyméthyl)-aminométhane..... 21
4.2-Capture de l'électron par les ions nitrate et par le protoxyde d'azote.....21
4.3-Production de radicaux superoxyde dans l'eau liquide.....22
4.4-Formation du radical $N_3^{\bullet}$ dans l'eau liquide.....23
4.5-Résumé des conditions utilisées dans l'état de phase liquide.... 24

5-SOURCES DE RAYONNEMENT IONISANT UTILISEES..... 24
5.1-Rayonnement gamma..... 24
5.2-Electrons accélérés..... 24

Partie III
III-Matériel et méthodes..... 25

1-ORIGINE DES PROTEINES..... 25

2-INFORMATIONS STRUCTURALES..... 25

3-REACTIFS..... 25
3.1-Purification de l'eau..... 25
3.2-Choix des réactifs..... 25

4-NETTOYAGE DE LA VERRERIE 26

5-VERIFICATION DE LA PURETE DES PROTEINES 26

6-PREPARATION DES SOLUTIONS PROTEIQUES 26
6.1-Choix du tampon.....26
6.2 Préparation des échantillons à irradier sous atmosphère d'azote27
6.3-Saturation en gaz des échantillons à irradier..... 27

7 DESCRIPTION DES SOURCES DE RAYONNEMENTS IONISANTS28
7.1-Radiolyse gamma..... 28
7.1.1-Irradiateurs au Cobalt 60..... 28
7.1.2-Irradiateur au Césium 137.....28
7.2-Radiolyse pulsée.....28

8-DOSIMETRIE 29
8.1-Dosimétrie de Fricke.....29
8.2-Dosimétrie au Méthyl Viologène..... 30

9-CONTROLE DE LA TEMPERATURE LORS DE L'IRRADIATION 30

10-ELECTROPHORESE (SDS-PAGE)..... 30

11-CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (CLHP)..... 31
11.1-Séparation des protéines..... 31
11.2-Hydrolyse trypsique..... 31
11.2.1-Aminoéthylation et carboxyméthylation..... 31
11.2.2-Digestion..... 32
11.3-Séparation des peptides..... 32
11.4-Détermination de la composition en acides aminés.....33

12-CHROMATOGRAPHIE EN PERMEATION DE GEL (CPG)..... 33
12.1-Préparation des échantillons..... 33
12.2-Séparation des protéines..... 34

13-SEQUENCAGE PROTEIQUE 34

14-SPECTROMETRIE DE MASSE 34

15-DETERMINATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA β-GALACTOSIDASE 35

16-DOSAGE ET DETERMINATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DU LYSOZYME 35
16.1-Vérification de la concentration..... 36
16.2-Détermination de l'activité enzymatique..... 36

17-FLUORIMETRIE 36

Partie IV
IV-Résultats et discussion..... 37

Section A
Radiolyse des protéines en solutions aqueuses liquide et congelée 38

A.1-IDENTIFICATION DE PRODUITS RADIOLYTIQUES 38

A.2-DETERMINATION DES RENDEMENTS RADIOLYTIQUES 39

A.3-COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS EN SOLUTIONS DILUEES ET SOUS FORME DE POUDRES LYOPHILISEES.....40

A.4-EFFET DE CAPTEURS.....41
A.4.1-Effet des ions nitrate: Capture de l'électron..... 41
A.4.2-Effet du Tris(hydroxyméthyl)aminométhane: Capture du radical hydroxyle..... 42

A.5-SYNTHESE DES DIFFERENCES OBSERVEES DANS LES PROCESSUS RADIO-INDUITS A –78°C ET A 36°C 43

Section B

Fragmentation radio-induite en solution congelée: Rôle de la structure protéique..... 47

B.1-EFFET DE LA COMPACITE ET DE LA CONFORMATION..... 47
B.1.1-Effet de la compacité de l'α-lactalbumine..... 47
B.1.2-Modifications conformationnelles de la citrate synthase liée à la présence du substrat..... 48
B.1.3-Résultats complémentaires..... 48
B.1.4-Interprétation des rendements de fragmentation sur la base de paramètres conformationnels..... 49

B.2-DETERMINATION DES SITES DE FRAGMENTATION SPECIFIQUES DU LYSOZYME DE BLANC D'ŒUF DE POULE..... 51
B.2.1-Sites révélés par séquençage Edman, composition en acides aminés et spectrométrie de masse..... 52
B.2.2-Emplacements présumés de certains sites par analyse des masses obtenues par spectrométrie de masse..... 52
B.2.3-Discussion de la localisation des sites de fragmentation sur la base de paramètres structuraux..... 53

Section C

Processus oxydatifs en solution liquide..... 54

C.1-DIMERISATION RADIO-INDUITE DANS LE LYSOZYME 54
C.1.1-Rendements de dimérisation..... 54
C.1.2-Propriétés spectrales des produits..... 55
C.1.2.1-Propriétés d'absorption..... 55
C.1.2.2-Propriétés de fluorescence..... 56
C.1.3-Effet du débit de dose..... 57
C.1.4-Interprétation des processus de dimérisation..... 58

C.2-ROLE DE L'OXYDATION DES RESIDUS TRYPTOPHANE..... 61
C.2.1-Effet de l'espèce..... 62
C.2.2-Effet de la température..... 63
C.2.3-Effet de la concentration..... 64

C.3-DETERMINATION DES SITES DE MODIFICATION..... 64
C.3.1-Détermination du site de fragmentation radio-induit.....64
C.3.2-Localisation des autres sites modifiés..... 65
C.3.2.1-Analyse des dimères..... 66
C.3.2.2-Analyse de solutions de lysozyme irradié.....67

C.4-MECANISMES D'OXYDATION PAR $N_3^{\bullet}$ DANS L'EAU..... 69

Partie V
V-Conclusions et perspectives 72

Partie VI
VI-Bibliographie..... 76

Partie VII
VII-Annexes..... 87

QUELQUES FORMULES DEVELOPPEES UTILES..... 87
Tyrosine, dihydroxyphénylalanine et bityrosine..... 87
Tryptophane, N-formylkynurénine et L-kinurénine..... 88

2-ARTICLES PUBLIES..... 89

Liste des figures

Figure I-1
Structure cristallographique de la β-galactosidase..... 10-A
Figure I-2
Structures cristallographiques de la citrate synthase..... 11-A
Figure I-3
Structure cristallographique du lysozyme de blanc d'œuf de poule..... 13-A
Figure I-4
Structure cristallographique du lysozyme de blanc d'œuf de dinde..... 13-A
Figure II-1
Distribution des ions et des molécules dans les trajectoires des électrons en mouvement..... 17-A
Figure IV-1
Effet de l'état de phase du solvant: Distribution, en fonction de la dose, de l'intensité relative de la bande correspondant à la masse moléculaire du protomère natif séparé par SDS-PAGE..... 38-A
Figure IV-2
Effet de l'état de phase du solvant: Séparation, par SDS-PAGE, des produits radiolytiques de la β-galactosidase, irradiée à doses croissantes..... 39-A
Figure IV-3
Influence de la proportion d'eau à –78°C: Diminution, avec la dose, de la quantité de protomère de masse moléculaire très proche de celle retrouvée dans la protéine native évaluée par SDS-PAGE 40-A
Figure IV-4
Influence de la proportion d'eau à 36°C: Diminution, avec la dose, de la quantité de protomère de masse moléculaire très proche de celle retrouvée dans la protéine native évaluée par SDS-PAGE..... 40-B
Figure IV-5
Effet de la capture de l'électron par NO_3^-: Disparition de la bande correspondant au monomère natif en SDS-PAGE, à -78°C, suivant la dose..... 41-A
Figure IV-6
Effet de la capture des radicaux hydroxyle par le Tris: Disparition de la bande correspondant au monomère natif en SDS-PAGE, à 36°C, en fonction de la dose..... 42-A
Figure IV-7
Séparation, en SDS-PAGE, d'échantillons de lysozyme dénaturé irradiés à doses croissantes 48-A
Figure IV-8
Relation entre le rapport Surface / Volume et les rendements G (-I)..... 50-A
Figure IV-9
Emplacement des résidus flanquant les sites de fragmentation qui ont été localisés avec précision..... 52-A
Figure IV-10
Spectre différentiel d'absorbance du lysozyme de poule irradié à 37°C en présence de $N_3^{\bullet}$..... 56-A

Figure IV-11
Evolution de l'absorbance à 315 nm du lysozyme soumis à des doses croissantes de rayonnement gamma en présence de $N_3^{\bullet}$..... 56-A
Figure IV-12
Evolution de l'absorbance à 315 nm de la tyrosine soumise à des doses croissantes de rayonnement gamma en présence de $N_3^{\bullet}$..... 56-B
Figure IV-13
Evolution de l'absorbance à 315 nm du tryptophane soumis à des doses croissantes de rayonnement gamma en présence de $N_3^{\bullet}$..... 56-B
Figure IV-14
Spectre d'émission en fluorescence du lysozyme de poule irradié à 37°C en présence de $N_3^{\bullet}$($\lambda_{excitation}$ = 325 nm)..... 57-A
Figure IV-15
Spectre d'émission en fluorescence du lysozyme de poule irradié à 37°C en présence de $N_3^{\bullet}$($\lambda_{excitation}$ = 380 nm)..... 57-A
Figure IV-16
Séparation par électrophorèse d'échantillons de différents lysozymes irradiés.... 62-A
Figure IV-17
Représentation de l'évolution des rendements de fragmentation et de dimérisation en fonction de la température..... 63-A
Figure IV-18
Représentation de l'évolution des rendements de fragmentation et de dimérisation en fonction de la concentration.....63-B
Figure IV-19
Spectre de spectrométrie de masse: Détermination du site précis de fragmentation du lysozyme de poule..... 64-A
Figure IV-20
Spectre de spectrométrie de masse : Détermination du site précis de fragmentation du lysozyme de dinde..... 64-A
Figure IV-21
Identification du site de coupure dans la structure cristallographique du lysozyme de poule..... 65-A
Figure IV-22
Identification du site de coupure dans la structure cristallographique du lysozyme de dinde..... 65-A
Figure IV-23
Séparation des fragments trypsiques du lysozyme de poule dimérisé..... 66-A
Figure IV-24
Séparation des fragments trypsiques du lysozyme de poule irradié..... 68-A

Liste des tableaux

TABLEAU I-I
Rayons de giration des différentes formes de l'α-lactalbumine..... 12-A
TABLEAU I-II
Séquences des lysozymes..... 14-A
TABLEAU II-I
Sélection des espèces radicalaires lors de la radiolyse dans l'état de phase liquide 24-A
TABLEAU IV-I
Effet de l'état de phase du solvant: Rendements de diminution de l'intensité relative de la bande correspondant à la masse moléculaire des sous-unités natives, évalués par SDS-PAGE, et de diminution de l'activité biologique relative..... 40-C
TABLEAU IV-II
Influence de la proportion d'eau: Rendements initiaux de diminution de l'intensité relative de la bande correspondant à la masse moléculaire des sous-unités natives, évalués par SDS-PAGE, et de diminution de l'activité biologique relative..... 40-C
TABLEAU IV-III
Effet de la capture de l'électron par NO_3^-: Rendements initiaux à-78°C et à 36°C..... 41-B
TABLEAU IV-IV
Effet de la capture des radicaux hydroxyle par le Tris: Rendements initiaux à –78°C et à 36°C..... 42-B
TABLEAU IV-V
Compilation des rendements initiaux de perte d'intensité de la bande correspondant à diverses protéines natives, en SDS-PAGE, en solution congelée..... 48-A
TABLEAU IV-VI
Différences entre les lysozymes de poule et de dinde..... 54-A
TABLEAU IV-VII
Comparaison des rendements initiaux de dimérisation dans les lysozymes de poule et de dinde..... 55-A
TABLEAU IV-VIII
Comparaison des rendements initiaux de dimérisation du lysozyme de poule en radiolyse gamma et pulsée.....55-A
TABLEAU IV-IX
Tableau comparatif des valeurs de fluorescence à 410 nm ($\lambda_{excitation}$ = 325 nm) du lysozyme de poule et de dinde..... 57-B
TABLEAU IV-X
Rendements de dimérisation et de fragmentation obtenus lors de l'irradiation ($N_3^\bullet$) suivant l'espèce de lysozyme..... 62-B
TABLEAU IV-XI
Variation des rendements observés lors de l'exposition à $N_3^\bullet$ suivant la température d'irradiation..... 62-B
TABLEAU IV-XII
Variation des rendements observés lors de l'irradiation ($N_3^\bullet$) suivant la concentration en protéine..... 63-C
TABLEAU IV-XIII
Fragments trypsiques attendus pour le lysozyme de poule carboxyméthylé et aminoéthylé.....67-A

TABLEAU IV-XIV
Modifications, suite à l'irradiation, dans les peptides trypsiques de fractions de lysozyme de poule..... 68-B
TABLEAU IV-XV
Réactions proposées..... 69-A

Liste des articles

ARTICLES PUBLIES

Effets conformationnels sur la fragmentation radio-induite des protéines
Michel Potier, Marilyne Audette, Xiang Chen et Abdelali Filali-Mouhim (1995) *Cahier de Radiobiologie*, **2**: 14-15

Lysozyme fragmentation induced by γ-radiolysis
2-A.Filali-Mouhim, M. Audette, M. St-Louis, L. Thauvette, L. Denoroy, F. Penin,X. Chen, N. Rouleau, J.-P. Le Caer, J. Rossier, M. Potier and M. le Maire (1997) *Int. J. Radiat. Biol.*, **72** (1): 63-70

ARTICLES EN PREPARATION
AU MOMENT DE LA REDACTION DE CE TRAVAIL

Protein γ-Radiolysis in Frozen Solutions is a Maromolecular Surface Phenomenon: Fragmentation of Lysozyme, Citate Synthase and α-Lactalbumine in Native or Denatured States
M. Audette, X. Chen, C. Houée-Levin, M. Potier and M. le Maire

Intramolecular Long Range Electron Transfer Between Tyrosine and Tryptophan in Lysozymes
Marilyne Audette, Moshe Faraggi, Chantal Houée-Levin and Pierre Jollès

Liste des sigles et abréviations

A	Absorbance
ACS	Qualité pour analyse "American Chemical Society"
ADN	Acide DéoxyriboNucléique
BSA	Sérum Albumine Bovine "Bovin Serum Albumin"
CLHP	Chromatographie Liquide à Haute Performance
CPG	Chromatographie en Perméation de Gel
D	Dose
D_D	Dose absorbée par le dosimètre
D_E	Dose absorbée par l'échantillon
DOPA	DihydrOxyPhénylAlanine
DTT	DiThioThreitol
e^-_{aq}	Electron hydraté
EDTA	EthylèneDiamineTetraacétique Acide
e^-	Electron
ESI-MS	Spectrométrie de masse par électro-jet "Electro-Spray Ionisation- Mass Spectrometry"
g	Rendement radiolytique de la décomposition de l'eau
G	Rendement
G (+D)	Rendement de formation de dimère évalue par CLHP
G (+ID)	Rendement de production de dimère évalué par densitométrie de gel d'électrophorèse
G (+IF)	Rendement de production de fragment évalué par densitométrie de gel d'électrophorèse
G (-A)	Rendement de diminution de l'activité enzymatique
G (-I)	Rendement de diminution de l'intensité de la bande correspondant à la masse de la protéine native évalué par densitométrie de gel d'électrophorèse
G (-IL)	Rendement de diminution de l'intensité de la bande correspondant à la masse du lysozyme natif évalué par densitométrie de gel d'électrophorèse
HEPES	N-[2-HydroxyEthyl] Piperazine-N'-[2-EthaneSulfonic acid]
I	Débit de dose
MALDI	Ionisation désorbée par laser assistée d'une matice "Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation"
MV	Méthyl Viologène
NFK	N-FormylKynurénine
PAGE	Electrophorèse sur gel de polyacrylamide "PolyAcrylamide Gel Electrophoresis"
PDB	Protein Data Bank
R_G	Rayon de giration
R_S	Rayon de Stokes
RPE	Résonance Paramagnétique-Electronique
S	Surface

SDS	Dodecyl Sulphate de Sodium
TFA	Acide TriFluoroacétique
TOF	Temps de vol "Time Of Flight"
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
V	Volume
Vitamine A	Rétinol
Vitamine C	Acide ascorbique
Vitamine E	Tocophérol
Δ A	Variation d'absorbance
ΔG	Energie libre

Liste des symboles utilisés pour les acides aminés

Code lettre	Abréviation	Nom complet
A	Ala	Alanine
C	Cys	Cysteine
D	Asp	Acide Aspartique
E	Glu	Acide Glutamique
F	Phe	Phenylalanine
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
K	Lys	Lysine
L	Leu	Leucine
M	Met	Methionine
N	Asn	Asparagine
P	Pro	Proline
Q	Gln	Glutamine
R	Arg	Arginine
S	Ser	Serine
T	Thr	Threonine
V	Val	Valine
W	Trp	Tryptophane
Y	Tyr	Tyrosine

Partie I

Introduction

I-Introduction

1-SITUATION DU SUJET

Cette thèse est consacrée à la description et à l'interprétation des phénomènes radiolytiques qui surviennent dans les protéines. Certaines modifications radio-induites sont irréversibles et modifient la structure donc la fonction des protéines. Les réarrangements sont de différents types et peuvent altérer les résidus comme la chaîne polypeptidique. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux mécanismes qui affectent l'intégrité de la chaîne polypeptidique, plus précisément aux phénomènes de fragmentation et de polymérisation.

La connaissance des phénomènes radiolytiques dans les protéines ouvre plusieurs horizons. Elle peut poser les bases fondamentales des processus de la radiostérilisation de matériel biomédical ou d'aliments. Elle rejoint des implications physiologiques car elle permet la compréhension de mécanismes de certaines pathologies. L'utilisation judicieuse du rayonnement ionisant à des fins de traitement ou de diagnostic ainsi que le suivi et l'encadrement dans les domaines où la radioprotection est de rigueur bénéficient également de telles études. La mise en place d'outils de recherche pour obtenir des informations structurales peut également être envisagée. Pour ces raisons, les réactions qui découlent de l'interaction du rayonnement ionisant avec les biopolymères doivent être approfondies.

1.1-Informations structurales

Les protéines comportent plusieurs niveaux d'organisation. La structure primaire, c'est-à-dire la suite séquentielle des acides aminés, constitue le premier. La structure secondaire est définie en termes d'unités structurales telles que des hélices α, des feuillets β, des retours de chaînes et des boucles. La structure tertiaire fait référence au repliement. Elle assure une organisation thermodynamiquement stable qui permet le maintien de la

fonction biologique. Dans le cas d'interactions inter-chaînes polypeptidiques, la structure quaternaire est évoquée.

L'utilisation de rayonnements ionisants permet d'obtenir des informations structurales sur des protéines sans purification préalable. Par exemple, le suivi de la diminution de l'activité biologique ou la modification des structures tertiaires en fonction de la quantité d'énergie reçue permet d'obtenir une estimation de la masse moléculaire (Lea, 1955; Beauregard *et al.*, 1987; Kepner et Macey, 1968; le Maire *et al.*, 1987, 1989). Cette technique, qui fait appel à la probabilité d'interaction rayonnement-protéine, présente cependant des limites importantes (le Maire *et al.*, 1990). Un choix éclairé des conditions expérimentales permettrait de réduire considérablement la marge d'erreur.

Pour plusieurs protéines la chaîne polypeptidique est coupée en des sites spécifiques (le Maire *et al.*, 1990). La distribution des fragments protéiques, selon leur masse moléculaire, semble être une signature de la structure tridimensionnelle de celles-ci. Des changements conformationnels ont été distingués par des différences dans la distribution des fragments radiolytiques (le Maire *et al.*, 1990; Potier *et al.*, 1991; Potier *et al.*,1994; Solomonson *et al.*, 1987).

Des applications supplémentaires, mettant à contribution l'inactivation enzymatique, ont été imaginées (Shafferman et Stein, 1975; Adams *et al.*, 1972; Kempner, 1993). Par exemple, la création de radicaux libres sélectifs pourrait permettre l'identification de résidus appartenant aux sites actifs. L'utilisation du rayonnement pourrait aussi contribuer à élucider certains modes d'associations et de coopérations impliquant les protéines (Pshezhetsky *et al.*, 1995, Greiner *et al.*, 1996) ou à identifier des segments de l'ADN par liaison radio-induite avec une molécule protéique (Moss *et al.*, 1997).

Les techniques de cristallographie aux rayons X peuvent aussi bénéficier des retombées de ce type d'études. En effet, elles pourraient édicter de nouvelles procédures qui permettraient de lutter contre la dégradation des cristaux, particulièrement lorsque ceux-ci doivent être exposés à des doses cumulées importantes.

1.2-Préservation et stérilisation

L'industrie a de plus en plus recours à l'irradiation pour la préservation des aliments (Simic, 1978) ainsi que la stérilisation de matériel biomédical et de certains médicaments (Salmenick *et al.*, 1987). Dans ces domaines, la crainte principale est de produire des composés toxiques, mutagènes, cancérogènes ou de réduire la valeur (organoleptique, nutritionnelle ou curative) des produits irradiés. Il est donc impératif de définir les conditions permettant d'obtenir le degré de stérilisation souhaitable tout en préservant les propriétés bénéfiques des produits commercialisés. Quels que soient les produits formés, leur nature ainsi que leur concentration doivent être connues. Une connaissance détaillée de la chimie des radiations dans les protéines permettra la prédiction voire l'élimination de réactions qui ne sont pas souhaitées.

1.3-Implications biologiques

Les rayonnements ionisants sont de plus en plus couramment utilisés dans le domaine de la santé. On fait appel à ceux-ci pour diagnostiquer des anomalies physiques autant que pour empêcher la prolifération de tumeurs. Par ailleurs, comme nous le verrons plus loin, l'utilisation du rayonnement ionisant permet de produire les mêmes radicaux libres que ceux provenant de processus enzymatiques. Cette production, *in vivo*, est permanente au sein de la matière vivante. Elle remplit certains rôles essentiels pour l'organisme. Mais, elle peut aussi entraîner l'endommagement des acides nucléiques, des membranes et des protéines et être ainsi la source de divers dysfonctionnements physiopathologiques (Halliwell et Gutteridge, 1986A).

Dans les organismes vivants, les radicaux libres provenant le plus souvent de l'oxygène, sont impliqués dans plusieurs fonctions vitales. Les radicaux oxygénés peuvent être crées *in vivo* par les cellules phagocytes lors de l'inflammation respiratoire, par les mitochondies lors des réactions de transfert d'électrons ou par la réduction des hydroperoxydes en présence de fer ou de cuivre (Halliwell et Gutteridge, 1984; Wolff et Dean, 1986). Des radicaux tyrosinyle ont été détectés dans de nombreux enzymes, incluant la ribonucléotide réductase, la prostaglandine H synthase, le photosystème II (Ma et Barry, 1996; Kim et Barry, 1998), la galactose oxydase et les peroxydases. Un

radical tryptophanyle a été identifié dans le cytochrome-C peroxidase et dans le site actif de l'ADN photolyase (Eiserich *et al.*, 1995). Ces radicaux participent à l'activité catalytique.

Les effets destructeurs des radicaux libres sur les systèmes biologiques, sont principalement associés à leur grande réactivité avec les biopolymères (Ward *et al.*, 1993; Freeman et Crapo, 1982; Halliwell et Gutteridge, 1986; Czapski, 1984; Davies, 1987; Farhataziz et Ross, 1977). Ils agissent par création de radicaux secondaires (Wolff et Dean, 1986; Willson *et al.*, 1985; Bisby *et al.*, 1982; Aldrich et Cundall, 1969; Adams *et al.*, 1969). Des altérations protéiques ont d'ailleurs été mises en évidence (Davies, 1987; Davies et Delsignore, 1987). Il existe de forts indices pour que le vieillissement (Faraggi et Houée-Levin, 1999), tout comme certaines pathologies dont certains cancer (Weinberg, 1996; Jackson *et al.*, 1997), l'athérosclérose (Jacob *et al.*, 1996; Li et von Harsdorf, 1997), les ulcères (Das *et al.*, 1997), la dystrophie musculaire de Duchenne (Haycock *et al.*, 1996), la maladie d'Alzheimer (Multhaup *et al.*, 1996) la maladie des joints temporomandibulaires (Milam *et al.*, 1998), la formation de calculs dans la vésicule biliaire (Sipos *et al.*, 1997), s'accompagne d'une accumulation de protéines oxydées dans certains tissus (Leeuwenburgh *et al.*, 1998).

Les organismes vivants, tout en tirant partie de la formation de certains radicaux libres, ont donc développé des moyens de protection contre les attaques radicalaires. Les mécanismes de dégradation des protéines oxydées *in vivo* sont une ligne de défense contre l'attaque des radicaux libres. En effet, nous assistons à une dégradation sélective qui empêche l'accumulation de fragments ou d'agrégats potentiellement toxiques. Cette dégradation, souvent par protéolyse, permet aux cellules de se remettre d'une attaque oxydative modérée (Grune et Davis, 1997; Salo *et al.*, 1990). Les protéines modifiées, souvent inactives (Willson, 1983) et partiellement dépliées, sont donc généralement plus sensibles aux protéases. Les cellules sont aussi dotées de substances réductrices ou d'antioxydants et de quelques enzymes qui permettent la réparation de lésions oxydatives dans les protéines (Halliwell et Gutteridge, 1986A).

L'accumulation de protéines inactives peut être causée par une déficience d'activité de protéases spécifiques, une diminution de la concentration d'agents protecteurs (par exemple, les vitamines A, C et E), une perte (pour la catalase, la superoxyde dismutase, le glutathion ou les peroxydases) de capacité de capture et une augmentation du niveau des oxydases (Fucci *et al.*, 1983). Les signaux perçus par les enzymes protéolytiques restent encore à cerner.

Les accumulations de protéines oxydées, observées dans plusieurs pathologies énumérées plus haut, indiquent que certains dommages oxydatifs sont mal gérés par l'organisme (Dean *et al.*, 1997). Quelles sont ces modifications? Est-il possible de prévenir ce problème? D'y remédier? Est-il possible de tirer avantage de certains réarrangements? Celles-ci ne sont que quelques interrogations qui doivent être résolues.

2-RESUME DES CONNAISSANCES ACTUELLES

2.1-Définition des types d'interactions rayonnement-protéine

Les rayonnements ionisants causent des dégâts dans les protéines par différents types d'interactions. L'effet direct est le dommage associé à l'interaction d'un rayonnement ionisant conduisant à des excitations et des ionisations dans une protéine. L'effet quasi-direct implique un dépôt d'énergie dans les molécules d'eau qui sont intimement liées aux protéines. Dans ce cas particulier, les entités initialement formées dans le solvant réagissent immédiatement avec les molécules protéiques. L'effet indirect est le résultat de l'action d'entités réactives que sont les radicaux libres qui apparaissent lors de la radiolyse de l'eau. (Kempner, 1993; von Sonntag, 1987). Dans l'eau liquide, seuls les effets indirects sont considérés comme significatifs lorsque la masse ainsi que le volume occupé par les protéines représentent moins de 1% de ceux du solvant et que la concentration protéique est égale ou inférieure à 10^{-3} M (Spinks et Woods, 1990).

Puisque les dépôts d'énergie se produisent au hasard et que la plupart des matériaux biologiques sont principalement constitués d'eau, les espèces initiales proviennent le plus souvent de la radiolyse de l'eau. Les principaux radicaux libres sont l'électron, qui peut

être entouré de molécules d'eau, et le radical hydroxyle (voir les mécanismes de la radiolyse dans la partie II). Leurs propriétés chimiques sont très différentes.

2.2-Réactions de l'électron avec les protéines

Dans l'état de phase solide, l'électron peut se retrouver sous deux formes. Il peut être libre ou "sec" et voyager très rapidement (dans une bande de conduction ou par effet tunnel). Alternativement il peut être "emprisonné" dans un site électrostatiquement favorable du réseau cristallin. Une des réactions les plus importante, dans l'état de phase solide, est sa recombinaison avec des ions positifs (Holroyd, 1987).

Dans l'eau liquide, l'électron éjecté par le rayonnement ionisant est hydraté (e^-_{aq}), c'est à dire solvaté avec quelques molécules d'eau. L'électron hydraté est un puissant réducteur ($E° = -2.9$ V). Il réagit habituellement avec les protéines avec des constantes de vitesse très élevées (de l'ordre de 10^{10} à 10^{11} M^{-1} s^{-1}) (Anbar *et al.*, 1973; Hart et Anbar, 1970). Dans les protéines, il peut réduire presque tous les résidus d'acides aminés. La réaction est plus rapide avec les composés soufrés (cystéine, cystine, méthionine) et l'histidine protonée. Ainsi, pour les protéines contenant des ponts disulfure, une partie importante des électrons est impliquée dans l'ouverture de ces liaisons. Les produits de ces réactions sont des fonctions thiols (Houée-Levin, 1994). Les liaisons carbonyle sont également ciblées. La réaction avec les groupes carbonyle peut aboutir à la coupure de la liaison peptidique ou à des désaminations (Garrison, 1987). L'électron aqueux a également la possibilité de s'additionner à des résidus aromatiques et hétérocycliques.

La réactivité de l'électron aqueux, bien que grande, dépend de l'organisation locale et de la conformation des protéines. Par exemple certains ponts disulfure sont très aptes à être réduits alors que d'autres sont totalement protégés (Braams et Ebert, 1967). De même, la réactivité des résidus histidine est très variable (Steiner *et al.*, 1985). Le pH (Braams, 1967; Hoffman et Hayon, 1975), la force ionique (Hoffman et Hayon, 1975) et la température (Braams et Ebert, 1967) sont des facteurs qui influencent sa réactivité.

2.3-Réactions du radical hydroxyle avec les protéines

Dans l'eau, à l'état solide, les radicaux hydroxyle possèdent une mobilité très réduite (Holroyd, 1987; Spinks et Wood, 1990). Nous pensons actuellement qu'ils sont peu impliqués dans les réactions avec les protéines.

Dans l'état de phase liquide, le radical hydroxyle est un oxydant fort ($E° = 2.72$ V). Le plus souvent, il agit par transfert d'électron ou par arrachement d'atome d'hydrogène (Wolff *et al.*, 1986). En général, les constantes de vitesse d'arrachement de H diminuent quand l'énergie de la liaison X-H augmente (X = C, N, ou S). Les réactions du radical hydroxyle avec les doubles liaisons ou les composés aromatiques, hétérocycliques et soufrés, se font par addition de OH (Simic, 1978). Ces produits peuvent éventuellement éliminer OH selon une réaction équilibrée. Les constantes de vitesse pour les réactions des radicaux hydroxyle avec les protéines, déterminées expérimentalement, sont de l'ordre de 10^{11} M^{-1} s^{-1}(Dorfman et Adams, 1973).

En théorie, dans les protéines, le radical hydroxyle pourrait attaquer tous les acides aminés (Gee *et al.*, 1985; Buxton *et al.*, 1988; Davies *et al.*, 1987). Cependant, on observe qu'il s'additionne préférentiellement aux résidus histidine et aromatiques (tyrosine, phenylalanine et tryptophane) ou bien qu'il oxyde les fonctions thiols. Ces réactions aboutissent à des dimères de tyrosine, des résidus tryptophane modifiés, des acides aminés hydroxylés et la formation de ponts disulfure supplémentaires (Houée-Levin, 1994). Le radical hydroxyle ne réagit pas avec les groupes carbonyle mais plutôt avec les atomes de carbone adjacents ou alors l'azote (Jones *et al.*, 1987; Mönig *et al.*, 1985). L'attaque des protéines par les radicaux hydroxyle aboutit donc, entre autres, à leur agrégation (Schuessler et Schilling, 1984; Wolff *et al.*, 1986).

La distribution des sites d'attaque semble toutefois, comme pour l'électron aqueux, dépendante de la conformation des protéines. Il est clair que la conformation influence significativement la réactivité (Dorfman et Adams, 1973; Davies *et al.*, 1987). Dans le cas des enzymes, une préoccupation importante est l'impact sur l'activité biologique. Celle-ci s'avère justifiée puisque certains résidus d'acides aminés (méthionine,

tryptophane, histidine, cystine) sont modifiés par les radicaux hydroxyle et occasionnent des variations de l'activité enzymatique (Garrison, 1986; Gee *et al.*, 1985).

2.4-Sélection des radicaux libres dans l'eau liquide

L'électron aqueux et le radical hydroxyle, de par leurs forts pouvoirs d'oxydo-réduction, réagissent à de nombreux sites. Pour isoler quelques réactions spécifiques, il faut avoir recours à d'autres radicaux plus sélectifs. Ainsi, les radicaux $NO_2^{\bullet}$, $ClO_2^{\bullet}$, $Br_2^{\bullet-}$,$I_2^{\bullet-}$, $N_3^{\bullet}$, $(CSN)_2^{\bullet-}$ et bien d'autres ont été employés pour mener à bien plusieurs études (voir par exemple: Alfassi, 1987; Bisby *et al.*, 1982; Spinks et Wood, 1990). Dans le cadre de notre travail, le radical azoture ($N_3^{\bullet}$) est un candidat particulièrement intéressant. Son potentiel d'oxydo-réduction est évalué à 1.3 V (DeFelippis *et al*, 1990) mais sa qualité principale est d'oxyder spécifiquement le cycle indole des résidus tryptophane. En effet, à pH physiologique (7,4) la réaction de $N_3^{\bullet}$ avec le tryptophane est environ 10 fois plus rapide que la réaction avec la tyrosine. Son utilisation facilite donc la sélection du site radicalaire initial ($Trp^{\bullet}$) (Prütz *et al.*, 1980 et 1981). Cela permet d'isoler l'une des réactions de $HO^{\bullet}$.

$$N_3^{\bullet} + Trp\text{---}X\text{---}Tyr \rightarrow Trp^{\bullet}\text{---}X\text{---}Tyr + N_3^{-} + H^{+} \qquad (I\text{-}1)$$

$N_3^{\bullet}$ génère des radicaux phenoxyle dans les peptides (Prütz *et al.*,1982) et dans les protéines (Butler *et al.*, 1982). En effet, il y a ensuite transfert intramoléculaire de charge, à partir des radicaux tryptophanyle vers la tyrosine (Butler *et al.*, 1982; Faraggi *et al.*, 1989; DeFelippis *et al.*, 1990A; Lee *et al.*, 1992; Bobrowski *et al.*, 1990; Weinstein *et al.*, 1991; Bobrowski *et al.*, 1989). Ce transfert se fait en 250-900 µs approximativement et a une constante de vitesse de premier ordre de 10^2 à 10^4 s^{-1} selon la protéine (Butler *et al.*, 1982).

$$Trp^{\bullet}\text{---}X\text{---}Tyr \leftrightarrow Trp\text{---}X\text{---}Tyr^{\bullet} \qquad (I\text{-}2)$$

2.5-Devenir des résidus tyrosine et tryptophane

La formation de liaisons covalentes entre des groupements tyrosyle a été observée suite à l'irradiation de protéines. (Yamamoto et Okuda, 1975; Hashimoto *et al.*, 1982). Ces dimérisations sont attribuées à l'oxydation induite par $HO^{\bullet}$. Les résidus tyrosinyle formés se dimérisent pour former plusieurs composés biphénoliques stables (Leher et Fasman, 1967). Le 2, 2'-biphénol, bityrosine semble être le plus fréquemment retrouvé (Davies *et al.*, 1987). La formation de bityrosine est donc proposé pour expliquer une partie de l'agrégation observée suite à l'irradiation protéique.

$$2\ Trp\text{---}X\text{---}Tyr^{\bullet} \rightarrow Trp\text{---}X\text{---}Tyr\text{-}Tyr\text{---}X\text{---}Trp \quad (I\text{-}3)$$

Dans les protéines, mis à part la production de dimères de bityrosine, par exposition aux radicaux $N_3^{\bullet}$ et $HO^{\bullet}$, la création d'autres sous-produits d'oxydation des résidus tyrosine (Ignatenko *et al.*, 1984; Kuwajima, 1989) et tryptophane (Langlois *et al.*, 1993) est envisageable.

3.0-FORMULATION DES OBJECTIFS DE TRAVAIL

Actuellement, le manque d'informations recueillies dans les protéines ne permet pas d'apprécier, dans son ensemble, les lois qui régissent les différences de susceptibilité à la fragmentation, à la polymérisation et à la perte de fonction biologique consécutive à l'irradiation de protéines.

Les buts qui sont poursuivis par ce travail sont nombreux. Nous souhaitons d'abord identifier les entités radicalaires primaires qui affectent l'activité biologique d'enzymes et provoquent des modifications de la chaîne polypeptidique dans l'état de phase liquide ou solide. Lorsque leur nature sera connue, nous tenterons de qualifier et quantifier leurs contributions relatives à la fragmentation et à l'agrégation. Nous souhaitons également préciser la localisation des sites où s'effectuent les réarrangements et proposer des mécanismes qui pourraient expliquer les processus radio-induits observés.

4-PLAN DE TRAVAIL

Les types de phénomènes que nous désirons étudier nous ont conduis à sélectionner, pour chacun de ceux-ci, une protéine modèle. Les phénomènes de fragmentation, de condensation et d'inactivation seront d'abord comparés en fonction de l'état de phase: solide et liquide. Des solutions diluées de β-galactosidase seront utilisées pour décrire et quantifier certaines similitudes et différences fondamentales. Nous tenterons de préciser le rôle des électrons et des radicaux hydroxyle dans ces modifications radio-induites par l'emploi de capteur spécifiques.

Les données de la littérature font état de phénomènes qui tendent à impliquer la conformation protéique pour expliquer les différences de réactivités expérimentale et théorique (Potier *et al.*, 1995; Braams et Ebert, 1967; Steiner *et al.*, 1985; Dorfman et Adams, 1973; Davies *et al.*, 1987) . En milieu solide, l'effet de la compacité sera explorée à l'aide de l'α-lactalbumine et l'effet de changements conformationnels avec la citrate synthase. La localisation des sites de fragmentation sera faite dans le lysozyme.

En milieu liquide, nous nous sommes focalisés sur les mécanismes de polymérisation induits par l'oxydation en raison de leur importance. A cet effet, nous avons utilisé la famille des lysozyme de type C et plus particulièrement les espèces: poule et dinde. Ces deux molécules ont une structure très proche et ne diffèrent que par quelques acides aminés. Afin d'obtenir un maximum de précision sur les mécanismes impliqués, un radical oxydant plus sélectif ($N_3^{\bullet}$) a été choisi.

La localisation précise des sites de modifications radio-induites, dans le lysozyme de poule, sera ensuite tentée. Elle permettra de caractériser les paramètres nécessaires à ces réorganisations irréversibles et, en complément des rendements observés, elle permettra d'émettre des hypothèses quant aux mécanismes.

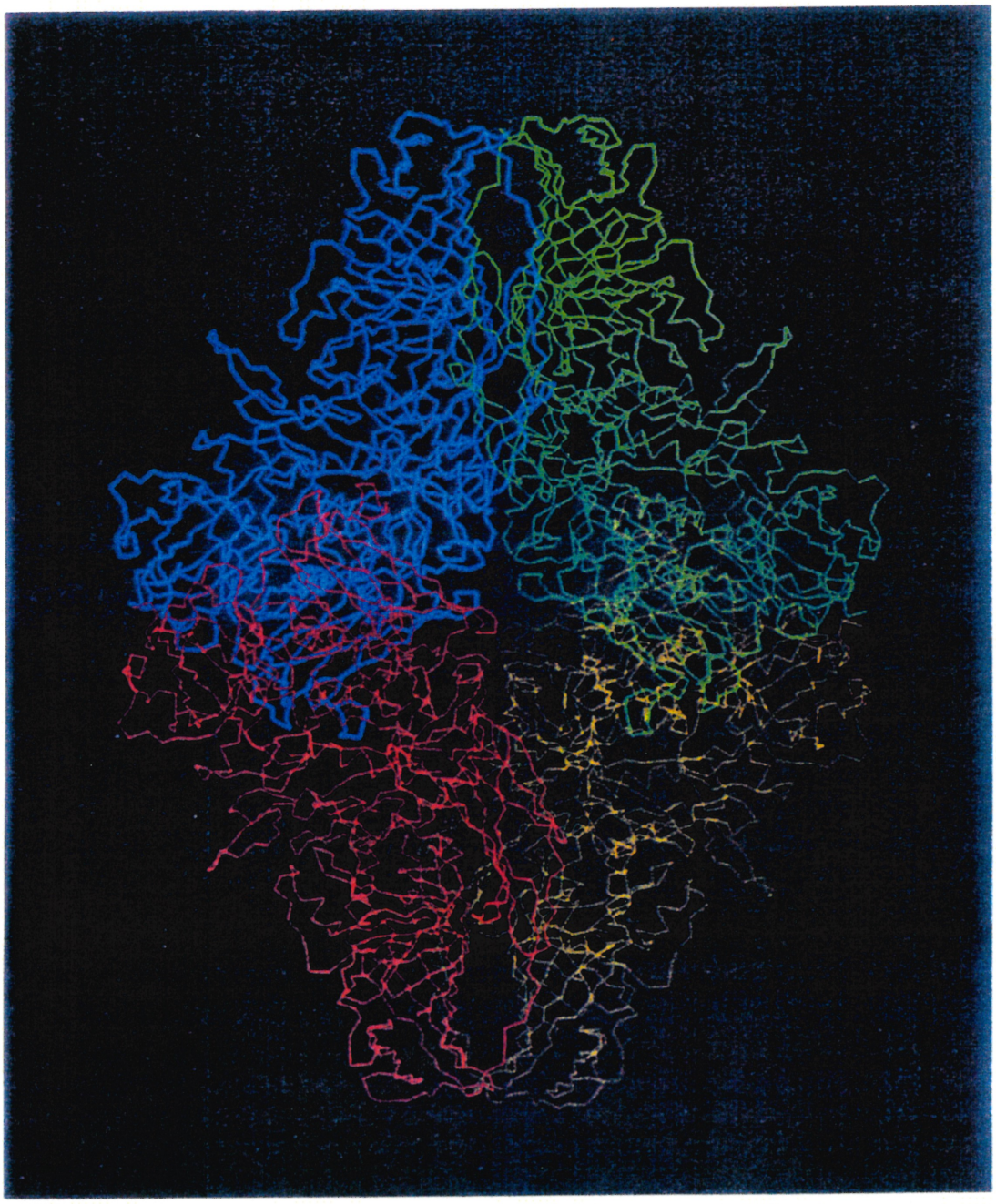


Figure I-1

Structure cristallographique de la β-galactosidase
Les quatre sous-unités identiques sont représentées en jaune, rouge, bleu et vert.

5-SELECTION DES PROTEINES MODELES

5.1–β-Galactosidase de *Escherichia Coli*

La β-galactosidase de *Escherichia Coli* (Figure I-1) a été choisie comme modèle pour plusieurs raisons. Cette protéine comporte d'abord l'avantage d'être accessible à l'état purifiée commercialement. Sa structure cristallographique est bien définie (Jacobson *et al.*, 1994; Jacobson et Matthiews, 1992), Elle a préalablement fait l'objet d'études de radiolyse, conduites à plusieurs températures dans l'intervalle –196°C à 36°C. En raison de sa taille importante, elle permet de visualiser les modifications protéiques à des doses raisonnables même dans l'état de phase solide.

Le rôle biologique de la β-galactosidase est d'hydrolyser le lactose pour produire du galactose et du glucose. Elle est constituée de quatre protomères identiques de 116 kDa composés de 1023 acides aminés. Il existe deux types d'interface entre les protomères (le long et le court) facilement identifiables dans la structure quaternaire de l'enzyme.

5.2-Citrate synthase de cœur de porc

La citrate synthase (Figure I-2) est une enzyme qui est disponible dans le commerce. Celle-ci se présente sous forme dimérique. Ces protomères ont un poids de 46,5 kDa. Elle a été employée dans ce travail car toutes les données cristallographiques de ses formes ouverte (native) et fermée (liée à son substrat) sont disponibles (Remington *et al.*, 1982). De plus, la transformation allostérique qui se produit lors de la liaison avec son substrat est bien décrite.

La citrate synthase catalyse la première étape du cycle de l'acide citrique. Elle assiste la condensation de l'acétyl-CoA avec l'oxaloacétate pour former du citrate.

Acétyl CoA + oxaloacétate $+H_2O \rightarrow$ citrate + CoA-SH + H+ $\quad \Delta G\,°' = -7{,}7$ kcal/mol

La citrate synthase est une enzyme régulatrice retrouvée dans de nombreux types de cellules. La réaction qu'elle catalyse est l'étape limitante du cycle de l'acide citrique.

