

Indépendance génétique de deux formes de l'anhydrase carbonique érythrocytaire bovine.

Jean-Marc GULIAN $\diamond$, Nicole LIMOZIN, Bernard MALLET, Jeanne DI COSTANZO
et Michel CHARREL.

*Laboratoire de Chimie biologique, Faculté de Médecine,
27 Bd Jean Moulin, 13385 Marseille Cedex 4, France,
et Equipe de Recherche du C.N.R.S. 49 associée à l'Université d'Aix-Marseille II.
(15-11-1976).*

Summary. — The two major forms of bovine erythrocyte carbonic anhydrase have been designated as CI and CII because their high activity of the C type. Separation of both forms and isolation of CI from the ethanol chloroform extract of the hemolysate were obtained by either column chromatography on DEAE-cellulose DE 23 or on DEAE-sephadex A-50. But pure preparations of the CII form were only obtained from DEAE-sephadex A-50 which separated CII from a minor component CI_I^V .

Comparative studies of the CI and CII forms and of the minor component CI_I^V strongly suggest that CI_I^V is a conformational variant of CI and that CI and CII are genetic variants differing at least in their primary structure by one Arg $\longrightarrow$ Gln substitution 56 residues from the N-acetylated terminus.

Based on the large variability of the proportion of the two isozymes in heterozygous individuals, the modality of the inheritance of these enzymes is discussed.

INTRODUCTION.

Il a été rappelé dans l'introduction du premier mémoire de cette série [1] qu'à la différence des Mammifères de la plupart des espèces étudiées à ce jour, les Ruminants ne renferment dans leurs hématies que des formes dites de « haute activité spécifique » de l'anhydrase carbonique (EC 4.2.1.1.). Ce fait a été récemment confirmé par chromatographie d'affinité d'hémolysat ou d'extraît érythrocytaire chez le Bœuf [2] et chez le Mouton (résultats non publiés). Cependant, des formes de « faible activité spécifique » ont été isolées de l'épithélium de la panse des bovinés [3, 4] et des ovinés (résultats non publiés). On est ainsi conduit à admettre que les deux gènes autosomiques distincts CAI et CAII [5], régissant respectivement la synthèse des isoenzymes érythrocytaires de « faible » et de « haute activité » chez de nombreux Mammifères, coexistent dans le génome des ruminants et que CAII s'exprime seul dans les érythrocytes de ces derniers. L'anhydrase carbonique érythrocytaire du Bœuf [6] (comme celle du Mouton [7]) se présente toutefois sous des formes multiples dont deux majeures ont été isolées dès 1960 par Lindskog [8] sous la désignation de A et de B dans l'ordre de leur mobilité anodique décroissante. Par leur haute activité spécifique, ces

deux enzymes sont du type CAII ou C (le type CAI ou B étant celui des anhydrases carboniques dites de « faible activité »). Aussi avons-nous proposé de les désigner par CI et CII dans l'ordre de leur mobilité anodique croissante [6].

De même forme et masse moléculaire [9] et de composition en amino-acides considérée comme identique [10], ces deux enzymes ont longtemps posé le problème de savoir si le déterminisme de leur différenciation est d'ordre physicochimique ou génétique. La seconde de ces deux hypothèses a commencé à prévaloir à la suite des données électrophorétiques établies par Sartore et coll. [11] à partir d'un très grand nombre de bovinés. La constatation, d'un animal à un autre, de la présence simultanée ou de l'absence de l'une ou l'autre des deux formes enzymatiques a conduit ces auteurs à admettre qu'elles sont des variants génétiques contrôlés par une paire de gènes alléliques. Si tel est le cas, CI et CII doivent différer tout au moins par une substitution d'acide aminé. Les recherches que nous avons entreprises dans cette voie dès 1973 [6, 12] ont apporté les premiers arguments biochimiques confirmant la validité de cette hypothèse.

L'objet du présent mémoire est d'exposer en détail l'état actuel de nos investigations qui, mettant à profit la connaissance de la séquence complète

$\diamond$ A qui toute correspondance doit être adressée.

de la forme CI [13, 14] et les modalités d'obtention de préparations hautement purifiées de la forme CII [6] conduisent à admettre que CII ne diffère de CI que par une substitution 56 Arg $\rightarrow$ Gln.

MATERIEL ET TECHNIQUES.

Isolement.

Les échantillons de sang utilisés au cours de cette étude ont été obtenus de 50 animaux (Abattoirs de Marseille) sans distinction de race, de sexe et d'âge. Collectés séparément sur EDTA (sel disodique 0,75 g/l) ils ont été traités à + 4°C selon la méthode utilisée habituellement et précédemment décrite [15]. En bref, cette méthode comporte essentiellement : le lavage des hématies déplasmatisées, leur hémolyse et l'obtention de préparations brutes d'anhydrase carbonique par dialyse sous pression (Amicon) et lyophilisation de l'extrait éthanol chloroforme (EEC) de l'hémolysat.

Tous les EEC ainsi obtenus ont été analysés par électrophorèse sur acétate de cellulose et certains d'entre eux par chromatographie sur colonne de DEAE-Sephadex A-50 et de DEAE-Cellulose DE 23.

Les conditions expérimentales de ces divers tests analytiques sont précisées dans les légendes des figures.

Détermination de la concentration en protéine.

La concentration en protéine des solutions a été calculée en fonction de leur absorbance à 280 nm sur la base du coefficient d'extinction spécifique $E_{280\text{ nm}}^{1\text{ cm}} = 19$ déterminé par Nyman et Lindskog [10] et en admettant que ce coefficient est identique pour les différentes formes moléculaires.

Détermination de l'activité enzymatique.

L'activité anhydrique carbonique a été déterminée par la méthode de Wilbur et Anderson [16].

Composition en aminoacides.

Le dosage des aminoacides a été effectué à l'aide de l'autoanalyseur Technicon, selon la méthode de Piez et Morris [17]. Les échantillons (environ 0,3 mg de protéine) ont été hydrolysés avec 0,5 ml d'HCl 6N tridistillé en tubes scellés sous vide et à 110°C. Les temps d'hydrolyse ont été de 20 heures et de 144 heures.