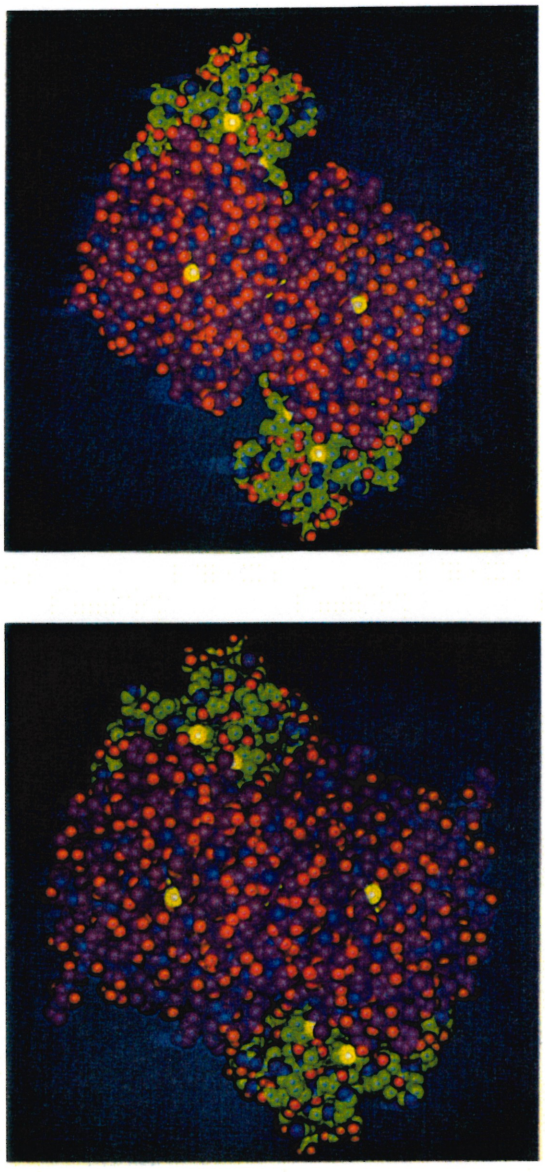


Figure I-2

Structures cristallographiques de la citrate synthase

A *Forme ouverte*

B *Forme fermée (liée à l'oxaloacétate)*

Les atomes de carbone du petit domaine de chaque sous-unité sont représentés en vert alors que ceux du grand domaine sont en violet. Les atomes d'azote, d'oxygène et de soufre sont respectivement bleus, rouges et jaunes. L'important changement conformationnel entre ces deux formes implique des mouvements interatomiques relatifs qui peuvent atteindre 15Å .

5.3–α-Lactalbumine de lait de cochon d'Inde

Cette protéine a été choisie en raison de la disponibilité d'informations structurales. En particulier, on connaît les rayons de ces différents états conformationnels (Tableau I-I). Le volume occupé par l'α-lactalbumine ainsi que la surface qu'elle présente au solvant peuvent donc être estimés dans sa forme native, dans une forme intermédiaire appelée globulaire fondue et dans sa forme entièrement dénaturée.

Cette petite protéine monomérique d'environ 14 kDa possède une structure tertiaire proche de celle des lysozymes de type C mais son rôle biologique est très différent. Sa fonction biologique consiste à moduler l'action de la galactosyltransférase. La fonction normale de la galactosyltransférase est de catalyser l'incorporation du galactose lié β(1-4) à la N-acétylglucosamine durant la synthèse des groupes prosthétiques d'oligosaccharides de certaines oligoprotéines. L'α-lactalbumine convertit cette réaction en synthèse de lactose en altérant la spécificité de substrat de la galactosyltransférase de N-acétylglucosamine au glucose.

5.4-Lysozyme

Le lysozyme est une petite enzyme qui clive le constituant polyosidique de la paroi des cellules bactériennes. Ce polyoside est un polymère alterné de résidus N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM) unis par des liaisons glycosidiques β (1-4). Le lysozyme exerce son activité bactéricide en hydrolysant la liaison glycosidique entre le C-1 du NAM et le C-4 du NAG. Le lysozyme, très efficace vis à vis des bactéries Gram+, intervient également dans les infections dues aux bactéries Gram- en intéragissant avec les lipopolysaccharides (LPS) de la membrane externe. Cette interaction qui perturbe la structure de la membrane externe facilite l'attaque de la couche de peptidoglycane mais l'action bactéricide sur les bactérie Gram- reste néanmoins très faible.

TABLEAU I-I

Rayons de giration des différentes formes de l'α-lactalbumine
Les rayons de giration (R_G) ont été calculés et estimés des façons suivantes :

$R_G = (\Sigma m_i r_i^2 / \Sigma m_i)^{1/2}$

Où m_i est la masse de l'atome i et r_i est la distance à laquelle se trouve cet atome du centre de masse de la molécule.

$R_G = R_S / \zeta$

Où R_S est le rayon de Stokes et ζ est une constante qui peut être estimée à 0,875 pour les protéines dénaturées et à 1,29 pour les protéines globulaires ou compactes (Tanford, 1961; le Maire et Rivas, 1983).

Forme de l'α-lactalbumine	**Rayon de giration (R_G) (nm)**
Forme native	1,37
Forme globulaire fondue	1,54
Forme dénaturée	2,83

Les lysozymes sont regroupés en familles. Nous avons, pour ce travail, utilisé des lysozymes de type C (Jollès et Jollès, 1984).

5.4.1-Lysozyme de blanc d'œuf de poule

Le lysozyme de blanc d'œuf de poule (Figure I-3) est constitué d'une seule chaîne polypeptidique de 129 acides aminées (14,3 kDa). Sa structure cristallographique est parfaitement déterminée (Blake *et al.*, 1965). Il possède quatre ponts disulfure intrachaînes (contribuant à sa grande stabilité : 30-115, 76-94, 64-80, 6-127). Pour ajouter à ces qualités, il est disponible commercialement. Sa source est abondante et peu onéreuse. Une quantité importante d'information est disponible dans la littérature puisqu'il a été l'objet de plusieurs études y compris en radiolyse (par exemple : Hashimoto *et al.*, 1982; Wienstein *et al.*, 1991; Franzini *et al.*, 1993; Bobrowski *et al.*, 1989, 1997).

5.4.2-Lysozyme de blanc d'œuf de dinde

Le lysozyme de blanc d'œuf de dinde (Figure I-4) est constitué d'une seule chaîne polypeptidique (129 acides aminés) de 14,2 kDa. Sa structure primaire, secondaire et tertiaire est très semblable à celle du lysozyme de blanc d'œuf de poule (Sarma et Bott, 1977; La Rue et Speck, 1970). Seules sept différences ponctuelles au niveau des résidus d'acides aminés sont rapportées (Tableau I-II).

5.4.3-Lysozyme d'œuf de tortue

Le lysozyme de *Trionyx gangeticus* fait également partie des lysozymes de type C. Sa structure tertiaire est proche de celles des lysozymes de blanc d'œuf de poule et de dinde mais des différences importantes sont notées dans sa structure primaire (Tableau I-II). Cette souche de lysozyme s'avère un choix intéressant pour évaluer l'influence de la structure primaire (Aschaffenburg *et al.*, 1980; Jollès *et al.*, 1977; Jollès, 1985).

5.4.4 Lysozyme de lait humain

Le lysozyme de lait humain fait partie des lysozymes de type C. Ses structures secondaire et tertiaire sont très proches de celles des blancs d'œuf de poule et de dinde. De

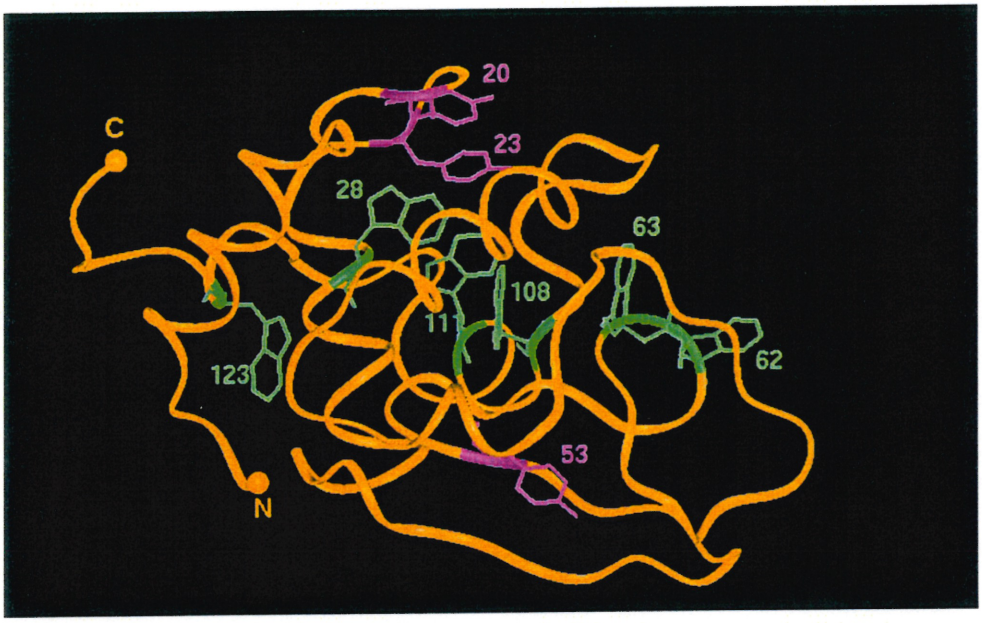


Figure I-3

Structure cristallographique du lysozyme de blanc d'œuf de poule
Les résidus tyrosine sont montrés en rose et les résidus tryptophane sont identifiés en vert.

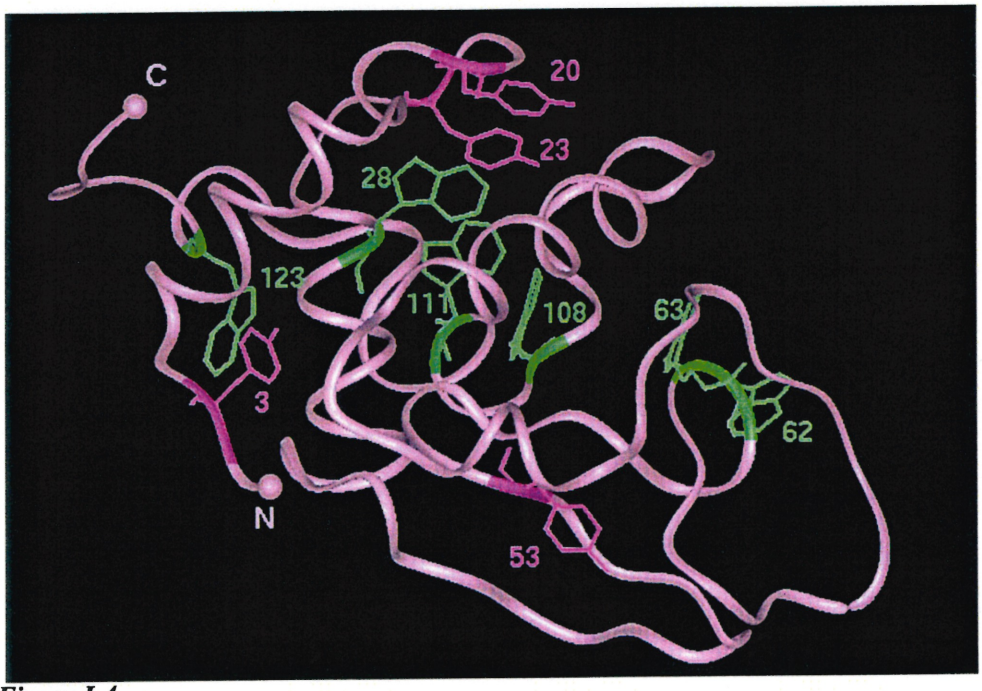


Figure I-4

Structure cristallographique du lysozyme de blanc d'œuf de dinde
Les résidus tyrosine sont montrés en rose et les résidus tryptophane sont marqués en vert.

nombreuses différences sont cependant retrouvées dans sa structure primaire (Tableau I-II). Il est donc aussi un choix intéressant pour évaluer l'influence de la structure primaire (Redfield et Dobson, 1990; Artymiuk et Blake, 1981; Jollès et Jollès, 1971).

TABLEAU I-II

Séquences des lysozymes
Seules les différences par rapport au lysozyme de blanc d'œuf de poule sont données.

Poule	..1	..2	..3	..4	..5	..6	..7	..8	..9	..0
.0	K	V	F	G	R	C	E	L	A	A
Dinde			Y							
Tortue		I	Y	E				A		R
Humain				E						R
.1	A	M	K	R	H	G	L	D	N	Y
Dinde					L					
Tortue	E				L				G	
Humain	T	L			L		M			G
.2	R	G	Y	S	L	G	N	W	V	C
Dinde										
Tortue	S						H			
Humain			I			A			M	
.3	A	A	K	F	E	S	N	F	N	T
Dinde										
Tortue	T		N	H			K			
Humain	L			W			G	Y		
.4	Q	A	T	N	R	N	T	D	G	S
Dinde	H									
Tortue					Y		P (G)		R	
Humain	R				Y		A (G)		R	
.5	T	D	Y	G	I	L	Q	I	N	S
Dinde										
Tortue										
Humain						F				
.6	R	W	W	C	N	D	G	R	T	P
Dinde										
Tortue		Y						K		
Humain		Y						K		
.7	G	S	R	N	L	C	N	I	P	C
Dinde			K							
Tortue	T	A	S		A	C	G		D	
Humain		A	V		A		H	L	S	
.8	S	A	L	L	S	S	D	I	T	A
Dinde										
Tortue		Q			N	A				
Humain					Q	D	N		A	D
.9	S	V	N	C	A	K	K	I	V	S
Dinde									A	
Tortue	A		V				R			R
Humain	A		A				R	V		R
10	D	G	N	G	M	N	A	W	V	A
Dinde	G									
Tortue		P	Q			G				
Humain		P	Q		I	R				
11	W	R	N	R	C	K	G	T	D	V
Dinde										
Tortue		T	K					Q	K	
Humain						Q	N	R		
12	Q	A	W	I	R	G	C	R	L	---
Dinde	H									
Tortue	S				K			K		
Humain	R	Q	Y	V	Q			G	V	

Partie II

Mécanismes de la radiolyse

II-Mécanismes de la radiolyse

1-INTERACTION DU RAYONNEMENT AVEC LA MATIERE

La radiolyse est définie comme l'ensemble des transformations chimiques provoquées dans la matière, par l'absorption de l'énergie d'un rayonnement ionisant. Lorsque l'énergie d'une particule ou d'un photon dépasse le potentiel d'ionisation d'une molécule, une collision avec cette molécule peut conduire à son ionisation. Les actes primaires de l'absorption d'énergie par un composé X irradié sont l'excitation et l'ionisation.

1.1-Evénements d'excitation

Les événements d'excitation peuvent s'écrire:

$$X \quad \rightsquigarrow \quad X^* \qquad \text{(II-1)}$$

L'excitation survient quand l'énergie échangée est inférieure à l'énergie d'ionisation et que l'électron, transféré à un niveau plus élevé, reste lié à la molécule.

1.2-Evénements d'ionisation

Les événements d'ionisation peuvent s'écrire:

$$X \quad \rightsquigarrow \quad X^+ + e^- \qquad \text{(II-2)}$$

Une ionisation se produit lorsque l'énergie échangée entre le rayonnement incident et la matière est suffisante. L'électron ainsi éjecté, acquiert une énergie cinétique qu'il cède au milieu, tout au long de sa trajectoire, par des chocs avec d'autres molécules jusqu'à ce que son énergie soit proche de l'énergie thermique.

1.3-Espèces radicalaires formées

Dans les molécules, les électrons sont habituellement réunis en paires. Les doublets électroniques permettent l'appariement de deux électrons de spin opposés et ainsi l'annulation de leurs champs magnétiques réciproques. Un radical libre, au contraire, est une entité dont la couche périphérique contient un électron célibataire. Cette espèce chimique, identifiée par " $^{\bullet}$ ", est peu stable et très réactive. Elle tend, au point de vue énergétique, à éliminer, par perte (radical réducteur) ou par gain (radical oxydant), le(s) électron(s) célibataire(s). De manière générale, la vitesse de réaction des radicaux libres est plus grande que celle des molécules.

1.4-Unités de mesure

La dose d'irradiation se définit comme la quantité d'énergie absorbée par unité de masse de matière. L'unité internationale pour la quantifier est le Gray (1 Gy = 100 rad = 1 J kg^{-1}). Un paramètre important à considérer conjointement est la vitesse de dépôt de cette énergie, c'est à dire le débit de dose, souvent exprimé en Gy s^{-1}. L'effet chimique du rayonnement se mesure par les rendements de formation de produits ou de disparition de réactifs. Ceux-ci se définissent comme le nombre de molécules formées ou disparues pour une énergie absorbée de 100 eV ou comme le nombre de moles produites ou consommées pour 1 J absorbé. Ces rendements sont symbolisés par G. Les rendements radiolytiques de la décomposition de l'eau sont souvent représentés par g.

2-RADIOLYSE DE L'EAU

L'eau est un constituant majeur de la matière vivante, au moins pondéralement. On sait maintenant que l'irradiation de l'eau liquide entraîne la formation de produits radicalaires ($HO^{\bullet}$, e^{-}_{aq} et $H^{\bullet}$) et moléculaires (H_2O_2 et H_2). Cette décomposition s'effectue en trois étapes successives (Farhataziz et Rodger, 1987).

2.1-Etape d'excitation et d'ionisation

Initialement l'interaction du rayonnement ionisant avec l'eau entraîne la production de molécules d'eau excitées (réaction II-3) ou du radical cation par arrachement d'un électron qui possède alors une énergie cinétique (réaction II-4).

$$H_2O \xrightarrow{\sim\sim} H_2O^* \qquad \text{(II-3)}$$

$$H_2O \xrightarrow{\sim\sim} H_2O^{\bullet+} + e^- \text{ (avec une énergie cinétique)} \qquad \text{(II-4)}$$

En utilisant les types de rayonnement décrits en II-5 il semble que, de ces deux réactions, l'ionisation soit prédominante (Spinks et Woods, 1990).

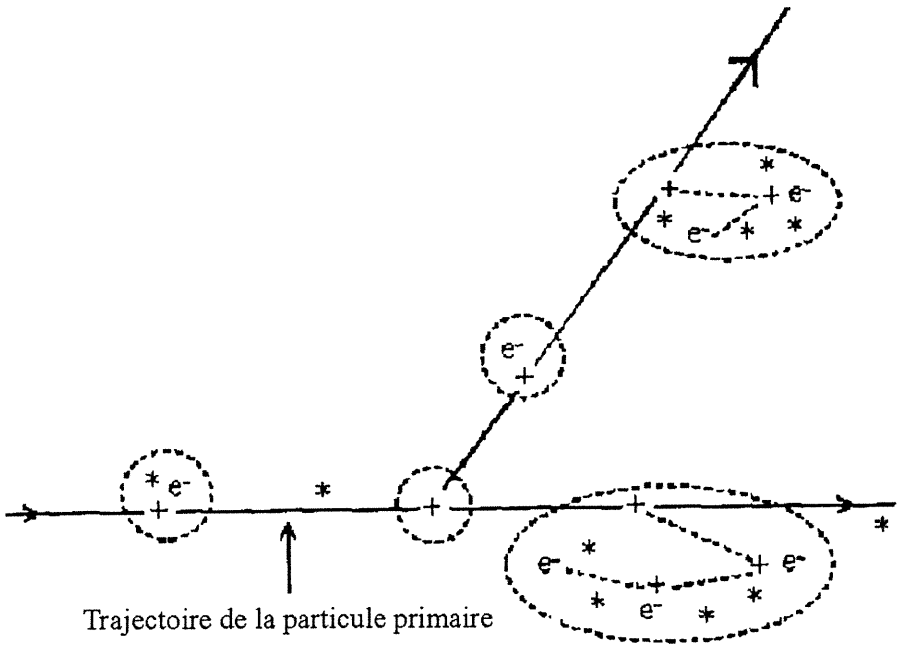
L'eau excitée peut conduire soit à une dissociation homolytique (réaction II-5), réaction supposée la plus courante, soit à une désexcitation (réaction II-6) (Spinks et Woods, 1990).

$$H_2O^* \rightarrow HO^{\bullet} + H^{\bullet} \qquad \text{(II-5)}$$

$$H_2O^* \rightarrow H_2O + \text{chaleur et vibrations} \qquad \text{(II-6)}$$

Après l'ionisation, l'électron secondaire est à son tour ralenti par ionisations et excitations successives. Des zones hétérogènes, dans le voisinage des dépôts d'énergie, sont donc générées. Celles-ci sont appelées grappes. Pour toutes, la densité d'ionisation est plus grande à la fin des trajectoires.

Les radicaux cations ($H_2O^{\bullet+}$) réagissent avec des molécules d'eau (réaction II-7) puis les ions H_3O^+ causent une acidification locale, en environ 10^{-14} seconde, tandis que les électrons se solvatent (cette opération dure environ 10^{-12} seconde). Le processus menant à la solvatation des électrons est résumé par la réaction II-8. Une faible quantité d'électrons en fin de parcours (thermiques) neutralisent l'ion positif parent pour donner une molécule d'eau excitée (Spinks et Woods, 1990).



= Evénements d'ionisation
= Trajectoire des électrons secondaires de faible énergie
+ = Ion positif
e^- = Electron libre
* = Molécule excitée

Figure II-1

Distribution des ions et des molécules dans les trajectoires des électrons en mouvement

$$H_2O^{\bullet +} + H_2O \rightarrow HO^{\bullet} + H_3O^{+} \quad \text{(II-7)}$$

$$e^- \text{ (énergie cinétique)} \rightarrow e^- \text{ (subexcitation)} \rightarrow e^- \text{ (thermiques)} \rightarrow e^- \text{ (hydratés)} \quad \text{(II-8)}$$

La position initiale des espèces créées découle directement du déploiement de la trace des particules ionisantes (photons, électrons primaires ou secondaires) dans le milieu (Goulet *et al.*, 1996). Les grappes contiennent les espèces suivantes : e^-_{aq}, $HO^{\bullet}$, H_3O^+ et $H^{\bullet}$.

2.2-Etape diffusionnelle

Des réactions de recombinaisons des espèces, dues à leur formation en forte concentration dans les zones hétérogènes, empêchent un certain nombre d'entre elles de s'échapper avant diffusion. Les grappes sont le siège des réactions II-9 à II-15.

$$HO^{\bullet} + HO^{\bullet} \rightarrow H_2O_2 \quad \text{(II-9)}$$

$$HO^{\bullet} + e^-_{aq} \rightarrow OH^- \quad \text{(II-10)}$$

$$HO^{\bullet} + H^{\bullet} \rightarrow H_2O \quad \text{(II-11)}$$

$$e^-_{aq} + H_3O^+ \rightarrow H^{\bullet} + H_2O \quad \text{(II-12)}$$

$$e^-_{aq} + e^-_{aq} \rightarrow H_2 + 2\,OH^- \quad \text{(II-13)}$$

$$e^-_{aq} + H^{\bullet} \rightarrow H_2 + OH^- \quad \text{(II-14)}$$

$$H^{\bullet} + H^{\bullet} \rightarrow H_2 \quad \text{(II-15)}$$

Les interactions avec le soluté interviennent seulement si celui-ci est suffisamment concentré pour qu'il y ait compétition avec les réactions de recombinaison.

2.3-Etape homogène

Au terme de cette étape, quelques nanosecondes après interaction du rayonnement avec la matière, les espèces radicalaires et moléculaires sont distribuées de façon homogène dans le milieu irradié. Pour des solutions aqueuses, diluées et neutres, irradiées par des rayons γ de ^{60}Co, les rendements radiolytiques radicalaires et moléculaires, d'après Ferradini et Pucheault (1983), sont:

g ($HO^{\bullet}$)	=	0,28 µmol J^{-1}	(2,7 moléc./ 100 eV)
g (e^{-}_{aq})	=	0,27 µmol J^{-1}	(2,6 moléc./ 100 eV)
g ($H^{\bullet}$)	=	0,07 µmol J^{-1}	(0,6 moléc./ 100 eV)
g (H_2O_2)	=	0,08 µmol J^{-1}	(0,7 moléc./ 100 eV)
g (H_2)	=	0,05 µmol J^{-1}	(0,4 moléc./ 100 eV)

3-RADIOLYSE DE LA GLACE

3.1-Etape d'excitation et d'ionisation

L'action initiale des rayonnements ionisants est de produire des molécules d'eau excitées et ionisées.

$$H_2O \rightsquigarrow H_2O^* \qquad \text{(II-3)}$$

$$H_2O \rightsquigarrow H_2O^{\bullet+} + e^- \text{ (avec une énergie cinétique)} \qquad \text{(II-4)}$$

La structure solide favorise la perte d'énergie des molécules excitées et donc la recombinaison sans dissociation.

$$H_2O^* \rightarrow H_2O \qquad \text{(II-6)}$$

Le radical cation produit lors de l'ionisation, par réaction avec une molécule d'eau, donne naissance au radical hydroxyle. De son côté, l'électron éjecté se thermalise pour devenir un électron "emprisonné". Les électrons emprisonnés peuvent être immobilisés à très basses températures et devenir mobiles lorsque la température est élevée. Certains électrons peuvent réagir par effet tunnel conduisant à des transferts d'électrons sur de longues distances (Brown et Dainton, 1968; Kevan, 1969; Kieffer, 1982).

$$H_2O^{\bullet+} + H_2O \rightarrow HO^{\bullet} + H_3O^+ \qquad \text{(II-7)}$$

$$e^- \text{ (avec une énergie cinétique)} \rightarrow e^- \text{ (emprisonné)} \qquad \text{(II-16)}$$

3.2-Réactions de recombinaisons

L'emprisonnement des radicaux, provenant de l'ionisation, entraîne une grande quantité de recombinaisons dont les suivantes :

e^- (emprisonné) + $HO^\bullet$	→	OH^-	(II-17)
e^- (ou e^- (emprisonné)) + H_3O^+	→	$H^\bullet$ + H_2O	(II-18)
H_3O^+ + OH^-	→	2 H_2O	(II-19)
$HO^\bullet$ + $H^\bullet$	→	H_2O	(II-11)
$H^\bullet$ + $H^\bullet$	→	H_2	(II-15)
$HO^\bullet$ + $HO^\bullet$	→	H_2O_2	(II-9)

3.3-Rendements de production

Les rendements de production des principaux produits de décomposition de la glace ont été évalués par différents auteurs. Ceux-ci sont plus faibles que dans l'eau liquide.

G ($-H_20$) ≅	0,10 µmol J^{-1}	(1,0 moléc./ 100 eV)	(Spinks et Wood, 1990)
g ($HO^\bullet$) ≅	0,08 µmol J^{-1}	(0,8 moléc./ 100 eV)	(Kevan, 1968)
g ($e^-_{emprisonné}$) ≅	0,02 µmol J^{-1}	(0,2 moléc./ 100 eV)	(Neilsson et Christensen, 1968)

4-SELECTION DES ENTITES RADICALAIRES

La radiolyse de l'eau et de la glace conduit à la formation, en majeure partie, de radicaux hydroxyle et d'électrons (hydratés dans l'eau liquide, et secs ou emprisonnés dans la glace). Ces produits radicalaires sont respectivement oxydants et réducteurs. Pour sélectionner les espèces radicalaires, des capteurs adéquats doivent être choisis. Un capteur est un composé chimique qui réagit, avec une constante de vitesse élevée, avec une entité radicalaire. Un bon capteur est sélectif, c'est à dire qu'il possède une grande affinité pour un radical par rapport aux autres présents dans le milieu.

Les irradiations sont généralement réalisées sous atmosphère d'argon ou d'azote pour s'affranchir de l'oxygène. La présence d'oxygène conduit à une chimie plus complexe lors de l'étape diffusionnelle qui, non seulement influence les rendements, mais entraîne la formation d'autres radicaux.

4.1-Capture du radical hydroxyle par le Tris(hydroxyméthyl)amino-méthane

Lors de la radiolyse de solutions protéiques, il a été noté que le Tris comme l'HEPES confèrent une protection significative contre la perte d'intégrité des résidus tryptophane et la formation de bityrosine alors que l'utilisation du tampon phosphate, sans contamination par le fer, reproduit relativement fidèlement les résultats obtenus dans l'eau pure (Davies *et al.*, 1987). De plus, il a été remarqué que le Tris et l'HEPES réduisent les masses apparentes des protéines estimées en employant la théorie de la cible (Parkinson, 1987). Ces deux tampons semblent donc avoir des propriétés de capteurs. En effet, le Tris s'avère un bon capteur des radicaux hydroxyle. Il affiche une contante de vitesse élevée ($k = 3{,}0 \times 10^9\ M^{-1}\ s^{-1}$) (Krisch *et al.*, 1991) et il est considéré comme non réactif avec les électrons (Buxton *et al*, 1988 ; Hicks et Gebicki, 1986).

$$\text{Tris} + HO^{\bullet} \rightarrow \text{Produits de réaction non identifiés} \qquad \text{(II-20)}$$

Les réactions de ces produits ne sont pas connues.

4.2-Capture de l'électron par les ions nitrate et par le protoxyde d'azote

L'ion NO_3^- est un excellent capteur d'un précurseur de l'électron dans sa forme aqueuse ou sèche ($k \cong 9 \times 10^9\ M^{-1}\ s^{-1}$) (Ershov et Pikaev, 1968). Les électrons thermalisés sont complètement captés par 0,1 M de NO_3^- dans les états de phase solide et liquide de l'eau (Ershov et Pikaev, 1968). Les réactions II-21 à II-26 ont été proposées:

$$NO_3^- + e^- \rightarrow NO_3^{2-} \qquad \text{(II-21)}$$

$$NO_3^{2-} + H_2O \rightarrow 2OH^- + NO_2^{\bullet} \qquad \text{(II-22)}$$

$$NO_3^- + H^\bullet \rightarrow OH^- + NO_2^\bullet \quad \text{(II-23)}$$

$$NO_2^\bullet + NO_2^\bullet + 3H_2O \rightarrow NO_2^- + NO_3^- + 2H_3O^+ \quad \text{(II-24)}$$

$$HO^\bullet + NO_2^- \rightarrow OH^- + NO_2^\bullet \quad \text{(II-25)}$$

$$e^- + NO_2^- \rightarrow NO_2^{2-} \ (+ H_2O) \rightarrow NO + 2OH^- \quad \text{(II-26)}$$

NO_2^- est aussi oxydé en NO_3^- par H_2O_2 (Schwarz et Allan, 1955; Daniels et Wigg, 1969; Farragi *et al.*, 1971). Toutefois $NO_2^\bullet$ est susceptible de réagir notamment avec certains acides aminés (Huie, 1994).

L'irradiation de solutions saturées en protoxyde d'azote fait en sorte que pratiquement tous les électrons hydratés sont transformés en radical hydroxyle. Dans ces conditions le rendement de formation de $HO^\bullet$ est d'environ $5,5 \times 10^{-7}$ mol J^{-1}.

$G(HO^\bullet) \cong g(HO^\bullet) + g(e^-_{aq})$

$$N_2O + e^-_{aq} \rightarrow HO^\bullet + OH^- + N_2 \quad \text{(II-27)}$$

4.3-Production de radicaux superoxyde dans l'eau liquide

L'irradiation sous oxygène entraîne la production de $O_2^{\bullet-}$ avec un rendement équivalent à la somme de e^-_{aq} et $H^\bullet$, soit d'environ $3,4 \times 10^{-7}$ mol J^{-1}. $HO^\bullet$ est toujours présent à raison de $2,8 \times 10^{-7}$ mol J^{-1}.

$$e^-_{aq} + O_2 \rightarrow O_2^{\bullet-} + H_2O \quad \text{(II-28)}$$
($k = 1,9 \times 10^{10}\ M^{-1} s^{-1}$) (Bielski, 1978)

$$e^-_{aq} + H_3O^+ \rightarrow H^\bullet + H_2O \quad \text{(II-29)}$$
($k = 2,2 \times 10^{10}\ M^{-1} s^{-1}$) (Bielski *et al.*, 1985)

$$H^\bullet + O_2 \rightarrow HO_2^\bullet \quad \text{(II-30)}$$
($k = 2 \times 10^{10}\ M^{-1} s^{-1}$) (Bielski *et al.*, 1985)

$$HO_2^{\bullet} + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + O_2^{\bullet-} \qquad \text{(II-31)}$$

($K_{HO_2^{\bullet}} = 1{,}6 \times 10^{-5}\ M^{-1}\ s^{-1}$) (Bielski *et al.*, 1985)

En milieu aéré, les électrons hydratés produits lors de la radiolyse de l'eau se transforment donc rapidement en radicaux superoxydes. Afin d'éliminer les radicaux $HO^{\bullet}$ et quelques $H^{\bullet}$, il est nécessaire d'ajouter aux solutions à irradier du formiate de sodium (0,1 M) (Rabani, 1962; Matthews et Sangster, 1965). Dans ce cas, ces deux espèces sont transformées quantitativement en radical $O_2^{\bullet-}$. Le rendement est alors d'environ $6{,}2 \times 10^{-7}$ mol J^{-1}. $G(O_2^{\bullet-}) \equiv g(HO^{\bullet}) + g(H^{\bullet}) + g(e^-_{aq})$

$$HO^{\bullet} + HCOO^- \rightarrow H_2O + CO_2^{\bullet-} \qquad \text{(II-32)}$$

($k = 3{,}5 \times 10^9\ M^{-1}\ s^{-1}$) (Matthews et Sangster, 1965)

$$H^{\bullet} + HCOO^- \rightarrow H_2 + CO_2^{\bullet-} \qquad \text{(II-33)}$$

($k = 5 \times 10^8\ M^{-1}\ s^{-1}$) (Rabani, 1962)

$$O_2 + CO_2^{\bullet-} \rightarrow CO_2 + O_2^{\bullet-} \qquad \text{(II-34)}$$

($k = 4{,}2 \times 10^9\ M^{-1}\ s^{-1}$) (Adams et Willson, 1969)

$$e^-_{aq} + O_2 \rightarrow O_2^{\bullet-} + H_2O \qquad \text{(II-28)}$$

($k = 1{,}9 \times 10^{10}\ M^{-1}\ s^{-1}$) (Bielski, 1978)

4.4-Formation du radical $N_3^{\bullet}$ dans l'eau liquide

$N_3^{\bullet}$ est obtenu en saturant avec N_2O une solution à irradier en présence de N_3^- (0,1 M).

$$N_2O + e^-_{aq} \rightarrow HO^{\bullet} + OH^- + N_2 \qquad \text{(II-27)}$$

$$N_3^- + HO^{\bullet} \rightarrow N_3^{\bullet} + OH^- \qquad \text{(II-35)}$$

De cette façon tous les radicaux libres provenant de la radiolyse de l'eau, à l'exception de $H^{\bullet}$ sont transformés en $N_3^{\bullet}$. Cette transformation des radicaux hydroxyle et de l'électron

aqueux est obtenue en environ 1 µs. Le rendement G ($N_3^{\bullet}$) est alors estimé à 5,5 x 10^{-7} mol J^{-1}.

4.5 Résumé des conditions utilisées dans l'état de phase liquide

L'ensemble des conditions d'irradiation dans l'état de phase liquide, utilisées lors de ce travail, sont rassemblées dans le Tableau II-I. Pour chaque condition, les espèces radicalaires formées ainsi que leurs rendements sont indiqués.

5-SOURCES DE RAYONNEMENT IONISANT UTILISEES

5.1-Rayonnement gamma

Lors de la désintégration de certains noyaux radioactifs, comme le cobalt 60, des photons de grande énergie, appelés rayons gamma, sont émis (1,332 et 1,173 MeV, avec un rapport de 1 pour 1). Le rayonnement γ (radiations électromagnétiques) provenant du césium 137 possède une énergie de 0,662 MeV. Les rayonnements β du césium 137 sont bloqués par l'écran qui entoure les sources. Ce type de rayonnement est continu.

5.2-Electrons accélérés

Des particules, comme les électrons accélérés peuvent aussi conduire à l'ionisation. Il est ainsi possible d'obtenir des électrons monoénergétiques, en grande quantité, pour des impulsions qui peuvent être très courtes. Le débit de dose est donc extrêmement important. En régime pulsée, nous avons fourni environ 15 Gy en 500 ns, soit environ 3 x 10^7 Gy s^{-1}. La radiolyse pulsée permet d'étudier le comportements d'espèces transitoires. Les deux types de rayonnement ionisant permettent donc, par des techniques distinctes, d'avoir accès à des données complémentaires.

TABLEAU II-I

Sélection des espèces radicalaires lors de la radiolyse dans l'eau liquide

Les rendements sont donnés en mol J^{-1}.

	Conditions	Radicaux formés	Rendements
A	Sous protoxyde d'azote	$HO^{\bullet}$	$5,5 \times 10^{-7}$
		$H^{\bullet}$	$0,7 \times 10^{-7}$
B	Sous argon ou sous azote	$HO^{\bullet}$	$2,8 \times 10^{-7}$
		e^{-}_{aq}	$2,7 \times 10^{-7}$
		$H^{\bullet}$	$0,7 \times 10^{-7}$
C	Sous protoxyde en présence de N_3^-	$N_3^{\bullet}$	$5,5 \times 10^{-7}$
		$H^{\bullet}$	$0,7 \times 10^{-7}$
D	Sous oxygène	$O_2^{\bullet -}$	$3,4 \times 10^{-7}$
		$HO^{\bullet}$	$2,8 \times 10^{-7}$
E	Sous oxygène en présence de $HCOO^-$	$O_2^{\bullet -}$	$6,2 \times 10^{-7}$

Partie III

Matériel et méthodes

III-Matériel et méthodes

1-ORIGINE DES PROTEINES

Les protéines qui ont été utilisées pour la réalisation de ce travail ont été obtenues auprès de Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO) pour la β-galactosidase de *Escherichia Coli*, le lysozyme de blanc d'œuf de poule, le lysozyme de blanc d'œuf de dinde, le lysozyme de lait humain ainsi que la citrate synthase de cœur de cochon. Le lysozyme d'œuf de tortue nous a été généreusement donné par le laboratoire du Professeur Pierre Jollès (Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, FR) alors que l'α-lactalbumine de lait de cochon d'Inde est un don du laboratoire du Dr. Philip Evans (Department of Biochemistry, University of Cambridge, UK)

2-INFORMATIONS STRUCTURALES

Les structures des protéines par cristallographie aux rayon X proviennent de Protein Data Bank (PDB), Brookhaven National Laboratories.

3-REACTIFS

3.1-Purification de l'eau

Eau ultra pure : L'eau a été recueillie, peu de temps avant chaque expérience, à la sortie d'un système de purification Millipore Barnstead NANApure II ou ELGA (résistivité 18 MΩ).

3.2-Choix des réactifs

Les réactifs qui ont été utilisés lors des irradiations sont soigneusement sélectionnées. Ils sont du plus haut degré de pureté disponible dans le commerce. Une attention particulière quant à la nature des traces des contaminants, comme les métaux, est portée lors du choix

de ceux-ci. En effet, de nombreuses impuretés réagissent sous l'effet du rayonnement ionisant et certaines catalysent des réactions radicalaires. Tous les autres réactifs chimiques utilisés sont de qualité pour analyses (ACS). L'oxaloacétate de sodium provient de ROCHE Boehringer (Allemagne).

4-NETTOYAGE DE LA VERRERIE

Le nettoyage de la verrerie utilisée pour les expériences de radiolyse comprend un trempage dans un détergent Hellmanex (Hellma) suivi d'un rinçage méticuleux avec de l'eau déionisée ultra pure.

5-VERIFICATION DE LA PURETE DES PROTEINES

La pureté des échantillons protéiques, utilisés pour l'ensemble de ce travail, a été vérifiée par confirmation la masse moléculaire attendu par électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide, SDS-PAGE. Dans le cas des lysozymes, une séparation par chromatographie liquide haute performance de phase inversée a été réalisée de surcroît.

6-PREPARATION DES SOLUTIONS PROTEIQUES

Les solutions de protéines ont été dialysées contre le tampon d'irradiation. La dialyse permet d'éliminer les petites molécules pouvant être présentes dans les préparations commerciales de protéines. Une attention particulière a été portée à l'emploi de solutions fraîchement préparées et à la qualité des réactifs utilisés.

6.1-Choix du tampon

Le Tris, l'HEPES et le phosphate sont des produits couramment employés pour maintenir constant le pH de solutions protéiques. Pour éviter de travailler en présence d'un capteur ou de composés qui peuvent introduire des artefacts le tampon phosphate, qui est pratiquement inerte, a été utilisé tout au long de ce travail.

6.2-Préparation des échantillons à irradier sous atmosphère d'azote

Les solutions à irradier ont été dégazées avec de l'azote Ultrapur à un débit d'environ 0,2 cm^3 par seconde pour une durée minimale de cinq minutes par millilitre de solution. Les tubes d'échantillons ont été immédiatement fermés sous atmosphère d'azote dans une boîte à gants. Les tubes ouverts, contenant les échantillons de poudres lyophilisées, ont été placés dans une boîte à gants où l'azote a été renouvelé trois fois, puis fermés.

6.3-Saturation en gaz des échantillons à irradier

Les données relatives à la pureté des gaz utilisés proviennent du fournisseur (Alphagaz):

- Argon N56 (N_2 : 0,5 ppmV, H_2O : 2 ppm V, CO + CO_2 : 0,1 ppm V, H_2 : 0,01 ppmV, O_2 : 0,5 ppm V, CnHm : 0,02 ppm V)

- Oxygène N48 (CO : 2ppm V, CH_4 : 0.2 ppm V, H_2 : 6 ppmV, Gaz rares : 8 ppm V)

- Protoxyde d'azote N40 (H_2O : 20 ppm V, CO : 4 ppm V, N_2 : 40 ppm V, O_2 : 20 ppm V, CnHm : 6 ppm V)

La saturation est atteinte à l'aide d'un système de récipients en verre, en pyrex ou en quartz, fermés avec des bouchons à jupes étanches, reliés en série par des tubes métalliques dans lesquels le gaz circule. Des échantillons, placés dans les récipients sous agitation permanente, sont soumis à un balayage par le gaz suffisamment longtemps pour atteindre la saturation. Dans nos conditions un minimum d'une heure était nécessaire. L'évaluation du temps requis pour atteindre cette saturation en gaz à débit fixe, pour un volume défini dans un contenant donné (avec agitation) a été réalisée en utilisant une solution, constituée de Méthyl Viologène (MV) (Sigma) 400 µM, de formiate 0,1 M et de phosphate de potassium 0,02 M (pH = 8,00). Cette dernière a été exposée à N_2O durant des temps croissants. Lorsque l'oxygène est absent du mélange, le radical stable $MV^{\bullet+}$ est produit avec un rendement de 6.2 x 10^{-7} mol J^{-1}.

7-DESCRIPTION DES SOURCES DE RAYONNEMENTS IONISANTS

7.1-Radiolyse gamma

7.1.1-Irradiateurs au Cobalt 60

Un Irradiateur Gammacell 220 (Atomic Energy of Canada Limited) situé à l'hôpital Sainte - Justine (Montréal, Canada) (Beauregard *et al.*, 1987) a été utilisé. Le débit de dose, compris entre 1 et 2 Gy s^{-1}, est déterminé par la position de l'échantillon dans la chambre de l'irradiateur et le facteur de décroissance de l'intensité de la source de ^{60}Co (qui est fonction du temps).

Un irradiateur gamma panoramique IL60PL (Cis Bio International, prototype 1991) situé au Laboratoire de Physico-Chimie du Rayonnement (Orsay, France) a aussi été employé. Les débits de dose pour chacune des positions étaient également compris entre 1 et 2 Gy s^{-1}.

7.1.2-Irradiateur au Césium 137

Un irradiateur à Césium 137 IBL 637 (Société Cis Bio International) situé à l'Institut Curie (Orsay, France) a été utilisé pour effectuer des vérifications isolées. Les débits de dose aux emplacements choisis pour les échantillons étaient compris entre 1,0 et 1,1 Gy s^{-1}

7.2-Radiolyse pulsée

Un accélérateur d'électrons (Accélérateur linéaire CGR-MeV) délivrant des impulsions d'électrons possédant une énergie de l'ordre de 4 à 5 MeV (Favaudon *et al.*, 1990) a été employé. Cet irradiateur est situé à l'Institut Curie (Orsay, France).

8-DOSIMETRIE

Les doses, exprimées en Gray, absorbées par un dosimètre (D_D) et un échantillon (D_E) qui ont été exposé au même champ de radiation sont reliées par l'équation suivante:

$$D_E = D_D \frac{\left(\mu_{en}/\rho\right)_E}{\left(\mu_{en}/\rho\right)_D} = D_D \frac{\sum_i \left[\left(\mu_{en}/\rho\right)\%\right]_E}{\sum_i \left[\left(\mu_{en}/\rho\right)\%\right]_D} \cong D_D \frac{\sum_i \left[\left(Z/mi\right)\%\right]_E}{\sum_i \left[\left(Z/mi\right)\%\right]_D} \cong D_D \zeta$$

où (μ_{en}/ρ) ($m^2\ kg^{-1}$) est le coefficient d'absorption d'énergie par unité de masse, Z est le numéro atomique, mi est la masse atomique et les pourcentages expriment la fraction massique de l'élément i par rapport à la masse totale du dosimètre ou de l'échantillon. Les coefficients d'absorption d'énergie par unité de masse pour plusieurs éléments, à une énergie de photon donnée sont retrouvés dans la littérature (Spinks et Woods, 1990; Evans, 1969; Hubbell, 1982; Brodsky, 1978). La dose absorbée par les échantillons correspond donc à celle donnée par le dosimètre multipliée par un facteur ζ. Ce dernier a une valeur très proche de 1 pour l'ensemble des conditions rencontrées dans ce travail.

8.1-Dosimétrie de Fricke

La vérification du débit de dose pour l'ensemble des irradiateurs gamma a été assurée par dosimétrie de Fricke (Spinks et Woods, 1990). Cette technique de dosimétrie chimique, consiste à irradier une solution de sulfate ferreux acide en présence d'oxygène. Pour ce faire, une solution de sel de Mohr (10^{-3} M d'ions ferreux) et d'acide sulfurique (0,4 M) saturée en air est irradiée. L'absorbance à 304 nm des solutions irradiées est soustraite de la valeur moyenne des valeurs d'absorbance de solutions non-irradiées. La variation d'absorbance (Δ A) ainsi obtenue permet d'évaluer la production de Fe^{3+}, dont le rendement (G ($Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$) = 1,618 x 10^{-6} mol J^{-1}) et le coefficient d'absorbtion molaire (ε) (ε_{304} = 2204 M^{-1} cm^{-1}) sont connus. La dose reçue (D) exprimée en Gy est calculée suivant la formule :

$D = (\Delta A/(l \times \varepsilon))/ G(Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+})$

Où l est le trajet optique exprimé en cm.

8.2-Dosimétrie au Méthyl Viologène

Cette technique de dosimétrie chimique, utilisée en radiolyse pulsée, consiste à mesurer la dose absorbée par le biais de la formation d'un radical stable (Mullazzani *et al.*, 1986). Plus précisément, il s'agit d'irradier une solution de Méthyl Viologène (Sigma) 400 µM, de formiate de sodium 0,1 M et de phosphate de potassium 0,02 M (pH=8,00) saturée en N_2O. Dans ces conditions les radicaux $CO_2^{\bullet-}$ formés ($G(CO_2^{\bullet-}) = 6{,}2 \times 10^{-7}$ mol J^{-1}), par le formiate et N_2O, réagissent avec le Méthyl Viologène (MV^{2+}) pour former le radical $MV^{\bullet+}$ stable. La concentration en $MV^{\bullet+}$ est alors mesurée par différence d'absorbance (Δ A) à 600 nm ($\varepsilon_{600} = 13700\ M^{-1}\ cm^{-1}$). La dose est obtenue suivant la formule :

$$D = (\Delta A/(l \times \varepsilon))/ G(MV^{\bullet+})$$

Où l est le trajet optique exprimé en cm.

9-CONTRÔLE DE LA TEMPERATURE LORS DE L'IRRADIATION

Une température de –78°C, lors de l'irradiation, a été obtenue à l'aide de carboglace. La constance des températures comprises entre 5°C et 43°C a été assurée en plaçant les échantillons dans un Dewar d'eau tempéré et en vérifiant fréquemment la température à l'aide d'un thermomètre gradué au demi-degré. La température ambiante de la chambre d'irradiation de l'irradiateur Gammacell, au moment des expériences, était de 36°C. En radiolyse pulsée, comme dans l'irradiateur au Césium 137, les échantillons ont été exposés aux rayonnements ionisants à température ambiante.

10-ELECTROPHORESE (SDS-PAGE)

Les appareils d'électrophorèse utilisés pour évaluer la pureté des échantillons et séparer les produits découlant de la fragmentation et de la dimérisation radio-induite des chaînes polypeptidiques étaient de marque BioRAD et ATTO. Les séparations des préparations de β-galactosidase ont été réalisées suivant la méthode décrite par Laemmli (1970) alors

que les séparations des solutions de lysozymes, d'α-lactalbumine et de citrate synthéthase ont été effectuées en employant la méthode de Schägger et von Jacow (1987). La densitométrie des gels colorés au Bleu de Coomassie R-250 a été faite à l'aide d'un appareil Ultroscan XL laser microdensitometer (LKB).

11-CHROMATOGRAPHIE LIQUIDE HAUTE PERFORMANCE (CLHP)

Un système Gold (Beckman) muni de deux pompes de type 126 et d'un détecteur à barrettes de diode de type 168 a été utilisé. Des colonnes de silice greffées C4 et C8 sont utilisées pour la séparation des protéines alors que des colonnes C18 sont choisies pour la séparation des peptides.

11.1-Séparation des protéines :

Les formes monomériques et dimériques des lysozymes ont été séparées grâce à une colonne Poros R1 (4 x 100 mm). Le gradient utilisé était de 35 à 60% de tampon B en 30 minutes pour un débit de 1,5 ml/min.

Tampon A : TFA 0,1%

Tampon B : acétonitrile 70% + TFA 0,1%

La détection a été faite à 214 nm, longueur d'onde d'absorption des liaisons peptidiques, et à 280 nm, où les résidus aromatiques absorbent principalement. L'équilibrage des phases dans la colonne a été réalisée par deux cycles, 100% de tampon B pendant 10 minutes puis de 100% de tampon A pendant 10 minutes, suivi de 20 minutes à 35% de tampon B. Les échantillons, d'environ 80 µg de protéines, ont été injectés.

11.2-Hydrolyse trypsique

11.2.1-Aminoéthylation et carboxyméthylation

Pour obtenir une meilleure digestion des chaînes du lysozyme par la trypsine, la réduction des ponts disulfure et l'alkylation des cystéines est nécessaire, les ponts disulfure rendant une partie importante de la protéine inaccessible aux enzymes protéolytiques. Les

échantillons de lysozyme natif et de lysozyme irradié ont donc été alkylés. Pour ce faire une solution contenant 6 M d'urée, 1 M de TRIS, 10 mM EDTA (pH = 8,6) et 20 µl/ml de 2-β-mercaptoéthanol ont été ajoutés aux échantillons. Après une heure d'incubation, 20 µl/ml d'éthylèneimine (Fluka) (aminoéthylation) ou 20 µg/ml d'iodoacétamide (Fluka, recrystallisé dans l'éthanol et l'éther de pétrole) (carboxyméthylation) ont été additionnés, les tubes sont incubés à l'obscurité sous azote durant 40 minutes. A nouveau, 20 µl/ml de 2-β-mercaptoéthanol étaient ajoutés pour éliminer l'éthylèneimine ou l'iodoacétamide excédentaire. Les échantillons protéiques sont ensuite dessalés par CLHP de phase inversée puis séchés (Speed Vac SAVANT).

11.2.2-Digestion

Les préparations ont été hydrolysées par la trypsine. Celle-ci coupe les liaisons peptidiques dans lesquelles se trouve engagé le groupe carboxyle des résidus lysine, arginine et cystéine modifiées par l'éthylèneimine. Les échantillons alkylés (0,5 à 3,0 mg) ont été dissous dans 150 µl d'eau pure. On y ajoute 150 µl d'une solution de NH_4HCO_3 (100 mg/ml) et environ 3% en masse de trypsine (Worthington) par rapport à la protéine qui doit être digérée. La trypsine provient de la solution suivante: trypsine 1 mg/ml, HCl 0,005 N, $CaCl_2$ 2 mM. La digestion est effectuée durant la nuit à une température d'environ 30°C.

11.3-Séparation des peptides

Les hydrolysats trypsiques (environ 0,5 mg) sont séparés sur une colonne Ultrasphere ODS 5 µm (4,6 x 150 mm) par CLHP en phase inversée, avec un gradient eau/acétonitrile (0 à 10% tampon B en 5 minutes, 10 à 35% en 30 min, 35 à 45% en 20 minutes et 45 à 100% tampon B en 5 minutes). Le débit a été fixé à 1,0 ml/min. L'équilibrage des phases de la colonne ayant été réalisée par deux cycles, 100% de tampon B pendant 15 minutes puis de 100% de tampon A pendant 15 minutes, suivi de 30 minutes à 100% de tampon A. La détection des peptides a été assurée par absorptiométrie à 214 nm, et suivie en parallèle à 280 ou 315 nm. Les fragments récoltés manuellement ont ensuite été séchés dans un appareil Speed Vac.

Les fractions contenant plusieurs peptides ont été séparés de nouveau sur une colonne PEP PR1 (7,5 x 75 mm) (Du Pont) avec un gradient linéaire de 0 à 100% de tampon B en 60 minutes (débit de 1,0 ml/min) après avoir pris soin de bien équilibrer la colonne. Le même traitement a été fait sur les peptides trypsiques provenant d'échantillons de lysozyme natif et de purifications de lysozyme dimérisé par exposition au rayonnement ionisant.

11.4-Détermination de la composition en acides aminés

La composition en acide aminés des peptides trypsiques, pour le lysozyme de blanc d'œuf de poule, a été déterminée. Chaque peptide isolé a été repris dans 200 µl d'acide chlorhydrique 6 N contenant 0,009% de phénol (ce dernier protège les résidus tyrosine) puis hydrolysé 20 heures à 110°C dans des tubes scellés sous vide. L'hydrolysat est ensuite séché, repris dans 200 µl de tampon d'analyse pH = 2,2 et centrifugé avant d'être déposé sur l'analyseur.

12-CHROMATOGRAPHIE EN PERMEATION DE GEL (CPG)

12.1-Préparation des échantillons

Le lysozyme de poule (2,0 mg/ml, tampon phosphate de potassium 10 mM, pH = 7,0) irradié sous atmosphère d'azote en présence de 0,1 M d'azoture de sodium, contenant au moins 10% de dimère estimé par densitométrie de gels d'électrophorèse, a été précipité avec du sulfate d'ammonium (50% saturation) sans ajustement du pH. Le précipité, dans lequel se trouve le produit dimérisé, a été dissous dans le tampon de séparation pour être séparé par CPG suivant les poids moléculaires. Cette stratégie a été développée par essais parallèles, à différents pourcentages de sulfate d'ammonium et ajustements du pH, pour maximiser le dépôt de dimère tout en maintenant une proportion forte de monomère dans la solution de sulfate d'ammonium. La précipitation avec $SO_4(NH_4)_2$ à permis d'augmenter la concentration en dimère qui sera ensuite séparée par chromatographie CPG.

12.2-Séparation des protéines

L'appareillage utilisé est constitué d'une pompe péristaltique (LKB Microperpex), d'une colonne ainsi que d'un collecteur de fraction (LKB Bromma 2070 Ultrarac II). Les chromatographies sont effectuées à la chambre froide (Tampon : 0,2 M Na_2SO_4 et 0,1 M NaH_2PO_4, pH = 6,5 avec 0,005% de saponine), à l'aide de colonnes constituées soit de gel TSK Toyopearl (HW40S et HW50S) ou d'Ultrogel ACA 54, permettant la séparation de poids moléculaires dans la gamme de masse voulue. Généralement, l'augmentation de la longueur de la colonne permet d'obtenir une meilleure séparation. Dans le cadre de ce travail des colonnes de 2 à 3 x 50 à 90 cm ont été utilisées. L'identification des protéines retrouvées dans chacune des fractions après séparation, a été assurée par gel d'électrophorèse (voir le paragraphe 10) et par CLHP sur Poros R1 (voir la section 11).

13-SEQUENCAGE PROTEIQUE

Des séquenceurs en phase gaz Applied Biosystems 470 A (INSERM U350 (Institut Curie)) et 473 (IBCP, UPR U412) du C. N. R. S., associée à l'Université Lyon I) ont été utilisés selon les recommandations du constructeur. Les séquences ont été obtenues par dégradation d'Edman (Edman et Begg, 1967; Edman et Henschen, 1975) à la suite d'électrotransfert sur membrane Immobilon-P (Millipore Corporation, Bedford, MA) (Matsudaira, 1987) ou directement sur les peptides trypsiques purifiés par CLHP.

14-SPECTROMETRIE DE MASSE

Nous avons eu recourt à un système MALDI TOF fabriqué à l'Institut de Physique Nucléaire (Orsay, France) ainsi qu'à un Système commercial de marque Elite Voyageur (Perkin Elmer) pour déterminer les masses moléculaires de peptides.

Les échantillons irradiés ont été dissous dans l'urée 6 M, et réduits par addition de 2% de 2-β-mercaptoéthanol à la température de la pièce pendant la nuit. Ceux-ci ont ensuite été dessalés par CLHP en phase inversée, lyophilisés puis congelés. Les polypeptides ainsi

traités ont été dissous dans une solution de 0,001% TFA de façon à obtenir une concentration finale comprise entre 1 x 10^{-3} et 1 x 10^{-4} M, après incorporation à une matrice α-CYANO (rapport solution / matrice, v/v, 1 : 4). Ils ont ensuite été analysés.

15-DETERMINATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DE LA β-GALACTOSIDASE

Les dosages d'activité enzymatique ont été réalisés par fluorimétrie en utilisant le 4-méthylumbelliferyl-β-D-galactopyranoside comme substrat (Beauregard *et al.*, 1987). Pour que les valeurs obtenues par fluorimétrie, à l'aide d'un appareil Perkin-Elmer, soient situées dans la plage de variation linéaire en fonction de la concentration de 4-méthylumbelliferone, la quantité produite par la réaction enzymatique ne doit pas excéder 6 nmol/ml (déterminé par une solution standard). De plus, la fluorescence de la solution témoin ne doit pas dépasser 10% des valeurs à obtenir. Une dilution des solutions d'enzyme irradiées, qui permet aux lectures d'être comprises dans l'intervalle de variation linéaire, est en général de 1 dans 2000. Le milieu de réaction, où les proportions volumiques des constituants sont : 43,75% de tampon phosphate de sodium (0,1 M pH = 7,7), 50% de solution de substrat 4 méthylumbelliféryl-β-D-galactoside (1,32 mM) + NaCl (0,2 M) et 6,25% de solution d'enzyme diluée, est placé à 37°C pour 10 minutes. La réaction est arrêtée par l'addition de 500% de tampon glycine (glycine 0,133 M, NaCl 0,06 M, Na_2CO_3 anhydre 0,083 M et NaOH 3 N (pH = 10,7)). La valeur du blanc est soustraite de chacune des valeurs de fluorescence obtenues (excitation à 365 nm et émission à 450 nm), puis les concentrations de produit formé sont calculées.

16-DOSAGE ET DETERMINATION DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE DU LYZOZYME

Le spectromètre utilisé était soit un modèle Cary 3E UV-Visible de Varian ou un modèle DU-70 de Beckman.

16.1-Vérification de la concentration

La concentration des échantillons de lysozyme de blanc d'œuf de poule a été vérifiée par mesure de l'absorbance (A) à 278 nm (ε_{278} = 37900 $M^{-1}cm^{-1}$).

Concentration = A/l x ε

Où l est le trajet optique exprimé en cm

16.2-Détermination de l'activité enzymatique

La méthode est basée sur la mesure de la diminution de l'absorbance d'une suspension de *Micrococuss lysodeikticus* sous l'action du lysozyme. Après avoir déterminé l'intervalle de concentration en lysozyme où l'activité enzymatique varie linéairement avec l'absorbance (typiquement entre 100 et 200 µg/ml), les solutions de lysozyme à analyser ont été diluées, dans les proportions convenables, avec un tampon phosphate de sodium (1/15 M pH = 6,2). La solution fraîchement préparée est ajoutée, à raison de 5%, à une suspension de substrat (*Micrococuss lysodeikticus*, 0,25 mg/ml) dans le même tampon. La diminution de l'absorbance à 650 nm (ou à 450 nm) a été suivie à la température de la pièce. (Shugar, 1952; Jollès *et al.*,1965 et Canfield, 1963)

17-FLUORIMETRIE

Un appareil Fluorolog 111 de la société Spex et un appareil SFM 25 de Kontron Instruments ont été employés pour l'ensemble des mesures qui ont servi à caractériser les modifications induites par radiolyse.

Partie IV

Résultats et discussion

IV-Résultats et discussion

Les rayonnements ionisants affectent les structures primaire, secondaire et tertiaire des protéines. Ces modifications engendrent, entre autres, l'inactivation des enzymes, la fragmentation de chaînes polypeptidiques et la liaison de deux ou plusieurs molécules protéiques entre elles. Plusieurs facteurs sont appelés à influencer la quantité ainsi que la nature des dommages qui sont induits à l'intérieur des protéines.

Parmi les paramètres qui affectent les modifications de la structure protéique, les effets occasionnés par l'état de phase du solvant (eau liquide ou glace) seront évalués. Un affinement, obtenu par sélection des conditions d'irradiation, permettra de dévoiler l'implication d'entités radicalaires, d'identifier quelques produits ainsi que de mettre en relief certains mécanismes sous-jacents.

Section A

Radiolyse des protéines en solutions aqueuses liquide et congelée

Pour évaluer l'effet de l'état (liquide ou solide) de l'eau sur les modifications radio-induites dans les protéines, la β-galactosidase de *Escherichia Coli* (0,8 mg/ml ($1,7 \times 10^{-6}$ M) en solution dans un tampon phosphate de potassium 10 mM, pH = 8,0) a été irradiée sous atmosphère d'azote à 36°C ainsi qu'à –78°C. L'azote a été utilisé pour évacuer l'oxygène. Les échantillons ont ensuite été séparés en deux fractions. Les produits de l'une ont été analysés en SDS-PAGE. La disparition de la quantité de monomère présente dans la bande correspondant à celui de la protéine native a été évaluée par densitométrie. La seconde fraction a permis de mesurer l'activité enzymatique résiduelle. Rappelons que la dose absorbée par les solutions aqueuses diluées est équivalente à celle qui est donnée par dosimétrie de Fricke (voir III-8).

Les résultats de l'analyse densitométrique, présentés dans la Figure IV-1, montrent qu'il existe une différence marquée dans l'ampleur des modifications protéiques en réponse aux phénomènes radiolytiques suivant l'état, liquide ou solide, du solvant. En effet, les courbes de diminution de la quantité de chaînes polypeptidiques intactes montrent incontestablement une diminution beaucoup plus marquée, en fonction de la dose, en solution aqueuse liquide qu'en solution aqueuse gelée. Cette tendance est en accord avec les rendements en radicaux libres issus de la radiolyse de H_2O. Puisque ces rendements dans la glace sont inférieurs à ceux existant dans l'eau liquide, un effet moindre de la dose est attendu à –78°C. Le rendement G ($-H_2O$) à 20°C est évalué à 0,4 μmol J^{-1} alors qu'il est de 0,1 μmol J^{-1} à –78°C (Spinks et Woods, 1990).

A.1- IDENTIFICATION DE PRODUITS RADIOLYTIQUES

Les clivages dans les chaînes polypeptidiques qui composent la β-galactosidase se traduisent par l'apparition, en SDS-PAGE, de bandes de masses moléculaires inférieures à celle d'une sous-unité native (116 kDa). Cette fragmentation peut s'effectuer d'une manière aléatoire ou spécifique. Dans le cas d'une fragmentation aléatoire une multitude de fragments de tailles différentes sont produits. Ceux-ci constituent alors un nuage le long du gel. La présence d'un nuage n'est pas synonyme de coupures aléatoires car le pouvoir de résolution ne permet pas de mettre en évidence un très grand nombre de

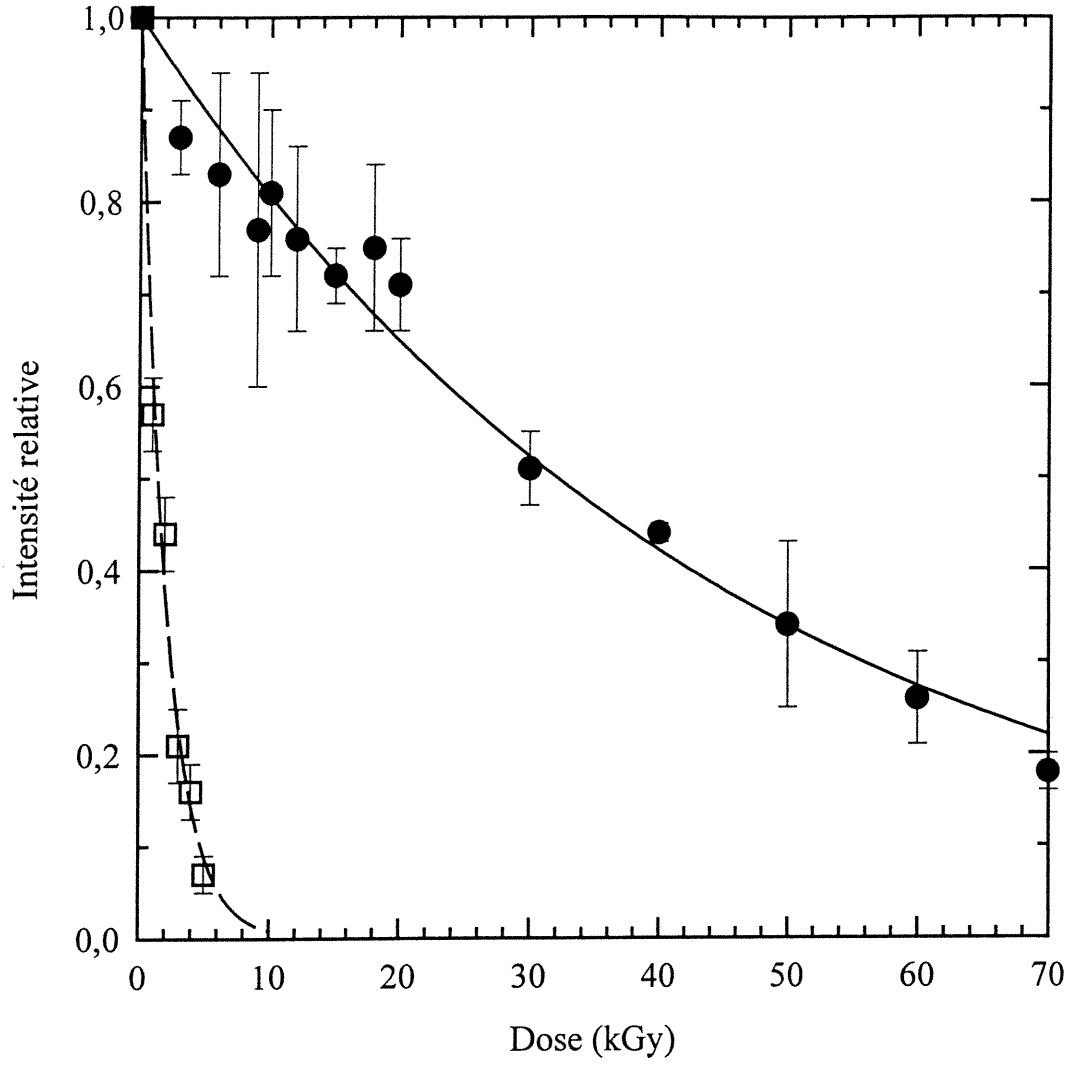


Figure IV-1

Effet de l'état de phase du solvant:
Disparition, en fonction de la dose, de l'intensité relative de la bande correspondant à la masse moléculaire du protomère natif séparé par SDS-PAGE

- • *Irradiation à -78°C*
- □ *Irradiation à 36°C*

Les données proviennent de solutions de β-galactosidase (1,7 x 10^{-6} M, tampon phosphate de potassium 10 mM, pH = 8,0) irradiées sous atmosphère d'azote (I ≅ 1 Gy s^{-1}). Les barres d'erreur sont calculées à partir de plusieurs déterminations. Chaque point à fait l'objet d'au moins trois mesures.

fragments spécifiques. Par contre, lorsqu'un nombre restreint de liens spécifiques sont coupés préférentiellement, des bandes résolues peuvent être distinguées.

Quelle que soit la température lors de l'irradiation, la β-galactosidase présente des sites privilégiés de cassure (Figure IV-2 et Potier *et al.*, 1991). La présence de fragments définis montre que les coupures ne s'effectuent pas obligatoirement au site radicalaire initial. Il pourrait, par exemple, y avoir migration d'électrons le long des chaînes polypeptidiques ou, à certains endroits, recombinaison trou-électron.

Sous irradiation à 36°C, en plus d'être fragmentées, les chaînes polypeptidiques s'associent entre elles. Les liens nouvellement formés, ne sont pas des ponts disulfure. En effet, l'agrégation est observée par séparation des produits radiolytiques en conditions réductrices. Dans ces conditions, les chaînes polypeptidiques réunies par des ponts disulfure sont libérées et migrent selon leurs masses moléculaires respectives.

Une proportion importante des modifications de chaînes polypeptidiques, dans les solutions aqueuses à l'état congelé, résulte de la fragmentation (Figure IV-2 A). En phase liquide, nous observons en plus de la fragmentation, une quantité considérable de polymérisation (Figure IV-2 B). La polymérisation, qui ne se produit pas à –78°C et qui est un processus très efficace à 36°C, met en évidence l'existence de différents mécanismes radiolytiques suivant l'état, liquide ou solide, de l'eau.

A.2-DETERMINATION DES RENDEMENTS RADIOLYTIQUES

La fraction des molécules protéiques dont les chaînes polypeptidiques sont intactes ou la fraction d'activité enzymatique résiduelle a été portée sur graphique en fonction de la dose. Une loi exponentielle, fraction = $\exp^{-mDose}$, lisse les données expérimentales. Cette fonction mathématique ne peut être interprétée chimiquement mais elle permet de déduire les rendements initiaux (G (-I) et G (-A), mol J^{-1}). Par définition, le rendement initial est égal à la valeur de la pente de la tangente à l'origine (m, kg J^{-1}) multipliée par la concentration protéique (c, mol kg^{-1}), soit G = m x c.

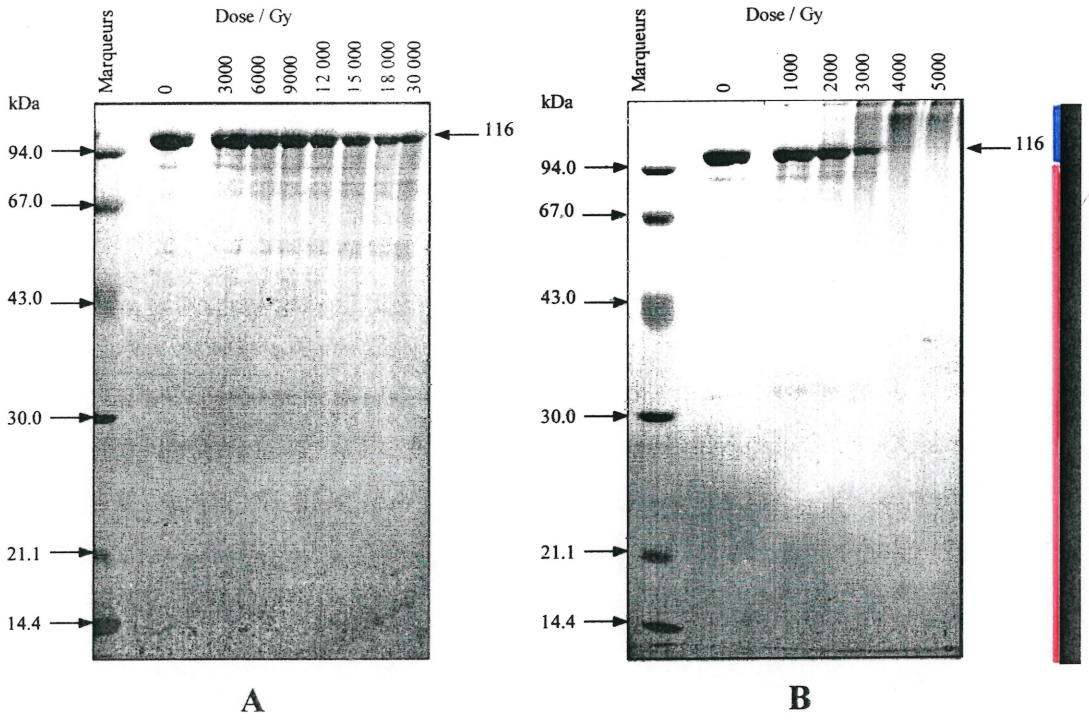


Figure IV-2

Effet de l'état de phase du solvant:
Séparation, par SDS-PAGE, des produits radiolytiques de la β-galactosidase irradiée à doses croissantes

A *Irradiation à –78 °C*
B *Irradiation à 36 °C*

Les images proviennent de séparations par SDS-PAGE réalisées en conditions réductrices. Des solutions de β-galactosidase ($1,7 \times 10^{-6}$ M, tampon phosphate de potassium 10 mM, pH = 8,0) ont été irradiées sous atmosphère d'azote durant des temps croissants ($I \cong 1$ Gy s^{-1}). Les zones sur les gels, où sont retrouvés les fragments et les agrégats, sont indiquées en rouge et en bleu respectivement.

Les rendements de diminution de l'intensité relative de la bande correspondant à la protéine native sur gel d'électrophorèse G (-I) et de l'activité enzymatique relative G (-A), en fonction de la dose, témoignent d'une différence marquée entre la chimie qui suit l'ionisation dans les solutions aqueuses liquide et congelée (Tableau IV-I). Pour une dose égale, les protéines sont plus modifiées à 36°C qu'à -78°C. La comparaison des valeurs de G (-I) et G (-A), pour une même température, laisse également transparaître des différences profondes entre les phénomènes qui se produisent dans les solutions à l'état liquide et solide. A basse température, les rendements de perte d'intensité et d'inactivation sont identiques. A température plus élevée, le rendement d'inactivation surpasse considérablement le rendement de perte d'intégrité de la chaîne polypeptidique.

A.3-COMPARAISON DES RESULTATS OBTENUS EN SOLUTIONS DILUEES ET SOUS FORME DE POUDRES LYOPHILISEES

Pour se faire une idée de l'importance du rôle de la quantité d'eau présente, à –78°C et à 36°C, nous avons comparés les rendements G (-I) et G (-A) obtenus après irradiation de solutions diluées et de poudre lyophilisées. Des échantillons de β-galactosidase ont donc été mis en solution à raison de 0,8 mg/ml ($1,7 \times 10^{-6}$ M) dans un tampon phosphate de potassium 100 mM, pH = 8,0. Une nouvelle série d'échantillons, cette fois lyophilisés, a été préparée. Toutes les préparations ont été exposées au rayonnement ionisant sous atmosphère d'azote.

La proportion d'eau, considérablement diminuée, et la proportion de sel ayant fortement augmentée font en sorte que la notion de solvant doit être abandonnée après lyophilisation. Il ne faut cependant pas perdre de vue que l'eau de constitution est toujours présente. La fraction aqueuse, contenue dans les échantillons, varie avec la protéine ainsi qu'avec le tampon utilisé et n'a pas été quantifiée pour ces analyses.

En se référant à l'équation mathématique $D_E = D_D\zeta$ (détaillée en III-8), la dose qui est mesurée par dosimétrie de Ficke est proche de celle qui est absorbée par les échantillons

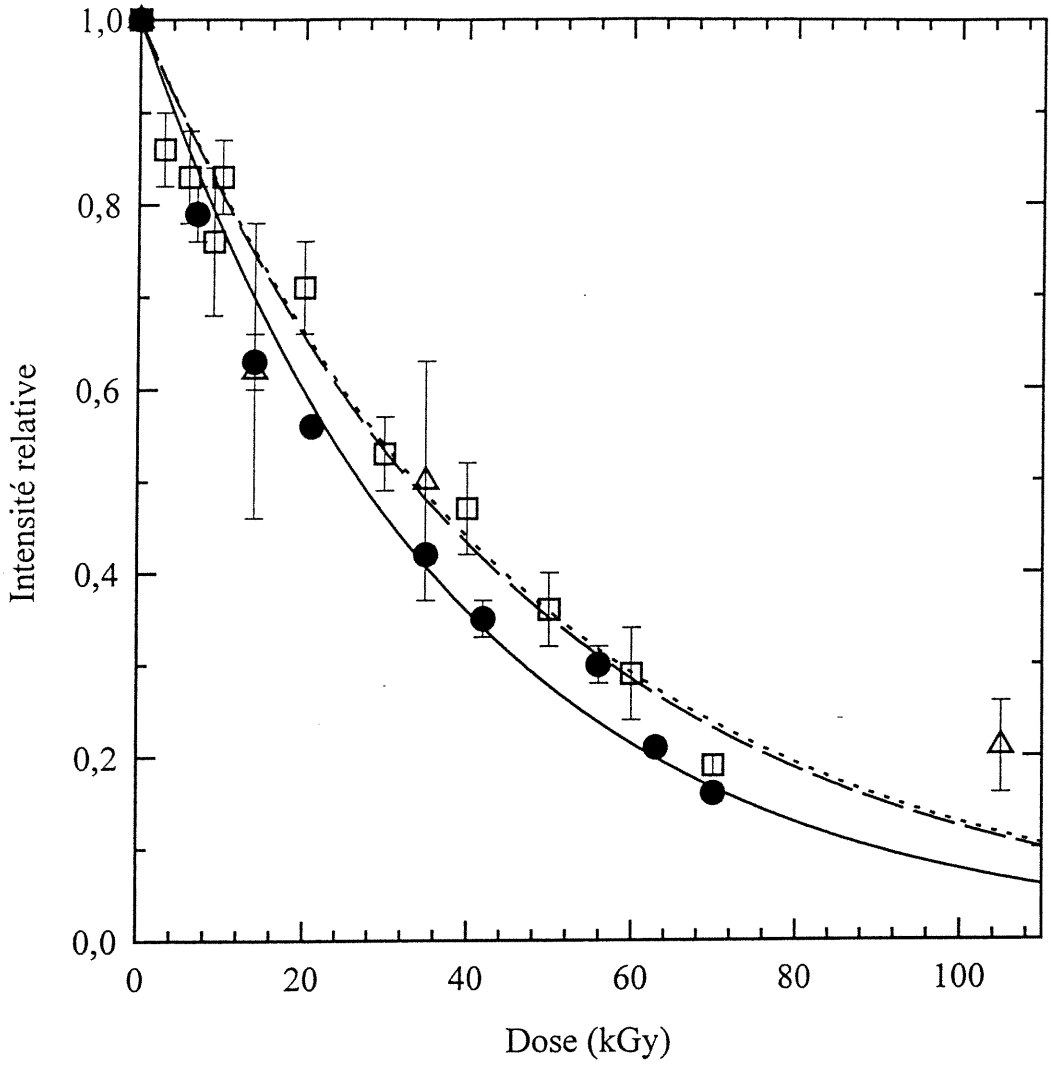


Figure IV-3

Influence de la proportion d'eau à –78°C:
Diminution, avec la dose, de la quantité de protomère de masse moléculaire très proche de celle retrouvée dans la protéine native évaluée par SDS-PAGE

□ *Échantillons dilués*
• *Échantillons lyophilisés*
Δ *Échantillons lyophilisés (Tris utilisé comme tampon)*

Les données sont obtenues à partir d'échantillons de β-galactosidase irradiés sous atmosphère d'azote à –78°C ($I \cong 1$ Gy s^{-1}). Les solutions de départ présentent une concentration protéique de $1,7 \times 10^{-6}$ M dont le pH est fixé à 8,0 soit par du tampon phosphate de potassium 100 mM, soit par du Tris 20 mM. Les barres d'erreur sont calculées à partir de plusieurs déterminations. Chaque point à fait l'objet d'au moins trois mesures.

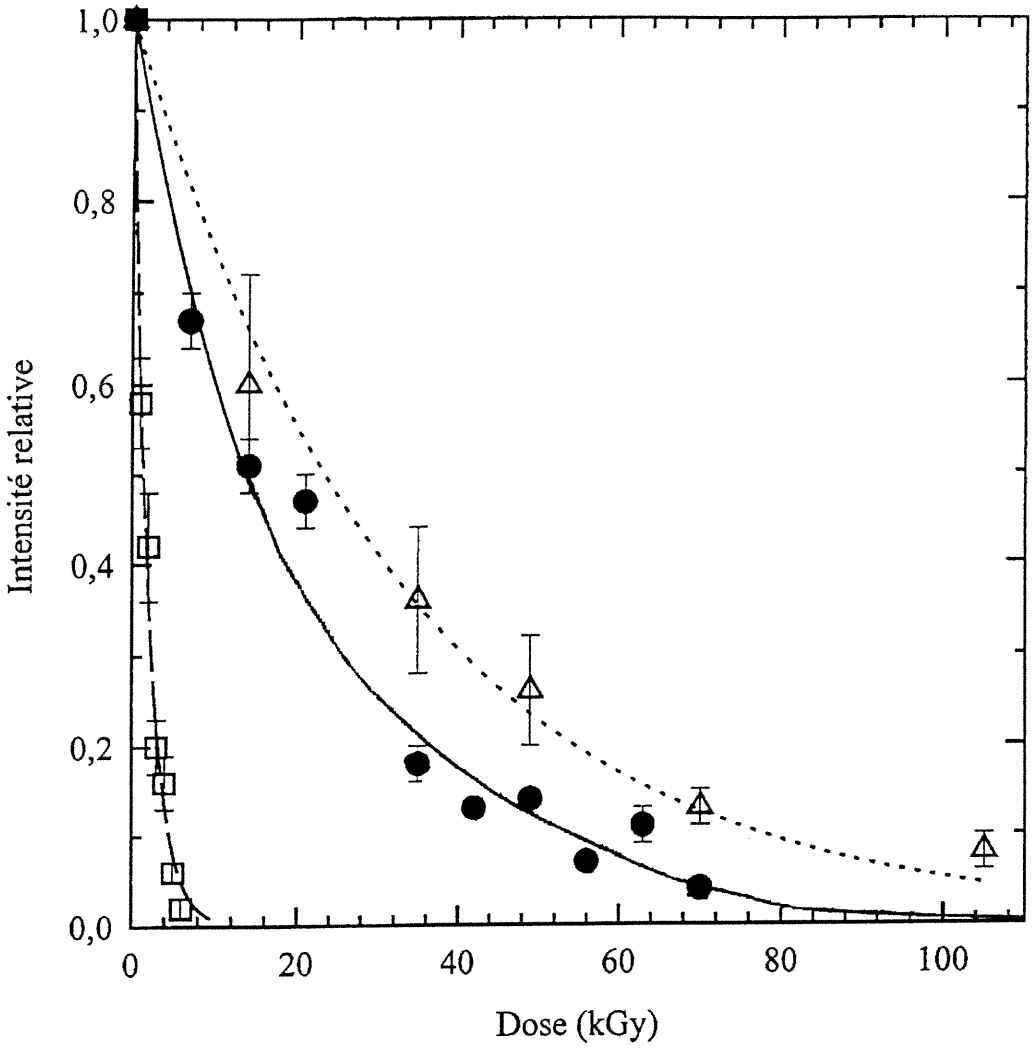


Figure IV-4

Influence de la proportion d'eau à 36°C:
Diminution, avec la dose, de la quantité de protomère de masse moléculaire très proche de celle retrouvée dans la protéine native évaluée par SDS-PAGE

- ▫ *Échantillons dilués*
- • *Échantillons lyophilisés*
- Δ *Échantillons lyophilisés (Tris utilisé comme tampon)*

Les données sont obtenues à partir d'échantillons de β-galactosidase irradiés sous atmosphère d'azote à 36°C ($I \cong 1$ Gy s^{-1}). Les solutions de départ présentent une concentration protéique de $1,7 \times 10^{-6}$ M dont le pH est fixé à 8,0 soit par du tampon phosphate de potassium 100 mM, soit par du Tris 20 mM. Les barres d'erreur sont calculées à partir de plusieurs déterminations. Chaque point à fait l'objet d'au moins trois mesures.

TABLEAU IV-I

Effet de l'état de phase du solvant:
Rendements de diminution de l'intensité relative de la bande correspondant à la masse moléculaire des sous-unités natives, évalués par SDS-PAGE, (G (-I)) et de diminution de l'activité biologique relative (G (-A))
Les échantillons de β-galactosidase (1,7 x10^{-6} M, tampon phosphate de potassium 10 mM, pH = 8,0) ont été irradiés, à 36 °C et à -78 °C, sous atmosphère d'azote (I ≅ 1 Gy s^{-1}).

Température (°C)	G (-I) (mol J^{-1})	G (-A) (mol J^{-1})
-78	(1,49 ± 0,06) x 10^{-10}	(1,31 ± 0,26) x 10^{-10}
36	(33,4 ± 1,8) x 10^{-10}	(92,0 ± 8,6) x 10^{-10}

TABLEAU IV-II

Influence de la proportion d'eau:
Rendements initiaux de diminution de l'intensité relative de la bande correspondant à la masse moléculaire des sous-unités natives, évalués par SDS-PAGE, (G (-I)) et de diminution de l'activité biologique relative (G (-A))
Les données sont calculées à partir d'échantillons de β-galactosidase irradiés sous atmosphère d'azote à –78°C et 36°C (I ≅ 1 Gy s^{-1}). Les solutions de départ présentent une concentration protéique de 1,7 x 10^{-6} M dont le pH est fixé à 8,0 soit par du tampon phosphate de potassium 100 mM, soit par du Tris 20 mM.

Conditions	G (-I) (mol J^{-1})	G (-A) (mol J^{-1})
-78°C		
Solution diluée	(1,44 ± 0,07) x 10^{-10}	(1,33 ± 0,30) x 10^{-10}
Poudre lyophilisée	(1,77 ± 0,08) x 10^{-10}	N.D.
Poudre lyophilisée (Tris)	(1,42 ± 0,27) x 10^{-10}	(0,92 ± 0,01) x 10^{-10}
36°C		
Solution diluée	(34,4 ± 0,20) x 10^{-10}	(92,5 ± 8,5) x 10^{-10}
Poudre lyophilisée	(6,38 ± 0,08) x 10^{-10}	N.D.
Poudre lyophilisée (Tris)	(2,04 ± 0,11) x 10^{-10}	(5,56 ± 0,32) x 10^{-10}

autant diluées que concentrés. En effet, dans la β-galactosidase $\zeta = 0,97$ et dans les sels constituant les tampons la valeur de ζ ne descend pas sous 0,95. L'eau ne pouvant que contribuer à l'augmentation de ζ, les faibles corrections à apporter aux doses ont été négligées.

Les données expérimentales recueillies à basse température sont reportées dans la Figure IV-3. Elles montrent une augmentation à peine perceptible de la sensibilité aux rayonnements ionisants lorsque les échantillons sont sous forme de poudre lyophilisée par rapport aux solutions congelées (voir Tableau IV-II). La même tendance est obtenue pour les mesures d'activité biologique (résultats non présentés).

A partir des courbes de la Figure IV-4, il apparaît qu'à 36°C la quantité d'eau présente influence les mécanismes de la radiolyse des protéines. En effet, en préparation lyophilisée, la diminution de l'intensité relative de la bande de 116 kDa en fonction de la dose est freinée par rapport à celle observée en solution. L'ordre de grandeur des rendements (G (-I) et G (-A)) s'approche alors de celui qui est observé à –78°C.

A.4-EFFET DE CAPTEURS

Des solutions de β-galactosidase (0,8 mg/ml ($1,7 \times 10^{-6}$ M), tampon phosphate de potassium 10 mM, pH = 8,0) auxquelles des quantités croissantes de $NaNO_3$ ou de Tris(hydroxyméthyl)aminométhane sont ajoutées, ont été dégazées, scellées sous atmosphère d'azote puis irradiées pendant des temps croissants. Les échantillons obtenus ont été séparés par SDS-PAGE puis l'intensité relative de la bande correspondant à la protéine native a été évaluée en fonction de la dose reçue. Une autre fraction des échantillons irradiés a été utilisée pour déterminer l'activité biologique.

A.4.1-Effet des ions nitrate: Capture de l'électron

A -78°C, les fonctions qui lissent les courbes, sans $NaNO_3$ et en présence de 1000 molécules de $NaNO_3$ par protomère protéique (Figure IV-5), sont significativement

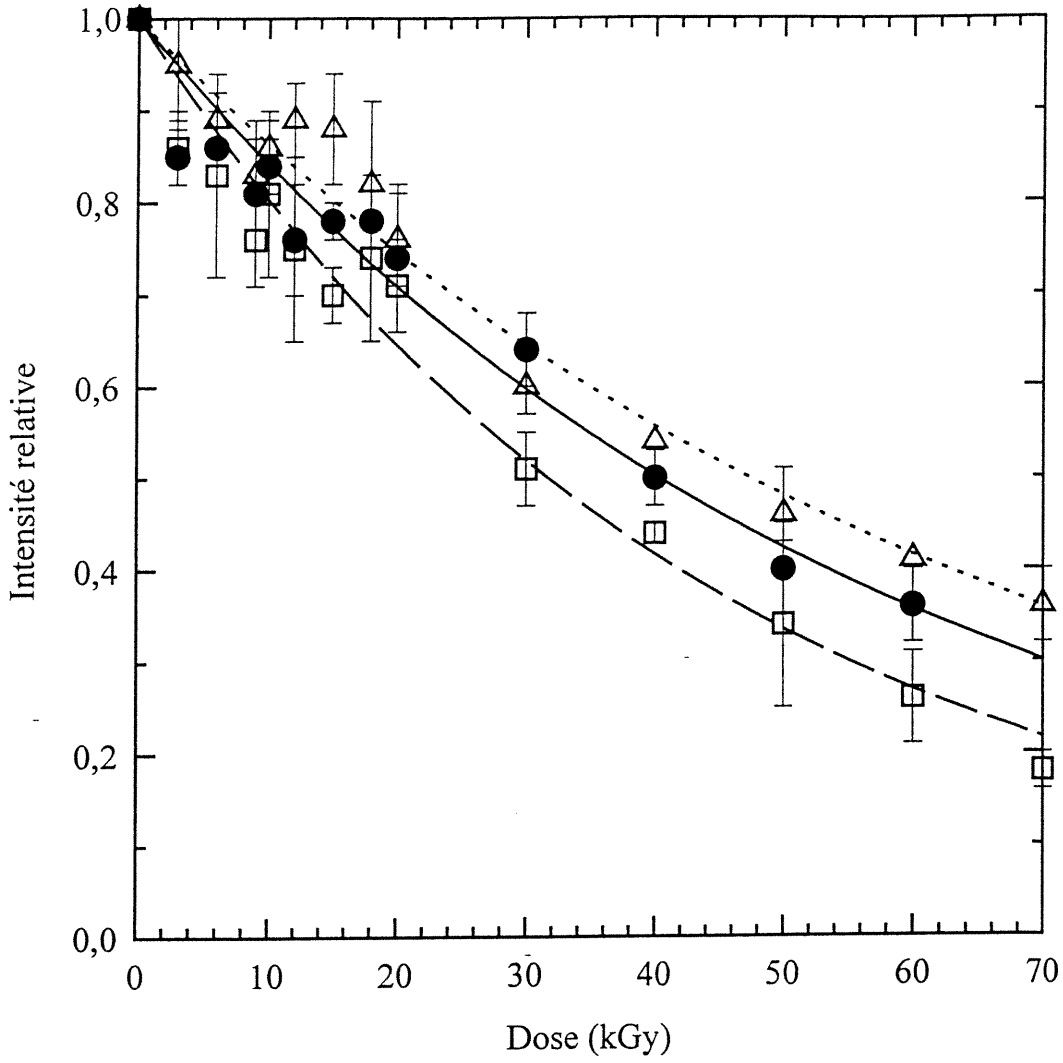


Figure IV-5

Effet de la capture de l'électron par NO_3^-:
Disparition de la bande correspondant au monomère natif en SDS-PAGE, à -78 °C, suivant la dose

- ▫ *Tampon phosphate*
- Δ *Tampon phosphate + $NaNO_3$ (1000 : 1)*
- • *Tampon phosphate + $NaNO_3$ (1 : 1)*

Les quantités croissantes de $NaNO_3$ sont exprimées sous forme de rapports (nombre de molécules de capteur : pour une molécule de monomère).
Les échantillons de β-galactosidase ($1{,}7 \times 10^{-6}$ M, tampon phosphate de potassium 10 mM, pH = 8,0) auxquels des quantités croissantes de $NaNO_3$ ont été ajoutées ont été irradiés sous atmosphère d'azote ($I \cong 1$ Gy s^{-1}). Les barres d'erreur sont calculées à partir de plusieurs déterminations. Chaque point à fait l'objet d'au moins trois mesures.