Le dosage du tryptophane a été réalisé selon la méthode de Bencze et Schmidt [18]. Environ 1 mg de protéine est dissous dans 1 ml de NaOH 0,1 N ;

les déterminations d'absorbance aux différentes longueurs d'ondes ont été effectuées à l'aide d'un spectrophotomètre Zeiss PMQ II.

Dosage des groupements acétyles.

La recherche et le dosage des groupements acétyles ont été effectués par la technique de Phillips [19].

Cartes de peptides tryptiques.

L'établissement des cartes de peptides tryptiques a été réalisé selon les modalités précédemment décrites pour les anhydrases carboniques érythrocytaires humaines [20].

Clivage par le bromure de cyanogène.

Les modalités du clivage par le bromure de cyanogène ont été précisées dans un mémoire précédent [14].

Comportement en milieu alcalin.

Les préparations purifiées d'anhydrase carbonique sont incubées 24 heures à 25°C et à pH 12,7 selon les modalités techniques précédemment décrites [21]. Ces modalités comportent l'addition de 0,6 ml de KOH N/10 à 1,6 ml d'une solution protéique à 3 p. cent dans l'eau, suivie après le temps d'incubation, d'une neutralisation de la solution alcaline par un volume égal (2,2 ml) d'une solution tampon phosphate mono- et disodique de pH 6,8. La fraction insolubilisée est écartée par centrifugation ; le surnageant est dialysé contre de l'eau désionisée bidistillée et lyophilisé après congélation.

RESULTATS EXPERIMENTAUX.

I. — ETUDE DE L'EXTRAIT

ÉTHANOL-CHLOROFORME (EEC) DE L'HÉMOLYSAT.

1. — *Electrophorèse comparative sur acétate de cellulose.*

L'électrophorèse sur acétate de cellulose individualise nettement deux constituants de l'EEC. Pour des raisons rendues évidentes par les résultats rapportés dans le paragraphe 3, ces deux constituants ont été désignés sur la figure 1, l'un par CI, l'autre par CI₂ ou par CII ou par CI₁ + CII. Parfaitement reproductibles pour l'EEC d'un même animal, les données fournies par cette technique démontrent que la proportion de ces deux constituants peut varier considérablement d'un animal à l'autre. A la limite, CI peut être absent (piste 5). Les 5 types d'EEC désignés de I à V ont été classés en fonction de l'importance relative de ces deux constituants.

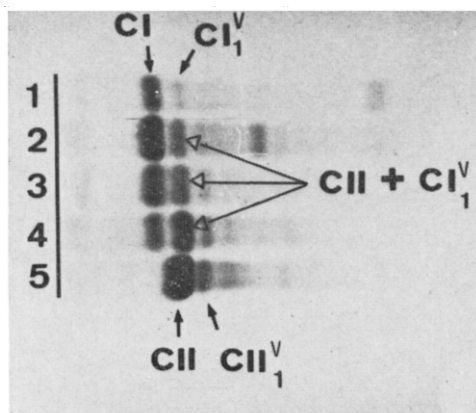


FIG. 1. — *Electrophorèse comparative sur acétate de cellulose* (tampon véronal sodique 0,02 M, pH 9,2; cuve et bandes Beckman; migration de 45 mn sous ~ 30 v/cm; coloration par le rouge ponceau) des divers types d'EEC étudiés.

2. — Chromatographie sur DEAE-Cellulose DE 23.

L'objectif de cette étude chromatographique et de la suivante a été limité à l'isolement des seuls constituants CI, CI_1^V et CII.

Les données de la chromatographie sur DEAE-Cellulose DE 23 (fig. 2 A) confirment celles de la technique précédente. On constate en effet, l'élution successive de deux zones protéiques CI et CI_1^V ou CI_1^V + CII, sauf dans le cas de l'EEC de type V pour lequel, seule la zone CII est éluee (fig. 2 A 3).

3. — Chromatographie sur DEAE-Sephadex A-50.

De façon identique à la technique précédente, la chromatographie sur DEAE-Sephadex A-50 (fig. 2 B) individualise CI sous la forme d'un constituant homogène, mais assure seule la purification de CII en en séparant un constituant mineur CI_1^V (fig. 2 B 2). Ce dernier se superpose à CII aussi bien au cours de l'électrophorèse de l'EEC que de sa chromatographie sur DEAE-Cellulose. Sa désignation par CI_1^V le rattache à CI : en effet, 1) lorsque CI est présent (types I et IV), CI_1^V l'est également et dans une proportion constante de l'ordre de 7 à 9 p. cent ; 2) lorsque CI est absent (type V), la chromatographie de l'EEC démontre que ce dernier renferme le seul constituant CII (fig. 2B 3).

La confrontation de ces données concernant exclusivement les trois constituants CI, CI_1^V et CII permet d'affirmer que les divers types d'EEC individualisés renferment respectivement :

- 1) le type I : les deux constituants CI et CI_1^V
- 2) les types II, III et IV : les trois constituants et,
- 3) le type V : le seul constituant CII.

II. — ACTIVITÉ ENZYMATIQUE.

La chromatographie sur DEAE-Sephadex A-50 permet en outre d'affirmer par la détermination de l'activité enzymatique de l'effluent que les trois constituants isolés correspondent à diverses formes moléculaires de l'anhydrase carbonique érythrocytaire. La comparaison de l'activité enzymatique spécifique de ces trois enzymes (tableau I) démontre que celle-ci est pour les trois enzymes du même ordre de grandeur.

TABLEAU I.

Activité anhydrique carbonique spécifique en U/mg

CI	CI_1^V	CII
19.300	18.400	18.990

III. — COMPOSITION EN AMINOACIDES.

Pour chaque enzyme, 4 hydrolysats de 20 heures et 4 hydrolysats de 144 heures ont été analysés. Les valeurs du tableau II correspondent aux moyennes obtenues à partir de ces 8 analyses.

Les trois formes moléculaires de l'anhydrase carbonique présentent une très grande analogie de

TABLEAU II.