TABLEAU IV-III

Effet de la capture de l'électron par NO_3^-:Rendements initiaux à –78 et à 36°C

G (-I) :Rendement de diminution de l'intensité relative de la bande correspondant à la masse du monomère natif évalué par SDS-PAGE.
G (-A) :Rendement de diminution de l'activité biologique résiduelle.

L'ensemble des échantillons de β-galactosidase ($1,7 \times 10^{-6}$ M, tampon phosphate de potassium 10 mM, pH = 8,0) ont été irradiés sous atmosphère d'azote à 36°C et à -78°C ($I \cong 1$ Gy s^{-1}). Les quantités de capteurs ajoutées sont exprimées sous forme de rapport (nombre de molécules de capteur : pour une molécule de monomère).

Conditions	G (-I) (mol J^{-1})	G (-A) (mol J^{-1})
-78°C		
Tampon phosphate	$(1,51 \pm 0,06) \times 10^{-10}$	$(1,52 \pm 0,40) \times 10^{-10}$
+ $NaNO_3$ (1 : 1)	$(1,18 \pm 0,06) \times 10^{-10}$	$(2,79 \pm 0,18) \times 10^{-10}$
+ $NaNO_3$ (1000 : 1)	$(1,01 \pm 0.04) \times 10^{-10}$	$(3,59 \pm 0,31) \times 10^{-10}$
36°C		
Tampon phosphate	$(3,84 \pm 0,37) \times 10^{-9}$	$(8,80 \pm 0,20) \times 10^{-9}$
+ $NaNO_3$ (1 : 1)	$(3,96 \pm 0,10) \times 10^{-9}$	$(10,3 \pm 0,6) \times 10^{-9}$
+ $NaNO_3$ (1000 : 1)	$(4,50 \pm 0,33) \times 10^{-9}$	$(31,8 \pm 2,0) \times 10^{-9}$

différentes. La présence, en quantité suffisante, de ce capteur d'électron pré-solvaté conduit à une très faible réduction de la fragmentation radio-induite. Ce résultat montre la contribution de l'électron dans le processus de fragmentation.

Par contre, dans l'eau liquide, des rendements G (-I) similaires ont été obtenus avec et sans NO_3^- (voir Tableau IV-III). Compte tenu des erreurs expérimentales, nous n'avons pas noté de différence statistiquement significative entre ces derniers. En admettant que $NO_2^\bullet$ ne réagit pas avec la chaîne polypeptidique (Cudic, *et al.*, soumis pour publication), ce résultat montre que ce n'est pas l'électron hydraté qui entraîne la majeure partie de la perte observée par association inter-chaînes et par fragmentation à 36°C.

Il est admis que les électrons peuvent être à l'origine de dommages de la chaîne polypeptidique menant à la fragmentation suite à l'irradiation en solution congelée. Contrairement à ce qui est attendu, l'augmentation de la concentration en $NaNO_3$ entraîne une augmentation du rendement d'inactivation à –78°C comme à 36°C (voir Tableau IV-III). Vraisemblablement, le radical $NO_2^\bullet$ réagit avec des résidus clés du site actif. Des réactions de nitration ont d'ailleurs déjà été mises en évidence, en milieu aqueux liquide, avec les résidus tyrosine ($k \cong 3 \times 10^7\ M^{-1}\ s^{-1}$) (Prütz *et al.*, 1985) et avec le tryptophane ($k \cong 5 \times 10^5\ M^{-1}\ s^{-1}$) (Alfassi, 1987).

A.4.2-Effet du Tris(hydroxyméthyl)aminométhane: Capture du radical hydroxyle.

Il est évident, en consultant le Tableau IV-IV, que l'ensemble des rendements obtenus à basse température (-78°C), en présence et en absence de Tris, sont voisins. $HO^\bullet$ n'est donc pas déterminant pour la perte d'intégrité de la chaîne polypeptidique. Dans les solutions congelées, la présence de Tris n'a pas affecté la décroissance de l'activité biologique suivant la dose reçue. Ce résultat confirme un bon nombre d'informations précédentes qui montrent que le radical hydroxyle est très peu, voire aucunement, impliqué dans les modifications structurales qui sont mesurées à –78°C. Les propriétés de la glace peuvent contribuer à empêcher sa diffusion (Simic, 1978).

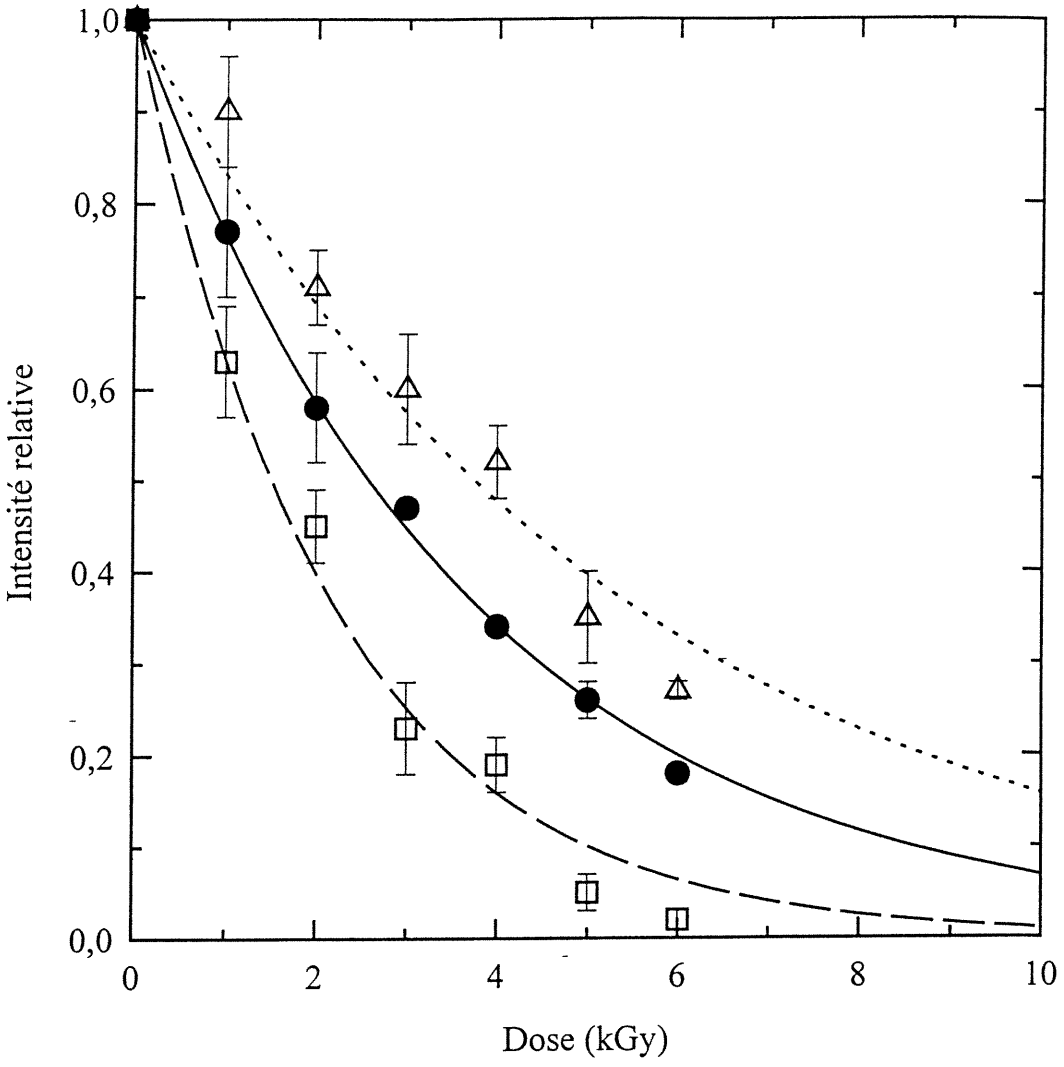


Figure IV-6

Effet de la capture des radicaux hydroxyle par le Tris:
Disparition de la bande correspondant au monomère natif en SDS-PAGE, à 36 °C, en fonction de la dose

- ▫ *Tampon phosphate*
- Δ *Tampon phosphate + Tris (1000 : 1)*
- • *Tampon phosphate + Tris (1 : 1)*

Les quantités croissantes de Tris sont exprimées sous forme de rapports (nombre de molécules de capteur : nombre de molécules de monomère).
Les échantillons de β-galactosidase ($1{,}7 \times 10^{-6}$ M, tampon phosphate de potassium 10 mM, pH = 8,0), auxquels des quantités croissantes de Tris ont été ajoutées, ont été irradiés sous atmosphère d'azote ($I \cong 1$ Gy s^{-1}). Les barres d'erreur sont calculées à partir de plusieurs déterminations. Chaque point à fait l'objet d'au moins trois mesures.

TABLEAU IV-IV

Effet de la capture des radicaux hydroxyle par le Tris: Rendements initiaux à –78°C et à 36°C

G (-I) : Rendement de diminution de l'intensité relative de la bande correspondant à la masse du monomère natif évalué par SDS-PAGE.
G (-A) : Rendement de diminution de l'activité biologique résiduelle

L'ensemble des échantillons de β-galactosidase ($1,7 \times 10^{-6}$ M, tampon phosphate de potassium 10 mM, pH = 8,0) ont été irradiés sous atmosphère d'azote à 36 °C et à -78 °C ($I \cong 1$ Gy s^{-1}). Les quantités de capteurs ajoutées sont exprimées sous forme de rapport (nombre de molécules de capteur : pour une molécule de monomère).

Conditions	G (-I) (mol J^{-1})	G (-A) (mol J^{-1})
-78°C		
Tampon phosphate	$(1,28 \pm 0,12) \times 10^{-10}$	$(1,25 \pm 0,16) \times 10^{-10}$
+ Tris (5 : 1)	$(1,16 \pm 0,08) \times 10^{-10}$	ND
+ Tris (1000 : 1)	$(1,05 \pm 0,04) \times 10^{-10}$	$(1,16 \pm 0,07) \times 10^{-10}$
36°C		
Tampon phosphate	$(3,17 \pm 0,17) \times 10^{-9}$	$(14,8 \pm 2,5) \times 10^{-9}$
+ Tris (5 : 1)	$(1,85 \pm 0,30) \times 10^{-9}$	ND
+ Tris (1000 : 1)	$(1,28 \pm 0,08) \times 10^{-9}$	$(7,40 \pm 0,73) \times 10^{-9}$

La Figure IV-6 permet de visualiser l'effet du Tris à 36°C. La présence de Tris entraîne une diminution de G (-I). De même G (-A) diminue. Ce complément d'information nous renseigne sur le rôle de premier plan tenu par le radical hydroxyle dans l'induction de modifications radio-induites en solution aqueuse liquide (Boguta et Dancewicz, 1983). Toutefois, la protection conférée par le Tris n'est pas totale car il ne les supprime pas.

Il est intéressant également de souligner que dans l'eau liquide, en présence de quantités importantes de Tris (soit environ 0,1 M), l'agrégation peut être supprimée (résultats non montrés). Les mêmes fragments spécifiques qu'en solution congelé sont alors retrouvés. Ainsi, l'agrégation que nous observons par SDS-PAGE en condition réductrice serait un phénomène relié à l'oxydation.

A.5-SYNTHESE DES DIFFERENCES OBSERVEES DANS LES PROCESSUS RADIO-INDUITS A –78°C ET A 36°C

Plusieurs différences, qui ont trait aux produits de radiolyse des protéines ainsi qu'à leurs rendements de formation, existent selon que l'irradiation s'effectue en solution aqueuse à l'état liquide ou congelé. Soulignons, entre autres, que dans la glace la fragmentation constitue le principal moteur de la perte de protéine. Des coupures de chaînes polypeptidiques pourraient être induites par des électrons, comme le laisse supposer la protection conférée par les ions nitrate. Lorsque les protéines sont irradiées en solution aqueuse liquide, G (-I) est dû en partie à la fragmentation et en partie à la polymérisation de molécules protéiques entre elles. Une partie importante de ces réarrangements serait causée par les radicaux hydroxyle, comme le laisse entendre la diminution de la sensibilité au rayonnement ionisant conférée par la présence de Tris. Les phénomènes de fragmentation, dans les deux phases, privilégient certains sites de coupure dans la chaîne polypeptidique.

En solution liquide diluée, on sait que les effets indirects représentent la plus grande partie des interactions radio-induites avec les protéines. Le fait que G (-I) et G (-A) soient

moins élevés lorsque les protéines sont irradiées sous forme de poudre lyophilisée montre le rôle joué par l'eau liquide (Tableau IV-II).

L'implication des radicaux hydroxyle dans les mécanismes d'agrégation et de fragmentation est connue et indéniable (Garrison, 1987). La capture des radicaux hydroxyle par le Tris confère une protection qui contribue à la diminution de G (-I) et G (-A). Puisque le radical hydroxyle réagit aussi avec les chaînes latérales d'acides aminés, il n'est pas surprenant que la valeur de G (-A) soit supérieure à celle de G (-I). Certains protomères non fragmentés ni polymérisés ne sont donc plus actifs. Nous pouvons considérer comme raisonnable que certaines modifications dans les chaînes latérales d'acides aminés du site actif, qui se trouve à l'interface entre les sous-unités ou qui sont importantes pour le maintien de la structure tridimensionnelle, contribuent à accentuer l'impact du rayonnement ionisant sur la perte d'activité biologique (Simic, 1978 ; le Maire *et al.*, 1990; Houée-Levin, 1994).

Lorsque les rendements G (-I) et G (-A) sont confrontés à g ($HO^{\bullet}$), nous réalisons que seule une petite fraction (bien inférieure à 10 %) des radicaux hydroxyle provoquent l'inactivation. Il faut encore la diviser pour obtenir la proportion de ceux-ci qui conduit à la fragmentation et à l'agrégation. Ainsi, seule une partie des réactions du radical hydroxyle conduit à des altérations de la chaîne polypeptidique ou à des réarrangements structuraux qui influencent la fonction biologique.

Il est intéressant de souligner que les rendements G (-I) et G (-A) pour les protéines lyophilisées, soumises au rayonnement, se rapprochent de ceux qui sont observés en solution congelée. Nous pouvons donc nous interroger sur le rôle de la radiolyse de l'eau à l'état solide. En solution congelée, les effets indirects semblent minimisés. Dans ces conditions, nous pensons que l'effet direct pourrait être déterminant.

Certains auteurs ont d'ailleurs suggéré qu'en milieu gelé les effets indirects sont négligeables. Les effets directs constitueraient la voie principale par laquelle s'effectuent les modifications protéiques (voir par exemple Kempner, 1993). En solutions diluées

congelées, les dépôts d'énergie dans la masse des échantillons s'effectuent, en grande partie, au niveau des molécules d'eau. Pour chaque événement, des produits capables de diffuser sont créés. Cependant, à basse température leurs vitesses de diffusion sont considérablement réduites à cause de la viscosité du milieu. De plus, l'abaissement de la température tend à réduire les vitesses des réactions chimiques. Ces faits sont en faveur d'une réduction de l'importance des effets indirects.

Pour ajouter de la crédibilité à l'hypothèse de la dominance de l'effet direct, le retrait d'une quantité importante d'eau n'affecte pas les rendements G (-I) et G (-A) à –78°C. L'égalité des rendements G (-I) et G (-A), lorsque les irradiations de protéines sont faites soit sous la forme de poudres lyophilisées soit sous la forme de solutions gelées, peut constituer un argument en faveur de l'hypothèse énoncée. En effet, chaque dépôt d'énergie, de l'ordre de 40 à 100 eV (Farataziz et Rodger, 1987) est suffisant pour induire plusieurs coupures de liaisons inter-atomiques dans les chaînes latérales et polypeptidiques. Un protomère cible a donc toutes les chances d'être à la fois fragmenté et inactivé (Kepner et Macey, 1968).

Mis à part l'explication fournie par l'exclusion des effets indirects, deux hypothèses peuvent être proposées pour expliquer l'équivalence observée. L'une par laquelle la fragmentation de la chaîne polypeptidique entraîne, pour la β-galactosidase, la perte de l'activité biologique. La perte d'activité serait alors restreinte à la sous-unité fragmentée. D'autre part, les chaînes sectionnées peuvent posséder une capacité de catalyse réduite. Dans cette hypothèse, la perte d'activité biologique est liée à la fois à la fragmentation et à d'autres modifications dans les chaînes latérales de certains acides aminés. La concordance des rendements (G (-I) et G (-A)), que nous observons, serait alors une coïncidence.

Les expériences de capture d'électrons par les ions nitrate, en solution aqueuse congelée, indiquent leur implication dans des mécanismes de fragmentation. L'observation d'un faible effet protecteur des ions nitrate peut signifier, par exemple, que les électrons secondaires sont responsables d'un certain nombre de coupures au niveau de la chaîne

polypeptidique. Cependant, les ions nitrate peuvent servir de puits pour des charges négatives qui sont générées dans les protéines de façon directe. A la lumière des résultats présentés jusqu'ici, bien que nous ne puissions pas formellement rejeter la contribution des effets indirects dans les mécanismes de fragmentation, nous suggérons la dominance des effets directs.

Section B

Fragmentation radio-induite en solution congelée: Rôle de la structure protéique

Il est acquis que les structures primaire, secondaire et tertiaire d'une protéine influencent la fragmentation radio-induite (Potier *et al*, 1995). Tout changement conformationnel notable peut donc se traduire par des différences dans les sites et les rendements de fragmentation et être accompagné par une nouvelle distribution des fragments.

B.1-EFFET DE LA COMPACITE ET DE LA CONFORMATION

Pour évaluer l'importance et l'influence de certains paramètres structuraux, nous avons choisi d'irradier des solutions d'α-lactalbumine ($1{,}40 \times 10^{-4}$ M) et de citrate synthase ($2{,}15 \times 10^{-5}$ M, 0,1 M Tris-HCl, pH = 8,0) dans différents états conformationnels. L'α-lactalbumine mise en solution dans l'eau adopte une forme pseudo-native*. Dans l'eau avec une valeur nominale de pH ajusté à 2,0, à l'aide d'une solution diluée d'acide chlorhydrique, elle se présente sous la forme globulaire fondue. Enfin, sa structure tertiaire est complètement dénaturée dans une solution d'urée 8 M, 0,1 M Tris-HCl, pH = 7,0 (Kuwajima, 1989). La citrate synthase a été irradiée seule (conformation ouverte) puis, dans sa forme fermée, soit en présence de substrat (oxaloacétate, 3 mM) (Remington *et al.*, 1982; Wiegand *et al.*, 1984). Ces solutions de protéines, placées sous atmosphère d'azote puis congelées rapidement en utilisant un bain carboglace / acétone, ont été soumises au rayonnement ionisant à –78°C. Les doses absorbées par les échantillons sont voisines de celles données par dosimétrie de Fricke. En effet les valeurs de ζ , dans l'expression $D_E = D_D\zeta$ (détaillée en III-8), sont comprises entre 0,98 et 1,00.

*Le terme "pseudo-native" est utilisé pour souligner que la force ionique n'est pas la même dans l'eau que dans le milieu physiologique.

B.1.1-Effet de la compacité de l'α-lactalbumine

Les données recueillies après l'analyse des phénomènes reliés à la fragmentation de l'α-lactalbumine dans différents états conformationnels: forme native, globulaire fondue et dénaturée ont été rassemblées. A partir de courbes de diminution de l'intensité relative de la bande correspondant à la masse de la chaîne polypeptidique complète, en fonction de la dose, nous avons constaté que la protéine est moins

sensible à la fragmentation dans sa forme native que dans la forme globulaire fondue. La forme dénaturée est celle qui, des trois, présente la plus grande susceptibilité à la fragmentation. Le calcul des rendements de disparition de la protéine par fragmentation (G (-I)) en est le reflet (Tableau IV-V).

L'irradiation des différentes formes de l'α-lactalbumine a aussi contribué à vérifier qu'une protéine dénaturée est fragmentée à une multitude de sites le long de la chaîne polypeptidique (résultats non présentés). Sans organisation structurale définie, les cassures se produisent à un très grand nombre d'endroits. Nous observons alors un nuage sur gel d'électrophorèse réalisé en conditions réductrices.

B.1.2-Modifications conformationnelles de la citrate synthase liée à la présence du substrat

La citrate synthase a été irradiée dans ses conformations ouverte (dans un tampon Tris) et fermée (liée à son substrat). La présence du substrat provoque une diminution significative de la sensibilité à la fragmentation en fonction de la dose. Les rendements traduisent donc un effet de protection contre la fragmentation conféré par l'adoption d'une structure plus compacte (Tableau IV-V).

La distribution, suivant leurs masses, des fragments radiolytiques séparés par électrophorèse est appelée empreinte. L'irradiation de la citrate synthase, dans ces formes ouverte et fermée, donne la même empreinte. Elle présente cependant une variation de l'intensité relative de certains fragments (résultats non présentés). Cette observation a donc permis de confirmer que l'efficacité de coupure peut être influencée par la structure tridimensionnelle des protéines.

B.1.3-Résultats complémentaires

Des études cristallographiques ont établi que le lysozyme lié à un substrat (chitine : poly-N-acétylglucosamine) (Diamond, 1974, Bernstein *et al.*,1967 et Abola *et al.*, 1987) ou à un inhibiteur (chitotriose : N,N',N''-triacéthylglucosamine) (Radmacher *et al.*, 1994) a une conformation très proche de celle du lysozyme natif. Sous toutes ses formes, le lysozyme présente la même vitesse de disparition de la bande correspondant à la protéine native par séparation en SDS-PAGE. En effet, dans des conditions où la

TABLEAU IV-V

Compilation des rendements initiaux de perte d'intensité de la bande correspondant à la protéine native, en SDS-PAGE, en solution congelée

Les masses moléculaires protéiques sont inclues ainsi que les rayons (évalués suivant: $r = (3M/4\bar{V}\pi)^{1/3}$ où M est la masse d'une protéine et $\bar{V}$ est son volume partiel spécifique).

Protéine (forme)	**Masse (kDa)**	**r (nm)**	**G (-I) (mol J^{-1})**
β–Galactosidase (native)	464	5,3	$(1,49 \pm 0,06) \times 10^{-10}$
α-Lactalbumine (native)	14	1,4	$(7,36 \pm 0,49) \times 10^{-10}$
α -Lactalbumine (globulaire fondue)	14	---	$(11,4 \pm 0,18) \times 10^{-10}$
α -Lactalbumine (dénaturée)	14	---	$(16,6 \pm 0,23) \times 10^{-10}$
Citrate synthase (fermée)	93	2,6	$(4,71 \pm 0,26) \times 10^{-10}$
Citrate synthase (ouverte)	93	---	$(5,50 \pm 0,26) \times 10^{-10}$

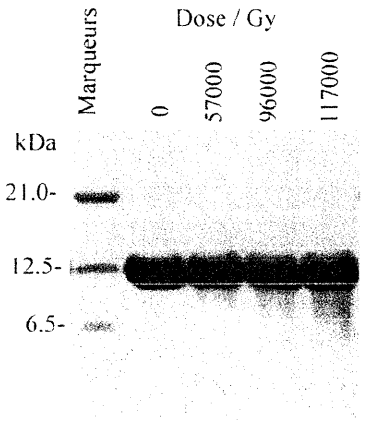


Figure IV-7

Séparation, en SDS-PAGE, d'échantillons de lysozyme dénaturé irradiés à doses croissantes

L'image provient de séparations en SDS-PAGE réalisées en conditions réductrices. Le lysozyme ($1,4 \times 10^{-4}$ M, dans l'urée 8 M, Tris-HCl 0,1 M, pH = 7,0) a été irradié sous atmosphère d'azote ($I \cong 1$ Gy s^{-1}).

structure tertiaire est préservée, la sensibilité à la fragmentation ne change pas. Cette étude s'est donc avérée être un bon contrôle négatif. Elle permet de supposer que la présence d'oxaloacétate complexé à la citrate synthase n'affecte pas significativement les rendements de fragmentation.

La même empreinte fragmentaire a été obtenue après irradiation de lysozyme seul, complexé avec la chitine ou avec le chitotriose (résultats non publiés obtenus par Xiang Chen). Comme pour les autres protéines étudiées, les fragments de radiolyse du lysozyme complètement dénaturé par l'urée, ne peuvent être distingués en SDS-PAGE (Figure IV-7). Il semble donc que l'accessibilité des sites au solvant puisse avoir une importance dans les mécanismes qui conduisent à la fragmentation.

Les mutations génétiques ponctuelles, qui causent une substitution d'un acide aminé par un autre dans la chaîne polypeptidique d'une protéine, peuvent induire des changements conformationnels. Dans l'α-galactosidase, la mutation Arg(301)→Gln est responsable de l'absence d'activité enzymatique de cet enzyme dans les tissus des patients atteints de la maladie de Fabry (Eng, 1993). L'enzyme mutée est plus sensible au rayonnement ionisant que l'enzyme native. Cette mutation pourrait donc faire en sorte que la protéine soit plus ouverte (Potier *et al.*, 1995).

B.1.4-Interprétation des rendements de fragmentation sur la base de paramètres conformationnels

Des résultats obtenus (Tableau IV-V) nous remarquons que la structure d'une protéine a un impact sur le rendement de disparition de la protéine par fragmentation. Nous observons que, pour une protéine donnée, plus la surface d'accessibilité au solvant est grande, plus la protéine est sensible au rayonnement ionisant.

Il peut être intéressant de rechercher une corrélation entre les rendements obtenus et certains paramètres géométriques dont la surface. Avant tout, nous voulons souligner que la masse moléculaire ne peut expliquer les changements de G (-I) qui ont été observés. Les résultats discutés précédemment stipulent que pour une protéine donnée, donc une masse moléculaire fixe, les rendements G (-I) ne sont pas constants lorsqu'une protéine adopte une conformation plus ouverte.

Les valeurs de G (-I) sont disponibles pour la β-galactosidase, la citrate synthase et l'α-lactalbumine dans leurs formes natives en solution congelée (Tableau IV-V). Selon nos données, la β-galactosidase, qui est la protéine la plus grosse, présente le plus petit rendement de fragmentation alors que l'α-lactalbumine, qui est la protéine la plus petite, affiche le rendement le plus élevé. Ces rendements peuvent-ils être réconciliés avec un effet de surface, comme semblent l'indiquer les rendements calculés pour une même protéine dans diverses formes?

D'abord, nous avons vu que la quantité d'eau présente ne semble pas affecter les rendements G (-I) (voir section A). Dans l'hypothèse de protéines assimilables à des sphères, en supposant que le volume partiel spécifique ($\bar{\nu}$) des protéines est constant (1,3 g / cm^3) (Tanford, 1961), la masse (M) est proportionnelle au volume (V).

$M = \bar{\nu} \times V = \bar{\nu} \times (4/3)\, \pi\, r^3$; alors $r^3 = M \times 3/(4\bar{\nu}\pi)$

où r est le rayon
La relation entre la masse, proportionnelle au volume, et la surface (S) est donc:

$S \propto M^{2/3}$; puisque $S = 4\pi r^2$; alors $r^2 = (M \times (3/(4\bar{\nu}\pi))^{2/3}$

Ainsi, si G (-I) est proportionnel à la surface, il est aussi proportionnel à $M^{2/3}$.

Pour une protéine native, la surface exposée au solvant augmente avec la masse protéique. L'augmentation de G (-I), lorsque la surface diminue, est donc difficile à expliquer. D'autant plus que G (-I) augmente quand une protéine adopte une conformation plus ouverte. La surface d'accessibilité au solvant ne peut, à elle seule, expliquer les rendements obtenus.

En explorant les résultats sur la base de rapports surface / volume (qui sont inversement proportionnels au rayon), nous obtenons une corrélation linéaire avec G (-I) (Figure IV-8). Nous pouvons alors poser l'hypothèse suivante: l'effet direct du rayonnement à l'intérieur de la protéine, loin de la surface, aboutit à une recombinaison radicalaire. Il ne mène pas à la fragmentation. Dans ce cas, nous

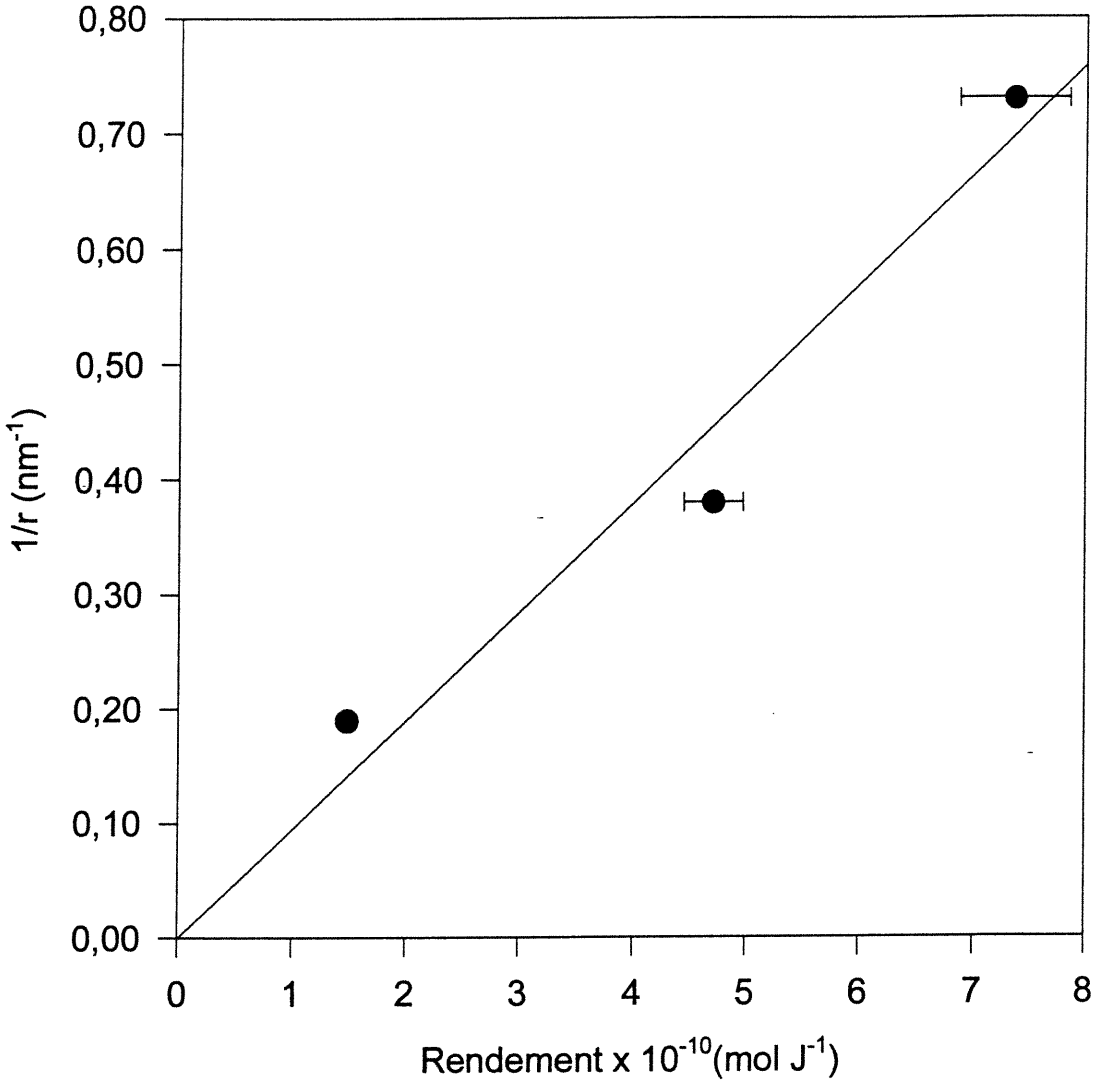


Figure IV-8

Relation entre le rapport Surface/Volume et les rendements G (-I)

La régression linéaire du rapport surface/volume, qui est proportionnelle à l'inverse du rayon, en fonction des rendements G (-I) présente un coefficient de corrélation de 0,95. Les données sources des rayons et les valeurs de G (-I) proviennent du Tableau IV-V: α-lactalbumine, citrate synthase et β-galactosidase dans leurs formes natives. Le rayon considéré est celui de la sphère compacte, sans inclusion d'eau, qui a la même masse moléculaire et le même volume partiel spécifique que les protéines.

devons observer que le rendement de fragmentation augmente lorsque le rayon diminue. C'est effectivement ce que l'on observe. Si, en revanche, les effets directs à l'intérieur de la protéine sont suivis en grande partie d'une migration du site radicalaire vers la surface, nous devrions observer que G (-I) augmente avec la masse, ce qui n'est pas le cas. Les résultats indiquent donc que la surface est bien le siège des interactions primaires menant aux coupures. On peut alors supposer que la fragmentation, induite par l'interaction directe du rayonnement avec les protéines, est assistée par des molécules d'eau. Dans cette hypothèse, plus nombreux sont les sites en contact avec des molécules d'eau, plus la probabilité que l'un d'entre eux conduise à une cassure dans la chaîne polypeptidique est importante. Nous ne pouvons pas expliquer les résultats obtenus sur la base d'effets indirects en négligeant l'effet direct.

B.2-DETERMINATION DES SITES DE FRAGMENTATION SPECIFIQUES DU LYSOZYME DE BLANC D'OEUF DE POULE.

Considérant l'ensemble des résultats obtenus, il ne fait aucun doute que la structure tertiaire est déterminante pour la fragmentation. Elle contribue, entre autres, à moduler le G (-I) et oriente les sites de cassure. Il est donc justifié d'identifier la position des sites de fragmentation à l'intérieur d'une protéine afin d'en établir la relation avec la conformation.

Les sites de fragmentation dépendent-ils réellement de l'accessibilité au solvant? Une étude ayant pour objectif de préciser les endroits, dans la séquence, ou s'effectuent les coupures a été conduite pour mieux cerner les mécanismes protéolytiques en termes de propriétés locales. Des échantillons de lysozyme de blanc d'œuf de poule (3,5 x 10^{-5} M, tampon Tris 20 mM pH = 8,0, sous atmosphère d'azote) rapidement congelés, dans un bain de carboglace et d'acétone, ont été soumis au rayonnement gamma. La température lors de l'irradiation a été maintenue à –78°C. Les échantillons ont été soumis à une électrophorèse, pour évaluer les masses moléculaires des fragments. Les séquences N-terminales des fragments ont été déterminées, après séparation par électrophorèse et transfert sur membrane, par séquençage direct. La séparation des fragments par CLHP en phase inversée, sur une colonne Vydac C18 avec un gradient eau / acétonitrile, a permis de procéder à l'analyse de la composition en acides aminés

et aussi d'avoir accès à la masse, par spectrométrie de masse, de chacun. Les résultats qui seront présentés dans les sections B.2.1 et B.2.2 sont le fruit d'un travail collectif (Filali-Mouhin *et al*, 1997).

B.2.1-Sites révélés par séquençage Edman, composition en acides aminés et spectrométrie de masse

Les sites précis de clivage qui ont été révélés par séquençage Edman, d'après la composition en acides aminés et par spectrométrie de masse figurent dans la liste suivante.

Site	Elément de structure	
Asp 48↓Gly49	(boucle)	
Asp52↓Tyr53	(feuillet β)	
Asp101↓Gly102	(boucle)	
Ser24↓Leu25	(à l'interface entre une boucle et une hélice α)	
Ser36↓Asn37	(boucle)	
Thr47↓Asp48	(boucle)	
Ala82↓Leu83	(hélice α)	
Asn103↓Gly104	(retour de chaîne)	
Arg112↓Asn113	(boucle)	
Gly126↓Cys127	(retour de chaîne)	(± un acide aminé)

B.2.2-Emplacements présumés de certains sites par analyse des masses obtenues par spectrométrie de masse

La position probable de certains sites, pour lesquels seule la spectrométrie de masse a été réalisée, a été établie par comparaison des masses moléculaires obtenues par spectrométrie et celles attendues pour l'hydrolyse des liens peptidiques. Ces derniers sont retrouvés dans la liste qui suit.

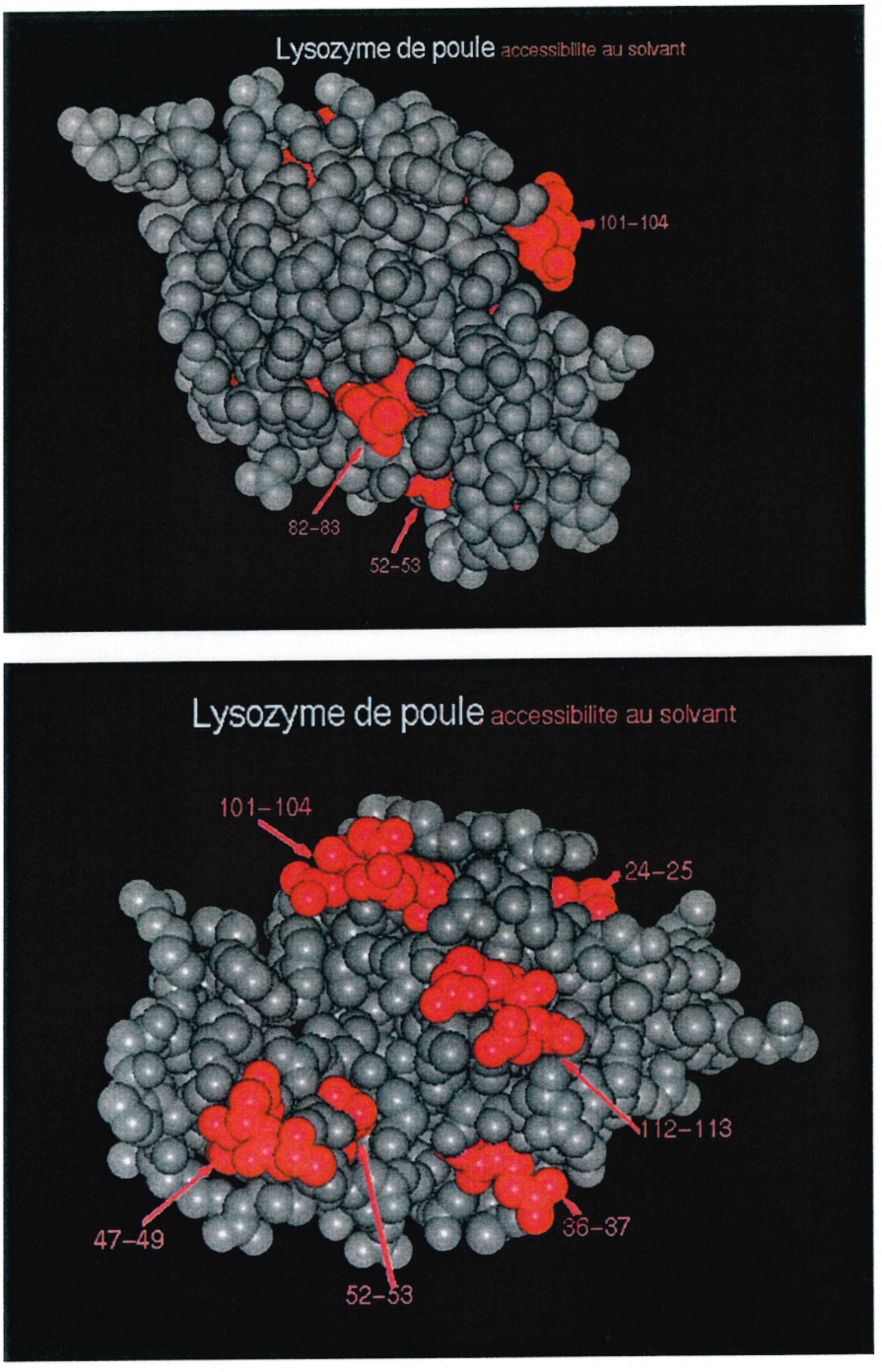


Figure IV-9

Emplacement des résidus flanquant les sites de fragmentation qui ont été localisés avec précision
Les échantillons de lysozyme de blanc d'œuf de poule ($3,5 \times 10^{-5}$ M, tampon Tris 20 mM pH = 8,0) ont été irradiés sous atmosphère d'azote à –78°C ($I \cong 1$ Gy s^{-1}). Deux angles de vue sont présentées pour permettre de visualiser l'ensemble des sites.

Site	Elément de structure
Tyr23⇓Ser24	(à l'interface entre un retour de chaîne et une boucle)
Asn27⇓Trp28	(hélice α)

B.2.3-Discussion de la localisation des sites de fragmentation sur la base de paramètres structuraux

L'examen des sites de fragmentation localisés avec précision dans le lysozyme et dans la citrate synthétase (résultats non-publiés: Asp59 – Pro60 localisé dans un retour de chaîne) montre que fréquemment le lien peptidique (CO-NH) lui-même semble être le site de radiolyse. Pour tirer ce genre de conclusion, il faut néanmoins supposer, que les chaînes latérales demeurent intactes. Les techniques d'analyse pour le calcul des masses ne permettent pas de tenir compte des autres coupures. Ainsi, les clivages aux positions 36-37, 103-104, 82-83 et 112-113 se produiraient au niveau du lien peptidique. Les résultats indiquent aussi que la majorité des coupures sont localisées dans les boucles et les retours de chaînes, beaucoup moins souvent dans les hélices α et très peu dans les feuillets β. Par contre, toutes celles qui sont connues avec précision sont situées à la surface des protéines dans des régions accessibles au solvant (Figure IV-9). L'ensemble des résultats obtenus jusqu'à maintenant indiquent que la fragmentation radio-induite est un phénomène de surface.

Nous remarquons que l'acide aspartique ou l'asparagine flanque fréquemment le site de clivage. Peut-être pouvons-nous tracer un parallèle entre le clivage par hydrolyse acide qui prend place d'un côté ou de l'autre des résidus d'acide aspartique (Tsung and Fraenkel-Conrat, 1965) et le processus de fragmentation étudié. Dans des milieux acides, lorsque des peptides sont chauffés, il n'est pas rare d'assister aussi à l'hydrolyse des groupes amide. Ainsi, les résidus asparagine sont partiellement désamidés et peuvent être clivés à leur tour (Allen, 1989).

Section C

Processus oxydatifs en solution liquide

Le travail précédent montre que la fragmentation ainsi que la polymérisation de chaînes polypeptidiques entre elles figurent parmi les réarrangements qui s'effectuent lors de l'irradiation de protéines en solution aqueuse liquide. En utilisant la dimérisation comme marqueur, nous avons étudié différents processus oxydatifs.

C.1-DIMERISATION RADIO-INDUITE DANS LE LYSOZYME

Les lysozymes de blanc d'œuf de poule et de dinde ($1,4 \times 10^{-4}$ M, tampon phosphate de potassium 10 mM, pH = 7,0), qui diffèrent seulement par sept acides aminés (voir Tableau IV-VI), ont été soumis à une irradiation gamma. Les irradiations ont été effectuées dans les conditions détaillées dans le Tableau II-I soit :

A sous protoxyde d'azote,
B sous argon
C sous protoxyde d'azote en présence d'ions azoture
D sous oxygène
E sous oxygène en présence d'ions formiate.

Les expériences ont ensuite été faites en irradiant, en régime pulsé, les échantillons à l'aide d'un accélérateur d'électrons. Nous avons ainsi apprécié l'effet du débit de dose. L'évaluation de la proportion de protéines dimérisées a été assurée par CLHP. L'électrophorèse a été utilisée pour confirmer la dimérisation en vérifiant les masses moléculaires.