Composition en aminoacides des enzymes CI, CI_1^V et CII.

Acides aminés	CI	CI_1^V	CII
Asp	32,1	32,2	32,1
Thra ^a	13,9	14,1	13,4
Ser ^a	14,9	14,4	14,7
Glu	24,2	24,4	25,2
Pro	18,8	19,4	18,5
Gly	20,5	21,1	21,0
Ala	17,4	17,2	17,2
Val ^b	20,5	20,6	20,8
Met	3,0	3,2	3,0
Ile	5,0	5,3	5,0
Leu	26,6	27,0	26,3
Tyr	8,2	8,0	7,8
Phe	11,3	10,9	11,1
Lys	18,5	17,9	18,2
His	10,9	10,9	10,8
Arg	9,0	9,0	8,0
Trp ^c	7,0		7,0

(a) Valeurs non corrigées (moyenne des 4 analyses de 20 heures).

(b) Moyenne des 4 analyses de 144 heures.

(c) Valeurs déterminées par spectrophotométrie selon Bencze et Schmidt [18].

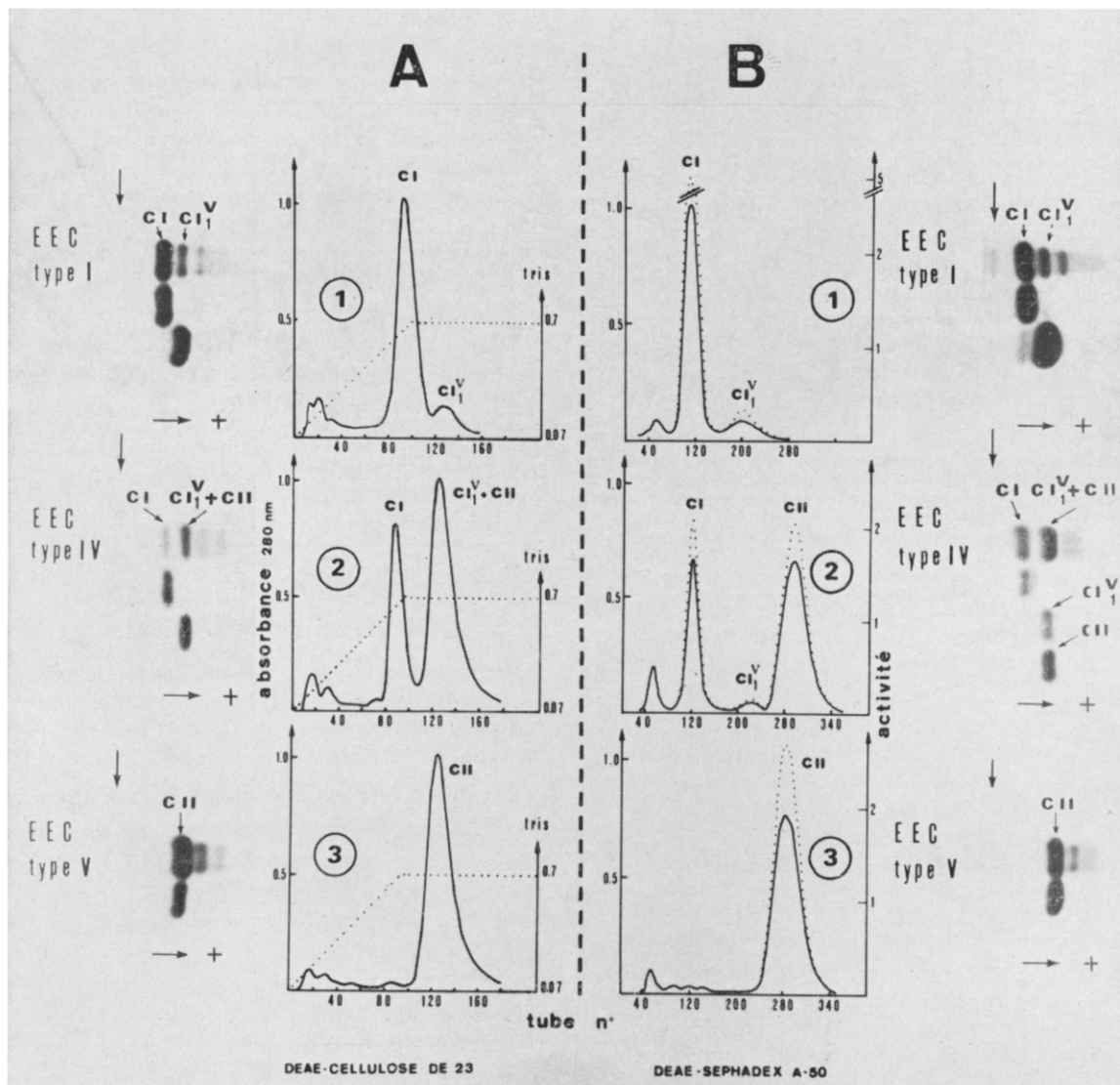


FIG. 2. — A) A droite. Chromatographie à $+2^{\circ}\text{C}$ des EEC des types I, IV et V sur colonne de DEAE-Cellulose DE 23 de $20 \times 2,5$ cm ; gradient linéaire tampon tris-HCl, pH 8,3, 0,007 M $\rightarrow$ 0,07 M en tris. Débit : 250 ml/heure. Volume des fractions collectées : 4,8 ml. En trait continu : chromatogramme établi à 280 nm. En pointillé : concentration du tampon.

A gauche. Electrophorèse comparative sur acétate de cellulose (conditions expérimentales identiques à celles précisées dans la légende de la figure 1) des trois types d'EEC chromatographiés et des constituants isolés de chacun d'eux.

B) A gauche. Chromatographie à $+2^{\circ}\text{C}$ des EEC des types I, IV et V sur colonne de DEAE-Sephadex A-50 de 25×5 cm en tampon tris-HCl, pH 8,3, 0,07 M en tris. Débit : 130 ml/heure. Volume des fractions collectées : 13 ml. En trait continu : chromatogramme établi à 280 nm. En pointillé : activité anhydrique carbonique déterminée sur l'effluent en unités par microlitre.

A droite. Electrophorèse comparative sur acétate de cellulose des trois types d'EEC chromatographiés et des constituants isolés de chacun d'eux.

leur composition en aminoacides. On doit noter en particulier, la quasi identité entre les formes CI et CI_1^V . Les différences existant entre ces deux formes et la forme CII portent essentiellement sur les résidus glutamique : 25 dans CII au lieu de 24

et surtout arginine : 8 dans CII au lieu de 9. De telles différences, parfaitement reproductibles d'une analyse à l'autre devraient se traduire par des différences sur les cartes de peptides trypsi-

IV. — CARTES DE PEPTIDES TRYPSIQUES SOLUBLES.

L'examen des cartes de peptides tryptiques solubles (fig. 3) fait apparaître une différence significative entre CII et le groupe CI et CI_1^v . Cette

différence correspond à l'existence d'une tache supplémentaire dans CI et CI_1^v (indiquée par une flèche). L'élution de cette tache et la détermination de sa composition en aminoacides ont permis de l'identifier à de l'arginine libre.

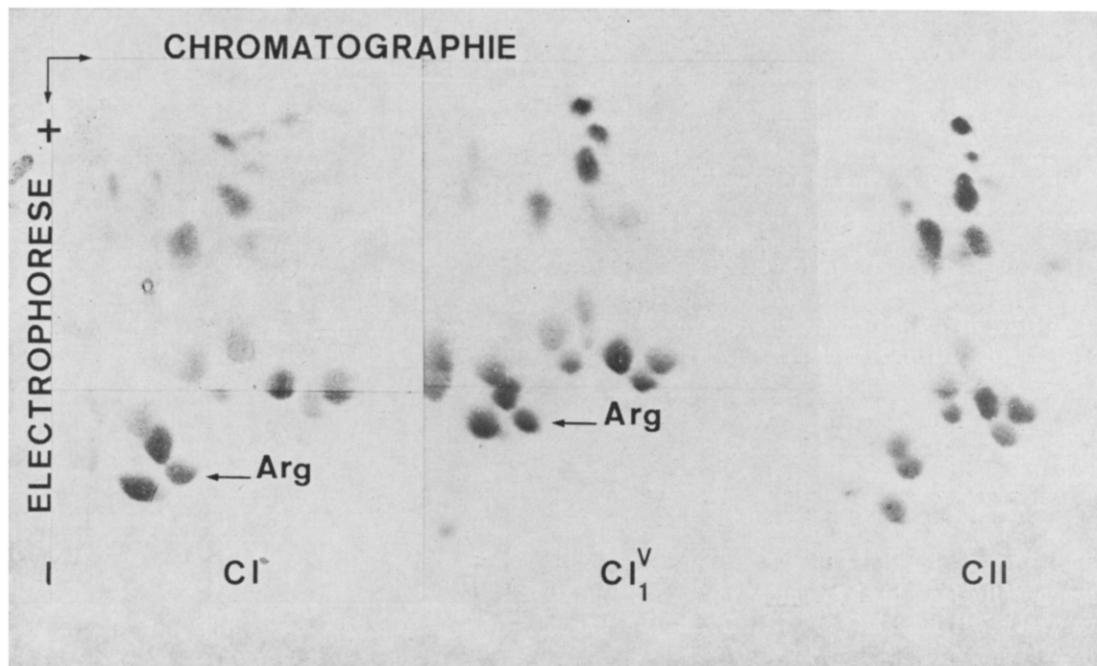


FIG. 3. — Cartes des peptides tryptiques solubles des enzymes CI, CI_1^v et CII. 1^{re} dimension : chromatographie en n-butanol-acide acétique-eau (4:1:5 v/v). 2^e dimension : électrophorèse sous 44 v/cm en tampon pyridine-acide acétique-eau (1:100:289 v/v), pH 3,6. Révélation des peptides par une solution tampon pyridine-acide acétique-eau (1:100:289).

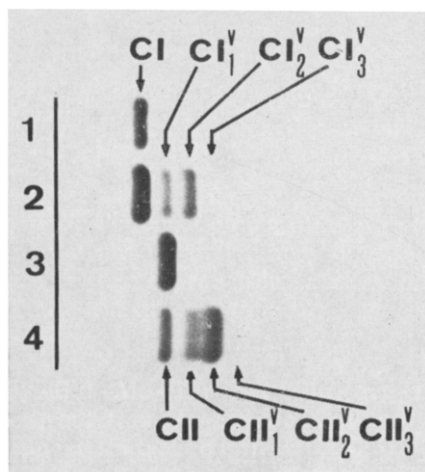


FIG. 4. — Électrophorèse comparative sur acétate de cellulose (conditions expérimentales identiques à celles précisées dans la légende de la figure 1) des enzymes CI (piste 1) et CII (piste 3) et des produits obtenus par séjour en milieu alcalin de CI (piste 2) et de CII (piste 4).

V. — COMPORTEMENT EN MILIEU ALCALIN DES ENZYMES CI ET CII.

La figure 4 montre que chacune des enzymes CI (piste 1) et CII (piste 3) donne naissance, par passage en milieu alcalin, à des constituants électrophorétiques stables plus rapides respectivement désignés par CI_1^v , CI_2^v , CI_3^v (piste 2) et par CII_1^v , CII_2^v , CII_3^v (piste 4) dans l'ordre de leur mobilité anodique croissante. Il est remarquable de constater par ailleurs (fig. 5) que la vitesse de migration électrophorétique des produits (piste 3) obtenus à partir de CI (piste 2) est identique à celle des constituants naturels révélés par l'électrophorèse d'un EEC de type I (piste 1). La chromatographie sur DEAE-Sephadex A-50 du mélange des produits de transformation obtenu à partir de CI, dans des conditions expérimentales identiques à celles utilisées pour le fractionnement de l'EEC, conduit à l'isolement de deux constituants identifiés à CI et CI_1^v (piste 4 et 5) par leur comportement chromatographique et électrophorétique [6, 22].