C.1.1-Rendements de dimérisation

Pour les deux protéines étudiées, les rendements de formation de dimères sont rapportés en radiolyse gamma (Tableau IV-VII) et pulsée (Tableau IV-VIII). L'électrophorèse réalisée en conditions réductrices a permis de montrer que les liaisons covalentes qui réunissent les deux monomères ne sont pas, du moins en proportion importante, de type pont disulfure. Les rendements de formation de dimères (G (+D)) évoluent suivant les conditions : $E < D < C < B \leq A$. Il y a donc d'autant plus de dimérisation que la solution est oxydante (voir Tableau II-I).

TABLEAU IV-VI

Différences entre les lysozymes de poule et de dinde

Position	**Lysozyme (poule)**	**Lysozyme (dinde)**
3	Phénylalanine	Tyrosine
15	Histidine	Leucine
41	Acide glutamique	Histidine
73	Arginine	Lysine
99	Valine	Alanine
101	Acide aspartique	Glycine
121	Acide glutamique	Histidine

Des données obtenues, nous pouvons conclure que $O_2^{\bullet-}$ ne provoque pas de dimérisation (condition E). En effet, $O_2^{\bullet-}$ seul semble interagir principalement avec les métaux (Faraggi et Houée-Levin, 1999). Conformément aux données de la littérature, des rendements obtenus dans les conditions D, il apparaît que la présence de O_2 inhibe la dimérisation (Wolff et Dean, 1986). Elle contribuerait plutôt à favoriser la fragmentation (Levitzki et Anbar, 1967; Butler et al., 1984; Wolff et al., 1986; Orr, 1967; Gutteridge et Wilkins, 1983). Le processus de fragmentation serait initié par l'arrachement d'un hydrogène du carbone α d'un acide aminé par $HO^{\bullet}$. Une réaction avec O_2 formerait subséquemment un composé peroxyle (Garrison *et al.*, 1962).

Dans les conditions A, B et C, où l'oxygène est absent, les rendements (G (+D)) représentent moins de 10% des rendements de formation des radicaux $HO^{\bullet}$ ou $N_3^{\bullet}$. Ainsi, il est certain que d'autres processus qui ne mènent pas à la dimérisation se produisent.

Nous remarquons que la formation de dimères est plus abondante dans le lysozyme de dinde que dans celui de poule. Les rendements (G (+D)), pour le lysozyme de dinde, évoluent suivant: A > B alors que pour le lysozyme de poule, les rendements (G (+D)) sont très voisins (environ 1 x 10^{-8} mol J^{-1}) dans les conditions A et B. L'attaque de cette protéine par les radicaux hydroxyle entraîne donc la production d'une quantité plus importante de protéine condensée. Les structures tertiaires des lysozymes de poule et de dinde étant pratiquement identiques, cette différence de comportement face aux radicaux $HO^{\bullet}$ ne peut qu'être liée aux différences relevées dans leurs structures primaires (Tableau IV-VI).

C.1.2-Propriétés spectrales des produits

C.1.2.1-Propriétés d'absorption

L'ensemble des échantillons protéiques irradiés dans les conditions A, B et C, présentent des propriétés spectrales similaires (nous n'avons pas remarqué de phénomène de diffusion). Un spectre typique (Figure IV-10) montre deux maxima d'absorption. Le premier est près de 310 nm et le second près de 350 nm. L'absorbance à 315 nm, augmente linéairement avec la dose reçue par les échantillons protéiques (Figure IV-11). Elle a été utilisée comme marqueur des modifications

TABLEAU IV-VII

Comparaison des rendements initiaux de dimérisation dans les lysozymes de poule et de dinde

Rendements initiaux de dimérisation, évalués par CLHP G(+D), du lysozyme de poule et de dinde (1,4 x 10^{-4} M, tampon phosphate de potassium 10 mM, pH = 7,0) obtenus par radiolyse gamma (I ≅ 1Gy s^{-1}). Les données sources proviennent d'irradiation à 0, 88, 220 et 400 Gy.

Conditions d'irradiation	G(+D) (mol J^{-1}) Lysozyme (poule)	G(+D) (mol J^{-1}) Lysozyme (dinde)
A ($HO^{\bullet}$, $H^{\bullet}$)	(1,23 ± 0,04) x10^{-8}	(4,42 ± 0,09) x 10^{-8}
B ($HO^{\bullet}$, e^{-}_{aq}, $H^{\bullet}$)	(1,34 ± 0,08)x 10^{-8}	(2,42 ± 0,04) x 10^{-8}
C ($N_3^{\bullet}$, $H^{\bullet}$)	(0,85 ± 0,07) x 10^{-8}	(0,88 ± 0,02) x 10^{-8}
D ($O_2^{\bullet -}$, $HO^{\bullet}$)	(0,26 ± 0,01) x 10^{-8}	(0,60 ± 0,01) x 10^{-8}
E ($O_2^{\bullet -}$)	Non détectable	Non détectable

TABLEAU IV-VIII

Comparaison des rendements initiaux de dimérisation du lysozyme de poule en radiolyse gamma et pulsée

Rendements initiaux de dimérisation, évalués par CLHP G(+D), du lysozyme de poule (1,4 x 10^{-4} M, tampon phosphate de potassium 10 mM, pH = 7,0) obtenus par radiolyse gamma (I ≅ 1 Gy s^{-1}) et radiolyse pulsée (I ≅ 3 x 10^{7} Gy s^{-1}). Les données sources proviennent d'irradiations à 0, 88, 220 et 400 Gy.

Conditions d'irradiation	G(+D) (mol J^{-1}) Radiolyse Gamma	G(+D) (mol J^{-1}) Radiolyse Pulsée
A ($HO^{\bullet}$, $H^{\bullet}$)	(1,23 ± 0,04) x10^{-8}	(5,11 ± 0,50) x 10^{-8}
B ($HO^{\bullet}$, e^{-}_{aq}, $H^{\bullet}$)	(1,34 ± 0,08) x 10^{-8}	(3,64 ± 0,50) x 10^{-8}
C ($N_3^{\bullet}$, $H^{\bullet}$)	(0,85 ± 0,07) x 10^{-8}	(2,03 ± 0,22) x 10^{-8}
D ($O_2^{\bullet -}$, $HO^{\bullet}$)	(0,26 ± 0,01) x 10^{-8}	Non détectable
E ($O_2^{\bullet -}$)	Non détectable	Non détectable

induites dans les protéines. Pour le lysozyme de poule et de dinde, les pentes initiales de la variation de l'absorbance en fonction de la dose croissent suivant les conditions d'irradiation : E < D < C < B < A. Il y a donc un accroissement de l'absorbance à 315 nm, comme pour les rendements de dimérisation, avec l'augmentation du potentiel oxydant du milieu.

Seuls les résidus aromatiques absorbent dans les longueurs d'onde du voisinage de 315 nm. Les résidus tryptophane montrent les variations d'absorbance le plus fortes suivent ensuite les résidus tyrosine et enfin les résidus histidine (Wetlaufer, 1962). Nous pouvons envisager que l'oxydation des résidus tryptophane et tyrosine, puisse expliquer le spectre d'absorption, entre 280 et 400 nm, obtenu lors de l'oxydation radio-induite des protéines.

L'évolution de l'absorbance de solutions de tyrosine (Figure IV-12) et de tryptophane (Figure IV-13), exposées à $N_3^{\bullet}$, a donc été suivie en fonction de la dose. Dans les deux cas, une augmentation du signal d'absorbance à 315 nm a été observée, l'augmentation étant plus rapide, à même concentration, pour les solutions de tryptophane.

C.1.2.2-Propriétés de fluorescence

Les spectres d'émission, à une longueur d'onde d'excitation de 325 nm, montrent un maximum à 410 nm (Figure IV-14). Une excitation à 380 nm donne un spectre différent (Figure IV-15). Ce dernier présente un maximum à environ 460 nm suivi d'un épaulement vers 470 nm. Ces données mettent en évidence la cohabitation d'au minimum deux espèces. Sur les spectres présentés, nous pouvons voir le signal raman de l'eau à environ 365 nm lors de l'excitation à 325 nm et à environ 435 nm lors de l'excitation à 380 nm.

La fluorescence à 410 nm lorsque la longueur d'onde d'excitation est de 325 nm pourrait être attribuée à la bityrosine (Gross et Sizer, 1959 ; Andersen, 1963, 1964, 1966 ; Lehrer et Fasman, 1967). La formation de bityrosine, par des rayons ultra-violets, X ou gamma, a déjà été mise en évidence dans des solutions aqueuses de tyrosine (Lehrer et Fasman, 1967 ; Boguta et Dancewicz, 1978, 1981).

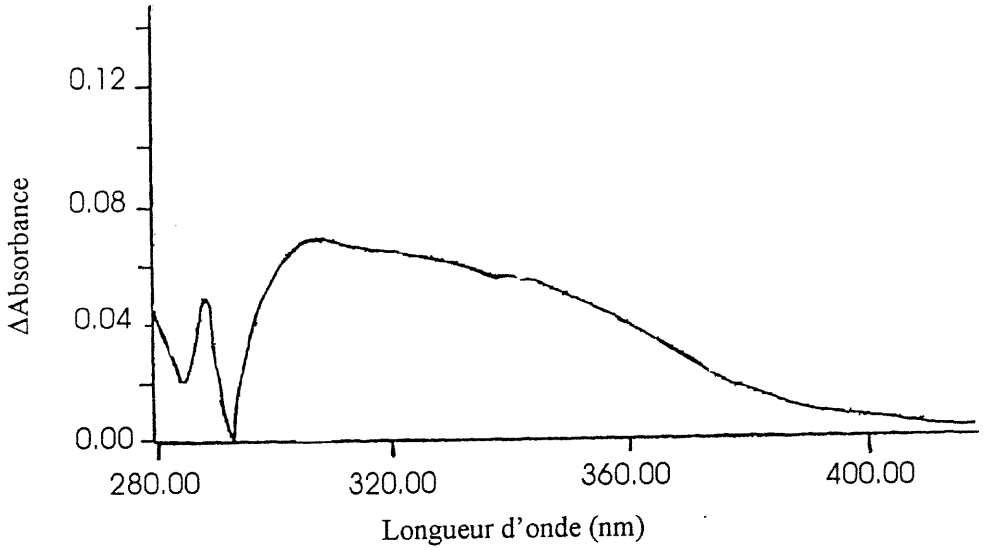


Figure IV-10

Spectre différentiel d'absorbance du lysozyme de poule irradié à 37°C en présence de $N_3^{\bullet}$
La préparation de lysozyme de blanc d'œuf de poule ($1,4 \times 10^{-4}$ M, tampon phosphate de potassium pH = 7,0, azoture de sodium 0,1 M, saturé en protoxyde d'azote) soumis à une dose de 832 Gy ($I \cong 1$ Gy s^{-1}) a été diluée cinq fois dans l'urée 8 M. Un échantillon, préparé de façon identique, non irradié a été utilisé comme référence.

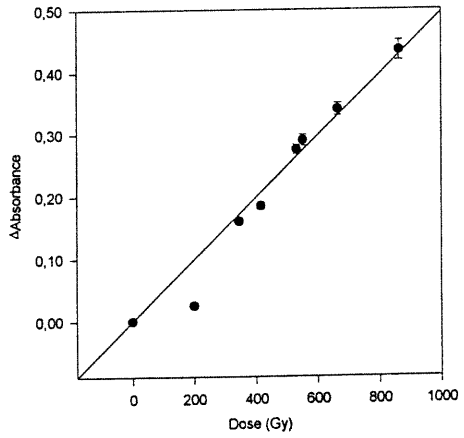


Figure IV-11

Evolution de l'absorbance à 315 nm du lysozyme soumis à des doses croissantes de rayonnement gamma en présence de $N_3^{\bullet}$
Les préparation de lysozyme de blanc d'œuf de poule ($1,4 \times 10^{-4}$ M, tampon phosphate de potassium pH = 7,0, azoture de sodium 0,1 M, saturé en protoxyde d'azote) soumis à des doses croissantes ($I \cong 1$ Gy s^{-1}) ont été diluées cinq fois dans l'urée 8 M. Un échantillon, préparé de façon identique, non irradié, a été utilisé comme référence.

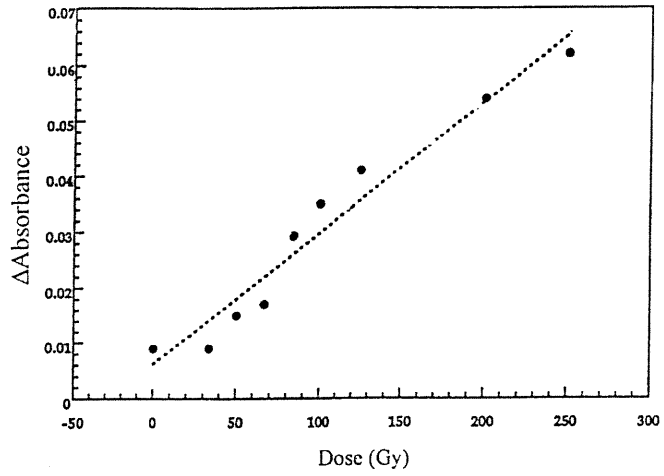


Figure IV-12

Evolution de l'absorbance à 315 nm de la tyrosine soumise à des doses croissantes de rayonnement gamma en présence de $N_3^\bullet$

Evolution de l'absorbance à 315 nm en fonction de la dose reçue. Préparation de tyrosine (60 µM, tampon phosphate de potassium 20 mM, pH = 7,3, azoture de sodium 0,1 M) saturée en protoxyde d'azote. (figure préparée par Alhan Chapelier)

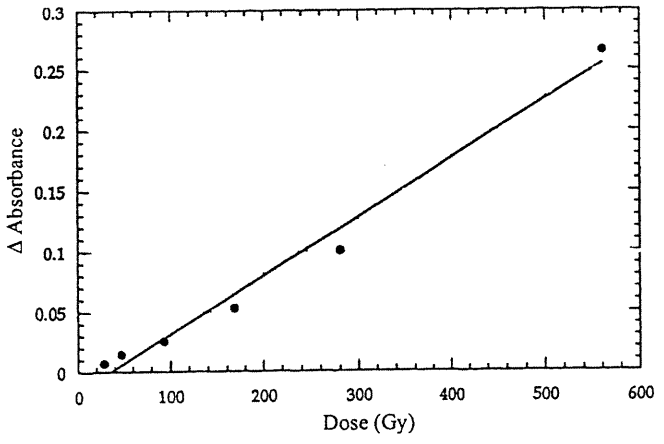


Figure IV-13

Evolution de l'absorbance à 315 nm du tryptophane soumis à des doses croissantes de rayonnement gamma en présence de $N_3^\bullet$

Evolution de l'absorbance à 315 nm en fonction de la dose reçue. Préparation de tryptophane (60 µM, tampon phosphate de potassium 20 mM, pH = 7,2, azoture de sodium 0,1 M) saturée en protoxyde d'azote. (figure préparée par Stéphanie Dronion)

L'intensité du signal de fluorescence à 410 nm ($\lambda_{excitation}$ = 325 nm) augmente avec la dose reçue (Figure VI-14). En radiolyse gamma, pour des conditions données, la pente de la courbe donnant l'intensité de fluorescence en fonction de la dose est la même pour les lysozyme de poule et de dinde. Le signal atteint un maximum pour les échantillons irradiés sous protoxyde d'azote en présence d'ions azoture et il diminue, pour une dose donnée, suivant l'ordre : A > B > D > E (Tableau IV-IX).

Dans les protéines, l'émission de fluorescence centrée à 460 ainsi que l'épaulement à 470 nm lorsque l'excitation est fixée à 380 nm augmentent avec la dose reçue. Ces derniers ont été suivis seulement dans les conditions C. Nous supposons fortement qu'ils soient dus à la formation de produits d'oxydation du tryptophane. En effet, lorsqu'un spectre d'émission de fluorescence ($\lambda_{excitation}$ = 380 nm) est enregistré sur des solutions, de résidus tryptophane seuls ou d'un mélange de résidus tyrosine et tryptophane, irradiées dans les conditions C, nous assistons à l'augmentation de l'intensité à 460 nm et à l'apparition d'un signal à 470 nm.

Les mesures de fluorescence ne peuvent être utilisées pour quantifier les produits formés car elles comportent le risque d'être erronées par l'environnement (Konev, 1967; Kronman et Holmes, 1971). La force ionique, qui diffère d'une condition à l'autre, peut également influencer ces mesures. Les résultats de fluorescence apportent cependant des renseignements qualitatifs, car ils permettent de montrer la présence d'au moins deux produits différents. Le croisement de signaux, dus à la présence d'autres produits, ne peut cependant être exclu (Hashimoto *et al.*, 1982).

C.1.3-Effet du débit de dose

Les radicaux primaires formés en radiolyse pulsée sont les mêmes qu'en radiolyse gamma. La différence, due aux écarts de débit de dose, réside principalement dans la concentration des radicaux formés au cours du temps.

Les rendements de formation de dimères, évalués par CLHP, obtenus par radiolyse pulsée (à un débit de dose de l'ordre de 15 Gy par 500 ns) et par radiolyse gamma (I ≅ 1 Gy s^{-1}), sont comparés dans les conditions A, B et C (Tableau IV-VIII). Pour l'ensemble de ces conditions d'irradiation, où $O_2^{\bullet-}$ est absent, le rendement en radiolyse pulsée est systématiquement supérieur. Sous protoxyde d'azote (où les

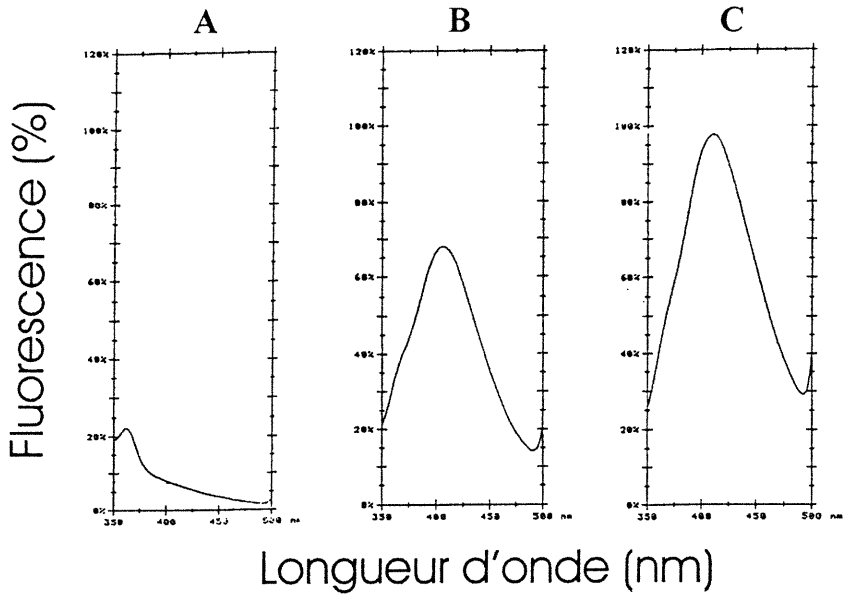


Figure IV-14

Spectre d'émission en fluorescence du lysozyme de poule irradié à 37°C en présence de $N_3^{\bullet}$
La préparation de lysozyme de blanc d'œuf de poule (1,4 x 10^{-4} M, tampon phosphate de potassium pH = 7,0, azoture de sodium 0,1 M, saturé en protoxyde d'azote) soumis à une dose de O (A), 416 (B) et 832 Gy (C) ($I \cong 1$ Gy s^{-1}) a été diluée cinq fois dans l'urée 8 M. La longueur d'onde d'excitation était fixée à 325 nm.

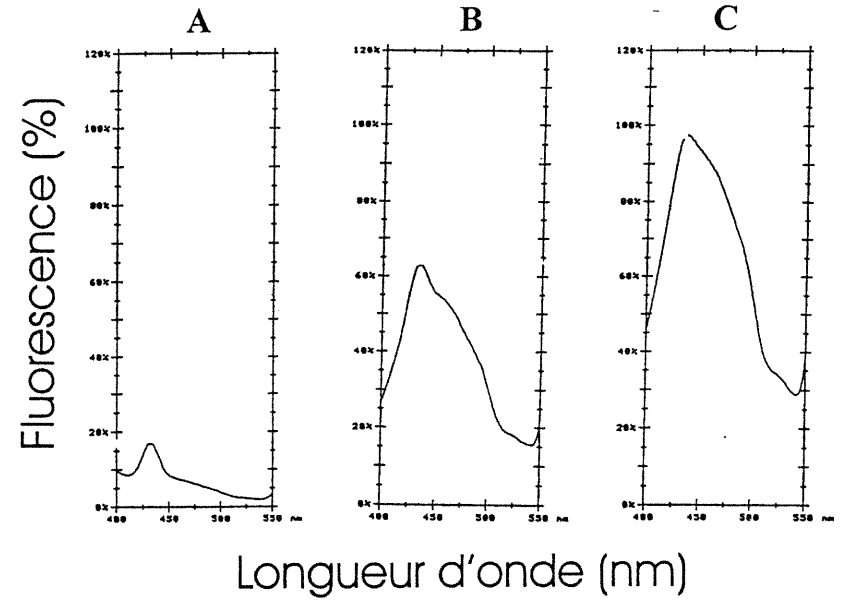


Figure IV-15

Spectre d'émission en fluorescence du lysozyme de poule irradié à 37°C en présence de $N_3^{\bullet}$
La préparation de lysozyme de blanc d'œuf de poule (1,4 x 10^{-4} M, tampon phosphate de potassium pH = 7,0, azoture de sodium 0,1 M, saturé en protoxyde d'azote) soumis à une dose de 0 (A), 416 (B) et 832 (C) Gy ($I \cong 1$ Gy s^{-1}) a été diluée cinq fois dans l'urée 8 M. La longueur d'onde d'excitation était fixée à 380 nm.

TABLEAU IV-IX

Tableau comparatif des valeurs de fluorescence à 410 nm (excitation à 325 nm) du lysozyme de poule et de dinde

Valeurs de fluorescence à 410 nm (excitation à 325 nm) du lysozyme de poule et de dinde ($1,4 \times 10^{-4}$ M, tampon phosphate de potassium 10 mM, pH = 7,0) obtenus par radiolyse gamma, sous protoxyde d'azote en présence de 0,1 M d'ions azoture, à une dose de 400 Gy ($I \cong 1 Gy\ s^{-1}$).

Conditions d'irradiation	% de fluorescence Lysozyme (poule)	% de fluorescence Lysozyme (dinde)
A ($HO^{\bullet}$, $H^{\bullet}$)	80	90
B ($HO^{\bullet}$, e^{-}_{aq}, $H^{\bullet}$)	22	24
C ($N_3^{\bullet}$, $H^{\bullet}$)	100	100
D ($O_2^{\bullet -}$, $HO^{\bullet}$)	8	16
E ($O_2^{\bullet -}$)	1	0

rendements de dimérisation sont les plus grands) le rendement, obtenu après radiolyse pulsée est environ quatre fois plus important qu'après irradiation gamma. Sous argon, les valeurs obtenues en radiolyse pulsée sont environ trois fois plus importantes. Finalement, sous protoxyde d'azote en présence d'azoture un facteur deux, en faveur de la radiolyse pulsée, existe entre les rendements mesurés suivant les deux types d'irradiation.

C.1.4-Interprétation des processus de dimérisation

Une synthèse des derniers résultats permet d'émettre quelques conclusions. Une première observation, qui peut être soulignée, est que les rendements de dimérisation sont beaucoup plus petits que les rendements en radicaux oxydants (Tableaux IV-VII et VIII). D'autres produits, en plus des dimères, sont formés.

Les spectres de fluorescence (Figures IV-14 et IV-15), qui présentent des maxima complètement distincts, suivant la longueur d'onde d'excitation, indiquent la présence d'au moins deux produits différents. Un processus connu, qui est compatible avec une augmentation de l'absorbance à 315 nm et un maximum de fluorescence à 410 nm (excitation à 325 nm), est la production de bityrosine (Hashimoto *et al.*, 1981; Pacifici et Davis, 1990). La formation de bityrosine intermoléculaire peut ainsi expliquer la formation de dimères.

Par ailleurs, des irradiations de solutions de résidus tyrosine montrent un accroissement des valeurs d'absorption à 315 nm dans cet intervalle (Figure IV-12). La diminution de l'intensité de fluorescence à environ 340 nm ($\lambda_{excitation}$ = 260 nm) due aux résidus tyrosine intacts, dans les protéines lors de l'exposition à $HO^{\bullet}$ (en absence d'oxygène), constitue une indication que les résidus tyrosine sont modifiés (Saha *et al.*, 1993).

Le deuxième type de produit, dont le signal est observé en fluorescence, proviendrait vraisemblablement de l'oxydation du tryptophane. La démonstration de la perte d'intensité de fluorescence à environ 360 nm ($\lambda_{excitation}$ = 280-290 nm) spécifique aux résidus tryptophane, dans les protéines, indique que ceux-ci sont modifiés même à de faibles taux d'exposition aux radicaux hydroxyle (Riedle et Kerjaschi, 1997; Franzini,

1993). Le N-formylkynurénine, absorbant à 320 nm (Langlois et al., 1993; Bobrowski *et al.*, 1997) et présentant un maximum en fluorescence proche de 460 nm, ou le L-kynurénine, qui absorbant à 360 nm (Langlois *et al.*, 1993), sont des candidats potentiels de produits formés.

Ayant une indication de la nature des produits radiolytiques, nous pouvons expliquer le grand écart qui existe entre G (+D) et g (oxydant$^{\bullet}$) sur la base des réactions IV-1 et IV-2 qui seraient en compétition. Nous savons donc que la dimérisation (réaction IV-1) est plus lente que la réaction IV-2.

2 (Protéine-TyrO$^{\bullet}$)	$\rightarrow$	Dimère	(IV-1)
Protéine-TyrO$^{\bullet}$ + Oxydant$^{\bullet}$	$\rightarrow$	Protéine oxydée	(IV-2)

Le débit de dose affecte le taux de dimérisation car, en radiolyse pulsée, à la fin de l'impulsion, il n'y a plus de radicaux oxydants disponible pour alimenter la réaction (IV-2). La réaction IV-1 devient alors prépondérante. Une quantité plus importante de dimère est alors produite. En radiolyse gamma, le radical oxydant est continuellement formé. La compétition entre les réactions IV-1 et IV-2 est permanente. La réaction IV-2 ne conduit pas à la production de dimère. Dans ces conditions, des rendements de dimérisation inférieurs à ceux qui sont observés en radiolyse pulsée sont attendus.

Les rendements relatifs de G (+D) en radiolyse pulsée par rapport à la radiolyse gamma, sont plus élevés dans les conditions A que dans les conditions B. Le radical HO$^{\bullet}$ (oxydant fort) est produit en quantité plus importante dans les conditions A. De plus grandes quantités de protéine-TyrO$^{\bullet}$ et de HO$^{\bullet}$ sont alors formées ponctuellement en radiolyse pulsée et de manière continue sous rayonnement gamma. Le radical protéine-TyrO$^{\bullet}$ alimente donc principalement la réaction IV-1 en radiolyse pulsée. Ainsi, elle contribue à augmenter la dimérisation. Les rendements de dimérisation sont alors amplifiés par rapport à la radiolyse gamma.

Sous irradiation gamma, les rendements de dimérisation sont voisins dans les conditions A et B, bien que HO$^{\bullet}$ se trouve produit en quantités supérieures en A. Etant

donné que ce dernier est généré de façon continue et que la réaction IV-2 est plus rapide, nous ne voyons pas augmenter le rendement de dimérisation.

Pour expliquer les différences de rendements obtenues entre la radiolyse pulsée et gamma pour le lysozyme de poule dans les conditions C, le même raisonnement qui a été exposé pour expliquer les résultats obtenus dans les conditions A peut être tenu. La vitesse de la réaction IV-2 serait simplement différente avec $N_3^{\bullet}$ et avec $HO^{\bullet}$.

Dans les conditions D, des produits radicalaires et moléculaires issus de l'oxygène, engendrent de nouvelles réactions de compétition avec les réactions IV-1 et IV-2. Ces réactions, dont certaines sont très rapides, expliquent les rendements faibles de dimérisation. Elles entraînent, entre autres, la formation de certains produits d'oxydation de la tyrosine, lesquels ne sont pas impliqués dans les processus de dimérisation.

Nous savons que la dimérisation n'est pas la seule réaction qui s'effectue. Le radical hydroxyle oxyde les chaînes latérales de certains acides aminés qui ne se dimérisent pas. Le seul fait de l'existence de produits d'oxydation du tryptophane constitue une preuve que des réactions, comme IV-2, se produisent.

Les inégalités de rendements de dimérisation rapportées pour les lysozymes de poule et de dinde (qui possède un résidu tyrosine supplémentaire) (Table IV-VII) dans les conditions où $HO^{\bullet}$ est présent indiquent un rôle important de la structure primaire. Ces rendements sont équivalents en présence de $N_3^{\bullet}$. Il existe donc des processus différents suivant les propriétés du radical oxydant utilisé. D'ailleurs, des différences dans les propriétés de fluorescence ont été notées lorsque des protéines sont oxydées par $HO^{\bullet}$ et par $N_3^{\bullet}$ (Hashimoto *et al.*, 1982).

C.2-ROLE DE L'OXYDATION DES RESIDUS TRYPTOPHANE

Dans le but d'affiner les mécanismes impliquant HO$^{\bullet}$ qui conduisent à l'agrégation et à la fragmentation protéique, un radical plus sélectif a été utilisé (Boguta et Dancewicz, 1983). Cette étape est nécessaire puisque les radicaux hydroxyle sont très peu sélectifs et entraînent la formation d'un grand éventail de produits (Garrison, 1987). Cette variété rend très complexe l'interprétation des données. Pour cette raison, le radical $N_3^{\bullet}$ qui réagit sélectivement avec le cycle indole du tryptophane a été choisi (Weinstein *et al.*, 1991). Cette attaque, que nous allons étudier de façon plus approfondie, est l'une des multiples réactions des radicaux hydroxyle.

Nous savons, grâce à la radiolyse pulsée, que le rendement de production de radicaux tryptophanyle par $N_3^{\bullet}$ s'effectue par une réaction rapide de second ordre ($9,5 \pm 0.9 \times 10^8$ M^{-1} s^{-1}), et qu'il est égal au rendement de production de $N_3^{\bullet}$. La disparition du signal d'absorption à 510 nm (Trp$^{\bullet}$) est accompagnée de l'apparition d'un signal d'absorption à 410 nm (TyrO$^{\bullet}$) (Mishra *et al.*, 1994). Par contre, le rendement de production du radical tyrosinyle est inférieur. Celui-ci n'est pas constant d'une espèce de lysozyme à l'autre (Audette *et al.*, en préparation, Weinstein *et al.*, 1991). Dans le lysozyme de dinde et de poule, l'efficacité de transfert atteint 40%. Le transfert d'électron (ou de H) entre un résidu de tryptophane et un résidu de tyrosine n'est donc pas total. Il est alors évident que d'autres réactions, qui ne sont pas vues en radiolyse pulsée, se produisent. Des analyses complémentaires ont alors été réalisées en radiolyse gamma.

$$G(N_3^{\bullet}) = G(Trp^{\bullet}\text{---}X\text{---}TyrOH)$$
$$G(TrpH\text{---}X\text{---}TyrO^{\bullet}) = 0.4\ G(Trp^{\bullet}\text{---}X\text{---}TyrOH)$$

L'analyse cinétique de ce transfert, faite par radiolyse pulsée, montre une seule réaction d'ordre 1.

Des solutions de lysozyme de blanc d'œuf de poule ($1,4 \times 10^{-4}$ M, tampon phosphate de potassium 10 mM, pH = 7,0) ont été soumises au rayonnement gamma sous protoxyde d'azote en présence d'azoture 0,1 M. L'espèce de lysozyme, la concentration en lysozyme et la température à laquelle ont été maintenus les

échantillons lors de l'irradiation ont été changées tour à tour. Les produits formés ont été dosés par densitométrie de gel d'électrophorèse, par CLHP en phase inversée, par mesure de variation d'absorbance (par rapport à un échantillon témoin non irradié) à 315 nm et par fluorimétrie.

C.2.1-Effet de l'espèce

Les lysozymes de type C présentent l'avantage de posséder des structures tridimensionnelles similaires (Bartik *et al*, 1993 et Redfield et Dobson, 1990). Les espèces étudiées ont donc été choisies au sein de cette famille. A partir des rendements présentés dans le Tableau IV-XI, nous pouvons conclure qu'il n'y a pas de différence significative entre les valeurs obtenues par CLHP (G (+D)) et par densitométrie de gel d'électrophorèse(G (+ID)). Soulignons que les rendements de disparition du lysozyme par fragmentation et dimérisation qui sont évalués par densitométrie (G (-IL)) sont petits devant G ($N_3^\bullet$) (5,5 x 10^{-7} mol J^{-1}). En effet, ils représentent environ 10% des rendements de formation de $N_3^\bullet$. Une proportion importante des interactions de $N_3^\bullet$ avec les protéines conduit donc à des modifications dans les chaînes latérales des acides aminés de telle sorte que la chaîne polypeptidique est préservée. La formation de dihydroxyphénylalanine (DOPA), un produit de l'oxydation des résidus tyrosine qui a déjà été identifié dans les protéines, pourrait être l'une de ces voies (Prütz *et al.*, 1983 ; Houée-Levin, 1994). Cependant, il nous est impossible de vérifier quelle est la proportion de $N_3^\bullet$ qui entraîne la formation de DOPA. Si le transfert d'électron entre les résidus tryptophane et tyrosine n'est pas total, la formation des produits d'oxydation du tryptophane, N-formylkynurénine (NFK) et L-kynurénine, peut également être proposée (Stadtman, 1993).

Des séparations électrophorétiques, réalisées en conditions réductrices, ont révélé l'existence d'une coupure dans la chaîne polypeptidique (Figure IV-16 A et B). Cette dernière est responsable de l'apparition d'une bande qui migre tout juste au dessous de celle du lysozyme natif. Ce résultat est aussi compatible avec un transfert $Trp^\bullet \rightarrow TyrO^\bullet$ qui n'est pas total. Au moins un autre site "sensible" est présent dans le lysozyme de poule et de dinde.

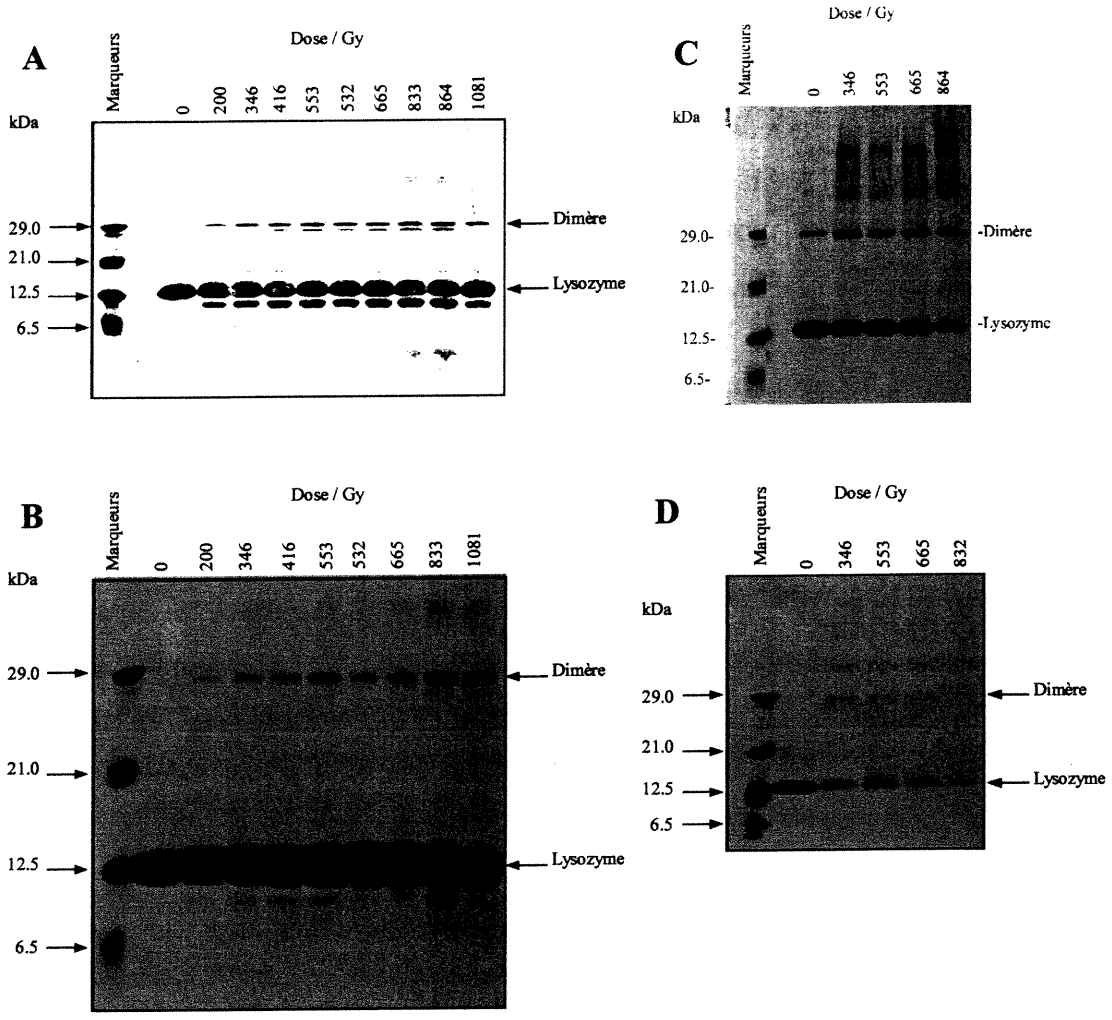


Figure IV-16

Séparation par électrophorèse d'échantillons de différents lysozymes irradiés
Séparation en SDS-PAGE, en conditions réductrices, d'échantillons de lysozyme irradiés (sous protoxyde d'azote en présence d'azoture, , dans un tampon phosphate de potassium pH = 7,0, à une température de 37°C) à différentes doses ($I \cong 1$ Gy s^{-1}).

A	*Lysozyme de blanc d'œuf de poule*
B	*Lysozyme de blanc d'œuf de dinde*
C	*Lysozyme d'œuf de tortue*
D	*Lysozyme de lait humain*

TABLEAU IV-X

Rendements de dimérisation et de fragmentation suivant l'espèce de lysozyme

Rendements évalués par densitométrie de gels d'électrophorèse :
G (-IL) : diminution de la proportion de lysozyme dont la chaîne polypeptidique est intacte
G (+IF) : augmentation de la fraction des fragments
G (+ID) : augmentation de la fraction des dimères

Lysozyme irradiés (sous protoxyde d'azote en présence d'azoture, dans un tampon phosphate de potassium pH = 7,0, à une température de 37°C) à différentes doses ($I \cong 1$ Gy s^{-1}).

Espèce	G (-IL) (mol J^{-1})	G (+IF) (mol J^{-1})	G (+ID) (mol J^{-1})
Poule	$(2,45 \pm 0,05) \times 10^{-8}$	$(1,42 \pm 0,03) \times 10^{-8}$	$(1,03 \pm 0,04) \times 10^{-8}$
Dinde	$(1,78 \pm 0,07) \times 10^{-8}$	$(0,68 \pm 0,03) \times 10^{-8}$	$(1,13 \pm 0,02) \times 10^{-8}$
Tortue	$(7,60 \pm 0,38) \times 10^{-8}$	0	$(1,41 \pm 0,13) \times 10^{-8}$

TABLEAU IV-XI

Variation des rendements observés suivant la température d'irradiation

Rendements évalués par densitométrie de gels d'électrophorèse :
G (-IL) : diminution de la proportion de lysozyme dont la chaîne polypeptidique est intacte
G (+IF) : augmentation de la fraction des fragments
G (+ID) : augmentation de la fraction des dimères
Rendement évalué par CLHP
G (+D) : augmentation de la fraction des dimères

Lysozyme de poule irradié (sous protoxyde d'azote en présence d'azoture, , dans un tampon phosphate de potassium pH = 7,0, à une température de 37°C) à différentes doses ($I \cong 1$ Gy s^{-1}).

Température (°C)	G (-IL) (mol J^{-1})	G (+IF) (mol J^{-1})	G (+ID) (mol J^{-1})	G(+D) (mol J^{-1})
5	$(1,64 \pm 0,25) \times 10^{-8}$	$(0,82 \pm 0,07) \times 10^{-8}$	$(0,82 \pm 0,20) \times 10^{-8}$	$(0,83 \pm 0,03) \times 10^{-8}$
15	$(2,25 \pm 0,02) \times 10^{-8}$	$(1,35 \pm 0,03) \times 10^{-8}$	$(0,88 \pm 0,03) \times 10^{-8}$	$(0,98 \pm 0,08) \times 10^{-8}$
25	$(2,59 \pm 0,05) \times 10^{-8}$	$(1,52 \pm 0,03) \times 10^{-8}$	$(1,09 \pm 0,06) \times 10^{-8}$	$(1.09 \pm 0,05) \times 10^{-8}$
30	$(3,44 \pm 0,10) \times 10^{-8}$	$(1,92 \pm 0,15) \times 10^{-8}$	$(1,50 \pm 0,10) \times 10^{-8}$	$(1.64 \pm 0,04) \times 10^{-8}$
37	$(3,55 \pm 0,18) \times 10^{-8}$	$(1,91 \pm 0,13) \times 10^{-8}$	$(1,72 \pm 0,15) \times 10^{-8}$	$(1.74 \pm 0,07) \times 10^{-8}$

Par l'observation des images de gels d'électrophorèse (Figure IV-16) et en regard des calculs de rendements (Tableau IV-X), on peut noter que l'importance relative de chacun des mécanismes étudiés est fonction de la protéine. Par exemple, aucune fragmentation n'est relevée pour les lysozymes d'origine humaine ou provenant de la tortue. En revanche, ce processus est effectif dans le cas de la poule et de la dinde. Toutes les protéines étudiées s'agglomèrent sous l'action de $N_3^{\bullet}$. Elles présentent toutes les signaux, en fluorescence et en absorption, qui indiquent la présence de bityrosines. Lorsque les rendements de production de fragments et de production de dimères sont additionnés, dans les lysozymes de poule et de dinde, les rendements de perte de chaîne polypeptidique sont obtenus. La perte de chaînes polypeptidiques se fait donc uniquement par la fragmentation et l'agrégation observées.

C.2.2-Effet de la température

Dans le lysozyme de poule, il y a augmentation avec la température de l'ensemble des rendements regroupés dans le Tableau IV-XI. Une hausse de température contribue donc à stimuler les réactions qui conduisent à la dimérisation et à la fragmentation. Toutefois, les profils obtenus pour la fragmentation et la dimérisation sont légèrement différents. Un changement de pente dans le rendement de formation de dimère se situe autour de 25°C (Figure IV-17): les rendements de formation de ce produit augmentent plus rapidement à partir de cette température minimale. D'ailleurs, la conformation adoptée par le lysozyme en solution change sensiblement dans cet intervalle de température (Cozzone *et al.*, 1975). Les modifications radio-induites lorsque l'eau est dans sa forme liquide semblent donc aussi gouvernées par la structure des protéines, tout comme en solution aqueuse congelée. La stéréolocalisation des résidus tyrosyle pourrait être le facteur déterminant dans ce cas particulier (Bouguta et Dancewicz, 1983). Le lysozyme de poule montre une faible diminution de l'activité enzymatique quand la dose augmente et voit ses rendements de perte d'activité biologique accentués à partir de 30°C. Pour le lysozyme de blanc d'œuf de poule, l'activité enzymatique ne réside pas uniquement dans les protéines intactes (Franzini *et al.*, 1993).