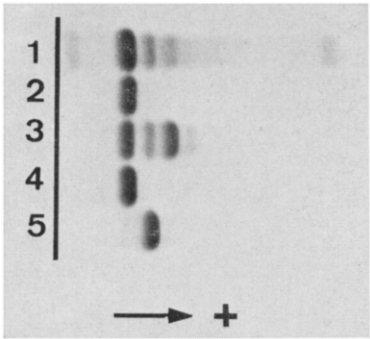


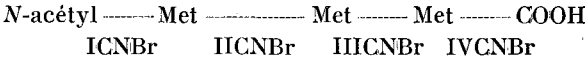
FIG. 5. — *Electrophorèse sur acétate de cellulose* (conditions expérimentales identiques à celles précisées dans la légende de la figure 1) d'un EEC de type I (piste 1), de l'enzyme CI (piste 2), du mélange des produits obtenus par séjour de CI en milieu alcalin (piste 3) et des constituants CI (piste 4) et CI_I^v (piste 5) isolés de ce mélange par chromatographie sur DEAE-Sephadex A-50 [6, 22].

VI. — ETUDE COMPARÉE DES FRAGMENTS HOMOLOGUES ISSUS DU CLIVAGE PAR LE BROMURE DE CYANOGENÈSE DES FORMES CI ET CII.

Les modalités techniques utilisées pour le clivage par le bromure de cyanogène au niveau des trois résidus méthionines présents dans l'une et l'autre formes, ainsi que celles mise en œuvre pour l'isolement des quatre fragments issus de ce clivage, sont exposés dans le mémoire précédent [14].

Le clivage conduit dans les deux cas à la formation de quatre fragments désignés par I-, II-, III-

et IVCNBr dans l'ordre de leur enchaînement à partir de l'extrémité N-acétylée terminale de la chaîne polypeptidique :



L'étude comparée de la composition en aminoacides (tableau III) et des cartes de peptides tryptiques (documents non présentés) des fragments

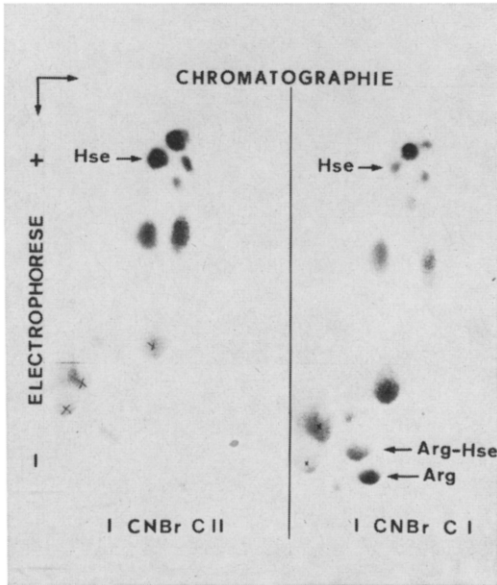


FIG. 6. — *Cartes des peptides tryptiques solubles des fragments ICNBr CII et ICNBr CI*. Conditions expérimentales identiques à celles précisées dans la légende de la figure 3.

TABLEAU III.

Composition en aminoacides comparée des fragments obtenus après clivage par le bromure de cyanogène des enzymes CI et CII.

Acides aminés	ICNBr		IICNBr		IIICNBr		IVCNBr	
	CI	CII	CI	CII	CI	CII	CI	CII
Asp	6,1	6,3	21,7	21,6	2,0	2,0	1,7	1,9
Thr	2,1	2,2	10,8	10,6	0,9	0,9	—	—
Ser	2,8	2,9	12,0	11,8	0,2	—	—	—
Glu	5,3	6,3	13,8	13,9	2,9	2,9	2,1	2,1
Pro	5,0	5,0	10,5	10,9	1,2	1,0	2,9	3,0
Gly	5,0	5,1	12,7	12,8	1,1	1,0	1,1	1,0
Ala	5,1	4,9	9,2	8,9	1,1	1,0	2,0	2,0
Val	4,0	4,2	14,1	14,5	—	—	0,9	1,0
Met	1,0	1,0	1,3	1,2	0,9	0,9	—	—
Ile	2,0	2,0	3,2	3,1	—	—	—	—
Leu	3,4	3,5	17,3	17,7	3,7	3,9	2,2	2,2
Tyr	1,9	1,8	5,8	6,1	—	—	—	—
Phe	1,1	1,1	7,1	7,2	2,2	2,0	1,0	1,1
Lys	3,9	4,0	10,8	10,6	1,1	1,0	2,0	1,9
His	4,5	4,6	5,5	6,0	—	—	—	—
Arg	3,0	2,0	2,4	2,3	1,1	1,0	2,9	3,0
Trp	2,0	—	—	—	—	—	—	—

CNBr conduit à admettre l'identité chimique des fragments homologues II, III et IV des deux enzymes. En opposition, la comparaison des fragments I, identifiés aux fragments N-acétylés par dosage d'un groupement acétyle, fait apparaître nettement la présence d'un résidu supplémentaire d'arginine et l'absence d'un résidu glutamique dans le fragment ICNBr de CI.

De telles modifications se traduisent sur les cartes de peptides tryptiques (fig. 6) :

1) par la présence dans le fragment ICNBr CI de deux taches identifiées l'une à de l'arginine libre, l'autre au dipeptide Arg-Hse et,

2) par la diminution considérable dans le fragment ICNBr CI d'une tache identifiée à de l'homosérine.

VII. — ÉTABLISSEMENT DE LA SÉQUENCE C-TERMINALE DU FRAGMENT ICNBr DE CII.

La nature chimique (Arg, Arg-Hse, Hse) des taches responsables des différences observées dans les fingerprints des fragments ICNBr de CI et de CII a conduit à rechercher la différence de structure primaire dans la séquence C-terminale de ces deux fragments.