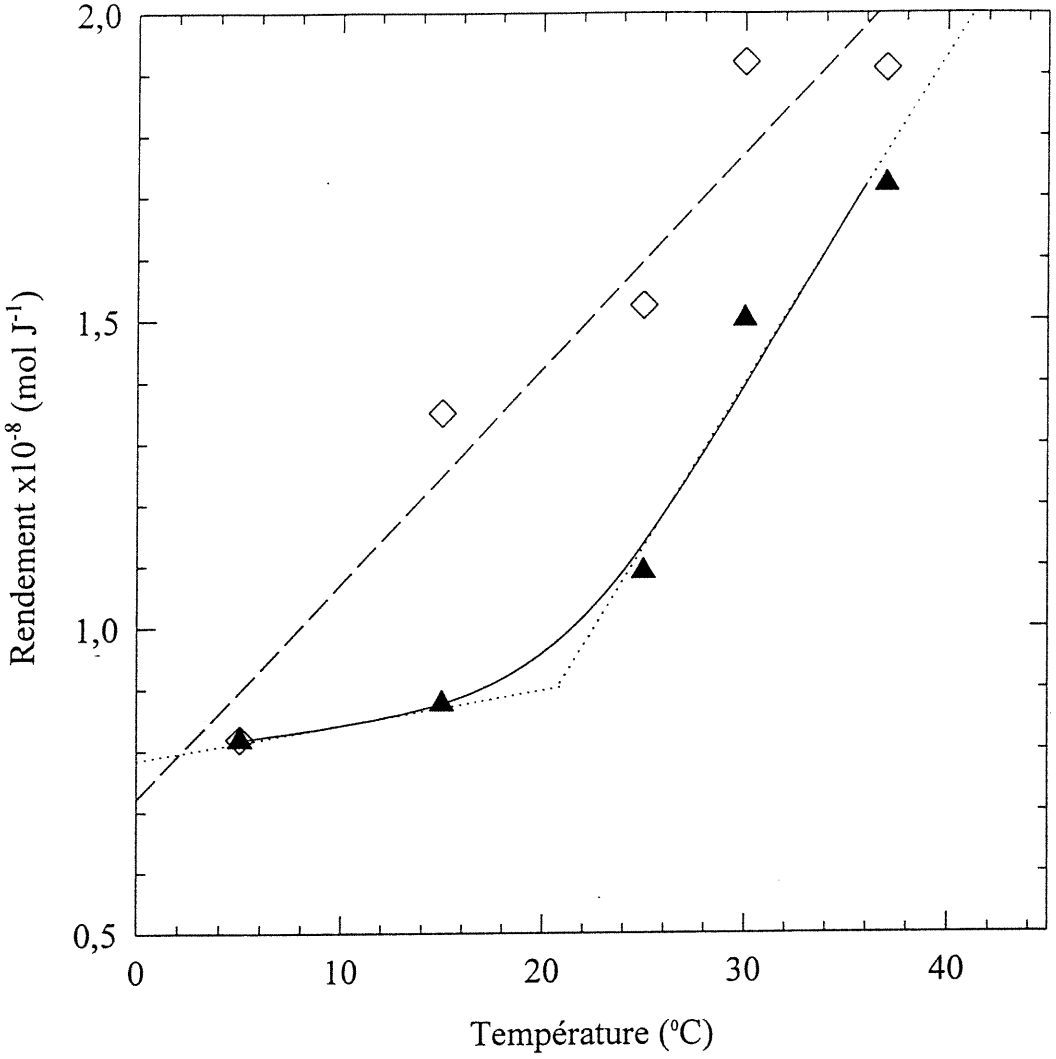


Figure IV-17
Représentation de l'évolution des rendements de fragmentation et de dimérisation en fonction de la température

◊ *Fragmentation*
▲ *dimérisation*

Les rendements, pour le lysozyme de poule 1,4 x 10^{-4} M, tampon phosphate de potassium 10 mM, pH = 7,0, irradié sous protoxyde d'azote en présence d'azoture (I ≅ 1 Gy s^{-1}), ont été obtenus par densitométrie de gels d'électrophorèse.

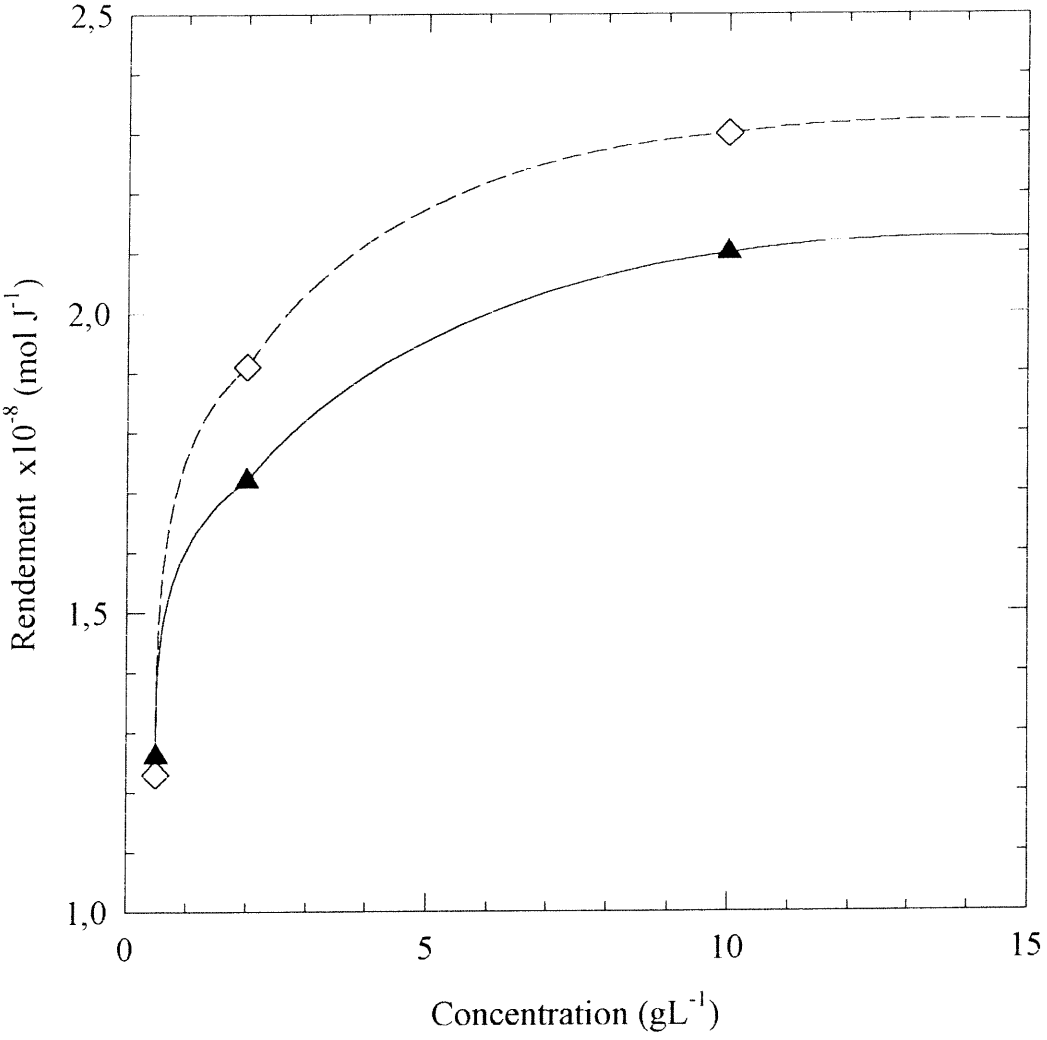


Figure IV-18

Représentation de l'évolution des rendements de fragmentation et de dimérisation en fonction de la concentration

◊ *Fragmentation*
• *dimérisation*

Les rendements, pour le lysozyme de poule (tampon phosphate de potassium 10 mM, pH = 7,0) irradié sous protoxyde d'azote en présence d'azoture (I ≅ 1 Gy s^{-1}), ont été calculés à partir de densitométries de gels d'électrophorèse.

TABLEAU IV-XII

Rendements observés suivant la variation de concentration en protéine

Rendements évalués par densitométrie de gels d'électrophorèse :
G (-IL) : diminution de la proportion de lysozyme dont la chaîne polypeptidique est intacte
G (+IF) : augmentation de la fraction des fragments
G (+ID) : augmentation de la fraction des dimères

Lysozyme irradiés (sous protoxyde d'azote en présence d'azoture, dans un tampon phosphate de potassium pH = 7,0, à une température de 37°C) à différentes doses ($I \cong 1$ Gy s^{-1}).

Concentration (M)	[g/L]	G (-IL) (mol J^{-1})	G (+IF) (mol J^{-1})	G (+ID) (mol J^{-1})
$3,5 \times 10^{-5}$	[0.5]	$(2,53 \pm 0,02) \times 10^{-8}$	$(1,23 \pm 0,05) \times 10^{-8}$	$(1,26 \pm 0,01) \times 10^{-8}$
$1,4 \times 10^{-4}$	[2.0]	$(3,55 \pm 0,18) \times 10^{-8}$	$(1,91 \pm 0,13) \times 10^{-8}$	$(1,72 \pm 0,15) \times 10^{-8}$
$7,0 \times 10^{-4}$	[10.0]	$(4,40 \pm 0,18) \times 10^{-8}$	$(2,30 \pm 0,14) \times 10^{-8}$	$(2,10 \pm 0,13) \times 10^{-8}$

C.2.3-Effet de la concentration

Pour le lysozyme de poule, le Tableau IV-XII rapporte une tendance à l'augmentation, pour l'ensemble des rendements (dimérisation, fragmentation et perte de l'intégrité de la chaîne polypeptidique), au fur et à mesure que la concentration en protéine augmente (Figure IV-18).

C.3-DETERMINATION DES SITES DE MODIFICATION

Deux types de modification structurale, au niveau de la chaîne polypeptidique, ont été rencontrés dans le lysozyme de blanc d'œuf de poule soumis à l'action du radical de l'azoture. L'un de ces réarrangements est une fragmentation unique et spécifique, l'autre est une dimérisation. Les acides aminés qui sont directement impliqués dans ces réorganisations ont été localisés.

C.3.1-Détermination du site de fragmentation radio-induit

Les séparations électrophorétiques de lysozymes (oxydés par $N_3^{\bullet}$), réalisées en conditions réductrices, ont révélé la présence d'un fragment d'environ 11 kDa. Après électro-transfert sur membrane, la bande correspondant à ce fragment a été découpée et récupérée pour en déterminer la séquence N-terminale. La séquence obtenue a été trouvée identique à celle de la protéine native. Afin de déterminer avec précision le lieu de coupure, des mesures de masse par spectrométrie de masse ont été effectuées (à une unité de masse près). En raison des nombreux ponts disulfure présent dans le lysozyme (quatre), une dénaturation en présence d'urée suivie d'une réduction des ponts disulfure avec du β-mercaptoéthanol ont été effectuées. Le dessalage a été fait par CLHP en phase inversée.

Quatre signaux de masses distinctes, dont trois sont montrés par la figure VI-19, ont été obtenus par spectrométrie. L'un, relativement faible, présente une masse d'environ 28000 Da. La valeur obtenue est imprécise car les étalons utilisés possédaient des masses très inférieures. Néanmoins, elle confirme la présence d'une liaison inter-chaîne polypeptidique. Un second signal est détecté à 14316 Da. Celui-ci s'apparente à la masse moyenne du lysozyme natif qui est de 14315 Da. Une troisième masse est détectée à 11286 Da. Il s'agit cette fois du fragment isolé par électrophorèse. En

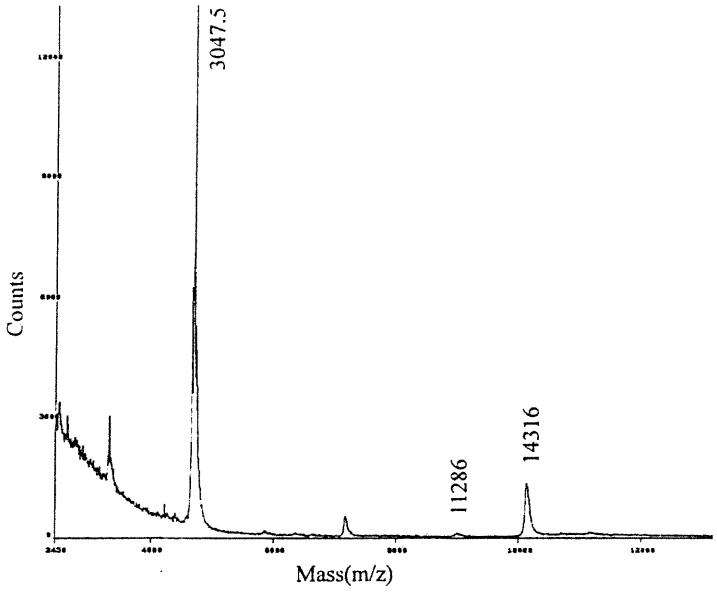


Figure VI-19

Spectre de spectrométrie de masse: détermination du site précis de fragmentation
Lysozyme de blanc d'œuf de poule (1,4 x 10-4 M, tampon phosphate de potassium pH = 7,0, azoture de sodium 0,1 M, saturé en protoxyde d'azote) qui a été soumis au rayonnement gamma du cobalt 60 (I ≅ 1 Gy s-1). L'échantillon à été réduit et dessalé

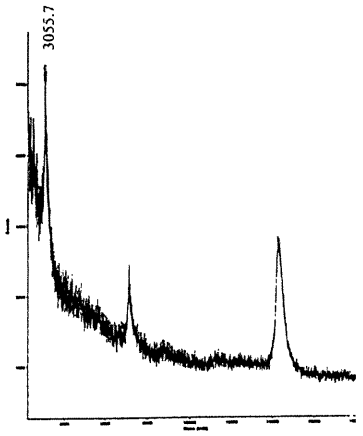


Figure VI-20

Spectre de spectrométrie de masse: détermination du site précis de fragmentation
Lysozyme de blanc d'œuf de dinde (1,4 x 10-4 M, tampon phosphate de potassium pH = 7,0, azoture de sodium 0,1 M, saturé en protoxyde d'azote) qui a été soumis au rayonnement gamma du cobalt 60 (I ≅ 1 Gy s-1). L'échantillon à été réduit et dessalé.

combinant cette information avec la séquence N-terminale nous pouvons déterminer l'endroit de la cassure. Celle-ci se situe entre l'asparagine en position 103 et la glycine en position 104. La masse mesurée du fragment complémentaire est de 3047,5 Da. Elle confirme donc le site de fragmentation qui se produit au niveau de la liaison peptidique avec l'addition d'une molécule d'eau.

Le lysozyme de blanc d'œuf de dinde possède aussi une liaison asparagine-glycine en position 103-104. La Figure IV-16 B montre qu'il est également le siège d'une fragmentation spécifique. Afin de vérifier que la cassure s'effectue au même site que celui qui a été caractérisé dans le lysozyme de blanc d'œuf de poule, des échantillons de dinde ont été préparés de façon identique. La séparation en SDS-PAGE a permis d'évaluer la masse moléculaire du fragment à environ 11 kDa. Par séquençage de ce fragment, nous avons montré que sa séquence N-terminale correspond à celle de la protéine originale. La spectrométrie de masse a permis d'établir à 3055,7 Da la masse du fragment C-terminal (Figure IV-20). Cette masse confirme que la cassure se produit au niveau de la liaison peptidique, entre l'asparagine 103 et la glycine 104, puisque la masse attendue, pour ce type de coupure, est de 3058 Da.

Les lysozymes, humain et de tortue, ne sont pas fragmentés par $N_3^{\bullet}$. Le lysozyme de tortue ne possède pas de résidu asparagine qui précède une glycine dans sa structure primaire. Le lysozyme de lait humain présente un site asparagine-glycine en position 19-20. Celui-ci n'est cependant pas fragmenté. Les différences dans la structure primaire semblent pouvoir affecter le lieu de scission car le lysozyme de tortue possède une structure tertiaire semblable à celle du lyzozyme de poule. L'ordre des acides aminés n'est cependant pas suffisant pour expliquer la sélection des sites car la séquence asparagine-glycine, localisée à un endroit différent dans la structure tertiaire du lysozyme de lait humain, n'est pas le lieu d'une fragmentation.

C.3.2-Localisation des autres sites modifiés

La stratégie qui a été utilisée pour effectuer la détermination précise d'autres sites modifiés consiste à comparer les rendements ainsi que certaines propriétés spectrales des divers fragments trypsiques de lysozyme non irradié ou irradié à différentes doses. La détection des fragments, séparés par CLHP en phase inversée à l'aide d'une

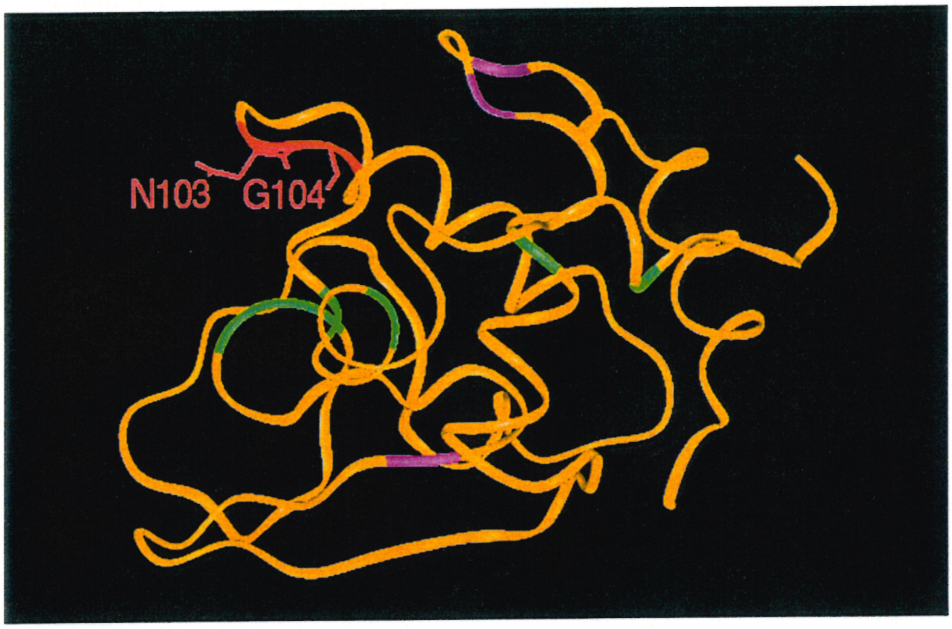


Figure IV-21

Identification du site de coupure dans la structure cristallographique du lysozyme de poule

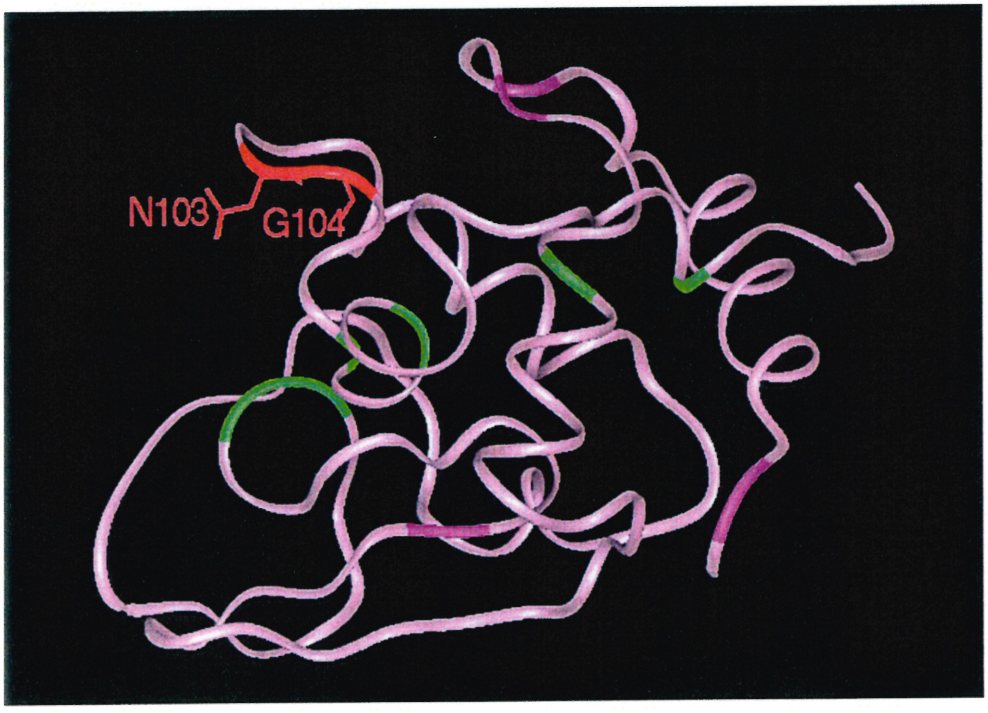


Figure IV-22

Identification du site de coupure dans la structure cristallographique du lysozyme de dinde

colonne Ultrasphere ODS 5mm (4,6 x 150 mm) dans un gradient eau / acétonitrile, a été suivie à 214 nm et soit à 280 nm soit à 315 nm.

C.3.2.1-Analyse des dimères

Nous avons d'abord comparé les profils de séparation des peptides trypsiques (obtenus après carboxyméthylation) issus de dimères de lysozyme irradié isolés avec les peptides trypsiques obtenus pour le lysozyme qui n'a pas été soumis au rayonnement (Figure IV-23). Le profil des fractions séparées avec un bon rendement sont superposables, c'est à dire qu'il n'y a pas de fraction additionnelle ou absente. De plus, les rendements des fractions séparées ne présentent pas de différences marquées. Seules les fractions 34 et 35 du lysozyme qui n'a pas été irradié sont légèrement plus importantes que les fractions correspondantes 32 et 33 de la forme dimérisée. Ces peptides, attendus aussi après l'aminoéthylation, présentent les mêmes caractéristiques que les fractions 20 et 21 de la figure IV-24. Ceux-ci incluent le site de fragmentation N_{103}-G_{104}.

En se référant à la figure IV-16 A, nous constatons qu'une partie des molécules de lysozyme peuvent être à la fois fragmentées et dimérisées. Ces dimères souvent hybrides, présentant des masses moléculaires inférieures à celles des dimères obtenus par condensation de deux chaînes polypeptidiques complètes, migrent légèrement sous la bande du dimère complet. Ces derniers, révélés au Bleu de Coomassie, montrent de faibles signaux. Leur présence se traduirait, dans ce type d'analyse, par des rendements amoindris des fractions C13 (Tableau IV-XIII) qui contiennent les résidus 103-104.

Les dimères isolés montrent un signal de fluorescence à 410 nm lorsque la longueur d'onde d'excitation est fixée à 325 nm. Ce signal est compatible avec la présence de ponts bityrosine. Nous avons donc entrepris de rechercher les fractions qui présentent ce signal (Figure 23). Les fractions 15 et 17 (suivant la numérotation attribuée au dimère) présentent un fort signal. Un signal beaucoup plus faible est détecté dans les fractions 20 et 28 (suivant la numérotation attribuée au dimère). Nous devons encore isoler une quantité suffisante de ces peptides pour déterminer leur composition exacte en s'aidant des techniques de séquençage, de la détermination de la compositions en acides aminés et de la spectrométrie de masse.

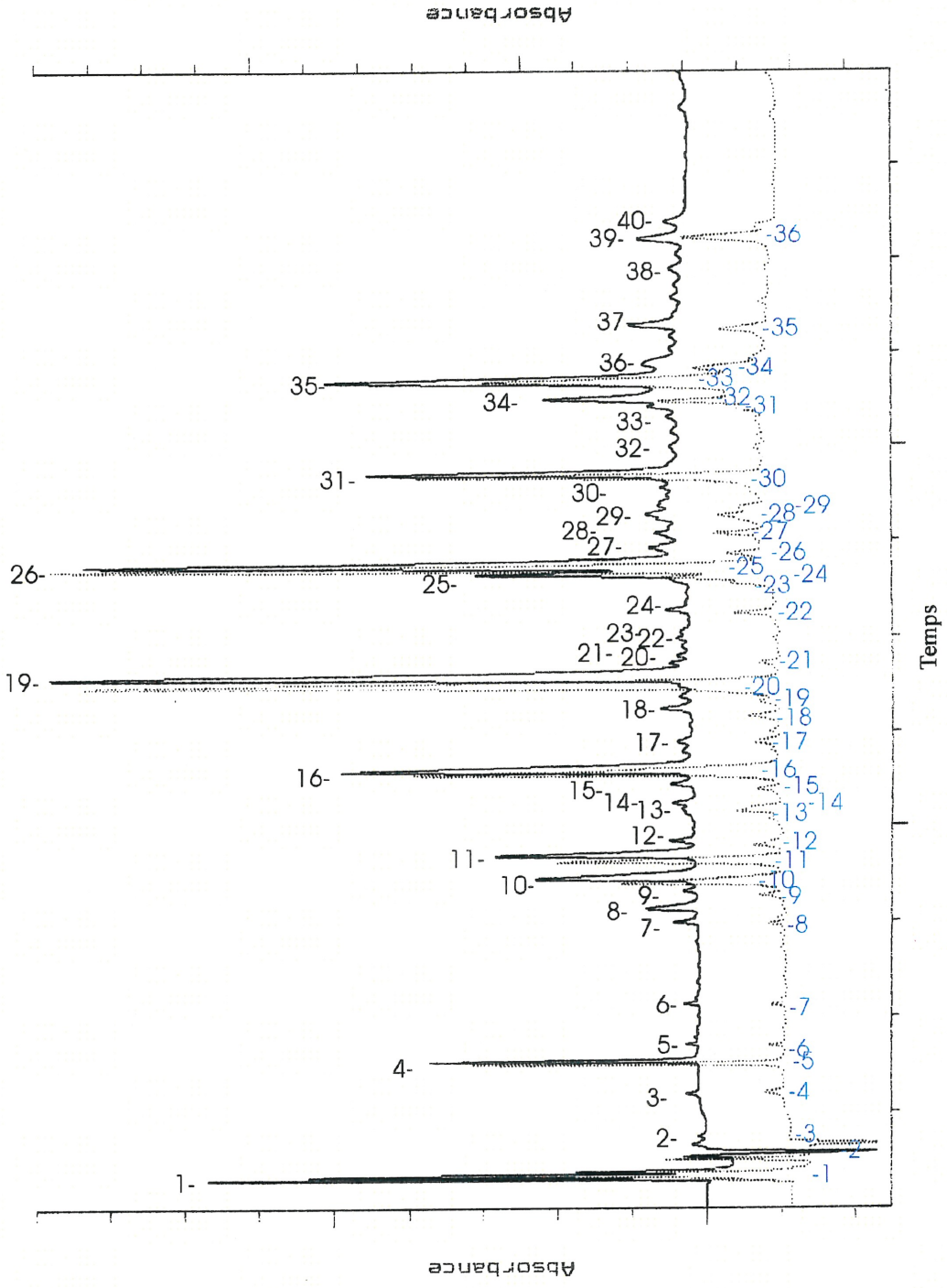


Figure VI-23

Séparations des fragments trypsiques du lysozyme de poule dimérisé

_____ *Lysozyme de poule non irradié*

..... *Lysozyme de poule dimérisé*

Des échantillons de lysozyme de blanc d'œuf de poule (1,4 x 10^{-4} M, tampon phosphate de potassium 10 mM, pH = 7,0, azoture de sodium 0,1M, sous protoxyde d'azote) et de dimère radio-formé ont été carboxyméthylés puis séparés par CLHP en phase inversée. La détection des fragments a été faite à 214 nm.

C.3.2.2-Analyse de solutions de lysozyme irradié

La séparation de peptides trypsiques (obtenus après aminoéthylation) de lysozymes irradiés à différentes doses a permis d'obtenir des informations supplémentaires. Tous les fragments trypsiques, séparés par CLHP, à condition qu'ils soient suffisamment abondant, ont été identifiés par l'analyse de leur composition en acides aminés. Des spectres de fluorescence ($\lambda_{excitation}$ = 325 nm puis 380 nm) ont été effectués pour chacune de ces fractions qui contiennent des résidus tyrosine ou tryptophane.

Sur un profil type de séparation des fragments provenant d'échantillons aminoéthylés de lysozyme non-irradiés (Figure IV-24), 22 fractions distinctes ont été caractérisées. Leurs positions séquentielles sont indiquées dans le Tableau IV-XIV. Les profils de séparations des fractions trypsiques du lysozyme, irradié à doses croissantes, montrent un affaissement progressif des fractions qui contiennent le fragment A19 (voir Tableau IV-XIII). Ces fractions sont en caractères gras dans le tableau IV-XIV. Cette diminution est accompagné par l'apparition de fractions surnuméraires qui sont éluées, pour la plupart, peu avant et peu après les fractions numérotées 19 à 22.

La fragmentation qui se produit entre les résidus 103 et 104 met en évidence qu'au moins un résidu appartenant à A19 (Tableau IV-XIII) est modifié par le rayonnement ionisant. La fragmentation contribue à l'affaissement observé. Le pourcentage que représente la fragmentation sur la totalité de l'échantillon n'est cependant pas suffisant pour justifier l'ampleur des changements. En outre, nous remarquons que les fractions qui contiennent A19 présentent un rapport A 315 nm / A 214 nm plus élevé que dans la protéine non irradiée. Cette augmentation est compatible avec l'hypothèse, préalablement énoncée, d'une formation radio-induite de dérivés oxydés de résidus tryptophane en position 108 et 111.

Nous avons tenté de séquencer les peptides contenus dans les fractions marquées par * (Figure IV-24), qui présentent des rendements de séparation variables d'un profil chromatographique à l'autre. L'analyse des spectres obtenus lors du séquençage n'a permis aucune détermination de leurs séquences N-terminales. Dans certains cas, nous

TABLEAU IV-XIII

Fragments trypsiques attendus pour le lysozyme de poule carboxyméthylé (C-) et aminoéthylé (A-)

Numéro de référence	Séquence du peptide
C1	(1)Lys
C2	(2)Val-Phe-Gly-Arg(5)
C3	(6)Cys-Glu-Leu-Ala-Ala-Ala-Met-Lys(13)
C4	(14)Arg
C5	(15)His-Gly-Leu-Asp-Ans-**Tyr**-Arg(21)
C6	(22)Gly-**Tyr**-Ser-Leu-Gly-Asn-**Trp**-Val-Cys-Ala-Ala-Lys(33)
C7	(34) Phe-Glu-Ser-Asn-Phe-Asn-Thr-Gln-Ala-Thr-Asn-Arg (45)
C8	(46)Asn-Thr-Asp-Gly-Ser-Thr-Asp-**Tyr**-Gly-Ile-Leu-Gln-Ile-Asn-Ser-Arg(61)
C9	(62)**Trp-Trp**-Cys-Asn-Asp-Gly-Arg(68)
C10	(69)Thr-Pro-Gly-Ser-Arg(73)
C11	(74)Asn-Leu-Cys-Asn-Ile-Pro-Cys-Ser-Ala-Leu-Leu-Ser-Ser-Asp-Ile-Thr-Ala-Ser-Val-Asn-Cys-Ala-Lys(96)
C12	(97)Lys
C13	(98)Ile-Val-Ser-Asp-Gly-Asn-Gly-Met-Asn-Ala-**Trp**-Val-Ala-**Trp**-Arg(112)
C14	(113)Asn-Arg(114)
C15	(115)Cys-Lys(116)
C16	(117)Gly-Thr-Asp-Val-Gln-Ala-**Trp**-Ile-Arg(125)
C17	(126)Gly-Cys-Arg(128)
C18	(129)Leu
A1	(1)Lys
A2	(2)Val-Phe-Gly-Arg(5)
A3	(6)Cys
A4	(7)Glu-Leu-Ala-Ala-Ala-Met-Lys(13)
A5	(14)Arg
A6	(15)His-Gly-Leu-Asp-Ans-**Tyr**-Arg(21)
A7	(22)Gly-**Tyr**-Ser-Leu-Gly-Asn-**Trp**-Val-Cys(30)
A8	(31)Ala-Ala-Lys(33)
A9	(34) Phe-Glu-Ser-Asn-Phe-Asn-Thr-Gln-Ala-Thr-Asn-Arg (45)
A10	(46)Asn-Thr-Asp-Gly-Ser-Thr-Asp-**Tyr**-Gly-Ile-Leu-Gln-Ile-Asn-Ser-Arg(61)
A11	(62)**Trp-Trp**-Cys(64)
A12	(65)Asn-Asp-Gly-Arg(68)
A13	(69)Thr-Pro-Gly-Ser-Arg(73)
A14	(74)Asn-Leu-Cys(76)
A15	(77)Asn-Ile-Pro-Cys(80)
A16	(81)Ser-Ala-Leu-Leu-Ser-Ser-Asp-Ile-Thr-Ala-Ser-Val-Asn-Cys(94)
A17	(95)Ala-Lys(96)
A18	(97)Lys
A19	(98)Ile-Val-Ser-Asp-Gly-Asn-Gly-Met-Asn-Ala-**Trp**-Val-Ala-**Trp**-Arg(112)
A20	(113)Asn-Arg(114)
A21	(115)Cys
A22	(116)Lys
A23	(117)Gly-Thr-Asp-Val-Gln-Ala-**Trp**-Ile-Arg(125)
A24	(126)Gly-Cys(127)
A25	(128)Arg
A26	(129)Leu

étions en présence de plusieurs séquences mélangées et dans d'autres cas, aucun signal formellement identifiable n'apparaissait.

En s'aidant d'un logiciel d'intégration (Gold de Beckman), nous avons remarqué que la proportion relative des fractions qui contiennent A6 (Y_{20}), A7 (Y_{23} et W_{28}) et A11 (W_{62} et W_{63}) (Tableau IV-XIII) a tendance à diminuer quand la dose augmente. Cette diminution est cependant beaucoup moins marquée que pour les fractions qui contiennent A19 (W_{108} et W_{111}). Etant donné que les fractions qui contiennent A10 ne sont pas séparées avec un bon rendement, nous n'avons pas été en mesure d'évaluer, de cette façon, si Y_{53} est modifiée. Toutefois, en se rapportant au Tableau XI-XIV, nous remarquons que les fractions 15, 16 et 18 présentent un faible signal de fluorescence à 410 nm ($\lambda_{excitation}$ = 325nm). Celles-ci incluent l'ensemble des résidus tyrosine présents dans la protéine (donc Y_{53}).

Les fractions 6 et 7, qui contiennent Y_{20}, ne présentent pas de signal de fluorescence à 410 nm (Tableau IV-XIV). En départageant l'apport des peptides A6 contenant Y_{20} dans les diminutions des rendements de séparation avec la dose, nous remarquons que la fraction 18 (qui contient aussi le résidu tyrosine 23) pourrait être la cause de la perte observée. Nous pouvons encore envisager que ce résidu tyrosine ne soit pas modifié. Par contre, des résidus tyrosine, en position 23 et 53, seraient impliqués dans les dimérisations.

Les fractions 11 et 12 (Tableau IV- XIV) qui contiennent W_{62} et W_{63} ne présentent pas de signal de fluorescence distinct des fractions non-irradiées. De plus, la diminution apparente du segment qui contient les résidus tryptophane 62 et 63, évaluée par les rendements de séparation de l'ensemble des peptides qui contiennent A11 (Tableau IV-XIII), peut être occasionné par la modification de la tyrosine 53. Le résidu tyrosine 53 est aussi retrouvée dans la fraction 16 (Tableau IV-XIV). En tenant compte de ces résultats, nous pensons que les résidus tryptophane en position 62 et 63 pourraient être réparés ou ne pas être modifiés.

Nous n'avons pas d'indications qui nous permettent de mettre en évidence des modifications au niveau du résidu tyrosine en position 20 ni des résidus tryptophane

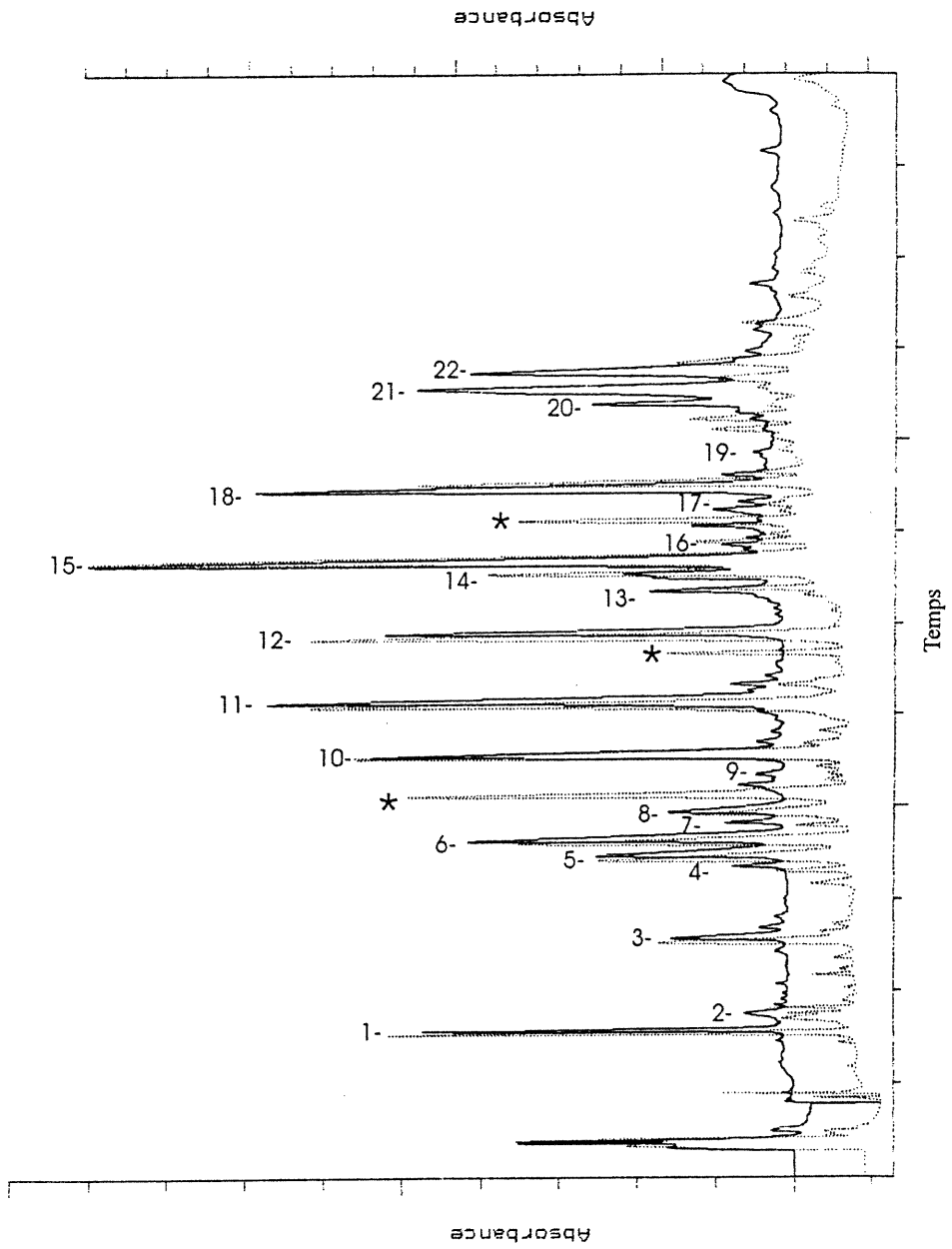


Figure VI-24

Séparations des fragments trypsiques du lysozyme de poule irradié

_____ *Lysozyme de poule non irradié*

..... *Lysozyme de poule irradié (1000 Gy)*

Les échantillons de lysozyme de blanc d'œuf de poule (1,4 x 10^{-4} M, tampon phosphate de potassium 10 mM, pH = 7,0, azoture de sodium 0,1M, sous protoxyde d'azote) ont été aminoéthylés puis séparés par CLHP en phase inversée. La détection des fragments a été faite à 214 nm.

TABLEAU IV-XIV

Modifications, suite à l'irradiation, dans les peptides trypsiques de fraction de lysozyme de poule

Les solutions de lysozyme ($1,4 \times 10^{-4}$ M, tampon phosphate de potassium 10 mM, pH = 7,0, azoture de sodium 0,1 M) irradiées sous protoxyde d'azote, ont été exposées à des doses croissantes de rayonnement ionisant ($I = 1$ Gy s^{-1}) Les observations ont été faites en comparant avec des séparations trypsiques de protéines qui n'ont pas été irradiées. Les fractions pour lesquelles les mesures n'ont pas été effectuées sont en grisées.

Numéro de référence suivant la figure 24	Séquence déterminée	Intensité de fluorescence maximale à 410 nm Excitation (λ_{325})	Intensité de fluorescence Excitation (λ_{380})
1	69-73		
2	74-76		
3	77-80		
4	2-5		
5	1-5		
6 (Y_{20})	15-21	Pas de signal	Pas de signal
7 (Y_{20})	14-21	Pas de signal	Pas de signal
8	6-13		
9	74-80		
10	34-45		
11 ($W_{62}W_{63}$)	62-68	Pas de signal	Pas de signal
12 ($W_{62}W_{63}$)	62-64	Pas de signal	Pas de signal
13 (W_{123})	7-13 et 115-125	Pas de signal	Pas de signal
14	81-94		
15 ($Y_{23}W_{28}$)	22-30	Faible signal	Pas de signal
16 ($Y_{53}W_{62}W_{63}$)	46-64	Faible signal	Pas de signal
17 ($Y_{23}W_{28}$)	22-33	N.D.	N.D.
18 ($Y_{20}Y_{23}W_{28}$)	15-30 et 15-33	Faible signal	Pas de signal
19 ($W_{108}W_{111}$)	81-112	N.D.	N.D.
20 ($W_{108}W_{111}$)	**97-114**	**Pas de signal**	**Signal (~460 nm)**
21 ($W_{108}W_{111}$)	**97-112**	**Pas de signal**	**Pas de signal**
22 ($W_{108}W_{111}$)	**98-112**	**Pas de signal**	**Signal (~510 nm)**

retrouvés aux positions 28, 62, 63 et 123. Ces observations indiquent cependant que les résidus tyrosine 23 et 53 ainsi que les résidus tryptophane 108 et/ou 111 sont modifiés suite à l'irradiation en présence de $N_3^{\bullet}$.

C.4-MECANISMES D'OXYDATION PAR $N_3^{\bullet}$ DANS L'EAU

A la lumière de l'ensemble des résultats, nous pouvons dresser un bilan des phénomènes reliés à l'oxydation des protéines par $N_3^{\bullet}$ en solution aqueuse à l'état liquide.

Nous savons que la première étape, qui conduit aux modifications observées, est l'attaque d'un résidu tryptophane se trouvant dans la protéine par le radical oxydant (réaction IV-3). Cette réaction, au cours de laquelle le site radicalaire est transféré, a été bien décrite avant ce travail (Bensasson *et al.*, 1993). Nous savons que ce transfert est quantitatif. Le rendement de formation de $N_3^{\bullet}$ est égal au rendement de formation du radical tyrosinyle dans les protéines.

Nous observons, en radiolyse pulsée, la disparition du radical tryptophanyle qui s'effectue au moment ou un radical tyrosinyle est produit (réactions IV-4 et IV-5). Ce transfert du site radicalaire n'est cependant pas quantitatif. Il est de l'ordre de 40% pour le lysozyme de blanc d'œuf de poule (Audette *et al.*, en préparation). D'autres mécanismes, comme IV-6 à IV-8, contribuent donc aussi à la disparition du radical tryptophanyle initial. Ainsi, des transferts de charge vers un autre résidu comme la tyrosine (Mishra *et al.*, 1994) ou le tryptophane (Imoto *et al.*, 1971) ont également été mentionnés. Le résidu accepteur peut se trouver soit sur la même chaîne polypeptidique soit sur une autre. Les mesures faites en radiolyse pulsée tendent à montrer qu'un mécanisme intramoléculaire est prédominant. Par contre, l'observation d'une augmentation des rendements de formation de certains produits, en radiolyse gamma, lorsque la concentration protéique est élevée laisse entendre que les réactions intermoléculaires sont effectives.

TABLEAU IV-XV

Réactions proposées:

$\mathbf{N_3^{\bullet} + TrpH\text{---}X\text{---}TyrOH \rightarrow Trp^{\bullet}\text{---}X\text{---}TyrOH + N_3^{-} + H^{+}}$	(IV-3)
$\mathbf{Trp^{\bullet}\text{---}X\text{---}TyrOH \leftrightarrow TrpH\text{---}X\text{---}TyrO^{\bullet}}$	(IV-4)
$(Trp^{\bullet}\text{---}X\text{---}TyrOH)_A + (TrpH\text{---}X\text{---}TyrOH)_B \rightarrow (TrpH\text{---}X\text{---}TyrOH)_A + (TrpH\text{---}X\text{---}TyrO^{\bullet})_B$	(IV-5)
$\mathbf{Trp^{\bullet}\text{---}X\text{---}TyrOH \leftrightarrow TrpH\text{---}X^{\bullet}\text{---}TyrOH}$	(IV-6)
$(Trp^{\bullet}\text{---}X\text{---}TyrOH)_A + (TrpH\text{---}X\text{---}TyrOH)_B \rightarrow (TrpH\text{---}X\text{---}TyrOH)_A + (Trp\text{---}X^{\bullet}\text{---}TyrOH)_B$	(IV-7)
$Trp^{\bullet}\text{---}X\text{---}TyrOH + Trp^{\bullet}\text{---}X\text{---}TyrOH \rightarrow TrpH\text{---}X\text{---}TyrOH + TrpOH\text{---}X\text{---}TyrOH$	(IV-8)
$\mathbf{TrpH\text{---}X\text{---}TyrO^{\bullet} + TrpH\text{---}X\text{---}TyrO \rightarrow TrpH\text{---}X\text{---}Tyr\text{-}Tyr\text{---}X\text{---}TrpH}$	(IV-9)
$TrpH\text{---}X\text{---}TyrO^{\bullet} + TrpH\text{---}X\text{---}TyrO^{\bullet} \rightarrow TrpH\text{---}X\text{---}TyrOH + TrpH\text{---}X\text{---}Tyr(oxydée)$	(IV-10)
$TrpH\text{---}X^{\bullet}\text{---}TyrOH + TrpH\text{---}X^{\bullet}\text{---}TyrOH \rightarrow TrpH\text{---}X(oxydé)\text{---}TyrOH + TrpH\text{---}X\text{---}TyrOH$	(IV-11)
$TrpH\text{---}X^{\bullet}\text{---}TyrOH + TrpH\text{---}X\text{---}TyrO^{\bullet} \rightarrow TrpH\text{---}X(oxydé)\text{---}TyrOH + TrpH\text{---}X\text{---}TyrOH$	(IV-12)
$TrpH\text{---}X^{\bullet}\text{---}TyrOH + TrpH\text{---}X\text{---}TyrO^{\bullet} \rightarrow TrpH\text{---}X\text{---}TyrOH + TrpH\text{---}X\text{---}Tyr(oxydée)$	(IV-13)
$TrpH\text{---}X^{\bullet}\text{---}TyrOH + Trp^{\bullet}\text{---}X\text{---}TyrOH \rightarrow TrpH\text{---}X(oxydé)\text{---}TyrOH + TrpH\text{---}X\text{---}TyrOH$	(IV-14)
$TrpH\text{---}X^{\bullet}\text{---}TyrOH + Trp^{\bullet}\text{---}X\text{---}TyrOH \rightarrow TrpH\text{---}X\text{---}TyrOH + Trp(oxydé)\text{---}X\text{---}TyrOH$	(IV-15)
$TrpH\text{---}X\text{---}TyrO^{\bullet} + Trp^{\bullet}\text{---}X\text{---}TyrOH \rightarrow TrpH\text{---}X\text{---}Tyr(oxydée) + TrpH\text{---}X\text{---}TyrOH$	(IV-16)
$TrpH\text{---}X\text{---}TyrO^{\bullet} + Trp^{\bullet}\text{---}X\text{---}TyrOH \rightarrow TrpH\text{---}X\text{---}TyrOH + Trp(oxydé)\text{---}X\text{---}TyrOH$	(IV-17)
$N_3^{\bullet} + TrpH\text{---}X\text{---}TyrO^{\bullet} \rightarrow TrpH\text{---}X\text{---}TyrO(oxydée)$	(IV-18)
$N_3^{\bullet} + TrpH\text{---}X^{\bullet}\text{---}TyrOH \rightarrow TrpH\text{---}X(oxydé)\text{---}TyrOH$	(IV-19)
$N_3^{\bullet} + Trp^{\bullet}\text{---}X\text{---}TyrOH \rightarrow Trp(oxydé)\text{---}X\text{---}TyrOH$	(IV-20)
$TrpOH\text{---}X\text{---}TyrOH + N_3^{\bullet} \rightarrow TrpO^{\bullet}\text{---}X\text{---}TyrOH + N_3H$	(IV-21)
$TrpOH\text{---}X\text{---}TyrOH + Trp^{\bullet}\text{---}X\text{---}TyrOH \rightarrow TrpO^{\bullet}\text{---}X\text{---}TyrOH + TrpH\text{---}X\text{---}TyrOH$	(IV-22)
$TrpOH\text{---}X\text{---}TyrOH + TrpH\text{---}X^{\bullet}\text{---}TyrOH \rightarrow TrpO^{\bullet}\text{---}X\text{---}TyrOH + TrpH\text{---}X\text{---}TyrOH$	(IV-23)
$TrpOH\text{---}X\text{---}TyrOH + TrpH\text{---}X\text{---}TyrO^{\bullet} \rightarrow TrpO^{\bullet}\text{---}X\text{---}TyrOH + TrpH\text{---}X\text{---}TyrOH$	(IV-24)
$TrpO^{\bullet}\text{---}X\text{---}TyrOH + TrpO^{\bullet}\text{---}X\text{---}TyrOH \rightarrow NFK\text{---}X\text{---}TyrOH + TrpOH\text{---}X\text{---}TyrOH$	(IV-25)
$\mathbf{TrpH\text{---}X^{\bullet}\text{---}TyrOH \rightarrow fragmentation}$	(IV-26)

La rencontre de deux radicaux tryptophanyle pourrait aussi entraîner la disparition de certains sites radicalaires initiaux. Une réaction de dismutation peut donc être évoquée (réaction IV-8).