La séquence C-terminale du fragment ICNBr de CI antérieurement établie [14, 23] est la suivante :

56 57

-Gly-Glu-Ala-Thr-Ser-Arg-Arg-Hse

Cette séquence constitue l'homoséryl peptide chymotrypsique de ce fragment. La composition en aminoacides de l'homoséryl peptide correspondant de ICNBr CII obtenu après hydrolyse chymotrypsique et chromatographie sur Dowex 1-X₂ est la suivante :

Thr₁, Ser₁, Glu₂, Ala₁, Arg₁, Hse₁

Elle diffère de celle du peptide homologue de ICNBr CI par l'absence d'un résidu arginine et la présence d'un résidu glutamique supplémentaire. Sept étapes de dégradation récurrente selon Edman ont permis d'en établir la séquence comme suit :

56 57

-Gly - Glu - Ala - Thr - Ser - Gln - Arg - Hse

→ → → → → → →

L'homosérine a été identifiée à l'autoanalyseur dans le matériel résiduel de la 7^e étape.

De telles données sont en accord avec celles obtenues de la composition en aminoacides des enzymes CI et CII (tableau II) et de leurs fragments homologues ICNBr (tableau III).

Elles démontrent que la molécule de CII diffère de celle de CI par une substitution Arg → Gln en position 56.

DISCUSSION.

Des trois techniques utilisées : électrophorèse sur acétate de cellulose, chromatographie sur DEAE-Cellulose DE 23 et chromatographie sur DEAE-Sephadex A-50, seule cette dernière assure l'isolement et la purification de trois constituants de l'EEC : CI, CI₁^v et CII. Les deux autres techniques ne permettent pas d'obtenir la séparation des constituants CI₁^v et CII. Les résultats de la chromatographie sur DEAE-Sephadex A-50 démontrent que si le constituant électrophorétique CI est homogène, le second constituant électrophorétique peut correspondre selon le type d'EEC soit à l'un soit à l'autre des deux constituants CI₁^v et CII, soit encore à leur mélange en proportion variable.

L'étude comparée de ces trois constituants a été abordée par la détermination de leur activité spécifique et de leur composition en aminoacides et par l'établissement de cartes de peptides tryptiques solubles. Les résultats font apparaître clairement que, de même et haute activité enzymatique spécifique, CI, CI₁^v et CII sont trois formes moléculaires de l'anhydrase carbonique érythrocytaire bovine présentant entre elles une très grande analogie chimique. La poursuite de cette étude comparée devait nous permettre de préciser les relations existant entre ces trois formes enzymatiques.

En ce qui concerne CI₁^v, la chromatographie sur DEAE-Sephadex A-50 démontre que son existence est toujours liée à celle de CI. En effet, cette technique ne révèle jamais la présence de CI₁^v dans les EEC qui ne renferment pas le constituant CI (type V). Par contre, chaque fois que CI est présent et quelle que soit l'importance de CII, CI₁^v peut être isolé de l'EEC dans une proportion quasi constante de 7 à 9 p. cent de CI. Si l'on considère, par ailleurs, la profonde similitude de composition en aminoacides et de cartes de peptides tryptiques de ces deux formes enzymatiques, il est permis de supposer que CI₁^v puisse n'être qu'un produit dérivé de CI. De telles données sont à rapprocher de celles antérieurement établies sur les anhydrases carboniques érythrocytaires humaines B et A de même et faible activité spécifique [21, 24, 25]. Parmi ces enzymes humaines, A représente régulièrement de 8 à 12 p. cent de B. Les données chimiques ont permis de conclure à leur quasi identité et il a été démontré que A résulte d'une elongation de la molécule sphérique de B

[26]. Cette modification moléculaire peut être obtenue *in vitro* à partir de la forme B par séjour en milieu alcalin. Dans de telles conditions, l'enzyme B humaine donne naissance à une série de produits de transformation artificiels de mobilité électrophorétique anodique croissante. Le moins rapide de ces produits possède des propriétés chromatographiques, électrophorétiques et hydrodynamiques identiques à celles de la forme A naturelle dont il conserve la totalité de l'activité anhydrique carbonique spécifique. Les résultats de recherches similaires réalisées sur les enzymes bovines démontrent que, de façon identique à l'enzyme B humaine, les enzymes CI et CII donnent naissance par séjour en milieu alcalin à une série de produits de transformation (Cf. fig. 4). Le produit de transformation immédiatement plus rapide que la forme CI présente des propriétés chromatographiques, électrophorétiques et enzymatiques identiques à celles de la forme naturelle CI₁^v. L'étude hydrodynamique des trois formes CI, CI₁^v et CII naturelles et de la forme CI₁^v artificielle démontre que les molécules CI et CII sont comme celle de la forme B humaine, assimilables à des sphères [9] alors que les molécules des formes CI₁^v naturelle et artificielle doivent, comme celle de la forme A humaine être assimilées à des ellipsoïdes de révolution allongés (recherches en cours). En sorte que l'hypothèse selon laquelle l'enzyme humaine A serait un variant conformationnel de B [20, 27, 28, 29] paraît pouvoir être étendue, avec la même probabilité, à l'enzyme CI₁^v bovine en la considérant comme un variant conformationnel de CI. Le fait que comme les anhydrases carboniques B humaine et CI bovine, la forme CII bovine donne des variants stables artificiels (fig. 4, piste 4) ou naturels (fig. 1, piste 5), suggère que cette propriété soit commune à toutes les enzymes de ce type. Le mécanisme de la formation de ces dérivés de pHi décroissant n'est pas totalement élucidé. L'hypothèse la plus généralement avancée est celle qui fait intervenir une désamidation partielle de la molécule, chaque étape de transformation correspondant à la perte d'un groupement amide [28]. La désamidation pourrait induire l'élongation moléculaire constatée sans que celle-ci n'affecte les propriétés anhydriques carboniques de tels variants conformationnels. L'existence de ces derniers n'implique en aucune façon celle de loci génétiques supplémentaires.

En ce qui concerne les deux formes enzymatiques CI et CII, l'étude de leur relation repose sur les différences chimiques minimales révélées par la comparaison de leur composition en aminoacides et de leur carte de peptides tryptiques

solubles. La confirmation de ces différences a été apportée par l'étude comparée des fragments homologues issus de leur clivage par le bromure de cyanogène. Cette étude comparée n'a permis de mettre en évidence que des différences portant sur les seuls fragments I. De ce fait, la position des trois résidus méthionine et la structure primaire des fragments II, III et IV peuvent être considérées comme identiques pour les enzymes CI et CII. Par contre, au niveau des fragments I, trois taches sont responsables des différences observées sur leur carte de peptides tryptiques. L'une identifiée à de l'arginine libre est présente dans le seul fragment ICNBr CI. Elle correspond exactement à la tache d'arginine libre responsable de la seule différence mise en évidence entre les fingerprints de CI et CII. Les deux autres taches sont la conséquence du clivage par le bromure de cyanogène au niveau de la première méthionine comme l'indique leur composition en aminoacides : Arg-Hse, et Hse. De ces deux taches, l'une Arg-Hse est présente dans le seul fragment ICNBr CI et l'autre Hse est considérablement plus abondante dans le fragment ICNBr CII. Ces données nous ont conduit à rechercher la différence de structure primaire dans la séquence C-terminale de ce fragment.

L'établissement de la séquence de l'octopeptide C-terminal de ICNBr CII et sa confrontation à celle de l'octopeptide C-terminal de ICNBr CI localisent la substitution Arg → Gln en position 56. Cette substitution rend compte des différences observées sur les cartes de peptides tryptiques. En effet, la substitution de l'arginine en position 56 par une glutamine ne permet plus la libération de l'arginine en position 57 et se traduit sur le fingerprint tryptique de CII par la disparition de la tache d'arginine libre. Cette substitution se traduit également par des différences sur les fingerprints tryptiques des fragments ICNBr CI et ICNBr CII. Les taches d'arginine libre du dipeptide Arg-Hse et d'homosérine libre qui figurent sur le premier résultat de l'hydrolyse de la liaison arginyl 56 et de celle incomplète de la liaison arginyl 57. Cette dernière liaison étant seule présente dans le fragment ICNBr CII, son hydrolyse ne libère plus que de l'homosérine.

Le remplacement d'un aminoacide basique (Arg) par un aminoacide neutre (Gln) est, par ailleurs, responsable de l'accroissement de la charge électro négative de CII qui permet de le séparer de l'isoenzyme CI par électrophorèse et chromatographie. Il est également responsable de la similitude des charges nettes de CII et de CI₁^v qui leur confère une vitesse de migration électrophorétique analogue à pH 9,2. En effet, la charge

nette de CII est analogue à celle qui résulterait de la perte par CI d'un groupement amide. Or, si l'on admet que le mécanisme par lequel CI donne naissance à CI_I^v est, comme dans le cas des enzymes humaines [28], la perte d'un seul groupement amide, on doit s'attendre à une telle similitude de la charge nette de CI_I^v et de CII.

La substitution Arg $\rightarrow$ Gln compatible avec le code génétique, a été notamment observée dans le cas de l'hémoglobine J Cape Town α_2 92 Arg $\rightarrow$ Gln [30]. Sa mise en évidence dans le cas des enzymes bovines CI et CII permet d'examiner du point de vue génétique les différents types d'EEC. Si l'on se limite aux deux seuls constituants CI et CII, ces divers types d'EEC (fig. 1) correspondent aux trois phénotypes suivants :

type I : CI/CI	} homozygotes
type V : CII/CII	
types II, III et IV : CI/CII hétérozygotes	

Le concept de l'indépendance génétique des deux formes enzymatiques de l'anhydrase carbonique bovine, auquel ce travail apporte la confirmation biochimique, a été antérieurement déduit de l'observation de ces trois phénotypes par électrophorèse de l'hémolysat de très nombreux bovins [11, 31]. Il a conduit les généticiens à admettre que la synthèse de ces deux formes enzymatiques était sous la dépendance de deux allèles autosomiques codominants.

En ce qui concerne ce dernier point, la très grande variabilité de proportion des formes CI et CII constatée chez les sujets hétérozygotes, nous paraît constituer un élément nouveau important. La distinction que nous avons pu faire dans ce mémoire entre les EEC que l'on doit considérer à la lumière des résultats comme appartenant à des sujets hétérozygotes souligne, pour la première fois, la prédominance de l'une ou de l'autre de ces deux formes iso-enzymatiques bovines (EEC de type II et IV). Cette variabilité appelle le commentaire suivant : la coexistence de deux allèles codominants, l'un normal et l'autre muté, se traduit généralement au niveau de la synthèse protéique — et donc du phénotype — par la présence d'environ 50 p. cent de chacune des protéines. Lorsque la proportion est en faveur de l'une des deux formes, c'est toujours la même forme qui est prédominante. La meilleure expressivité du gène prédominant peut résulter, entre autres, de cinétiques différentes au cours de la biosynthèse, de stabilités différentes des protéines synthétisées ou de l'existence de gènes multiples responsables de la synthèse d'une même chaîne polypeptidique. La prédominance de l'une ou l'autre des deux iso-enzymes de l'anhydrase carbonique bovine pour-

rait résulter de l'existence d'un facteur inconnu susceptible de modifier, selon le cas, l'expressivité de l'un ou de l'autre des allèles. Elle pourrait également trouver une explication dans l'existence d'une multiplicité de gènes. Cette dernière hypothèse désignée par l'expression « x gènes — une chaîne polypeptidique » a été admise pour les hémoglobines humaines. En effet, l'existence d'au moins deux loci a été envisagée aussi bien pour la synthèse des chaînes γ de l'hémoglobine fœtale [32] que pour celle des chaînes α de l'hémoglobine adulte [33].

L'étude que nous nous proposons de réaliser sur des bovins de diverses races et sur la descendance de géniteurs spécialement choisis devrait nous permettre d'acquérir des données complémentaires plaçant en faveur de l'une ou l'autre des hypothèses précédentes.

Remerciements.

Nous exprimons toute notre gratitude à Monsieur le Professeur Y. Derrien et à M^{me} G. Laurent pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail au cours de sa réalisation et de sa rédaction et remercions M^{me} B. Charvet, M^{lle} C. Dalmasso, M^{me} G. Isnard et M. D. Muzy pour leur excellente collaboration technique.