Dans les limites de la création d'un site radicalaire primaire par protéine, localisé sur un résidu tryptophane, de nombreuses réactions peuvent se produire. Nous avons vu que la nature du radical oxydant, le débit de dose, la concentration des réactifs, la température lors de l'irradiation et les différents niveaux d'organisation structurales (notamment les structures primaire et tertiaire) des protéines sont autant de paramètres qui influencent la contribution de chacune.

On peut s'attendre à ce qu'une partie des radicaux tyrosinyle, qui ont été crées dans les protéines, réagissent ensemble pour former des ponts de bityrosine (Hashimoto *et al.*, 1981; Bobrowski *et al.*, 1997). Cette réaction conduit à la polymérisation. Nous avons aussi observé des dimérisations qui présentent toutes les caractéristiques de la formation de ponts de bityrosine. Au moins une partie des dimérisation observées sont le résultat de la réaction IV-9.

En irradiant plusieurs espèces de lysozyme, nous avons aussi remarqué que plus la teneur en résidus tyrosine est élevée, plus les rendements de condensation ont tendance à augmenter. Des paramètres conformationnels régissent forcément les possibilités de dimérisation. Ainsi le lysozyme de dinde, qui contient un résidu tyrosine en plus que celui de la poule, présente le même rendement de dimérisation. Nous avons aussi remarqué que les taux de dimérisation sont supérieurs lorsque le débit de dose passe de 1 (en radiolyse gamma) à 10^7 (en régime pulsé) Gy s^{-1}. La vitesse à laquelle s'effectue la dimérisation est donc inférieure à celles d'autres réactions.

Les rendements de dimérisation que nous observons sont faibles. Ainsi, d'autres produits d'oxydation sont manifestement générés. La formation de DOPA (Gieseg, *et al.*, 1993), par exemple, pourrait être l'un d'entre eux (réaction IV-10) (Prütz *et al.*, 1983). Nous avons aussi mis en évidence la présence de résidus tryptophane oxydés. Les produits d'oxydation du tryptophane, et en particulier, le N-formylkinurénine correspond à une oxydation à 4 électrons. Des mécanismes ont été proposés pour la

photo-oxydation du tryptophane (Sun et Zigman, 1978; Pileni *et al.*, 1979). En radiolyse, le mécanisme pourrait inclure une ou plusieurs des réactions IV-21 à IV-24 suivi par IV-25.

Du fait que nous retrouvons un site de fragmentation, nous ne pouvons pas exclure la présence d'un site radicalaire ailleurs que sur les résidus tyrosine et tryptophane. Ainsi, les réactions ou le résidu accepteur est symbolisé par un X (IV-6, IV-7, IV-11, IV-12, IV-13, IV-14, IV-15, IV-19, IV-23 et IV-26) se doivent d'être proposées. Nous ne sommes pas en mesure de dire si la fragmentation s'effectue à l'endroit du site radicalaire ou si elle serait reliée, par exemple, à des changements conformationnels qui faciliterait l'hydrolyse de ce site.

Les rendements de fragmentation varient beaucoup avec l'espèce. Ils semblent dépendre à la fois de la séquence et de la structure tertiaire. Soulignons que la température contribue à augmenter les rendements de fragmentation et de dimérisation. Nous remarquons que les rendement de dimérisation et de fragmentation ne varient pas de façon proportionnelle. La dimérisation est plus sensible au changement conformationnel qui s'effectue dans le lysozyme en solution entre 20 et 30°C.

L'influence de la nature du radical oxydant est illustré par les différences dans les rendements de dimérisation dans les lysozymes de poule et de dinde lors de l'oxydation par le radical hydroxyle alors qu'ils sont équivalent quand $N_3^{\bullet}$ est employé. Nous proposons un mécanisme par lequel $HO^{\bullet}$ peut accroître le rendement de dimérisation relativement à $N_3^{\bullet}$. $HO^{\bullet}$ pourrait bien être en mesure de créer un site radicalaire localisé sur le résidu tyrosine en position 3 alors que $N_3^{\bullet}$ en serait incapable. Il suffit d'imaginer une attaque de $HO^{\bullet}$ sur la tyrosine 3 ou sur un acide aminé permettant un transfert de charge vers la tyrosine 3 alors que les résidus oxydés par $N_3^{\bullet}$ ne le permettent pas.

Partie V
Conclusions et perspectives

V-Conclusions et perspectives

Dans le cadre de l'étude de modifications radio-induites dans les protéines, nous nous étions fixé comme objectif de caractériser les mécanismes prédominants, en solution aqueuse, qui conduisent à des altérations de chaînes polypeptidiques. Nous avons vu que l'état de la phase de l'eau, liquide ou gelée, influence considérablement les rendements de fragmentation et de polymérisation. En effet, à dose égale, la chaîne polypeptidique est au moins vingt fois plus lésée en solution liquide. Il en est de même pour les rendements de diminution de l'activité biologique. Des mécanismes impliquant des entités radicalaires distinctes sont à l'origine des différences observées.

L'irradiation de protéines dans la glace, à –78°C, induit des coupures au niveau de la chaîne polypeptidique. Tous les sites privilégiés de clivage, qui ont été identifiés avec précision, sont localisés à la surface des protéines. Ces derniers se retrouvent principalement dans les boucles et les retours de chaînes mais toujours dans des lieux accessibles au solvant. Nous avons également démontré que les changements conformationnels qui affectent significativement la proportion de surface présentée au solvant, par rapport au volume, influence la susceptibilité à la fragmentation. Ainsi, pour une protéine donnée, une conformation plus ouverte multiplie la fréquence des événements de fragmentation. L'ensemble de nos résultats indiquent que la fragmentation est un phénomène de surface.

Nous avons formulé l'hypothèse que seules les interactions primaires qui ont lieu très près ou à la surface de la protéine peuvent induire la fragmentation. Nous soupçonnons l'eau d'être impliquée dans les mécanismes de fragmentation radio-induite. Les rendements de fragmentation et d'inactivation ne sont cependant pas sensibles à la présence du solvant sous forme de phase continue à cette température. En effet, dans un environnement constitué principalement de sels, mais où l'eau de constitution est présente, les rendements sont les mêmes qu'en solution diluée. Nous pouvons alors envisager l'exclusion d'une contribution significative de l'effet indirect de la radiolyse du solvant. Notons, cependant, que les électrons contribuent à augmenter la susceptibilité de la chaîne polypeptidique à la fragmentation. Les modifications seraient dues aux électrons éjectés par l'interaction du rayonnement ionisant avec les protéines elles-mêmes.

Pour tenter d'établir l'origine, en terme d'effet direct ou indirect, de la fragmentation radio-induite, nous avons contacté M. Vincent Cobut, de l'Université Cergy-Pontoise. Avec son aide, nous avons imaginé une simulation, par la méthode Monté-Carlo, dont le but sera de reproduire nos résultats expérimentaux. Elle nous permettra de quantifier l'apport des effets direct et indirect. Une approche expérimentale, pour mesurer l'apport relatif des effets direct et indirect, impliquerait d'exclure totalement l'eau. Le grand défi qui doit alors être surmonté est de préserver la structure tridimensionnelle de la protéine étudiée.

Nous devons encore explorer si la fragmentation que nous observons s'effectue à –78°C ou si elle se produit lors du réchauffement des échantillons, voire au moment de l'hydratation de ces derniers lorsqu'ils sont exposés aux rayonnement ionisant sous forme de poudre lyophilisée. Des expériences de RPE, qui offrent la possibilité d'explorer un intervalle de température assez important, pourraient alors nous être d'un grand secours. L'identification et le suivi du devenir de radicaux stables lorsque la température est élevée progressivement pourrait aider à élucider les processus sous-jacents à la fragmentation.

En solution aqueuse liquide, en plus de la fragmentation, la polymérisation s'avère une conséquence importante de l'irradiation de protéines. Contrairement à ce qui a été observé en solution gelée, dans les solutions liquides diluées, l'effet indirect est prédominant. Nous avons observé que la dimérisation et certaines fragmentations sont dues à des processus oxydatifs. Leurs rendements dépendent du radical oxydant ainsi que de la protéine. Pour une protéine donnée, des changements structuraux induisent des variations dans les rendements de dimérisation et de fragmentation.

Nous avons montré que seule une petite fraction des radicaux oxydants conduit à des réarrangements de la chaîne polypeptidique. L'existence de plusieurs produits qui n'altèrent pas la chaîne polypeptidique, comme des modifications dans les chaînes latérales de certains acides aminés, ne fait aucun doute. L'oxydation de résidus tryptophane illustre bien ces phénomènes.

De façon à limiter l'éventail des possibilités de réactions d'oxydation, nous avons employé le radical $N_3^{\bullet}$ en substitution au radical hydroxyle. L'exposition de protéines au radical $N_3^{\bullet}$conduit à la création de radicaux tryptophanyle dans les protéines. Ces derniers entraînent, entre autres, la formation de résidus tryptophane oxydés (par exemple W_{108} et/ou W_{111} du

lysozyme de blanc d'œuf de poule). Il induit l'oxydation de résidus tyrosine (vraisemblablement comme Y_{23} et Y_{53} du lysozyme de blanc d'œuf de poule). Une manifestation de cette oxydation est la dimérisation par formation de ponts de bityrosine. Ils contribuent également à la fragmentation de la chaîne polypeptidique (notamment le lien peptidique N_{103}-G_{104} des lysozymes de blanc d'œuf de poule et de dinde). Tous les résidus tryptophane et tyrosine ne semblent pas intervenir de façon équivalente dans ces processus. Certains d'entre eux ne semblent pas modifiés. Ils peuvent donc être épargnés ou alors être réparés. Citons par exemple, Y_3 du lysozyme de blanc d'œuf de dinde. La fragmentation, quant à elle, dépend de la séquence mais aussi de sa position dans la structure tertiaire des protéines. Le site localisé, dans deux protéines, est situé à la surface de la protéine.

Depuis environ trente ans, on s'interroge sur les phénomènes de transfert intramoléculaire de charge, qui s'effectuent sur de longues distances, dans les protéines (Klapper et Faraggi, 1979; Farraggi et Bettelheim, 1977). Jusqu'à présent, toutes les données expérimentales dont nous disposons avaient été obtenues par radiolyse pulsée. Notre travail montre pour la première fois que ces données sont très incomplètes. Des transferts de charge du radical tryptophanyle vers un autre résidu que la tyrosine n'avaient jamais été observés (Weinstein *et al.*, 1991). De même nous pouvons isoler pour la première fois des sites réactifs en localisant des acides aminés altérés.

Certains schémas réactionnels ont pu être proposés pour décrire l'ensemble des observations. Pour compléter le tableau des processus radio-induits dans des solutions aqueuses (liquide) de protéines nous devons encore déterminer si d'autres type de dimérisation, que la formation de pont de bityrosine, sont envisageables. Nous souhaitons, entre autres, savoir si les dimérisations observées se produisent entre des résidus homologues. Nous voulons également approfondir les mécanismes de clivages spécifiques entre les résidus asparagine et glycine (Bornstein et Balian, 1977; Inglis *et al.*, 1980; Asward, 1990) et caractériser plus précisément les modifications induites dans les résidus tryptophane et tyrosine à l'aide de leurs propriétés d'absorbance et de fluorescence.

Nous savions que les réactions radicalaires dans les protéines ont un déroulement complexe, affecté non seulement par la thermodynamique des réactions, mais également par la structure primaire, secondaire et tertiaire qui jouent un rôle encore non compris dans le contrôle cinétique des réactions. Nos résultats qui montrent la localisation des sites oxydés, apportent

des bases expérimentales pour des modélisations et peuvent servir à l'élaboration de données théoriques qui permettront de comprendre les processus qui font intervenir des étapes intramoléculaires de transfert d'électrons dans les protéines. Notre étude pourra aussi aider à prédire la formation de certains types de produits radio-induits et à l'identification des dérivés protéiques qui interviennent, par exemple, dans la signalisation intracellulaire.

Partie VI
Bibliographie

VI-Bibliographie

Abola, E. E., Bernstein, F. C., Bryant, S. H., Koetzle, T. F. and Weng, J. (1987) "Protein Data Bank" in Crystallographic Databases-Information Content, Software Systems, Scientific Applications. Allan, F. H., Bergerhoff, G. and Sievers, R. (eds). Data Commission of the Born/ Cambridge/ Chester. pp. 107-132

Adams, G. E., Redpath, J. L., Bisby, R. H. and Cundall, R. B. (1972) *Israel J. Chem.*, **10** : 1079

Adams, G. E. and Willson, R. L. (1969) *Trans. Far. Soc.*, **65** : 2981-2983

Adams, G. E., Willson, R. L., Aldrich, J. E. and Cundall, R. B. (1969) *Int. J. Radiat. Biol.*, **16** : 333-342

Aldrich, J. E. and Cundall, R. B. (1969) *Int. J. Radiat. Biol.*, **16** : 343-358

Alfassi, Z. B. (1987) *Radiat. Phys. Chem.*, **29**: 405-406

Allen, G (1989) Sequencing of proteins and peptides 2nd edition in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Burdon, R. H. and Knippenberg, P. H. editors, Amsterdam (Chapter 3: Specific cleavage of protein).

Anbar, M., Bambenek, M. and Ross, A. B. (1973) *Natl. Stand. Ref. Data Ser., Natl. Bur. Stand.*, **43**

Andersen, S. O. (1963) *Biochim. Biophys. Acta*, **69** : 249

Andersen, S. O. (1964) *Biochim. Biophys. Acta*, **93** : 213

Andersen, S. O. (1966) *Acta Physiol. Scand.*, **66**, Suppl., 263

Artymiuk, P. J. and Blake, C. C. F. (1981) *J. Mol. Biol.*, **152**: 737-762

Aschaffenburg, R., Blake, C. C. F., Dickie, H. M., Gayen, S. K., Keegan, R. and Sen, A. (1980) *Biochim. Biophys. Acta*, **625**: 64-71

Asward, D. W. (1990) Enzyme Engineering, Annals of New-York Academy of Sciences, vol. 613, edited by Hirosuke Okada, Atsuo Tanaka and Harvey W. Blanch, The New-York Academy of Sciences, New-York.

Bartik, K., Dobson, C. M. and Redfield, C. (1993) *Eur. J. Biochem.*, **215** : 255-266

Beauregard, G., Maret, A., Salvayre, R. and Potier, M. (1987) *Meth. Anal.*, **32** : 313-343

Beauregard, G., Tauvette, L. and Potier, M. (1987) in Lipid Storage Disorders II : Biological and Medical spects (Salvayre, R., Douste-Blazy, L. and Gatt, S., Eds.) NATO ASI Series, Plenum Press, New-York, pp. 487-497

Bensasson, R. V., Land, E. J. and Truscott, T. G. (1993) Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine, Oxford Science publications.

Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J. B., Meyer, E. F., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimarushi, T. and Tasumi, M. (1967) *J. Mol. Biol.*, **112**: 535-542

Bielski, B. H. J. (1978) *Photochem. Photobiol.*, **28** : 645-647

Bielski, B. H. J., Cabell, D. and Arudi, R. L. (1985) *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **14**: 1041-1098

Bisby, R. H., Cundall, R. B., Movassaghi, S., Adams, G. E., Posener, M. L. and Wardman, P. (1982) *Int. J. Radiat. Biol.*, **42** : 163-171

Blake, C. C. F., Koening, D. F., Mair, G. A., North, A. C. T., Phillips, D. C. and Sarma, V. R. (1965) *Nature*, **206**: 757-761

Bobrowski, K., Holcman, J., Poznanski, J. and Wierzchowski, K. L. (1997) *Biophys. Chem.*, **63** : 153-166

Bobrowski, K., Holcman, J. and Wierzchowski, K. L. (1989) *Free Rad. Res. Commun.*, **6**: 235-241

Bobrowski, K., Wierzchowski, K. L., Holcman, J. and Ciurak, M. (1990) *Intl. J. Radiat. Biol.*, **57** : 919-932.

Boguta, G. and Dancewicz, A. M. (1979) *Studia Biophys.*, **73**: 149-156

Boguta, G. and Dancewicz, A. M. (1981) *Int. J. Radiat. Biol.*, **39**: 163-174

Boguta, G. and Dancewicz, A. M. (1983) *Int. J. Radiat. Biol.*, **43**: 249-265

Bornstein, P. and Balian G. (1977) Selective clivage by Chemical Methods in Methods in Enzymology edited by C. H. W. Hirs, Academic Press, New York, pp 132-145

Braams, R. (1967) *Radiat. Res.*, **31**: 8-26

Braams, R. and Ebert, M. (1967) *Int. J. Radiat. Biol.*, **13** : 195-197

Braams, R. and Ebert, M. (1968) The influence of changes in conformation of a macromolecule on reaction rates, In Radiation Chemistry vol.1, Americain chemical society publications pp. 465-471

Brodsky, A. (1978) in CRC Handbook of Radiation Measurements and Protection, Section A (ed. A. B. Brodsky), CRC Press, West Palm Beach, Fl., pp. 229-265

Brown, D. M. et Dainton, F. S. (1968) *Radiat. Res. Rev.*, **1** p. 241

Butler, J., Land, E. J., Prütz, W. A. and Swallow, A. J. (1982) *Biochim. Biophys. Acta,* **705** : 150-162

Butler, J., Land, E. J, Swallow, A. J. and Prutz, W. (1984) *Radiat. Phys. Chem.*, **23** : 265-270

Buxton, G. V. in Farhataziz and Rodgers, M. A. J. (1987) Radiation Chemistry, Principles and Applications, VCH Publishers, New-York, pp. 321-349

Buxton, G. V., Greenstock, C. L., Helman, W. P. and Ross, A. B. (1988) *J. Phys. Chem. Ref. Data,* **17** : 513-750

Canfield, R. E. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238** : 2698

Colowick, S. P. and Kaplan, N. O. (1977) Methods in enzymology, vol XLVII, Enzyme structure part E, edited by C. H. W. Hirs and Serge N. Timasheff, Academic Press, London.

Cozzone, P. J., Opellla, S. J., Jardetzky, O., Berthou, J. and Jollès, P. (1975) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**: 2095-2098

Cudic, M., Dendane, M., Houée-Levin, C. and Ducrocq, C., soumis pour publication

Czapski, G. (1984) *J. Chem.*, **24** : 29-32

Daniels, M. and Wigg, E. E. (1969) *J. Phys. Chem.*, **73** : 3703; Daniels, ibid., 3710

Das, D., Bandyopadhyay, D., Bhattacharjee, M. and Banerjee, R. K. (1997*) Free Radical Biol. Med.,* **23**: 8-18

Davies, K. J. A. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262** : 9895-9901

Davies, K. J. A. and Delsignore, M. E. (1987) *J. Biol. Chem.,* **262** : 9908-9913

Davies, K. J. A., Delsignore, M. E. and Lin, S. W. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262** : 9902-9907

Dean R.T., Fu, S., Stocker, R. and Davis, M. J. (1997) *Biochem. J.,* **324** (Pt 1) : 1-18

DeFelippis, M. R., Faraggi, M. and Klapper, M. H. (1990) *J. Phys. Chem.*, **94** : 2420-2424

DeFelippis, M. R., Faraggi, M. and Klapper, M. H. (1990A) *J. Am. Chem., Soc.,*. **112** : 5640-5642

Diamond, R. (1974) *J. Mol. Biol.*, **82**: 371-391

Dorfman, L. M. and Adams, G. E. (1973) Reactivity of the Hydroxyl Radical in Aqueous Solutions, National Standards References Series **46**, National Bureau of Standards, Washington, D.C.

Edman, P. and Begg, G. (1967) *Eur. J. Biochem.*, **1** : 80-91

Edman, P. and Henschen, A. (1975) In : Protein Sequence Determination (Needleman, S.B., ed.), New York, pp. 232-279.

Eiserich, J. P., Butler, J., Van Der Vliet, A., Cross, C. E. and Halliwell, B. (1995) *Biochem. J.*, **310**: 745-749

Eng, C. M., Resnick-Silverman, L. A., Niehaus, D. J., Astrin, K. H. and Desnick, R. J. (1993) *Am. J. Hum. Genet.*, **6**: 1186-1197

Ershov, B. G. and Pikaev, A. K. (1968) Stabilisation of électron in low température radiolysis of polar systems In Radiation Chemistry, American chemical society publications, pp. 1-24

Evans, R. D. (1969) Radiation Dosimetry, Second Edition (eds. F. H. Attix, W. C. Roesch and E. Tochilin) Academic Press, New York, vol 3.

Faraggi, M. and Bettelheim, A. (1977) *Radiat. Res.*, **71** : 311-324

Faraggi, M., DeFelippis, M. R. and Klapper, M. H. (1989) *J. Am. Chem. Soc.*, **111** : 5141-5145

Faraggi, M. and Houée-Levin, C. (1999) *J. Chim. Phys.*, **96** : 71-84

Faraggi, M., Zehavi, D. and Anbar, M. (1971) *Trans. Faraday Soc.*, **67** : 701

Farataziz and Rodgers, M. A. J. (1987) Radiation Chemistry : Principles and Applications, VCH Publishers Inc., New-York.

Farhataziz and Ross, A. B. (1977), Selected specific rates of reactions of transient from water in aqueous solution, III, Hydroxyl radical and perhydroxyl radical and their radical

anions. Nat. Stand. Ref. Data, Nat. Bur. Stand. (U. S.) (Washington : U. S. Government Printing Office)

Favaudron, V., Tourbez, H., Houée-Levin, C. and Lhoste, J.-M. (1990) *Biochemistry,* **29** : 10978-10989

Ferradini, C. et Pucheault, J. (1983) Biologie de l'action des rayonnements ionisants, Masson , Paris.

Filali-Mouhim, A., Audette, M., St-Louis, M., Tauvette, L., Denoroy, L., Penin, F., Chen, X., Rouleau, N., LeCaer, J. P., Rossier, J., Potier, M. and le Maire, M. (1997) *Int. J. Radiat. Biol.*, **72**: 63-70

Franzini, E., Sellak, H., Hakim, J. and Pasquier, C. (1993) *Biochim. et Biophys. Acta*, **1203** : 11-17

Freeman, B. A. and Crapo, J. D. (1982) *Lab. Invest.*, **47** : 412-426

Fucci, L., Oliver, C. N., Coon, M. J. and Stadtman, E. R. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **50** : 1521-1525

Garrison, W. M. (1986) *Curr. Top. Radiat. Res.*, **4** : 43-94

Garrison, W. M. (1987) *Chem. Rev.*, **87** : 381-398

Garrison, W. M., Jayko, M. E. and Bennet, W. (1962) *Radiat. Res.,* **16** : 483-502

Gee, C. A., Kittridge, K. J. and Willson, R. L. (1985) *Br. J. Radiol.*, **58** : 251-256

Geiner, D. P., Hughes, K. A. and Meares, C. F. (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **225**: 1006-1008

Gieseg, S. P., Simpson, J. A., Charlton, T.S., Duncan, M. W. and Dean, R. T. (1993) *Biochemistry*, **32**: 4780-4786

Goulet, T., Jay-Gerin, J. P., Frongillo, Y., Cobut, V. et Fraser, M. J. (1996) *J. Chim. Phys.*, **93** : 111-116

Gross A. J. and Sizer, I. W. (1959) *J. Biol. Chem.*, **234** : 1611

Grune, T. and Davis K. J. (1997) *Biofactors*, **6** : 165-172

Gutteridge, J. M. C. and Wilkins, S. J. (1983) *Biochim. Biophys. Acta.*, **759** : 38-41

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1984) *Biochem. J.,* **219** : 1-14

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1986) *Arch. Biochem . Biophys.*, **246** : 501-514

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1986A) Free radicals in biology and medicine, Oxford University Press, New-York.

Hart, E. J. and Anbar, M. (1970) Reaction with constituents of biological systems, In The hydrated electron, Wiley-Interscience, New-york, pp. 157-169

Hashimoto, S., Kira, A., Imamura, M. and Kondo, M. (1981) *Int. J. Radiat. Biol.*, **40** : 31-46

Hashimoto, S., Kira, A., Imamura, M. and Masuda, T. (1982) *Int. J. Radiat. Biol.*, **41** : 303-314

Haycock, J. W., MacNeil, S., Jones, P., Harris, J. B. and Mantle, D. (1996) *Neuroreport,* **8**: 357-361

Hicks, M., Gebicki, J. M. (1986) *FEBS Lett.*, **199** : 92-94

Hoffman, M. Z. and Hayon, E. (1975) *J. Phys. Chem.*, **79** :1362-1369

Holroyd, R. A. in Farhataziz and Rodgers, M. A. J. (1987) Radiation Chemistry, Principles and Applications, VCH Publishers, New-York, pp. 201-235

Houée-Levin, C. (1994) *J. Chim. Phys.*, **91**: 1107-1120

Hubbell, J. H. (1982) *Int. J. Appl. Radiat. Isotopes*, **33**: 1269-1290

Huie, R. E. (1994) *Toxicilogy,* **89** : 194-216

Ignatenko, A. V., Cherenkevich, S. N. and Komyak, A. I. (1984) Translated from *Zhurnal Prikladnoi Specktroskopii*, **41**: 83-87

Imoto, T., Forster, L. S., Rupley, J. A. and Tanaka, F. (1971) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **69**: 1151-1155

Inglis, A., McKern, N., Roxburgh, C. and Stricke, P. (1980) In: Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis. (Birr, C., ed.), pp.329-343. Elsevier / North-Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Jackson, J. H., Vollenweider, M., Hill, J., Robriguez, H., Schwabacher, A.W., Mitra, G. and Kuo, C. Y. (1997) *Oncogene,* **14**: 2803-2808

Jacob, J. S., Cistola D. P., Hsu F. F., Muzaffar S., Mueller D. M., Hazen S. L. and Heinecke, J. W. (1996) *J. Biol. Chem.*, **271**: 19950-19956

Jacobson, R. H. and Matthews, B. W. (1992) *J. Mol. Biol.*, **223** : 1177-1182

Jacobson, R. H., Zhang, X., Dubose, R. F. and Matthews, B. W. (1994) *Nature,* **369** : 761-766

Jollès, J., Jollès P. (1971) *Helv. Chim. Acta*, **54**: 2668-2675

Jollès J., Sen, A., Prager, E. M. and Jollès P. (1977) *J. Mol. Evol.*, **10**: 261-264

Jollès P. (1985) Communication personnelle

Jollès, P., Charlemagne, D., Petit, J. F., Maire, A. C. et Jolles, J. (1965) *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **47** (12) : 2241-2253

Jollès, P. and Jollès, J. (1984) *Mol. and Cell. Biochem.*, **63**: 165-189

Jones, G. D., Lea, J. S., Symons, C. R. and Taiwo, F. A. (1987) *Nature*, **330** : 773-774

Kempner, E. S. (1993) *Quart. Rev. Biophys.*, **26**: 27-48

Kepner, G. R. and Macey, R. I. (1968) *Biochim. Biophys. Acta,* **163** : 188-203

Kevan, L. (1968) Radiation chemistry of frozen aqueous solutions. In Radiation Chemistry of Aqueous Systems, ed. G. Stein (Jerusalem: Weizmann Science Press), pp. 21-71

Kevan, L. (1969) dans Actions Chimiques et Biologiques des Radiations (ed. M. Haïssinsky), vol. 13, Masson, Paris, chap. 2.

Kieffer, F. (1982) in Study of Fast Processes and Transient Species by Electron Pulse Radiolysis (eds. J.H. Baxendale and F. Busi) Reidel, Dordrecht: p. 363

Kim. S. and Barry, B. A. (1998) *Biophys. J.*, **74** : 2588-2600

Klapper, M. H. and Faraggi, M. (1979) *Quart. Rev. Biophys.*, **12** : 465-519

Konev, S. V. (1967) in Fluorescence and Phosphorescence of Protein and Nucleic Acid (Plenum, New York, N. Y.) chapter 3.

Krisch, R. E., Flick, M. B. and Trumbore, C. N. (1991) *Radiat. Res.,* **126** : 251-259

Kronman, M. J. and Holmes, L. G. (1971) *Photochem. Photobiol.*, **14** : 113-134

Kuwajima, K. (1989) *Protein- Struct. Funct. Genet.*, **6**: 87-103

Laemmli, U. K. (1970) *Nature,* **227** : 680-685

Langlois, R., Ali, H. and van Lier, J. E. (1993) *J. Chim. Phys.*, **90** : 985-999

La Rue, J. N., Speck, J. C. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**: 1985-1991

Lea, D. E. (1955) Action of Radiations on Living Cells, 2nd edn., pp. 69-99, Cambridge University Press, Cambridge.

Lee, H., Faraggi, M. and Klapper, M. H. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1159** : 386-294

Leeuwenburgh C., Hansen P., Shaish A., Holloszy J. O. and Heinecke, J. W. (1998) *Amer. J. Physiol.*, **274** (2 Pt 2) : R453-461

Lehninger, A. L. (1982) Principe de Biochimie, Worth Publisher Inc., New York.

Lehrer S. S., and Fasman, G. D. (1967) *Biochemistry, N. Y.*, **6**: 757-767

le Maire, M., Ghazi, A., Moller, J. V. and Aggerbeck, L. P. (1987) *Biochem. J.*, **247** : 399-404

le Maire, M. and Rivas, E. (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, **722** : 150-157

le Maire, M., Thauvette, L., deForesta, B., Viel, A., Beauregard, G. and Potier, M. (1990) *Biochem. J.*, **267** : 431-439

le Maire, M., Viel, A. and Moller, J. V. (1989) *Anal. Biochem.*, **177** : 50-56

Levitzki, A. and Anbar, M. (1967) *J. Am. Chem. Soc.*, **89** : 4185-4189

Li, P. H., Dietz R. and von Harsdorf, R. (1997) *Circulation,* **96**: 3602-3609

Ma, C. and Barry, B. A. (1996) *Biophys. J.*, **71** : 1961-1972

Matsudaira, P. (1987) *J. Biol. Chem.*, **262**: 10035-10038

Matthews, R. W. and Sangster, D. F. (1965) *J. Phys. Chem.*, **69**: 1938-1940

Milam S. B., Zardeneta G. and Schmitz J. P. (1998) *J. Oral Maxillofac. Surg.*, **56**: 214-223

Mishra, A. K., Chandrasekar, R., Faraggi, M. and Klapper, M. H. (1994) *J. Am. Chem. Soc.*, **116** : 1414-1422

Mönig, J., Chapman, R. and Asmus, K. D. (1985) *J. Phys. Chem.*, **89** : 3139-3144

Moss, T., Dimitrov, S. I. and Houde, D. (1997)"UV- laser crosslinking of proteins to DNA" In Methods: a compagnion to Methods in Enzymology, **11**: 225-234

Mullazzani, Q. G., d'Angelantonio, M., Venturi, M., Hoffman, M. Z. and Rodgers, M. A. J. (1986) *J. Am. Chem. Soc.*, **90** : 5347-5352

Multhaup, G., Schlicksupp, A., Hesse, L., Beher, D., Ruppert, T., Masters, C. L. and Beyreuther, K. (1996) *Science,* **271**: 1406-1409

Neilsson, G. and Christensen, H. C. (1968) Pulse Radiolysis of Ice and Frozen HF Solutions. In Radiation Chemistry, ed. American chemical society publications, pp. 71-78

Orr, C. M. W. (1967) *Biochemistry,* **6** : 3000-3006

Pacifici, R. E. and Davies, K. J. A. (1990) *Methods Enzymol.*, **186**: 485-502

Parkinson, D. (1987) Effect of Buffers on Target-Size Analysis in Target-Size Analysis of Membrane Proteins, ed. Alan R. Liss, Inc, (New-York) pp. 43-49

Pileni, M.-P., Walrant, P. and Santus, R. (1979) *J. Phys. Chem.*, **80**: 1804-1809

Potier, M., Audette, M., Chen, C. and Filali-Mouhim, A. (1995) *Cahiers de radiobiologie*, **2**, décembre 1995

Potier, M., Thauvette, L., Michaud, L., Éiroux, S. and Beauregard, G. (1991), *Biochemistry,* **30** : 8151-8157

Potier, M., Villemure, J.-F. and Thauvette, L. (1994) *Biochem. J.*, **298** : 571-574

Prütz, W. A., Butler, J. and Land, E. J. (1983) *Int. J. Radiat. Biol.*, **44**: 183-196

Prütz, W. A., Butler, J., Land, E. J. and Swallow, A. J. (1980) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **96** : 513-520

Prütz, W. A. , Land, E. J. and Sloper, R. W. (1981) *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, **77** : 281-292

Prütz, W. A., Mönig, H., Butler, J. and Land, E. J. (1985) *Arch. Biochem. Biophys.*, **243** : 125-134

Prütz, W. A., Siebert, F., Butler, J., Land, E. J., Menez, A. and Montenay-Garestier, T. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, **705** : 139-149

Pshezhetsky, A., Elsliger, M. A., Vinogradova, M. V. and Potier, M. (1995) *Biochemistry*, **34**: 2431-2440

Rabani, J. (1962) *J. Am. Chem. Soc.,* **84** : 868-871

Radmancher, M., Fritz, M., Hansma, H. G. and Hansma, P. K. (1994) *Science*, **265**: 1577-1579

Redfield, C. and Dobson, C. (1990) *Biochemistry*, **29** : 7201-7214

Remington, S., Wiegand, G. and Hubert, R. (1982) *J. Mol. Biol.*, **158** : 111-152

Riedle, B. and Kerjaschki, D. (1997) *Amer. J. Pathol.*, **151**: 215-231

Saha, A., Mandal, P. C. and Bhattacharyya, S. N. (1993*) Int. J. Radiat. Biol.*, **63** : 557-564

Salmenick, P. J. M., Kolkman-Roodbeen, J. C., Gribnau, T. C. J., Ljanssen, P. S. and Van Der Veen, A. J. (1987) *Scientific Edition*, **9** : 178

Salo, D. C., Pacifici, R. E., Lin, S. W., Giulivi, C. and Davies, K. J. A. (1990) *J. Biol. Chem.,* **265** : 11919-11927

Sarma, R. and Bott, R. (1977) *J. Mol. Biol.*, **113**: 555-565

Schägger, H and von Jagow, G. (1987) *Anal. Biochem.*, **166**: 368-379

Schuessler, H. and Schilling, K. (1984) *Int. J. Radiat. Biol.*, **45** : 267-287

Schwarz, H. A. and Allen, G. (1955) *J. Am. Chem. Soc.*, **77** : 1324

Shafferman, A. and Stein, G. (1975) *Biochem. Biophys. Acta,* **416** : 287-317

Shugar, D. (1952) *Biochem. Biophys. Acta.*, **8** : 302-309

Simic, M. G. (1978) *J. Agric. Food Chem.*, **26** : 6-14

Sipos P., Gamal E. M., Blazovics, A., Metzger, P., Miko, I. and Furka, I. (1997) *Acta Chirurgica Hungarica,* **36**: 329-330

Solomonson, L. P., McCreery, M. J., Kay, C. J. and Barber M. J. (1897) *J. Biol. Chem.*, **262** : 8934-8939

Spinks, J. W. T. and Wood, R. T. (1990) An Introduction to Radiation Chemistry, 3rd Edition, A Willey Interscience publication, John Willey and Sons, Inc., New York.

Stadtman, E. R. (1993) *Annu. Rev. Biochem.*, **62** : 797-821

Steiner, J. P., Faraggi, M., Klapper, M. H. and Dorfman, L. M. (1985) *Biochemistry*, **24** : 2139-2146

Sun, M. and Zigman, S. (1979) *Photochem. Photobiol.*, **29** : 893-897

Tanford, C. (1961) Physical Chemistry of Macromolecules. Willey ed., New-York (chapters 4-6, p. 339)

Tsung, C. M. and Fraenkel-Conrat, H. (1965) *Biochemistry*, **4**: 793-801

von Sonntag, C. (1987) The Chemical Basis of Radiation Biology, Taylor and Francis, London

Ward, P. A., Till, G. O., Kunkel, R. and Beauchamp, C. (1993) *J. Clin. Invest.*, **72** : 789-801

Weinberg, E. D. (1996) *Eur. J. Cancer Prev.*, **5**: 19-36

Weinstein, M., Alfassi, Z. B., DePhilipps, M. R., Klapper, M. H. and Faraggi, M. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1076** : 173-178

Wetlaufer, D. B. (1962) *Adv. Protein Chem.*, **17**: 303

Wiegand, G., Remington, S., Deisenhofer, J. and Hubert, R. (1984) *J. Mol. Biol.*, **74**: 205-219

Willson, R. L. (1983) Radioprotectors and Anticarcinogens (Nygaard, O. F. and Simic, M. G., eds.), Academic Press, New-York, pp. 1-22

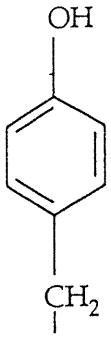
Willson, R. L., Dunster, C. A., Forni, L. G., Gee, C. A. and Kittridge, K. J. (1985) *Phil. Trans. Roy. Soc. London B.*, **311** : 545-563

Wolff, S. P. and Dean, R. T. (1986) *Biochem. J.*, **234** : 399-403

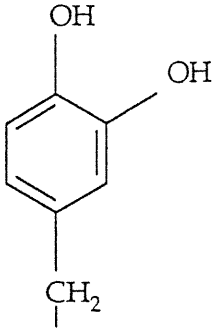
Wolff, S. P., Garner, A. and Dean, R. T. (1986) *TIBS*, **11** : 27-31

Yamamoto, O. and Okuda, A. (1975) *Radiat. Res.*, **61** : 251-260

Partie VII
Annexes

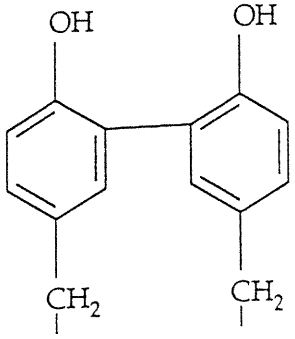


Tyrosine (Y)

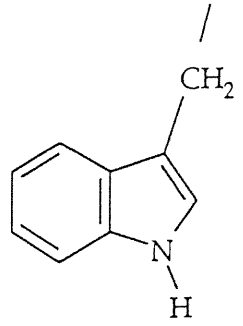


Dihydroxyphénylalanine

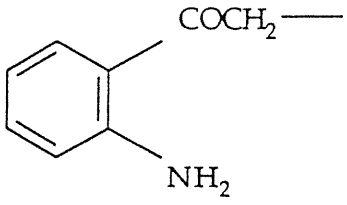
(DOPA)



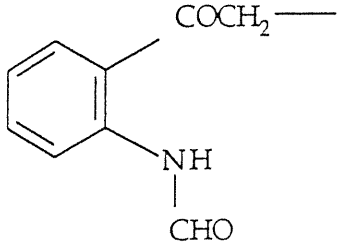
Bityrosine



Tryptophane (W)



Kynurenine



N-formyl Kynurenine

Articles

EFFETS CONFORMATIONNELS SUR LA FRAGMENTATION RADIO-INDUITE DES PROTÉINES

par:

Michel Potier, Marilyne Audette, Xiang Chen,
Abdelali Filali-Mouhim

Service de génétique médicale, Hôpital Sainte-Justine,
Montréal, Québec, Canada

Effets conformationnels sur la fragmentation radio-induite des protéines

Nos travaux antérieurs ont démontré que des protéines irradiées, en poudres lyophilisées ou en solutions congelées, par des rayons gamma se fragmentent à des sites précis le long de la chaîne polypeptidique.[1] Cette fragmentation spécifique a été observée la première fois en analysant, par électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide, les fragments d'une protéine irradiée à des doses croissantes de rayons γ.[1] En effet, on a observé la disparition progressive de la bande correspondant à la protéine native et l'apparition simultanée de bandes correspondant à de plus petits fragments dont le nombre et l'intensité sont fonctions de la dose d'irradiation. La relation entre la quantité de protéine intacte après irradiation, notée A_D, et la dose d'irradiation D est :[2]

$$A_D/A_0 = \exp(-KD)\,,$$

où A_0 est la quantité de protéine native et K est, par définition, égale à $1/D_{37}$, soit l'inverse de la dose (en Mrad) nécessaire pour diminuer la quantité initiale de protéine à 37% de sa valeur initiale.

La fragmentation radio-induite des protéines à des sites précis le long de la chaîne polypeptidique suggère que ces sites sont déterminés par la structure tertiaire des protéines. Comme corollaire à cette hypothèse, tout changement conformationnel devrait se traduire par une fragmentation différente ou une variation de l'intensité des fragments. Cette hypothèse a été testée directement sur un ensemble de protéines de structures tertiaires connues et qui subissent des transitions conformationnelles bien caractérisées.[3] Pour notre étude, nous avons sélectionné la transition allostérique de l'aspartate transcarbamylase, les changements conformationnels dus à la liaison enzyme-substrat de la citrate synthétase et les différents intermédiaires de repliement de l'α-lactalbumine. L'effet des radiations sur ces protéines dans des conformations bien caractérisées a été étudié à un niveau macroscopique en mesurant les doses D_{37} correspondant à la fragmentation de la protéine native.

Nous avons trouvé que, lorsque les protéines adoptent une structure plus compacte suite à une interaction avec un effecteur allostérique ou un substrat, ces protéines deviennent plus résistantes aux radiations, ce qui se traduit par une augmentation de leur D_{37}. En effet, pour l'aspartate transcarbamylase, le D_{37} passe de 59 Mrad dans la forme ouverte à 67,2 dans la forme R, plus compacte, qui est produite par interaction avec le PALA [*N*-(phosphoroacétyl)-*N*-aspartate]. La citrate synthétase, qui adopte des formes plus compactes en présence de son substrat, l'oxaloacétate, montre aussi le même phénomène d'accroissement de la valeur du D_{37}. Ce dernier passe de 10,8 Mrad dans la forme native (conformation ouverte) à 14,1 Mrad en présence d'oxaloacétate (conformation compacte). Dans le cas de l'α-lactalbumine, le D_{37} de la forme native (53,1 Mrad) est presque deux fois plus grand que ceux des formes globulaire fondue (28 Mrad) et complétement dénaturée (25,6 Mrad). Dans ce cas, les changements conformationnels impliqués sont plus importants que ceux étudiés chez l'aspartate transcarbamylase et la citrate synthétase. Il est intéressant de noter que toutes ces protéines, après dénaturation dans l'urée 8 M, sont fragmentées de façon aléatoire plutôt qu'à des sites précis comme c'est le cas dans leur forme native.