RÉSUMÉ.

Les deux formes majeures de l'anhydrase carbonique érythrocytaire bovine ont été désignées par CI et CII en raison de leur haute activité de type C. La séparation de ces deux formes et l'isolement de CI à partir de l'extrait éthanol chloroforme de l'hémolysat ont été obtenus aussi bien par chromatographie sur DEAE-cellulose DE 23 que sur DEAE-sephadex A-50. Cependant l'obtention de préparations purifiées de la forme CII n'est possible que par la chromatographie sur DEAE-sephadex A-50 qui seule sépare CII d'un constituant mineur CI_I^v .

L'étude comparée des formes CI et CII et du constituant mineur CI_I^v , suggère fortement que CI_I^v n'est qu'un variant conformationnel de CI et démontre que CI et CII sont des variants génétiques. Ces derniers diffèrent dans leur structure primaire par au moins une substitution Arg $\rightarrow$ Gln en position 56 à partir de l'extrémité N-acétylée terminale. Sur la base de la très grande variabilité de proportion des formes CI et CII constatée chez les individus hétérozygotes, les modalités de la transmission génétique de ces enzymes sont discutées.

BIBLIOGRAPHIE.

1. Filippi-Foveau, D., Sciaky, M., Limozin, N., Dalmasso, C. & Laurent-Tabusse, G. (1976) *Biochimie*, **58**, 1057-1070.
2. Marriq, C., Giraud, N. & Laurent, G. (1974) *C. A. Acad. Sc. Paris*, **279**, série D, 1325-1328.
3. Carter, N. J. (1971) *Biochim. Biophys. Acta*, **235**, 222-236.
4. Marriq, C., Giraud, N., Limozin, N., Garçon, D., Filippi, D. & Laurent, G. (1975) *10th Meeting of F.E.B.S., Paris*, Abstracts n° 7770.

5. Tashian, R. E., Goodman, M., Headings, V. E., Desimone, J. & Ward, R. H. (1971) *Biochem. genet.*, **5**, 183-200.
6. Charrel, M., Gulian, J. M., Laurent, G. & Derrien, Y. (1973) *C. R. Acad. Sc. Paris*, **276**, série D, 1061-1063.
7. Laurent, G., Charrel, M., Mallet, B., Gulian, J. M., Fine, J. M. & Derrien, Y. (1975) *10th Meeting of F.E.B.S.*, Paris, Abstracts, n° 776.
8. Lindskog, S. (1960) *Biochim. Biophys. Acta*, **39**, 218-226.
9. Reynaud, J., Luccioni, F., Bouthier, M., Savary, J. & Derrien, Y. (1971) *Biochimie*, **53**, 1095-1098.
10. Nyman, P. O. & Lindskog, S. (1964) *Biochim. Biophys. Acta*, **85**, 141-151.
11. Sartore, G., Stormont, C., Morris, B. G. & Grunder, A. A. (1969) *Genetics*, **61**, 823-831.
12. Gulian, J. M., Limozin, N., Charrel, M., Laurent, G. & Derrien, Y. (1974) *C. R. Acad. Sc. Paris*, **278**, série D, 1123-1126.
13. Sciaky, M., Limozin, N., Filippi-Foveau, D., Gulian, J. M., Dalmasso, C. & Laurent, G. (1974) *C. R. Acad. Sc. Paris*, **279**, série D, 1217-1220.
14. Sciaky, M., Limozin, N., Filippi-Foveau, D., Gulian, J. M. & Laurent-Tabusse, G. (1976) *Biochimie*, **58**, 1071-1082.
15. Laurent, G., Charrel, M., Luccioni, F., Autran, M. F. & Derrien, Y. (1965) *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **47**, 1101-1124.
16. Wilbur, K. M. & Anderson, N. G. (1948) *J. Biol. Chem.*, **176**, 147-153.
17. Piez, K. A. & Morris, L. (1960) *Anal. Biochem.*, **1**, 187-201.
18. Bencze, W. L. & Schmidt, K. (1957) *Anal. Chem.*, **29**, 1193-1196.
19. Phillips, D. M. P. (1963) *Biochem. J.*, **86**, 397-401.
20. Laurent, G., Garçon, D., Charrel, M., Ardoino, L. A. & Derrien, Y. (1967) *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **49**, 1021-1033.
21. Laurent, G., Charrel, M., Garçon, D., Castay, M., Marriq, C. & Derrien, Y. (1964) *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **46**, 603-620.
22. Gulian, J. M. (1974) *Thèse Doctorat 3^e Cycle*, Marseille, 52 pages.
23. Laurent, G., Foveau, D., Limozin, N. & Sciaky, M. (1973) *C. R. Acad. Sc. Paris*, **276**, série D, 827-830.
24. Nyman, P. O. (1961) *Biochim. Biophys. Acta*, **52**, 1-12.
25. Laurent, G., Marriq, C., Nahon, D., Charrel, M. & Derrien, Y. (1962) *C. R. Soc. Biol.*, **156**, 1456-1461.
26. Reynaud, J., Santini, Ph., Bouthier, M., Savary, J. & Derrien, Y. (1969) *Biochim. Biophys. Acta*, **171**, 363-365.
27. Derrien, Y. & Laurent, G. (1969) *Exposés ann. Biochim. Méd.*, **29**, 167-211.
28. Funakoshi, S. & Deutsch, H. F. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 3438-3446.
29. Charrel, M. (1969) *Thèse Doct. ès. Sc. Phys.*, Marseille, 99 pages.
30. Botha, M. C., Beale, D., Isaacs, W. A. & Lehmann, H. (1966) *Nature*, **212**, 792.
31. Soos, R. (1971) *Acta Veterinaria Academiae Scientiarum Hungaricae*, **21**, 231-238.
32. Schroeder, W. A., Huisman, T. H. J., Shelton, J. R., Shelton, J. B., Kleihauer, E. F., Dozy, A. M. & Robberson, B. (1968) *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **60**, 537.
33. Hollan, S. R., Jones, R. T. & Koler, R. D. (1972) *Biochimie*, **54**, 639-648.