Comme témoin négatif, nous avons étudié le lysozyme dont le D_{37} n'est pas modifié par l'interaction avec son substrat, la chitine, ni avec un inhibiteur compétitif, le chitotriose. En effet, l'analyse des données cristallographiques montre que la conformation du lysozyme lié au substrat ou à l'inhibiteur est très proche de celle du lysozyme natif.

Les mutations génétiques ponctuelles, qui causent un changement d'acide aminé par un autre dans la chaîne polypeptidique d'une protéine, induisent souvent des changements conformationnels qui détruisent l'activité enzymatique. Ainsi, la mutation Arg 301 → Gln dans l'α-galactosidase, qui cause la déficience complète de cet enzyme dans les tissus des patients atteints de la maladie de Fabry, induit un changement de

conformation qui a été détecté par l'étude de la fragmentation radio-induite. En effet, le D_{37} de l'enzyme muté diminue par rapport à celui de l'enzyme normal, passant de 20 à 14,1 Mrad, ce qui correspondrait à une forme plus ouverte de cet enzyme.

Nous croyons qu'avec l'ensemble des résultats que nous avons obtenus, il ne fait aucun doute que c'est bien la structure tertiaire qui détermine les sites de fragmentation dans les protéines. Ces observations justifient notre projet de recherche à plus long terme qui tente de relier la nature des fragments et la position des sites de cassure après exposition aux rayons γ à la structure tertiaire d'une protéine. Nous avons noté aussi que le niveau de résolution pourrait être assez élevé puisque la radiolyse détecte des changements conformationnels subtils dans les protéines. En effet, le changement conformationnel que subit la citrate synthétase, soit une rotation de 16° du petit domaine par rapport au grand lorsque l'oxaloacétate se lie au site actif, est parfaitement détectable par le changement de D_{37} observé et par le changement d'intensité de deux fragments sur gel de SDS-polyacrilamide.

La méthode que nous avons principalement utilisée jusqu'à maintenant pour l'analyse des fragments, soit l'électrophorèse sur gel de SDS-polyacrylamide, ne possède pas le niveau de résolution et de précision pour la détermination de la masse moléculaire qui serait nécessaire pour localiser les sites de fragmentation à l'acide aminé près. Cependant, le transfert sur membrane de polyvinylène des bandes séparées sur gel de SDS-polyacrylamide et le séquençage *N*-terminal des acides aminés nous ont permis de déterminer avec précision plusieurs sites de fracture dans le lysozyme.[4] L'autre approche que nous avons commencé à utiliser consiste à séparer les fragments de radiolyse par une méthode de chromatographie à haute performance couplée à l'analyse de la composition en acides aminés des fragments pour déterminer les sites de fracture, ou encore à déterminer la masse des fragments par spectrométrie de masse en utilisant la technique MALDI/MS (ou "*matrix-assisted laser desorption mass spectrometry*").

En conclusion, ce projet, très prometteur, permettra éventuellement d'étudier les changements conformationnels des protéines à l'intérieur de membranes ou de cellules intactes après congélation rapide.

Références citées

1. M. le Maire, L. Thauvette, B. de Foresta, A. Viel, G. Beauregard et M. Potier, *Biochem. J.* 267, 431 (1990).
2. G. Beauregard, A. Maret, R. Salvayre et M. Potier, *Meth. Biochem. Anal.* 32, 313 (1987).
3. X. Chen, N. Rouleau, A. Filali-Mouhim, M. le Maire et M. Potier, en préparation.
4. M. Potier, M. St-Louis, L. Thauvette, L. Denoroy, F. Penin, X. Chen, N. Rouleau, J.-P. Le Caer, J. Rossier, A. Filali-Mouhim et M. le Maire, en préparation.

Michel POTIER, Marilyne AUDETTE, Xiang CHEN et Abdelali FILALI-MOUHIM

Service de génétique médicale
Hôpital Sainte-Justine, Université de Montréal
Montréal (Québec), Canada

Les "formes réactives de l'oxygène" : quel avenir!

Une bonne nouvelle!

On peut applaudir, en effet, l'arrivée d'un nouveau-né dans le domaine des "radicaux libres" et de la radiobiologie : le *Laboratoire de biogérontologie*, du "Centre de recherche en gériatrie et gérontologie" de l'Hôpital d'Youville de Sherbrooke, affilié à l'Université de Sherbrooke.

Cette nouvelle, nous en sommes sûrs, fera un grand plaisir à tous ceux qui, dans ce domaine, n'ont cessé de déployer leurs efforts pour faire avancer les différents axes de recherche concernés. À cette occasion, nous aimerions remercier et encourager le Pr J.-P. Jay-Gerin, ainsi que le Pr

INT. J. RADIAT. BIOL 1997, VOL. 72, NO. 1, 63–70

Lysozyme fragmentation induced by γ-radiolysis

A. FILALI-MOUHIM†, M. AUDETTE, M. ST-LOUIS, L. THAUVETTE, L. DENOROY‡, F. PENIN*, X. CHEN, N. ROULEAU, J.-P. LE CAER¶, J. ROSSIER*, M. POTIER and M. LE MAIRE‖

(Received 12 August 1996; accepted 29 January 1997)

Abstract. Irradiation of lysozyme in frozen states in the absence of oxygen induces specific fragmentation at defined sites along the backbone chain. This paper localizes radio-fragmentation sites by two methods. First, N-terminal sequencing of radiolysis fragments after separation by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and estimation of their molecular masses. Secondly, after purification of radiolysis fragments by reverse phase-HPLC and determination of their molecular mass by electro-spray-ionization mass-spectrometric analysis, combined to N-terminal sequencing and total amino acid analysis. Evidence for the breakage of the peptide bond itself (CO–NH) is given, with radio-fragmentation sites mostly found at the surface of irradiated lysozyme in solvent exposed loops and turns.

1. Introduction

Radiation damage to proteins has been the subject of great attention because of the current interest in radiobiology and radiosterilization of food and enzymes. At the molecular level two types of damages are observed: fragmentation and aggregation (see review by Yamamoto 1992). At room temperature, under anaerobic conditions in aqueous solutions and lyophilized form, aggregation is the most important damage observed (see reviews by Garrison 1987 and von Sonntag, 1987). At low temperature in the frozen state, breakage of the polypeptide backbone is the major damage observed (see review by Kempner 1993).

Exposure of proteins to ionizing radiations results in both non-random and random fragmentation (see review by Kempner 1993). The non-random fragmentation of proteins is of particular interest because radio-fragmentation sites (RFS) may be determined by the protein structure and their characterization represents a first step in order to develop the radiation-induced fragmentation as a tool to examine or compare protein structures. Non-random fragmentation occurs in frozen solutions of aspartate transcarbamylase and carbonic anhydrase under N_2 (le Maire *et al.* 1990), of nitrate reductase under vacuum (Solomonson *et al.* 1987), and in oxygenated aqueous solutions of bovine serum albumin, (Schuessler and Schilling 1984) and hemoglobin (Puchala and Schuessler 1993). Random fragmentation was observed mostly in membrane-bound proteins (see review by Kempner 1993).

Among the proteins studied, the well-characterized enzyme lysozyme has attracted considerable attention. Most of the studies were performed in the absence of oxygen at room temperature in aqueous solution (Aldrich and Cundall 1969, Hashimoto *et al.* 1981, Franzini *et al.* 1993) or in lyophilized form (Stevens *et al.* 1969, 1967, Marciani and Tolbert 1972, Friedberg 1969), and the oxygen effect was investigated by Stevens *et al.* (1970). In these experimental conditions, aggregation was found to be the most important radiation damage although some fragmentation was observed (Stevens *et al.* 1967, 1970, Franzini *et al.* 1993).

There appears to have been no study of radiation damage to lysozyme in frozen aqueous solutions. In this work we use hen egg-white lysozyme (LYS) in frozen aqueous solution to localize the RFS in the three dimensional structure of this enzyme. The interpretation of radiolysis in terms of structural determinants at the primary, secondary and tertiary structural levels is attempted.

2. Materials and methods

2.1. *Materials*

LYS and SDS were obtained from Sigma Chemical Co. (St-Louis, MO). The purity of the protein preparation was tested by SDS polyacrylamide-gel

†Author for correspondence.
Service de Génétique Médicale, Hôpital Sainte-Justine, Département de Pédiatrie, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada H3T 1C5.
‡Service Central d'Analyse, Centre National de la Recherche Scientifique, 69390 Vernaison, France.
*Institut de Biologie et de Chimie des Protéines, Centre National de la Recherche Scientifique, 69367 Lyon Cedex 07, France.
¶Neurobiologie de la Diversité Cellulaire, URA CNRS 2054, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielles de la Ville de Paris, 75005 Paris, France.
‖Section de Biophysique des Protéines et des Membranes, Département de Biologie Cellulaire et Moléculaire, CEA et UR CNRS 1290, 91191 Gif-sur-Yvette Cedex, France.

0955–3002/97 $12.00 © 1997 Taylor & Francis Ltd

electrophoresis (SDS-PAGE) according to Laemmli (1970). Molecular mass standards for SDS-PAGE were purchased from Pharmacia-LKB (Piscataway, NJ).

2.2. *Irradiation conditions*

Protein solutions ($3{\cdot}5 \times 10^{-5}$ mol dm^{-3}) in 20 m mol dm^{-3} tris(hydroxymethyl)amino methane (Tris) (pH 8·0) were irradiated in a Gammacell 220 ^{60}Co source (Nordion International Inc., Kanata, Ontario, Canada) as previously described (Beauregard *et al.* 1987). Buffers were deoxygenated with N_2 and protein solutions were quickly frozen in a dry ice/acetone bath before irradiation. The temperature of the irradiated samples in the Gammacell 220 was maintained at 195 K with crushed dry ice. The dose rate was about 1 Gy s^{-1} determined by Fricke dosimetry.

2.3. *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis*

The irradiated samples were thawed at room temperature under anaerobic atmosphere, and SDS and 2-mercaptoethanol were added to reduce the disulphide bridges before electrophoretic analysis on a Tricine-SDS-gel according to the method of Schägger and von Jagow (1987). Proteins bands were stained with Coomassie blue R-250 and the gels were scanned using a Vernon Phi 5 (orange filter no. 16) spectrophotometer or an Ultroscan XL laser microdensitometer (LKB). The peak surfaces were corrected for variations in protein band widths on the SDS-gels. Proportionally between the amount of protein applied to the gel and the response of the microdensitometer was tested between 0·1 and 5 μg of protein.

N-Terminal sequencing of the separated radiolysis fragments on the SDS-gel was performed after electrotransfer to Immobilon-P membranes (Millipore Corporation, Bedford, MA) as described by Matsudaira (1987). Sequence was determined using an Applied Biosystem 470 A gas-phase sequenator with online phenylthiohydantoin analysis.

2.4. *Reverse phase-HPLC*

Irradiated LYS samples were incubated overnight at 303 K in 6 mol dm^{-3} guanidinium-HCl, 20 mmol dm^{-3} DTT, 50 mmol dm^{-3} Tris-HCl, pH 8·8. The fragments were prepurified on Vydac C18 column (4·6 × 300 mm) using a water/acetonitrile gradient in the presence of 0·1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA). The fractions collected during several runs were pooled, lyophilized and redissolved in the above guanidinium-HCl buffer. This material was loaded onto a Waters Delta Pak C18 column (2·1 × 150 mm) and eluted at a flowrate of 0·25 ml/min using the optimized water/acetonitrile gradient in the presence of 0·1% (v/v) TFA. The collected peaks were separated in two equal fractions before lyophilization. The first fraction, used for aminoacid analysis, was hydrolysed in 6 mol dm^{-3} HCl for 24 h at 383 K (Pico-Tag, Waters) before being applied to a Beckman aminoacid analyser (model AAA-6300). The detection was done with ninhydrin by post column derivation. The second fraction, used for mass spectrometry, was dissolved in 20 ml acetonitrile : water : formic acid, 50 : 49 : 1 (v/v/v) and injected in an electro-spray mass-spectrometer (ESI-MS) as previously described (le Maire *et al.* 1993). If sufficient quantities of fragments were available, N-terminal sequencing was also performed as described above.

3. Results

LYS is a single polypeptide chain of 14·307 Da. SDS-PAGE analysis of the reduced irradiated LYS revealed at least 11 different radiolysis fragments with M_r between 11·250 and 2·650 (Figure 1) whereas the non-reduced irradiated LYS showed no detectable fragments. No aggregation which implicate disulphide crosslinks or other intermolecular covalent bonds was observed by comparing band patterns after electrophoresis on SDS-polyacrylamide gel under reducing and non-reducing conditions (data not shown).

Table 1 shows the position of RFS in irradiated LYS deduced from the radiolysis fragments separated

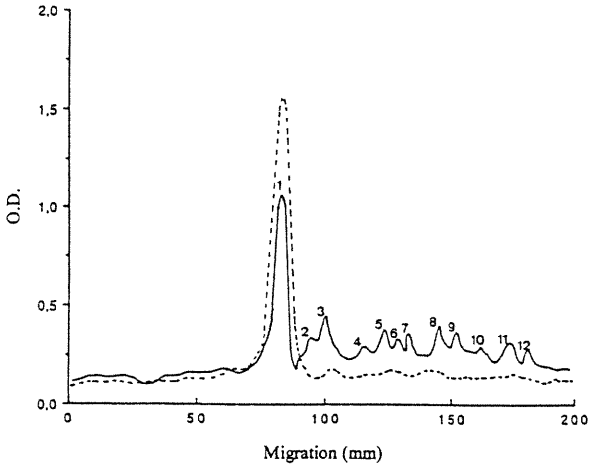


Figure 1. Densitometer traces of irradiated (—) and non-irradiated (···) LYS after analysis by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Irradiation is done at 70 kGy under N_2 with 20 mmol dm^{-3} Tris.

Table 1. Position of RFS in irradiated LYS determined by N-terminal sequencing of intact protein and radiolysis fragments. The N-terminal residue number determined by Edman degradation is indicated as a superscript: (↓) RFS identified by direct N-terminal sequencing of fragment, (⇓) RFS identified at the C-terminal of a fragment from N-terminal sequence and M, of the radiolysis fragment estimated by SDS-PAGE, (*) RFS between two aminoacids belonging two different secondary structures.

Fragments	Molecular mass (kDa)	Sequence N-terminal→C-terminal	Secondary structure	
			N-terminal	C-terminal
1	11·25	^{1}Lys→^{103}Asp⇓^{104}Gly		turn
2	10·5	^{1}Lys→^{96}Lys⇓^{97}Lys		helix/loop*
3	9·5	^{1}Lys→^{85}Ser⇓^{86}Ser		loop
4	8·0	^{1}Lys→^{71}Gly⇓^{72}Ser		turn
5A	7·25	^{48}Asp↓^{49}Gly→^{114}Arg⇓^{115}Cys	loop	loop/turn*
5B	7·25	^{1}Lys→^{63}Trp⇓^{64}Cys		turn/loop*
6A	7·0	^{52}Asp↓^{53}Tyr→^{115}Cys⇓^{116}Lys	sheet	turn
6B	7·0	^{1}Lys→^{62}Trp⇓^{63}Trp		turn/loop*
7	6·25	^{1}Lys→^{56}Leu⇓^{57}Gln		turn
8	6·0	^{1}Lys→^{54}Gly⇓^{55}Leu		sheet/turn*
9	4·75	^{1}Lys→^{42}Ala⇓^{43}Thr		sheet
10	2·75	^{101}Asp↓^{102}Gly→^{124}Ile⇓^{125}Arg	loop	turn
11	2·65	^{1}Lys→^{23}Tyr⇓^{24}Ser		turn/loop*
Intact LYS	13·75	^{1}Lys→^{129}Leu		

The aminoacid compositions of the secondary structures of LYS are as follows:
Helix:
^{5}Arg...^{15}His, ^{25}Leu...^{35}Glu, ^{80}Cys...^{84}Leu, ^{89}Thr...^{96}Lys.
Sheet:
^{1}Lys...^{3}Phe, ^{38}Phe...^{40}Thr, ^{42}Ala...^{46}Asn, ^{50}Ser...^{54}Gly, ^{57}Gln...^{60}Ser.
Turn:
^{13}Lys...^{16}Gly, ^{17}Leu...^{20}Tyr, ^{19}Asn...^{22}Gly, ^{20}Tyr...^{23}Tyr, ^{54}Gly...^{57}Gln, ^{59}Asn...^{62}Trp, ^{69}Thr...^{72}Ser, ^{54}Gly...^{57}Gln, ^{59}Asn...^{62}Trp, ^{69}Thr...^{72}Ser, ^{74}Asn...^{77}Asn, ^{103}Asn...^{106}Asn, ^{115}Cys...^{118}Thr, ^{124}Ile...^{127}Cys.

by SDS-PAGE. The N-terminal sequence of most radiolysis fragments corresponded to that of intact LYS, starting with a lysine residue (^{1}Lys). In the case of bands 5 and 6, two sequences were obtained simultaneously, indicating the presence of at least two fragments with approximately the same molecular mass which were labelled 5A, 5B, 6A and 6B. Three fragments yielded sequences starting with internal residues of LYS: fragment 10 (residues 102–124), 6A (residues 53–115) and 5A (residues 49–114) allowing us to localize the RFS 101–102, 52–53 and 48–49 corresponding to the cleavage of the peptide bond. With fragments 1, 2, 3, 4, 5B, 6B, 7, 8, 9, and 11 the RFS were localized approximately from an estimation of the fragment mass by electrophoresis (since all these fragments contained the N-terminal sequence of intact LYS). In these experimental conditions, mass determination of proteins by SDS-PAGE had an estimated error of 3–4% yielding a 2–4 residues error in the localization of RFS depending on the fragment size.

In order to obtain a more precise localization of RFS of LYS, ESI-MS was used to determine the M of radiolysis fragments isolated by RP-HPLC combined to N-terminal aminoacid sequencing and aminoacid analysis to identify the fragments (Table 2). Because the radiolysis fragments stay associated with the protein molecule, highly denaturing conditions were applied for dissociation, as it was previously observed for irradiated β-galactosidase (Potier *et al.* 1991). Hence, irradiated LYS must be treated for several hours in the presence of 6 mol dm^{-3} guanidinium HCl and 20 mmol dm^{-3} DTT in order to obtain a resolved RP-HPLC chromatogram.

A typical separation of irradiated LYS at 100 kGy compared with non-irradiated LYS is illustrated in Figure 2. The large peaks eluted between 3 and 8 min correspond essentially to guanidinium-HCl and DTT. The three peaks eluted between 34 and 38 min are not proteins, as verified by UV absorption spectroscopy and SDS-PAGE (data not shown). The numerous compounds eluted between 8 and 16 min correspond to small peptide fragments of LYS as shown by SDS-PAGE (data not shown). Since these two regions were too heterogeneous, they could not be further analysed, but fragments eluted between 25 and 60 min and not present in control LYS appeared to be well resolved. However, direct analysis either by SDS-PAGE and/or ESI-MS showed large heterogeneity for most of them (data not shown). Several RP-HPLC runs were thus performed to accumulate sufficient quantities of fragments con-

Table 2. Position of RFS in irradiated LYS determined by ESI-MS and N-terminal sequencing or amino-acid analysis.

Fractions[a]	Experimental mass[b]	Expected mass[c]	Proposed sequenced N-terminal→C-terminal	Method for fragments analysis[e]	Secondary structure[f]	
					N-terminal	C-terminal
b	4048 ± 1	4051	^{1}Lys→^{36}Ser⇓^{37}Asn	N-ter and AA		loop
c	5268 ± 18	5312	^{1}Lys→^{47}Thr⇓^{48}Asp	AA		loop
e	3834 ± 1	–	–	–		
f	4067 ± 1	–	–	–		
h	3049 ± 1	3049	^{103}Asp⇓^{104}Gly→^{129}Leu	AA	turn	
	3160 ± 1	–	–	–		
k	3325 ± 11	–	–	–		
l	3206 ± 1	3208	^{82}Ala⇓^{83}Leu→^{112}Arg⇓^{113}Asn	AA	helix	loop
o	2732 ± 1	2743	^{1}Lys→^{24}Ser⇓^{25}Leu	N-ter		loop/helix*
p1	2657 ± 3	2656	^{1}Lys→^{23}Tyr⇓^{24}Ser	–		turn/loop*
p2	3034 ± 1	3027	^{1}Lys→^{27}Asn⇓^{28}Trp	–		helix
	3049 ± 4	–	–			
t	4751 ± 1	4793	^{82}Ala⇓^{83}Leu→^{126}Gly⇓^{127}Cys	AA	helix	turn
	4766 ± 2	–	–	–		
	4917 ± 1					

[a]See Figure 2, fraction *p* yielded two peaks after the second chromatography.

[b]Experimentally determined M by ESI-MS. In some instance, the purified fraction contained several peptides, the most abundant one being indicated first.

[c]Expected M (average mass, not the monoisotopic mass) on the basis of the proposed sequence, assuming that the breaks occur in the peptide bonds and that the side chains remain intact. Note that in some cases there is a difference between expected and measured M indicating that these assumptions are not always valid.

[d]The sequences are proposed on the basis of the experimentally determined M by ESI-MS and either the N-terminal sequencing (fractions b and o) or total amino-acid analysis (fractions c, h, l and t) according to a computer program (Cordier-Ochsenbein *et al.* 1995). This program is designed to identify the best fitted fragment from an amino-acid analysis, knowing the protein sequence. Fractions p1 and p2, were not in sufficient amount for amino-acid analysis and these fragments were identified on the basis of mass alone.

[e]AA, identification of fragments by total amino acid analysis and computer program of Cordier-Ochsenbein *et al.* (1995), and N-ter., by N-terminal sequencing.

[f]Secondary structure at the break site as deduced from the known 3-D structure. For fraction l the peptide result from two breaks so that two secondary structures are indicated.

tained in fractions named from a to t (See Figure 2). Each fraction was further purified by RP-HPLC on a narrow bore C18 column, with optimization of the acetonitrile gradient in order to obtain the best resolution.

N-terminal sequencing and/or aminoacid analysis allowed us to identify most of the radiolysis fragments separated by HPLC. Comparison of experimental aminoacid composition of fragments with calculated composition of all possible LYS fragments using the computer program of Cordier-Ochsenbein *et al.* (1995) allowed the identification of the radiation-induced fragments c, h, l, and t (Table 3) whereas the fragment bands b and o were identified by their N-terminal sequence. Fragments p1 and p2 were in too small amounts for accurate amino acid analysis and their sequence was deduced exclusively from their masses. When the aminoacid analysis program gave alternative fragments sequence mass spectrometry allowed a clear identification of the radiolysis fragments. Examination of the tertiary structure of LYS (Diamond 1974) revealed that most of the RFS (Tables 1 and 2) fell into loop and turns structures at the surface of LYS.

The expected M was computed on the basis of the proposed sequence assuming that the breaks occurred in the peptide bonds and that the aminoacid side chains remain intact. However, Table 2 shows some differences between expected and measured M values, (see for example fraction c) which may be understood by assuming either a break outside the peptide bond like in the CH–CO, NH–CH bond or in the amino-acid side chains. As discussed below, the radio-fragmentation mechanism of proteins, generally accepted to date, involves cleavage of NH–CH bonds (Garisson 1987).

As shown in Tables 1 and 2, five precisely determined RFS are adjacent to an Asp residue. The peptide bonds with an Asp residue may be more labile because there is an α,β-transpeptidation reaction which takes place between the side chain and main chain carboxyl groups, particularly at acidic pH (Swallow and Abrahamson 1958, Naughton *et al.* 1960). Indeed, Asp 48-Gly 49, a labile site of LYS

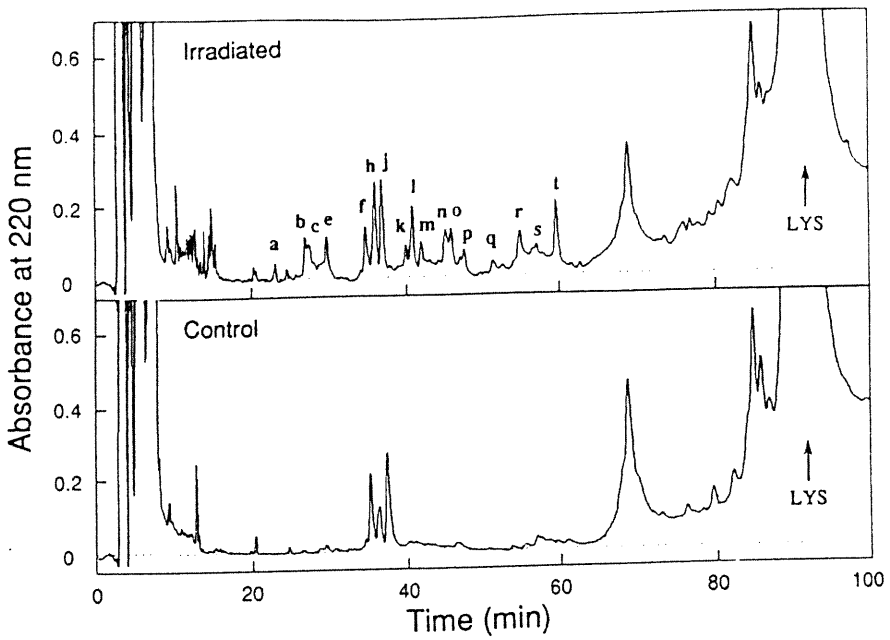


Figure 2. RP-HPLC separation of radiolysis fragments from lysozyme irradiated at 100 kGy under N_2 with 20 mmol dm^{-3} Tris. Samples of irradiated and control LYS were prepared as described in Material and methods. Samples of 0·25 mg protein were loaded on a reverse-phase VYDAC C18 column (4·6 × 300 mm) previously equilibrated with 10% (v/v) acetonitrile in 0·1% (v/v) TFA. The separation was carried out at 1 ml/min with the following discontinuous gradient: 25% acetonitrile for 5 min; 28% for 11 min, 38% for 78 min; 43% for 98 min; and 60% for 108 min. All chromatographies were monitored by UV using a photodiode array detector (model 991 from Waters).

Table 3. Comparison between experimental and computed amino acid content of radiolysis fragments.

	Amino acid composition (%)									
	Fraction b 1–36		Fraction c 1–47		Fraction h 104–129		Fraction l 83–112		Fraction t 83–126	
Amino acid	Exp	Calc	Exp	Calc	Exp	Calc	Exp	Calc	Exp	Calc
Asx*	11·9	11·1	13·5	13·6	11·6	13·0	13·3	17·9	16·7	17·5
Thr	1·9	0	3·4	4·6	3·0	4·3	3·5	3·6	4·3	5
Ser	5·7	5·6	4·1	4·6	0·8	0	4·4	14·3	6·6	10·0
Glx*	7·3	5·6	8·6	6·8	6·7	4·3	8·0	0	3·7	2·5
Pro	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gly	12·5	11·1	12·4	9·1	13·1	13·0	19·5	7·1	12·1	10·0
Ala	13·8	13·9	12·7	13·6	11·9	13·0	8·9	14·3	13·6	12·5
Val	5·3	5·6	4·9	4·6	12·7	8·7	15·0	10·7	9·3	10·0
Met	2·0	2·8	1·9	2·3	4·1	4·3	6·2	3·6	2·7	2·5
Ile	0·5	0	1·8	0	6·3	4·3	4·4	7·1	5·4	7·5
Leu	7·8	8·3	7·7	6·8	6·3	4·3	6·2	7·1	3·7	5·0
Tyr	3·9	5·6	3·0	4·6	0	0	0	0	0	0
Phe	4·6	5·6	4·1	6·8	0	0	0	0	0	0
His	3·9	2·8	1·9	2·3	0·8	0	2·7	0	1·9	0
Lys	11·2	8·3	7·8	6·8	5·6	4·3	6·2	7·1	12·8	7·5
Arg	7·7	8·3	12·4	9·1	17·2	17·4	1·8	3·6	7·4	7·5
% error§	1·8		1·9		1·4		2·8		1·8	

*Asx contains Asn and Asp, Glx contains Glu and Gln. Cys and Trp are not taken into account because they are lost during acid hydrolysis.

§error as given by the computer program of Cordier-Ochsenbein *et al.* (1995).

Exp-experimental.

Cal-calculated.

at acidic pH, is also fragmented by radiations (Table 1).

4. Discussion

The radiation-induced protein fragmentation in aqueous solutions may be affected by three factors. First, the local conformation of an amino acid in the peptide chain, secondly, its accessibility to the water radiolysis products and thirdly, the amino acid sequence itself where some particular amino acid residues may be more susceptible to radiolysis. In this latter case for example, Pro residues have been proposed to be a specific target for peptide chain scission in oxygenated aqueous solutions of bovine serum albumin (Schuessler and Schilling 1984) and of haemoglobin (Puchala and Schuessler 1993). Examination of the RFS localized in LYS (Tables 1 and 2) indicate that they fell mainly into loops and turns located at the solvent exposed surface of the protein structure. There is no evidence for the presence of a preferred amino acid residue (Tables 1 and 2) which would determine a radio-fragmentation site (RFS).

The radiolysis of frozen aqueous solutions produces dry electrons (e^-_{dry}), positive holes (H_2O^+), excited water molecules (H_2O^*) and hydroxyl radicals which are generated with a small yield ($G(^{\cdot}OH) = 0{\cdot}08\ \mu mol/J$) (Kevan 1968) as compared to aqueous solutions at room temperature ($G(^{\cdot}OH) = 0{\cdot}28\ \mu mol/J$). Freezing and the presence of Tris, an hydroxyl radical scavenger (Krisch *et al.* 1991), reduce considerably the reactivity of this radical.

It has been inferred that the fragmentation of peptides, polypeptides and proteins in the solid state involves dry electrons (see review by Garrison 1987), this has been well supported in the case of collagen by the use of heavy metals ions (Cu^{2+}, Fe^{2+}, Ni^{2+}) as electron scavengers (Friedberg *et al.* 1975). The breaks may occur through reductive cleavage by dry electrons which are easily trapped by the carbonyl groups of proteins (see review by Garrison 1987). Symons (1995) has suggested that this electron adduct can either be localized by protonation in the trapping site or undergo migration along the peptide chain, until its localization to a carbonyl oxygen by proton transfer according to the following reaction mechanism:

$$\sim\text{-CONHCH(R)-}\sim \xrightarrow{e^-} \sim\text{-C(O}^-\text{)NHCH(R)-}\sim \xrightarrow{H^+} \sim\text{-}\dot{\text{C}}\text{(OH)NHCH(R)-}\sim \quad (1)$$

The newly formed radical $\sim$-Ċ(OH)NHCH(R)-$\sim$ may undergo loss of the amide group with consequent polypeptide chain breakage

$$\sim\text{-}\dot{\text{C}}\text{(OH)NHCH(R)-}\sim \rightarrow \sim\text{-CONH}_2 + \dot{\text{C}}\text{H(R)-}\sim \quad (2)$$

followed by hydrogen abstraction

$$\dot{\text{C}}\text{H(R)-}\sim + \sim\text{-CONHCH(R)-}\sim \rightarrow \text{CH}_2\text{(R)-}\sim + \sim\text{-CONH}\dot{\text{C}}\text{(R)-}\sim \quad (3)$$

to give the well-known long lived α-carbon radical $\sim -\text{CONH}\dot{\text{C}}\text{(R)} - \sim$. Reactions (2) and (3) are expected to occur at low temperature as shown in the case of peptides (Sevilla *et al.* 1979) and are greatly favoured in this paper's experimental conditions (low LYS concentration and low dose-rate), over any radical–radical reactions which can lead to aggregates. On warming, the α-carbon centered radical can undergo disproportionation

$$2(\sim\text{-CONH}\dot{\text{C}}\text{(R)-}\sim) \rightarrow \sim\text{-CON} = \text{C(R)-}\sim + \sim -\text{CONHCH(R)-}\sim \quad (4)$$

or dimerization

$$2(\sim\text{-CONH}\dot{\text{C}}\text{(R)-}\sim) \rightarrow \sim\text{-CONHC(R)-}\sim \quad \sim\text{-CONHC(R)-}\sim \quad (5)$$

This latter reaction appears to be negligible in our experimental conditions since aggregation has not been observed (Figure 1). The unsaturated product formed in reaction (4) is labile and undergoes hydrolysis to give additional fragments

$$\text{-CON} = \text{C(R)-}\sim + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \sim -\text{CONH}_2 + \text{RCO-}\sim \quad (6)$$

The above fragmentation mechanism, generally admitted to date, involves main-chain cleavage at the NH–CH bond. Using N-terminal amino acid sequencing, we have found that another type of cleavage, that has never been reported, may occur at the peptide bond CO–NH (Tables 1 and 2). Clearly, there is an alternative pathway for the radiation induced fragmentation in proteins that needs to be further investigated.

Although the reaction of the electron at the carbonyl group is expected to be the dominant mechanism, positive hole centre could be implicated in the radio-fragmentation of proteins. In frozen aqueous solutions, the hole centre can be produced mainly by charge transfer from ionized solvent molecules, a phenomenon recently called the 'quasi-direct' effect (Becker and Sevilla 1993). Results from electron spin resonance experiments at low temperature have suggested that the hole centre, in γ irradiated proteins at low temperature, is largely localized at the backbone amide (Symons 1995). In the case of peptides,

hole formation expected at the carboxyl group is followed by a decarboxylation reaction (Sevilla *et al.* 1979). However, many questions remain concerning the reaction pathway for hole in proteins.

The water of hydration appears to play a significant role in the radiation-induced fragmentation of proteins. First, solvent may be required for bond scission in regions where hydrogen bonds between water and main chain carbonyl groups are frequent (see reaction (2)). Secondly, post-irradiation treatment can produce bond scission of modified sites accessible to the solvent (see reaction (6)). Thirdly, ionization of the hydration water molecules could result in radiation damage to proteins via positive charge transfer. Consideration of hydration effect is then of particular interest in the radiation chemistry of proteins. This effect is currently under further investigation.

Acknowledgments

The authors acknowledge the precious help of A. Gomez de Gracia, Section de Biophysique des Protéines et des Membranes, C.N.R.S., to Roland Montserret for his help in RP-HPLC separations and to Marguerite-Marie Boutillon for aminoacid analysis. The Medical Research Council of Canada (grant MT-10626 to M. P.), the Commissariat à l'Énergie Atomique and the Centre National de la Recherche Scientifique, France, who provided financial support for this work.

References

ALDRICH, J. E. and CUNDALL, R. B., 1969, The radiation-induced inactivation of Lysozyme. *International Journal of Radiation Biology*, **16,** 343–358.

BEAUREGARD, G., MARET, A., SALVAYRE, R. and POTIER, M., 1987, The radiation inactivation method as a tool to study structure-function relationships in proteins. *Methods in Biochemical Analysis*, **32,** 313–343.

BECKER, D. and SEVILLA, M. D., 1993, The chemical consequences of radiation damage to DNA, In *Advances in Radiation Biology*, vol. **17,** edited by J. T. Lett and W. K. Sinclair, (San Diego: Academic Press), pp. 121–180.

CORDIER-OCHSENBEIN, F., CORDIER, S. and RUSSO-MARIO, F., 1995, A computer program to determine a protein sequence from an amino acid analysis. *Biotechnology*, **13,** 267–278.

DIAMOND, R., 1974, Real space refinement of the structure of hen egg-white lysozyme. *Journal of Molecular Biology*, **82,** 371–387.

FRANZINI, E., SELLAK, H., HAKIM, J. and PASQUIER, C., 1993, Oxidative damage to lysozyme by the hydroxyl radical: comparative effects of scavengers. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1203,** 11–17.

FRIEDBERG, F., 1969, Effect of irradiation on some lyophilized proteins. *Radiation Research*, **38,** 34–42.

FRIEDBERG, F., KOMINAMI, S., NANDEKAR, A. K. N. and RIESZ, P., 1975, Effect of metal ions on the formation of chain breaks and radicals in γ-irradiated collagen and polyadenylic acid. *Radiation Research*, **61,** 55–62.

GARRISON, W. M., 1987, Reactions mechanisms in radiolysis of peptides, polypeptides, and proteins. *Chemical Reviews*, **87,** 381–398.

HASHIMOTO, S., SEKI, H., MASUDA, T., IMAMURA, M. and KONDO, M., 1981, Dimer formation in radiation-irradiated aqueous solution of lysozyme studied by light-scattering-intensity measurement. *International Journal of Radiation Biology*, **40,** 31–46.

KEMPNER, E. S., 1993, Damage to proteins due to the direct action of ionizing radiation. *Quarterly Reviews of Biophysics*, **26,** 27–48.

KEVAN, L., 1968. Radiation chemistry of frozen aqueous solutions. In *Radiation Chemistry of Aqueous Systems*, edited by G. Stein (Jerusalem: Weizmann Science Press), pp. 21–71.

KRISCH, R. E., FLOCK, M. B. and TRUMBORE, C. N., 1991, Radiation chemical mechanisms of single- and double-strand break formation in irradiated SV40 DNA. *Radiation Research*, **126,** 251–259.

LAEMMLI, U. K., 1970, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227,** 680–685.

LE MAIRE, M., DESCHAMPS, S., MØLLER, J. V., LE CAER, J. P. and ROSSIER, J., 1993, Electrospry ionization mass spectrometry on hydrophobic peptides electroeluted from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis application to the topology of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase. *Analytical Biochemistry*, **214,** 50–57.

LE MAIRE, M., THAUVETTE, L., DE FORESTA, B., VIEL, A., BEAUREGARD, G. and POTIER, M., 1990, Effects of ionizing radiation on proteins. Evidence of non-random fragmentations and a caution in the use of the method for determination of molecular mass. *Biochemical Journal*, **267,** 431–439.

MARCIANI, D. J. and TOLBERT, B. M., 1972, Analytical studies of fractions from irradiated lysozyme. *Biochimica and Biophysica Acta*, **271,** 262–273.

MATSUDAIRA, P., 1987, Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidine difluoride membranes. *Journal of Biological Chemistry*, **262,** 10035–10038.

NAUGHTON, M. A., SANGER, F., HARTLEY, B. S. and SHAW, D. C., 1960, The amino and sequence around the reactive serine residue of some proteolytic enzymes. *Biochemical Journal*, **77,** 149–163.

POTIER, M., THAUVETTE, L., MICHAUD, L., GIROUX, S. and BEAUREGARD, G., 1991, Inactivation mechanism of tetrameric β-galactosidase by γ-rays involves both fragmentation and temperature-dependent denaturation of protomers. *Biochemistry*, **30,** 8151–8157.

PUCHALA, M. and SCHUESSLER, H., 1993, Oxygen effect in the radiolysis of proteins. III. Hemoglobin. *International Journal of Radiation Biology*, **64,** 149–156.

SCHÄGGER, H. and VON JAGOW, G., 1987, Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry*, **166,** 368–379.

SCHUESSLER, H. and SCHILLING, K., 1984, Oxygen effect in the radiolysis of proteins. Part 2. Bovine serum albumin. *International Journal of Radiation Biology*, **45,** 267–281.

SEVILLA, M. D., D'ARCY, J. M. and MOREHOUSE, K., 1979, An electron spin resonance study of γ-irradiated frozen aque-

ous solutions containing dipeptides. mechanisms of radical reaction. *Journal of Physical Chemistry*, **83,** 2887–2892.

SOLOMONSON, L. P., MCCREERY, M. J., KAY, C. J. and BARBER, M. J., 1987, Radiation inactivation analysis of assimilatory NADH: Nitrate Reductase. *Journal of Biological Chemistry*, **262,** 8934–8939.

STEVENS, C. O., SAUBERLICH, H. E. and BERGSTROM, G. R., 1967, Radiation-produced aggregation and inactivation in egg white Lysozyme. *Journal of Biological Chemistry*, **242,** 1821–1826.

STEVENS, C. O., LONG, J. L. and UPJOHN, D., 1969, Radiation produced aggregation in crystalline preparations of ribonuclease, lysozyme, and trypsin. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, **132,** 951–957.

STEVENS, C. O., TOLBERT, B. M. and BERGSTROM, G. R., 1970, Effects of oxygen on irradiated solid egg-white lysozyme. *Radiation Research*, **42,** 232–243.

SYMONS, M. C. R., 1995, Electron spin resonance studies of radiation damage to DNA and to proteins. *Radiation Physics and Chemistry*, **45,** 837–845.

SWALLOW, D. L. and ABRAHAMSON, E. P., 1958, Formation of ε-(Aminosuccinyl)-Lysine from ε-aspartyl-lysine from bacitracin A, and from the cell walls of lactobacilli. *Biochemical Journal*, **70,** 364–373.

VON SONNTAG, C., 1987, *The Chemical Basis of Radiation Biology* (London: Taylor & Francis).

YAMAMOTO, O., 1992, Effect of radiation on protein stability. In *Stability of Protein Pharmaceuticals, Part A: Chemical and Physical Pathways of Protein Degradation*, edited by T. J. Ahern and M. C. Manning (New York: Plenum Press), pp. 361–421.

Remerciements

Le travail de cette thèse a été effectué dans les laboratoires des docteurs:

Michel Potier (Service de Génétique Médicale du Centre Hospitalier Universitaire, Université de Montréal, Hôpital Ste-Justine)
Yves Blouquit (Institut Curie, INSERM U350 sous la direction de M. Daniel Lavallette)
Chantal Houée-Levin (LPCR, Université Paris XI, sous la direction de Mme Jacqueline Belloni, jusqu'en 1997, puis de M. Bernard Levy)

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance à tous les membres de ces laboratoires qui, de près ou de loin, ont participé à l'élaboration de cette thèse.

Je souhaite adresser toute ma gratitude aux membres de mon jury pour avoir accepté la lourde tâche d'évaluer ce travail. Un grand merci aussi au Dr Catherine Pasquier et au Dr Michel Charlier pour avoir mis à l'épreuve et commenté ce document ainsi qu'au DrMarc le Maire et au Pr Geneviève Lemaire pour l'intérêt porté à mon travail. Merci au Dr Michel Potier, au Pr Chantal Houée-Levin et au Dr Yves Blouquit pour avoir assumé, jusqu'à son achèvement, le suivi de ce travail.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance au Dr Michel Potier, qui a guidé mes premières expériences dans le domaine de la radio-biochimie des protéines ainsi qu'au Dr Ali Filali-Mouhim qui m'a initié à la chimie du rayonnement. Sincères remerciements à toute l'équipe du centre hospitalier universitaire de l'hôpital Ste-Justine pour votre soutien et pour vos conseils indispensables (particulièrement à Mme Van Nugen, M. Richard Gingras, Mlle Catherine Richard, M. Erique Lukong, Mme Lorraine Michaud, Dr Alexey Pshezhetsky et tous le personnel du service de génétique médicale).

Je suis sensible à l'honneur que le Pr Chantal Houée-Levin m'a fait en acceptant de me recevoir dans son laboratoire. Je lui suis très reconnaissante d'avoir encadré mon travail et de m'avoir initié à la cinétique. Je rends hommage à ses qualités personnelles et à son sens de la pédagogie. Je remercie aussi très chaleureusement tous les gens appartenant au LPCR, qui m'ont énormément appris et soutenue (surtout Dr Chaibia Elhanine, Dr Cécile Roselli, Mme Mélodie Chapelier et Mlle Stéphanie Dronion). Une aide

précieuse m'a aussi été apporté par Mme Georgette Picq, Pr Jacqueline Belloni, Dr Dora Grand, Dr Mona Tréguer et Dr Hynd Remita.

Je remercie vivement le Dr Yves Blouquit qui m'a fait découvrir les techniques de chromatographie. Je voudrais souligner sa grande valeur scientifique, la qualité de son enseignement, sa patience, sa disponibilité, son aide inestimable et ses qualités humaines. Merci de m'avoir soutenue à plus d'un titre lors de mes déplacements en France. Ma profonde considération vous est acquise. Je souhaite également souligner la contribution de Mme Patricia Duchambon qui, par son assistance, a permis de compléter les dernières expériences nécessaires à l'achèvement du travail expérimental.

Mille mercis au Dr Elisabeth Adjadj et M. Eric Quiniou qui ont eu la bonté de me consacrer du temps et me prodiguer des conseils lors de l'évaluation des données cristallographiques ainsi que pour la présentation matérielle des structures tridimensionnelles. Merci aussi au Dr Vincent Favaudon, Dr Yann Henry, M. Hervé Tourbez, M. Christophe Patry et tous les gens de l'Institut Curie qui ont toujours été disponibles pour moi et qui ont égaillé mes journées de leurs sourires.

Merci de tout cœur au Dr Claude Deprun pour son aide indispensable et son expertise, qui m'a été d'un grand secours dans le cadre des analyses par spectrométrie de masse. Il m'est également impossible de passer sous silence l'implication et la gentillesse du Dr Gérard Bolbach (LCSO Université Pierre et Marie Curie, Jussieu, Paris), du Dr Martine Caroff (Equipe Endotoxines UMR 8619, Département de biochimie, Université d'Orsay) et du Dr Sophie Bourcier (Ecole Polytechnique). Je remercie aussi Mme Marguerite-Marie Boutillon (CNRS, UPR 412, associée à l'Université de Lyon I) pour s'être investie dans la détermination de quelques séquences d'acides aminés. Mes sincères remerciements vont également au Dr Pierre Jollès et au Dr Philip Evans pour avoir généreusement procuré des protéines purifiées qui ont été employées lors de ce travail.

Sincères remerciements à mes amis: spécialement à Craig Stuart pour son support moral et son aide précieuse lors de la réalisation de ce travail. Merci aussi à Marie-France et Valentin Blouquit qui m'ont toujours soutenue.